

Spéciation du mercure dans les produits de la pêche par double dilution isotopique et chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à plasma induit (GC-ICP-MS)

Stéphanie da Fonseca Clemens

▶ **To cite this version:**

Stéphanie da Fonseca Clemens. Spéciation du mercure dans les produits de la pêche par double dilution isotopique et chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à plasma induit (GC-ICP-MS). Sociologie. AgroParisTech, 2011. Français. NNT : 2011AGPT0050 . pastel-00753697

HAL Id: pastel-00753697

https://pastel.hal.science/pastel-00753697

Submitted on 19 Nov 2012

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.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Physico-chimie analytique

présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie CLEMENS

le 15 septembre 2011

Spéciation du mercure dans les produits de la pêche par double dilution isotopique et chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à plasma induit (GC-ICP-MS)

Directeurs de thèse : David AMOUROUX et Olivier F.X. DONARD
Co-encadrements de la thèse : Mathilde MONPERRUS et Thierry GUERIN

Jury

Pr Jacques GUILLOT, Unité BIPAR, Ecole vétérinaire de Maisons-Alfort	Président
Dr Jean-Claude AMIARD, Directeur de recherche, CNRS, Université de Nantes	Rapporteur
Dr Pablo RODRIGUEZ-GONZALEZ, Chercheur, Département de Physique et Chimie Analytique, Université d'Oviedo (Espagne)	Rapporteur
Dr David AMOUROUX, Directeur de recherche, LCABIE IPREM UMR 5254, CNRS/UPPA, Pau	Membre du jury
Dr Mathilde MONPERRUS, Maître de conférences, LCABIE IPREM UMR 5254, CNRS/UPPA, Pau	Membre du jury
Dr Thierry GUERIN, Chargé de recherche, ANSES-LSA Unité CIME, Maisons-Alfort	Membre du jury
Dr Olivier DONARD, Directeur de recherche, IPREM UMR 5254, CNRS/UPPA, Pau	Invité du jury

Anses, Laboratoire de Sécurité des Aliments, Unité CIME
23, avenue du Général Leclerc – 94706 Maisons-Alfort Cedex

Remerciements

J'adresse tous mes remerciements aux membres du jury qui ont étudié et évalué mes travaux et qui, en me délivrant le titre de Docteur, m'ont fait l'honneur de leur confiance sur mes capacités en tant que chercheur. Je remercie tout particulièrement Jacques Guillot pour avoir accepté de présider ce jury de thèse et Jean-Claude Amiard et Pablo Rodriguez-Gonzalez pour avoir accepté d'examiner ces travaux de thèse en tant que rapporteurs.

Je remercie Olivier F.X. Donard et David Amouroux, mes co-directeurs de thèse, pour leur confiance et leur investissement tout au long de ce parcours et pour leur accueil durant 3 mois de stage à Pau. Une attention toute particulière à Mathilde Monperrus qui a investit beaucoup de temps pour me former au cours de ces 3 mois alors qu'elle n'était pas encore ma Co-encadrant de thèse. Un grand merci également à l'ensemble des membres du laboratoire pour les échanges chaleureux et les connaissances partagées. Je suis reconnaissante envers Patricia Navarro et Vincent Perrot pour le temps qu'ils m'ont consacrés en dehors du cadre de la thèse et pour m'avoir fait découvrir le « Garage » et les pistes de skis pyrénéennes.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Laurent Laloux pour avoir accepté de m'accueillir au sein du LSA afin d'effectuer ces travaux de thèse.

Mes pensées se tournent à présent vers mes collègues de l'ANSES et tout particulièrement ceux de l'équipe CIME qui m'ont accompagnés durant ces trois années malgré les quelques difficultés rencontrées. Surmonter ces situations ensemble nous a permis de développer des relations professionnelles de qualité.

En premier lieu, je souhaite témoigner mon respect et toute ma confiance à Thierry Guérin, mon Co-encadrant de thèse à qui j'ai donné beaucoup de fils à retordre. Le fait d'avoir été un chat noir durant le quasi totalité de ma thèse n'a pas aidé. Néanmoins, à force de patience et d'investissement, il m'a permis d'acquérir de nombreuses connaissances et une grande rigueur. Je te remercie bien chaleureusement.

Je voudrais ensuite remercier Laurent Noël, Christelle Vastel, Rachida Chekri, Claude Chafey, Béatrice et Christian Testu, les « anciens » de l'équipe pour avoir été d'un grand secours et d'un grand soutien. Vous avez tous été merveilleux et ce fut un vrai plaisir de passer ces années avec vous.

Une petite pensée particulière pour Sandrine Millour et Axelle Leufroy, arrivées dans le service la même année que moi. Vous m'avez apporté votre sympathie et à présent nos chemins se séparent car nos routes divergent. Contrairement à celles qui ont quitté le Sud pour tenter leur chance à Paris, je quitte Paris pour tenter ma chance dans le Sud.

Je remercie enfin les autres membres de l'équipe qui nous ont joints un temps puis qui sont partis voguer vers d'autres horizons : Ali Kadar, Louisa Gherbi et Vincent Dufailly.

Au sein de l'ANSES, vous êtes nombreux a qui je tiens à dire merci pour les petits échanges, les petits coups de pouce, ... Je pense ainsi au PAFT, aux qualiticiennes et aux informaticiens. Je tiens plus particulièrement à témoigner toute ma reconnaissance aux membres des équipes POP et NAT qui m'ont aidé à plusieurs reprises par leurs connaissances en GC et en lyophilisation, de manière parfaitement altruiste. Cela m'a été d'une grande aide et j'ai énormément apprécié leur soutien.

Merci également,

À tous mes amis pour m'avoir soutenu, aidé, relevé lorsque nécessaire mais surtout de m'avoir changé les idées et permis de souffler de sorte que ma vie durant ces 3 années ne se soit pas résumé à une thèse.

À Céline, qui me suit, m'écoute et me guide depuis notre plus tendre enfance, ainsi qu'à Alex et Olivia qui sont de vrais bols d'air frais. Un merci spécial pour la petite Elia qui nous a rejoints depuis peu et qui, en cette longue fin de thèse, m'a offert sans relâche son magnifique sourire.

À mes cousins et cousines : Sylvia, Bertrand et Yanis, David, Mick et Cécile, Michel, Tony, Christina, Estéban et Eva de m'avoir soutenu et encouragé.

À ma belle famille. Bien que je sois « la belle fille préférée » de mon beau père, quoi que la seule, un tel investissement de la part d'une belle famille est chose rare mais très louable. Merci beaucoup pour l'intérêt que vous me portez et pour les nombreux encouragements que vous m'avez dispensés et faits encore preuves à mon égard.

À mes sœurs et mes parents qui m'ont toujours permis de décompresser et de passer d'agréables moments sans entendre les mots « thèse » ou « mercure ». D'importants événements

familiaux se sont déroulés au cours de ces trois années mais ils m'ont toujours préservés afin que je puisse rester concentrée et que j'effectue ma thèse sereinement. Merci beaucoup.

À mon mari qui as vécu cette thèse autant que moi. De tous, il a été mon plus grand soutien lors des coups durs, des moments de joie, des doute et des ras-le-bol, ... Il a été également ma plus grande source de motivation pour mener a bien cette thèse sans toutefois oublier mon épanouissement personnel. Le mariage, le voyage de noce, l'enfant, je lui ai beaucoup reproché de trop m'en demander en parallèle de mes travaux. Mais maintenant je prends conscience que ces événements ont faite de moi bien plus qu'un docteur.

Enfin une attention pour Manon, colocataire docile, forte et en pleine santé durant cette fin de thèse, ce qui a permis à Maman de finir son parcours en toute tranquillité.

Merci à tous.

Sommaire

Liste des abréviations **5**

Liste des figures **9**

Liste des tableaux **11**

Liste des communications **12**

Liste des articles **13**

Introduction générale **14**

Partie I : Problématique du mercure **17**

I. Généralités 17

I.1 Propriétés 17

II. Le cycle biogéochimique du mercure 18

II.1 Sources d'émissions 18

II.1.1 Sources naturelles 18

II.1.2 Sources anthropiques 20

II.2 La spéciation du mercure dans l'environnement 20

II.3 Réactivité du mercure dans l'environnement 22

II.3.1 Oxydation et réduction 22

II.3.2 Méthylation et déméthylation 24

II.3.3 Bioamplification et bioaccumulation 27

III. Toxicité du mercure 30

III.1 Devenir du méthylmercure dans l'organisme humain 30

III.2 Exposition chronique 31

III.3 Indicateurs d'exposition au méthylmercure 31

III.4 Données cliniques 32

III.4.1 Intoxications de Minamata et Niigata au Japon 32

III.4.2 Intoxication en Iraq 33

III.5 Données épidémiologiques 33

III.6 Valeurs toxicologiques de référence 36

III.7 Valeurs réglementaires 37

III.8 Evaluation de l'exposition humaine au mercure 37

IV. Conclusion 40

Partie II : Optimisation de la méthode de spéciation du mercure dans les produits de la pêche par DID et GC-ICP-MS 41

I. Introduction 41

II. Spéciation du mercure dans les produits de la pêche : état de l'art 42

II.1 Méthode de préparation d'échantillon 43

II.1.1 Extractions solide/liquide (SLE) 43

II.1.2 Extractions assistée par sonication (SAE) 45

II.1.3 Extractions assistée par micro-ondes (MAE) 46

II.1.4 Méthode alternative 49

II.1.5 Conclusion 50

II.2 Méthode de séparation et de détection 51

II.2.1 Séparation par chromatographie liquide haute performance 51

II.2.2 Les détecteurs de spectrométrie atomique couplés à l'HPLC 51

II.2.3 Les détecteurs de spectrométrie de masse couplés à l'HPLC 52

II.2.4 Séparation par chromatographie en phase gazeuse 54

II.2.5 Les détecteurs de spectrométrie atomique couplés à la GC 56

II.2.6 Les détecteurs de spectrométrie de masse couplés à la GC 58

II.2.7 Conclusion 60

II.3 La dilution isotopique 61

II.3.1 Principe 61

II.3.2 Modes de calcul 62

II.3.3 Avantages et inconvénient 63

II.3.4 Conclusion 64

III. Bilan sur l'état de l'art (**REVUE I**) 64

IV. Mise en place du couplage 89

IV.1 Préambule 89

IV.2 Le couplage GC-ICP-MS 89

IV.2.1 Séparation par GC 89

IV.2.2 Interface entre le GC et l'ICP-MS 90

IV.2.3 Détection par ICP-MS 95

V. Conditions expérimentales 100

V.1 Instrumentation 100

V.2 Echantillons et matériaux de référence certifiés 101

V.3 Préparation des échantillons avant analyse 101
V.3.1 Préparation physique des échantillons 101
V.3.2 Préparation chimique des échantillons 102
V.4 Quantification des espèces mercurielles 103
VI. Résultats et discussion 105
VI.1 Optimisation de l'étape de marquage isotopique 105
VI.2 Optimisation de l'étape d'extraction 107
VI.3 Optimisation de l'étape de dérivation 113
VI.4 Evaluation des différentes techniques de calcul par dilution isotopique 116
VI.4.1 Quantification des taux de méthylation et déméthylation 117
VI.4.2 Vérification de la fiabilité des feuilles de calculs par IPD 119
VI.4.3 Analyse statistique des sources d'erreur 122
VII Validation interne de la méthode d'analyse 129
VII.1 Mise en place de la procédure de validation de la méthode 129
VII.1.1 Espèces analysées et matériaux utilisés 130
VII.1.2 Qualification de l'appareil 130
VII.1.3 Paramètres de mesure 130
VII.2 Limites de détection et de quantification 130
VII.3 Répétabilité 131
VII.4 Fidélité intermédiaire de reproductibilité 132
VII.5 Justesse 134
VII.6 Profil d'exactitude 135
VII.7 Conclusion sur la validation de méthode 137
VIII. Conclusions et perspectives 138

Partie III : Applications de la méthode à des études sur la spéciation du mercure dans des matrices biologiques 140

I. Introduction 140
II. Contrôles qualités internes (CQI) mis en place 141
III. Contrôles qualités externes (CQE) effectués 143
IV. Applications 146
IV.1 Étude des échantillons lyophilisés d'anguilles et de civelles 146
IV.1.1 Contexte de l'étude 146
IV.1.2 Résultats expérimentaux (**ARTICLE I**) 147
IV.1.3 Discussion 165

IV.1.4 Conclusion 167
IV.2 Impact de la lyophilisation sur la spéciation du Hg 167
IV.2.1 Contexte de l'étude 167
IV.2.2 Résultats expérimentaux et discussion 168
IV.2.3 Conclusion 171
IV.3 Étude des échantillons lyophilisés de l'EAT 2 172
IV.3.1 Contexte de l'étude 172
IV.3.2 Résultats expérimentaux (**ARTICLE II**) 173
IV.3.3 Résultats complémentaires et discussion 186
IV.3.4 Conclusion 188
V. Conclusion et perspectives de la partie III 188

Partie IV : qualité en recherche 190
Conclusions générales et perspectives 194
Bibliographie 197
Annexes 216

Liste des abréviations

AAS : Atomic Absorption Spectrometry, spectrométrie d'absorption atomique

AES : Atomic Emission Spectrometry, spectrométrie d'émission atomique

AESA : Agence Européenne de Sécurité Alimentaire

AFS : Atomic Fluorescence Spectroscopy, spectroscopie de fluorescence atomique

ANR : Agence Nationale de Recherche

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

BSR : Bactéries Sulfato-Réductrices

BuMgCl : Butyl Magnesium Chloride, chlorure de magnésium butylé

CALIPSO : études des Consommations Alimentaires de produits de la mer et Imprégnations aux éléments traces, Polluants et Oméga 3

CCQM : Comité Consultatif pour la Quantité de Matière

CE : Commission Européenne

CGC : Capillary Gas Chromatography, chromatographie gazeuse sur colonne capillaire

CIME : Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement

CO_2 : dioxyde de carbone

CQI : Contrôle Qualité Interne

CQE : Contrôle Qualité Externe

CSL-FAPAS : Central Science Laboratory-Food Analysis Performance Assessment Scheme, laboratoire scientifique centralisé - système d'évaluation des performances analytique alimentaire

CV : Cold Vapor, vapeur froide

D : Déméthylation

DDW : eau déionisée

DHTP : Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire

D-IDMS : Double Isotope Dilution Mass Spectrometry, analyse par double dilution isotopique couplée à un spectromètre de masse

D-SS-IDMS : Double Specie-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry, analyse par double dilution isotopique spécifique à l'espèce couplée à un spectromètre de masse

EAT : Etude de l'Alimentation Totale

ECD : Electron Capture Detection, détection par capture d'électron

EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic, acide éthylène-diamine-tétraacétique

EI : Electron Impact, impact électronique

EtHg : éthyle mercure

Et_2Hg : diéthyle mercure

FAAS : Flame Atomic Absorption Spectroscopy, spectrométrie d'absorption atomique à flamme

FAO : Food and Agriculture Organisation, organisation de l'alimentation et l'agriculture

FAPES : Furnace Atomization Plasma Emission Spectrometry, spectrométrie d'émission atomique avec plasma et four graphite

FI : Flow Injection

GC : Gas Chromatography, chromatographie gazeuse

GD-AES : Glow Discharge - Atomic Emission Spectrometry, spectrométrie d'émission atomique à décharge luminescente

H_2O : eau

H_2O_2 : eau oxygénée

H_2SO_4 : acide sulfurique

HAc : acide acétique

HCl : acide chlorhydrique

Hg° : mercure élémentaire

Hg : mercure

Hg(I) : ion mercureux

Hg(II) : ion mercurique

$HgBr_2$: bromure mercurique

$HgCl_2$: chlorure mercurique

Hg_2Cl_2 : chlorure mercureux

HgO : oxyde mercurique

HgS : sulfure mercurique

HgT : mercure total

HNO_3 : acide nitrique

HPLC : High Performance Liquid Chromatography, chromatographie liquide à haute

ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry, spectrométrie d'émission atomique couplé à un détecteur à plasma induit

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, spectromètre de masse couplé à un détecteur à plasma induit

ICP-MSq : Spectromètre de masse quadripolaire couplé à un détecteur à plasma induit

IDMS : Isotope Dilution Mass Spectrometry, analyse par dilution isotopique couplée à un spectromètre de masse

ID : Isotope Dilution, dilution isotopique

IDEA : Isotopic Deconvolution for Environmental and Analytical chemistry of organometallic Pollutants, Déconvolution isotopiques pour l'étude environnementale et analytique des polluants organométalliques

IHg : mercure inorganique

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IPD : isotope pattern déconvolution, déconvolution isotopique

IRMM : Institute of Reference Materials and Measurements, institut des matériaux et mesures de référence

JECFA : Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires

KCl : chlorure de potassium

KOH : potassium hydroxide, hydroxyde de potassium

LCABIE : Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement

LD : Limite de Détection

LDa : Limite de Détection absolue

LQ : Limite de Quantification

LSA : Laboratoire de Sécurité Alimentaire

MAE : Microwave Assisted Extraction, extraction assistée par micro-onde

MeHg : méthylmercure

Me_2Hg : diméthylmercure

MeHgCl : méthylmercure chloré

MeOH : méthanol

MGR : mercure gazeux réactif

MIP : Microwave-Induced Plasma, Plasma induit par micro-onde

M : Méthylation

MRC : Matériel de Référence Certifié

MS : Mass Spectrometry, spectrométrie de masse performance

$NaBEt_4$: tétraéthylborate de sodium

$NaBH_4$: borohydrate de sodium

$NaBPh_4$: tétraphénylborate de sodium

$NaBPr_4$: tétrapropylborate de sodium

NaCl : chlorure de sodium

NaOH : hydroxyde de sodium

NF V : norme française, version

NRC : National Research Council, conseil national de recherche

O_3 : ozone

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PhHg : phényle mercure

PLE : Pressurized Liquid Extraction, extraction en liquide pressurisé

Pyro : pyrolyse

R_m : rapport isotopique du mélange

SAE : sonicated assisted extraction, extraction assistée par sonication

SBSE : Stir Bar Sorptive Extraction, extraction par sorption sur barreau magnétique

SDME : Single Drop Micro Extraction, microextraction sur une goutte

SFC : Supercritical Fluid Chromatography, chromatographie en fluide supercritique

SFE : Supercritical Fluid Extraction, extraction en fluide supercritique

SLE : Extraction solide-liquide

SO_4 : sulfate

SPME : Solid Phase MicroExtraction, micro extraction en phase solide

SS-IDMS : Specie-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry, analyse par dilution isotopique spécifique à l'espèce couplée à un spectromètre de masse

SU-IDMS : Unspecie-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry, analyse par dilution isotopique non spécifique à l'espèce couplée à un spectromètre de masse

T°amb : Température AMBiante

TMAH : TetraMethylAmmonium Hydroxide, hydroxide de tétramethylammonium

UPPA : Université de Pau et des Pays de l'Adour

US EPA : United-States Environmental Protection Agency, agence de protection de l'environnement aux Etats-Unis

US FDA : United-States Food and Drug Administration, administration des medicaments et des aliments aux Etats-Unis

UV, UVB : Ultra-Violet

VTR : Valeur Toxicologique de Référence

WHO : World Health Organization, organisation mondiale de la santé (OMS)

Liste des figures

Figure 1 : Ceinture globale de mercure (Jonassen et al., 1972)

Figure 2: Le cycle biogéochimique du mercure (source : LCR 2011)

Figure 3 : Principaux processus biotique et abiotique du cycle biogéochimique du Hg (Barkay et al., 2003)

Figure 4 : Bioaccumulation et bioamplification du MeHg

(Site : http://www.tetes-chercheuses.fr/magazines/numero-1/dossier/une-mer-de-molecules-172/)

Figure 5 : Bioaccumulation du Hg à la 1ére étape de la chaîne alimentaire (Morel et al., 1998)

Figure 6: Schéma du couplage GC-ICP-MS

(http://www.speciation.net/Public/Document/2007/08/11/2930.html)

Figure 7 : Photographie du four du GC en couplage GC-ICP-MS

Figure 8 : couplage GC-ICP-MS

Figure 9 : Interface du couplage GC-ICP-MS

Figure 10 : Débit de gaz make up de 200 ml min^{-1}

Figure 11 : Débit de gaz make up de 250 ml min^{-1}

Figure 12 : Débit de gaz make up de 300 ml min^{-1}

Figure 13 : Représentation schématique d'un ICP-MS

Figure 14 : Photographie de la torche en couplage GC-ICP-MS

Figure 15 : Evaluation du biais en masse du MeHg dans le BCR-464, à différent valeurs R_{exp} dans la plage d'intégration du pic

Figure 16 : Analyses du BCR-464 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 2 techniques de marquage et de dérivation

Figure 17 : Analyses du DOLT-4 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 2 techniques de marquage et de dérivation

Figure 18 : MAE 160W (4 min)

Figure 19 : MAE 120W (8 min)

Figure 20: MAE 60W (3 min)

Figure 21 : Analyse du BCR-464 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

Figure 22 : Analyse du DOLT-4 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

Figure 23 : Analyse du TORT-2 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

Figure 24 : Exemple de chromatogramme obtenu sur le BCR-464 après extraction SLE (m/z 202).

Figure 25 : Système d'agitation rotative

Figure 26 : Analyse du DOLT-4 par RA (en µg kg^{-1}), D-IDMS et IPD

Figure 27 : Analyse du DOLT-4 (en µg kg^{-1}), comparaison entre 3 techniques d'agitation

Figure 28 : Analyse du BCR-4, comparaison entre 3 techniques d'agitation

Figure 29 : Analyse du TORT-2, comparaison entre 3 techniques d'agitation

Figure 30 : Capture d'écran sur la feuille de calcul par IPD

Figure 31 : Bilan de l'étude kragten pour le DOLT-4

Figure 32 : Bilan de l'étude kragten pour le TORT-2

Figure 33 : Bilan de l'étude kragten pour le BCR-464

Figure 34 : Représentation graphique de l'étude kragten sur le TORT-2

Figure 35 : Représentation graphique de l'étude kragten sur le BCR-464.

Figure 36 : Profil d'exactitude du MeHg

Figure 37 : profil d'exactitude du HgT

Figure 38 : Cartes de contrôle du DOLT-4 pour le MeHg et le HgT (n = 10).

Figure 39 : Z-scores pour le MeHg sur l'échantillon de thon en conserve (FAPAS, 2010)

Figure 40 : Teneurs en MeHg de l'IMEP-109 (IRMM, 2010)

Figure 41 : Cycle biologique de l'anguille

(source : http://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr/milieux-continentaux/poissons/anguille-migrateur.php)

Figure 42 : Concentrations en iHg et MeHg ($mg.kg^{-1}$) dans les trois poissons analysés.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gamme de concentrations en HgT des différents compartiments de la nature (d'après INERIS 2006)

Tableau 2 : Etude épidémiologique menée en Nouvelle-Zélande (d'après AFSSA 2002 et 2004)

Tableau 3 : Etude épidémiologique menée dans les Seychelles (d'après AFSSA 2002 et 2004)

Tableau 4 : Etude épidémiologique menée dans les îles Féroé (d'après AFSSA 2002 et 2004)

Tableau 5 : Valeurs toxicologiques de référence (d'après AFSSA 2002 et 2004, INERIS 2006, JECFA 2010)

Tableau 6 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction SLE pour les matrices biologiques

Tableau 7 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction SAE pour les matrices biologiques

Tableau 8 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction MAE pour les matrices biologiques

Tableau 9 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction suivie d'une SPME pour les matrices biologiques

Tableau 10 : Récapitulatif des principales méthodes de HPLC-spectrométrie atomique pour les matrices biologiques

Tableau 11 : Récapitulatif des principales méthodes de HPLC-spectrométrie de masse pour les matrices biologiques

Tableau 12 : Récapitulatif des principales méthodes GC-spectrométrie atomique pour les matrices biologiques

Tableau 13 : Récapitulatif des principales méthodes GC-spectrométrie de masse pour les matrices biologiques

Tableau 14 : Mode opératoire utilisé au LCABIE

Tableau 15 : Concentrations en MeHg et HgT (mg kg^{-1}) pour les trois MRCs

Tableau 16 : M et D calculés pour chaque MRCs, pour un triplicata d'injection

Tableau 17 : Evaluation des feuilles de calculs IPD sur un triplicata d'injection

Tableau 18 : Evaluation de la répétabilité et test de Cochran

Tableau 19 : Evaluation de la reproductibilité interne

Tableau 20 : Evaluation de la justesse en MeHg et HgT

Tableau 21 : Bilan de la validation de méthode

Tableau 22 : Valeurs moyennes obtenues pour les anguilles et civelles (en µg Hg kg^{-1})

Tableau 23 : Pourcentages de MeHg d'après les données par IPD du tableau 4 de l'article I

Tableau 24 : Concentrations et écart-types en MeHg et HgT (mg kg-1) des 2 laboratoires

Tableau 25 : Concentrations en Hg (µg kg^{-1}) des échantillons de produits de la pêche EAT 2

Liste des communications

Navarro P., **Da Fonseca S.**, Perrot V., Guérin T., Donard O.F.X., Monperrus M., Amouroux D.
Mercury speciation in biological pattern by double isotope dilution and GC-ICP-MS. *4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (RAFA 2009), 4-6 November 2009, Prague, Czech Republic.*

Navarro P., **Da Fonseca S.**, Tabouret H., Bolliet V., Guérin T., Monperrus M., Amouroux D.
Organomercury and butyltin compounds in European eel from the Adour estuary by multiple species-specific isotopic dilution. *ISOBAY - XII International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay, 3-6 mai 2010, Brest, France.*

Navarro P., **Da Fonseca S.**, Guérin T., Amouroux D., Monperrus M.
Potential and limitation of isotopic deconvolution calculations for species-specific isotope dilution analyses for the speciation of organometallic compounds. *European Winter conference on Plasma Spectrochemistry, 30 Janvier au 4 février 2011, Zaragoza, Spain.*

Clémens S., Guérin T., Monperrus M., Amouroux D., Donard OFX.
Mercury speciation in biological samples by multiple spiking species-specific isotope dilution analysis: method optimization and validation. *European Winter conference on Plasma Spectrochemistry, 30 Janvier au 4 février 2011, Zaragoza, Spain.*

Clémens S., Monperrus M., Donard OFX., Amouroux D., Guérin T.
Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: method validation and occurrence data. *TRACESPEC, 18-20 mai 2011, Pau, France.*

Liste des articles

Clémens S., Monperrus M., Donard O.F.X., Amouroux D., Guérin T. Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: Method validation and occurrence data. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401: 2699-2711 (2011). http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5040-1*

Navarro P., **Clémens S.**, Perrot V., Bolliet V., Tabouret H., Guérin T., Monperrus M., Amouroux D. Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, Anguilla anguilla glass eel and yellow eel. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry (in press).*

Clémens S., Monperrus M., Donard O.F.X., Amouroux D., Guérin T. Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: a (critical) review. *Talanta (en cours de révision)*

Introduction générale

Le mercure (Hg) est un élément naturel connu depuis l'antiquité (- 750 avant J-C). Les alchimistes puis le corps médical du XVIe au XIXe siècles le désignaient par le nom « vif-argent » et le représentaient grâce au symbole de la planète Mercure, d'où son nom actuel. Le Hg est un élément métallique naturellement présent dans la croûte terrestre (0,02 mg kg^{-1}), qui présente la particularité d'être sous forme liquide dans les conditions normales de température et de pression. Il existe sous différentes formes chimiques, organiques ou inorganiques. Le mercure est utilisé dans de très nombreuses industries (batteries, câbles et interrupteurs électriques, appareils de mesure, amalgames dentaires, lampes), conduisant à des rejets dans l'environnement auxquels s'ajoute l'incinération des déchets. Le mercure fut utilisé probablement dès 2700 avant notre ère pour amalgamer l'or, l'argent ou d'autres métaux. La plupart des chercheurs d'or utilisent encore du Hg pour amalgamer les paillettes ou poussières d'or malgré qu'il soit aujourd'hui reconnu comme pouvant être particulièrement toxique pour l'homme et l'environnement. Les premières maladies reconnues comme étant dues à une exposition au Hg datent du début du XIXème siècle chez les chapeliers. Ces artisans utilisaient des sels de Hg pour travailler les poils d'animaux qui composent le feutre nécessaire à la fabrication de chapeaux. L'expression anglaise "as mad as a hatter", "aussi fou qu'un chapelier", est issue de cette pratique. En effet, les chapeliers étaient peu à peu intoxiqués par le mercure. Ils étaient connus pour leur comportement étrange, symptôme de l'hydrargyrie, maladie dégénérative qui provoque des troubles neurologiques suite à une exposition chronique au Hg. Le personnage du chapelier fou de Lewis Carroll dans "Alice au pays des merveilles" est une illustration de ce phénomène.

La présence de Hg dans l'alimentation humaine et plus particulièrement dans les produits de la pêche, représente un risque potentiel pour l'homme. L'agence nationale de sécurité sanitaire de

l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a pour mission de réaliser l'évaluation des risques, à partir de quatre outils 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). Alors que la toxicité du Hg dépend de sa forme chimique et de la dose absorbée par l'organisme, les valeurs de contamination actuellement disponibles sont fondées sur des teneurs exprimées en mercure total (HgT). En conséquence, le calcul de l'exposition au méthylmercure (MeHg) repose sur une hypothèse simplificatrice qui considère que le pourcentage moyen de Hg présent sous forme méthylée dans la chair des poissons est égal à 84% du HgT (MeHg = 0,84. HgT) ; avec une variation de 15% autour de cette valeur entre les différentes espèces et, au sein de ces dernières, selon les zones de pêche (AFSSA 2002). Néanmoins, cette hypothèse fut remise en cause en 2004 par des études menées au Japon et au Canada car leurs résultats montrent que le MeHg peut représenter une part moindre dans la teneur totale en Hg chez certains poissons (Ministère japonais de la santé 2003, Dabeka et al 2004, Forsyth et al 2004). Par conséquent, la mise au point de méthodes de spéciation du Hg dans ces matrices alimentaires est nécessaire afin d'améliorer la sécurité sanitaire des aliments destinés à l'homme. 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'apport de données sur les différentes espèces mercurielles, en complément des teneurs en HgT, permettra aux agences gouvernementales d'émettre de nouvelles valeurs toxicologiques de référence (VTR) et des recommandations alimentaires plus précises (Commission du Codex Alimentarius 2005).

L'objectif principal de cette étude a donc été de mettre au point une méthode permettant à l'ANSES, une meilleure évaluation des risques encourus par le consommateur en déterminant la spéciation des différentes formes mercurielles présentes dans les produits de la pêche. 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 des travaux de thèse a porté sur la problématique liée à la présence du mercure dans l'environnement afin de définir le contexte général de l'étude. Après une présentation du cycle biogéochimique du mercure, incluant ses différentes formes, les sources d'émission et sa réactivité dans l'environnement, sa toxicité et l'exposition humaine au MeHg seront exposées.

La deuxième partie des travaux a ensuite été consacrée à l'optimisation d'une méthode d'analyse de spéciation du mercure, par couplage entre une séparation par chromatographie en phase gazeuse et une détection par ICP-MS et une quantification par dilution isotopique, des principaux composés mercuriels susceptibles d'être retrouvés dans les produits de la pêche. Pour atteindre cet objectif, une étude exhaustive de l'état de l'art des diverses méthodes de préparation d'échantillon, de séparation et de quantification du Hg dans les matrices biologiques a été menée afin de justifier les choix analytiques adoptés (Revue I). Ensuite, les résultats expérimentaux de l'optimisation des conditions de préparation d'échantillon (marquage isotopique, extraction, dérivation) et de quantification des composés mercuriels dans des produits de la pêche (dilution isotopique simple ou multiple) seront présentés et les critères analytiques de la méthode optimisée seront évalués selon les normes en vigueur, à l'aide de matériaux de référence certifiés (MRC) (Article I et II).

La troisième partie a porté sur la mise en place de contrôles qualités internes (CQI) et externes (CQE) dans le but de contrôler la méthode validée et de tester son applicabilité à différents échantillons réels de produits de la pêche. Dans un premier temps seront présentés les CQI utilisés pour valider nos séries d'essais ainsi que les résultats des CQE réalisés dans le cadre d'une participation à plusieurs essais interlaboratoires d'aptitudes (Eilas). Dans un second temps sera présenté les résultats de trois applications qui ont été menées au cours de ces travaux. La première application a porté sur l'analyse d'échantillons lyophilisés de deux stades d'évolution de l'anguille (la civelle et l'anguille jaune) et a été menée au sein du laboratoire LCABIE. La deuxième application, menée conjointement par le LCABIE et CIME, a eu pour but d'évaluer l'impact de l'étape de lyophilisation sur les composés mercuriels à partir de l'étude de trois échantillons frais de poissons. Pour finir, la troisième application a consisté en l'analyse au laboratoire CIME des échantillons lyophilisés de l'étude EAT 2.

Enfin, la quatrième et dernière partie de ce manuscrit présente les conclusions du rapport des 2 audits qualité en recherche réalisés par le service qualité de l'ANSES afin de : « *Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche.* »

Partie I : Problématique du mercure

I. Généralités

I.1 Propriétés

Le mercure est un élément chimique de symbole Hg qui fut découvert par les civilisations anciennes. Le cinabre, une espèce minérale composée de sulfure mercurique (HgS), a été décrit pour la première fois par Théophraste en 315 av. J.-C. Le mercure doit son nom à sa forme liquide très mobile qui rappela la vélocité de Mercure, le dieu des marchands et dieu messager aux pieds ailés. Paracelse, le père de la toxicologie, a écrit dans les années 1530 que « Alle Ding sind Gift, und nichts ohn Gift; allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist » (Tout est poison, rien n'est sans poison, ce qui fait le poison c'est la dose) et démontra que la syphilis pouvait être soignée grâce au mercure.

Le Hg est le seul métal (à l'exception du brome) présent sous forme liquide dans les conditions normales de température et de pression. Ce métal a un aspect brillant argenté. Selon la classification périodique du tableau de Mendeleïev, le Hg, de numéro atomique 80, possède 7 isotopes stables, à une masse molaire de 200,59 g mol^{-1} et est le troisième élément de la colonne 12 qui regroupe également le zinc (Zn) et le cadmium (Cd). Sa température de fusion est de -38,84 °C et sa température d'ébullition est de 356,58 °C alors que pour les autres métaux, les températures d'ébullition sont supérieure à 650 °C. La structure électronique du Hg ([Xe] $4f^{14}$ $5d^{10}$ $6s^2$) lui confère une double variance. Il peut être élémentaire (Hg°, mercure métallique), monovalent (Hg(I),

ion mercureux) ou divalent (Hg(II), ion mercurique) (PNUE 2005). De part son état liquide à température ambiante, le mercure élémentaire réagit avec les métaux (sauf le fer et le platine) en les dissolvant, ce qui conduit principalement à la formation d'amalgames. Cette propriété est très utilisée en orpaillage pour extraire les faibles quantités d'or contenues dans les poussières par exemple (Veiga et Baker, 2004). Dans un premier temps, l'or est amalgamé par le Hg puis l'alliage est chauffé à 400 - 500 °C pour que le Hg s'évapore, libérant ainsi l'or. Les deux autres amalgames les plus utilisés sont l'amalgame d'étain pour la fabrication de miroir et l'amalgame d'argent et de cuivre pour la fabrication des plombages dentaires (Miquel 2001, Herrera et al., 2009).

II. Le cycle biogéochimique du mercure

II.1 Sources d'émissions

II.1.1 Sources naturelles

Le Hg est un élément ubiquiste présent dans l'atmosphère, les sols, les sédiments, les milieux aquatiques et la biosphère. Les principales sources naturelles de Hg sont de type géogénique. La croute terrestre est riche en mercure élémentaire (Hg°) et en Hg complexé avec le soufre (HgS) tels que les minerais cinabre, métacinabre et hypercinnabar. Les concentrations en mercure total varient de 21 à 56 µg kg^{-1} selon que l'on considère la croute inférieure ou supérieure (Hans Wedepohl, 1995). Le dégazage de la croute terrestre est la principale source de ce métal dans l'environnement avec 2700 à 6000 tonnes de Hg° rejeté par an dans l'atmosphère (Varekamp et Busek, 1986).

La « ceinture globale de mercure » est une grande émettrice de Hg° dans l'atmosphère, avec un taux global moyen de 1,5 ng m^{-2} h^{-1}. Elle regroupe les aires qui ont été naturellement ou géologiquement (dégazage de la croute terrestre, activités volcaniques, schistes noirs, etc.) enrichies en Hg (Figure 1), aires principalement situées aux limites des plaques tectoniques. Au nord-ouest de l'Amérique, le flux global annuel de Hg° émis a été estimé à 10 tonnes par an pour le Mexique et l'ouest des USA. Par comparaison, ce flux est de 2,1 t an^{-1} au Nevada, et de 0,08 t an^{-1} en Arizona (Gustin et al., 2000 et 2008).

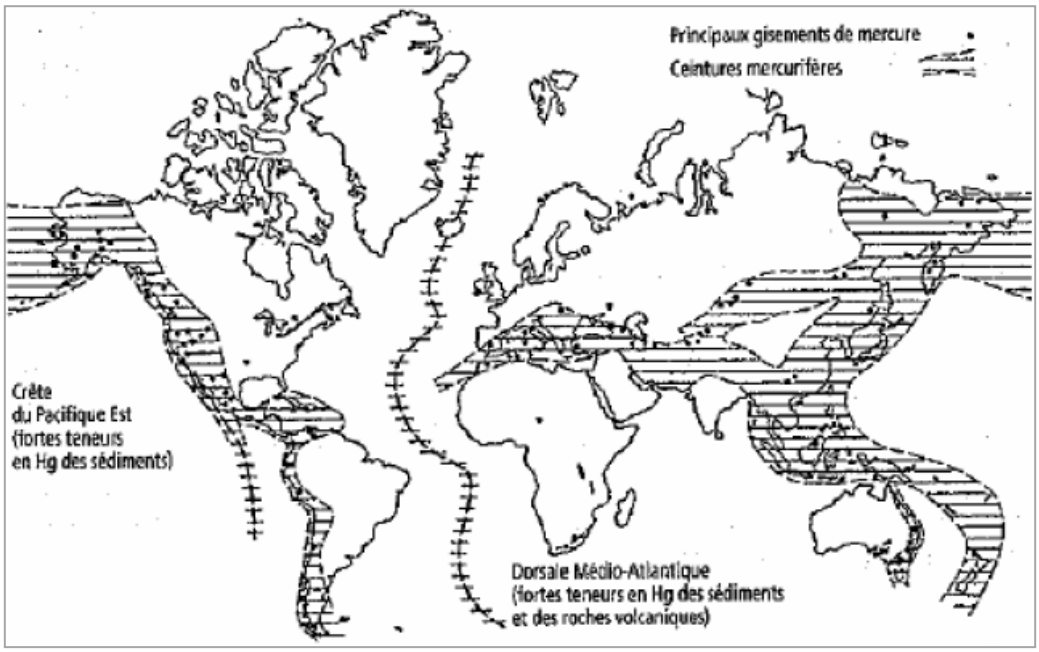


Figure 1 : Ceinture globale de mercure (source : Jonassen et Boyle, 1972)

Les plus importants gisements naturels de Hg au monde sont concentrés dans la région Méditerranéenne (Almaden en Espagne, Monte Amiata en Italie et Idria en Slovénie) (Gustin et al., 2000, Kotnik et al., 2007).

La seconde source majeure d'émission naturelle de Hg sont les volcans. En raison de la grande variété de volcans, de leur localisation et de leur niveau d'activité (éruptions, fumerolles, etc.), les estimations d'émission de Hg peuvent varier d'un facteur 10^4. Ainsi, les estimations d'émission de Hg peuvent varier de 20 à 2000 t an^{-1} (Nriagu et Becker, 2003, Gustin et al., 2008). Le Hg libéré est gazeux ou particulaire s'il provient des éruptions volcaniques et des fumerolles. Bagnato et al. (2007) ont évalué le flux de Hg émis par des volcans tel que le Mont Etna en Sicile, Italie, à 75 – 100 t an^{-1}. Nriagu et Becker (2003) ont estimé que le flux annuel moyen mondial de Hg émis par les volcans en activité entre 1980 et 2000 et en se basant sur la mesure du rapport Hg/SO_4 des exhalations, a été de 57 t an^{-1}, avec 99 t pour le volcan Bagana, 87 t pour le Kilauea, 69 t pour le Sakura-jima, 57 t pour le St-Helens et 46 t pour le Nyamuragira. Une telle activité plaça les émissions volcaniques devant les émissions de Hg liée au dégazage de la croûte terrestre qui elles ont été évaluées à 37,6 t an^{-1} en moyenne.

La dispersion du Hg provenant des sources naturelles est restée à peu près la même au cours des années (~ 4400–5200 t an^{-1}) et pourtant la concentration en Hg dans l'environnement ne cesse d'augmenter car au Hg provenant des sources naturelles s'ajoutent, depuis l'entrée de la civilisation dans l'aire industrielle, des rejets anthropiques. Ces apports supplémentaires rendent difficile l'estimation des apports atmosphériques de Hg uniquement dues aux sources naturelles. De plus, ils augmentent les quantités disponibles de Hg dans le monde et influent sur la spéciation de l'élément.

II.1.2 Sources anthropiques

Le Hg émis dans l'atmosphère par les sources anthropogéniques est constitué en majorité de particules et de mercure gazeux réactif (MGR). Sa durée de vie est donc bien plus courte que celle du Hg émis par sources naturelles qui est présent dans l'atmosphère sous forme de Hg° (Gustin et al., 2000). 30% du MGR dans l'air provient des sources anthropogéniques avec un pic à 60% noté en avril-mai 2000 à Barrow, Alaska (Lindberg et al., 2002). Le Hg particulaire représente 10% du Hg dans l'atmosphère. L'apport annuel moyen mondial de Hg est évalué à 2200–4000 t an^{-1} alors qu'il était de 1600 – 1800 t an^{-1} à l'aire préindustrielle (Martin et al., 2011) et les concentrations en Hg dans certains lacs, sédiments, glaces et tourbières ont augmenté d'un facteur 2 à 4 par rapport à il y a 150 ans.

La première source anthropique de Hg est la combustion de produits fossiles (charbon – fiouls) suivi par les exploitations minières (plomb et zinc), les rejets industriels (industrie du chlore et de la soude…), l'incinération des déchets, la lixiviation des sols suite aux constructions humaines (ex : barrages hydroélectriques) et à la déforestation (Veiga et Barker, 2004, PNUE 2005, Yudovich et Ketris, 2005, Pacyna et al., 2006). Le cas le plus flagrant d'émission anthropogénique de Hg est la province de Guizhou, Chine, qui est la plus importante productrice de Hg et la zone mondiale la plus polluée par le Hg, avec une émission atmosphérique issue des raffineries et des procédés d'extraction de 11 tonnes par an (Horvat et al., 2003). Cette région est également la plus importante zone de production de charbon.

Malgré sa toxicité connue, le Hg est encore utilisé pour la fabrication de produits comme les piles miniatures, les ampoules basse consommation, les amalgames dentaires, les vaccins, etc. ou pour le traitement des sols (fongicides, fertilisants agricoles, etc.). Le Hg contenu dans ces produits s'insère dans le cycle d'élimination des déchets et provoque des rejets de Hg dans l'air et des dépôts subséquents au sol et dans l'eau. 80% de ces rejets se volatilisent dans l'atmosphère, 15% se répandent dans les sols par l'épandage de boues de stations d'épurations et de composts et 5% sont directement versés dans les rivières et estuaires (Stein et al., 1996).

II.2 La spéciation du mercure dans l'environnement

Le Hg est présent dans l'ensemble des compartiments de l'environnement et possède de nombreuses formes physico-chimiques comme le montre son cycle biogéochimique en figure 2.

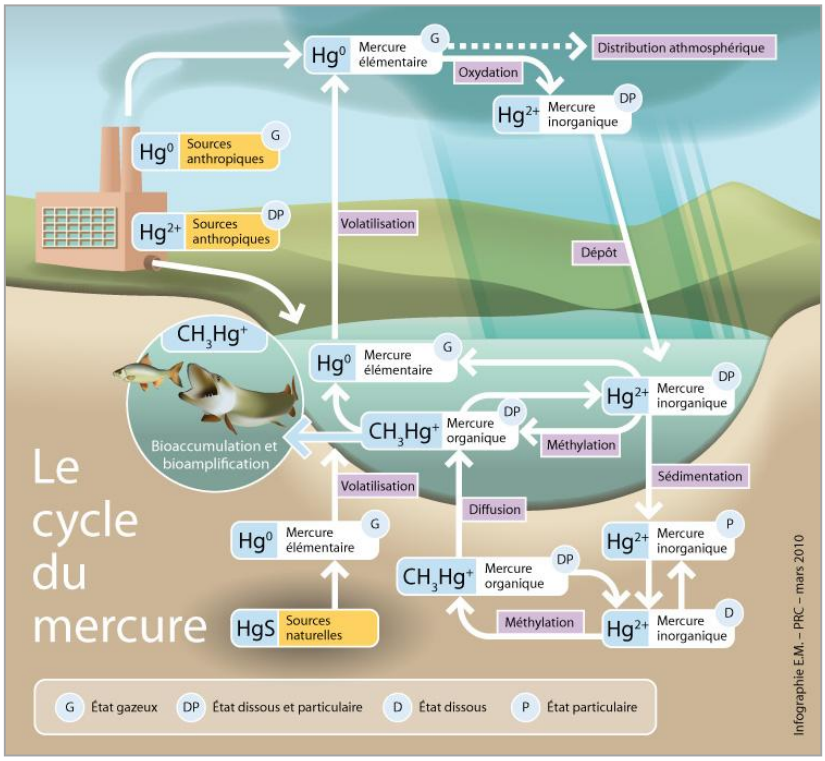


Figure 2 : Le cycle biogéochimique du mercure (source : LCR 2011)

La distribution du mercure dans l'environnement s'organise principalement autour de trois espèces, le Hg°, le mercure inorganique (iHg) et le MeHg, qui subissent toutes sortes de transferts et processus physico-chimiques et régissent la spéciation du Hg. Les principaux transferts sont représentés dans la figure 2 tandis que les principaux processus sont présentés dans la figure 3.

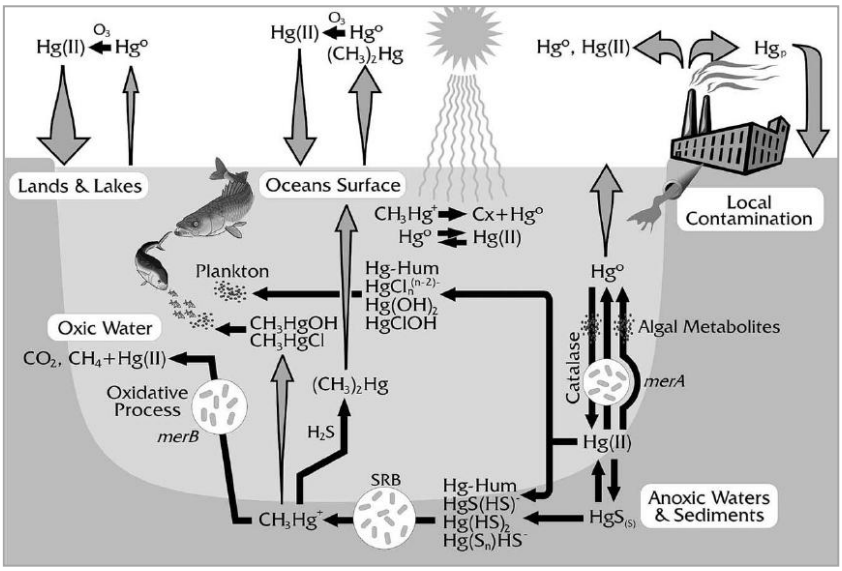


Figure 3 : Principaux processus biotique et abiotique du cycle biogéochimique du Hg (source : Barkay et al., 2003)

Le Hg émis par voie naturelle ou anthropique, est principalement rejeté dans l'atmosphère où il est distribué selon les conditions climatiques. Il peut par exemple être oxydé en iHg et se déposer dans les sols et l'eau. Dans les milieux aquatiques et plus particulièrement au niveau des eaux de surfaces, le iHg est réduit en Hg° qui de nouveau se volatilise dans l'air. Sinon, le iHg peut être méthylé par des processus biotiques ou abiotiques ou être sédimenté. Des réactions inverses peuvent également être observées avec la déméthylation biotique ou abiotique du MeHg formé. Dans les sédiments, des processus de méthylation-déméthylation, de réduction-oxydation et d'adsorption-désorption sont constatés. Le MeHg va diffuser vers le milieu aquatique et par absorption va entrer dans la chaîne alimentaire où il sera bioaccumulé et bioamplifié. Certaines des réactions engagées dans le cycle biogéochimique du Hg sont bien connues mais la plupart restent encore peu ou pas définies. Les principaux facteurs influençant la spéciation du Hg sont les apports naturels et anthropiques de Hg, les paramètres environnementaux (pH, paramètres physicochimiques régulant la réactivité et la mobilité des contaminants) et les activités biologiques des organismes et micro-organismes aquatiques.

II.3 Réactivité du mercure dans l'environnement

Les différents processus impliqués dans la réactivité du Hg sont soit biotique soit abiotique ou une synergie des deux dans le cas où des produits biogéniques interviendraient (produits pouvant être synthétisés et excrétés par les micro-organismes puis réagir dans l'environnement). Les processus biotiques sont des réactions intra- ou extracellulaires avec des organismes vivants (micro-organismes). Les processus abiotiques sont purement chimiques (réactions chimiques, réactions photochimiques) et sont liés à la présence de certains composés dont les produits biogéniques.

II.3.1 Oxydation et réduction

Dans l'atmosphère :

L'espèce Hg dominante dans l'atmosphère est le Hg°. Peu soluble et très volatil, il peut parcourir de longues distances sur une durée moyenne de 1 à 2 ans. Le MeHg est peu présent dans l'atmosphère car il est principalement issu de réactions de méthylation dans les sédiments, l'eau et les organismes aquatiques. Les échanges mercuriels entre l'atmosphère et l'eau sont des phénomènes de déposition atmosphérique et volatilisation. Des dépôts de Hg dans l'eau et sur les continents se font par voie sèche (vent) ou humide (pluie, neige) et sont dépendants des conditions météorologiques (forces et direction des vents, saisons, températures, etc.). Elles sont

principalement constituées de mercure inorganique (iHg) qui peut être issu de l'oxydation du Hg° par l'oxone ou la présence de radicaux libres OH (Hines et Brezonik, 2004, Calvert et Lindgerb, 2005, Sommar et al, 2010). En milieu aquatique, la réaction de réduction du iHg en Hg° la plus mentionnée est la photo-réduction, principalement en milieu humide et sous l'action de rayonnements lumineux de longueurs d'onde allant de 280 à 320 nm (UVB) (Muresan et al., 2008). Le Hg° est ensuite facilement transféré de l'eau vers l'atmosphère.

Dans le système aquatique :

Le Hg° et le iHg subissent dans le système aquatique de nombreuses réactions d'oxydoréduction. Le Hg° va principalement être volatilisé dans l'atmosphère tandis que le iHg est transféré de l'eau vers les sédiments et vice-versa par des phénomènes de sédimentation et de remobilisation. Dans les eaux de surface, les réactions sont principalement de type photo-réductrice et photochimique tandis qu'au niveau des eaux profondes ont lieu des réactions liées à l'activité biologique (bactéries, phytoplancton) (Monperrus et al., 2007a, Whalin et al., 2007). Ces phénomènes sont régulés par les conditions météorologiques et hydrodynamiques telles que la houle, les marées, courants, vents, etc.

L'oxydation du Hg° est principalement abiotique par photochimie. Des études ont montré une diminution de la concentration en Hg° dans des milieux aqueux salins exposés aux UVA et UVB tandis que cette concentration reste constante la nuit (Monperrus et al., 2007a, Whalin et al., 2007). Néanmoins, l'oxydation du Hg° peut également être biologique. En effet, Smith et al. (1998) ont montré que le Hg° peut être oxydé par les bactéries hydroperoxides KatG et KatE et Hines et Brezonik (2004) ont confirmé ces travaux, précisant que ces réactions se produisent dans les milieux où les rayons lumineux ne pénètrent pas (Smith et al., 1998, Hines et Brezonik, 2004).

Les réactions de réduction sont favorisées par les radiations UV et permettent de limiter la quantité de iHg disponible pour la méthylation. Les réductions biotiques du iHg contribuent de beaucoup au flux d'émission de Hg° dans l'atmosphère. Elles sont dominantes dans l'Océan Pacifique et les environnements estuariens (Barkay et al., 2003, Monperrus et al., 2007a). Les fortes concentrations en iHg favorisent l'enrichissement du milieu où il est accumulé par les bactéries résistantes (*Escherichia coli*, saccharomyces, etc.) et induisent des réactions de réduction par les organismes possédant les enzymes réductases codées par le gène *mer*A (Barkay et al., 2003). Dans certaines eaux profondes où d'importantes concentrations de Hg° ont été notées, ce sont les organismes phototrophes comme des algues ou des espèces phytoplanctoniques plutôt que les bactéries réductrices, qui peuvent provoquer la réduction de iHg en Hg°, soit par des processus

dépendant de la lumière et qui font intervenir la photosynthèse, soit par des mécanismes ne nécessitant pas de radiations (Amyot et al., 1997, Hines et Brezonik, 2004, Dill et al., 2006). Dans les bassins versants, la réduction biotique du iHg diminue avec l'augmentation de la teneur en matière organique car il tend à être adsorbé et donc n'est plus disponible (Gabriel et Williamson, 2004).

Dans les sédiments :

Les réactions présentées pour le système aquatique peuvent également avoir lieu dans les sédiments. La réduction biotique est dominante dans les sols riches en matière organiques et en chlorure et est fonction du pH et de la concentration des autres métaux lourds, compétiteurs du Hg (Monperrus et al., 2007a, Whalin et al., 2007). La réduction abiotique est quant à elle majoritairement liée à des réactions photochimiques et est fonction de la quantité de matière organique, de l'intensité de la lumière et de la concentration en chlorures (Amyot et al., 2004, Gustin et al., 2008).

II.3.2 Méthylation et déméthylation

Le méthylmercure (MeHg) est une espèce présente essentiellement dans le système aquatique, dans les sols saturés en eau et dans les êtres vivants. Les teneurs en MeHg de ces différents compartiments sont induites par les processus de méthylation (liaison avec un groupement méthyle CH_3) et de déméthylation (dissociation de ce même groupement) du Hg.

Après sédimentation, 25% du iHg piégé est remobilisé dans le milieu aquatique principalement par diffusion passive, bioturbation ou hydrodynamisme et 24% du Hg libéré est présent sous forme méthylée (Covelli et al., 1999). Les 75% de iHg restant dans les sédiments se complexent avec des composés comme les sulfures, les oxydes de fer ou le manganèse pour former des composés inorganiques tels que le HgS et le HgS_2^{2-} ou se complexent avec des matières organiques en décomposition, des acides fulviques ou humiques (acide acétique, acide salicylique, EDTA, cystéine) pour former des composés organiques tels que le MeHg (Covelli et al., 1999, Falter, 1999, Horvat et al., 1999, Gabriel et Williamson, 2004). Le MeHg formé est ensuite soit déméthylé par réactions biotiques ou abiotiques et redevient du iHg, soit absorbé par les micro-organismes (phytoplancton, zooplancton) puis bioaccumulé et bioamplifié dans la chaîne alimentaire. Dans l'eau, les organomercures peuvent être transférés de la phase particulaire à la phase dissoute par des processus réversibles d'adsorption et désorption sur des particules minérales, organiques ou biogéniques (Gabriel et Williamson, 2004, Ogrinc et al., 2007, Bengtsson et Picado, 2008). La concentration en MeHg dans le système aquatique et les sédiments est dépendante des

réactions de méthylation et déméthylation (M et D), oxydation-réduction et sorption-désorption. Le pourcentage de MeHg dans le HgT des sédiments ne dépasse généralement pas les 2%. Dans les océans, le MeHg vient principalement de trois sources : les sédiments estuariens et les plateaux océaniques, les sédiments au niveau des eaux profondes des océans et les colonnes d'eau océaniques (Whalin et al., 2007).

Méthylation :

Le MeHg est principalement synthétisé à partir du iHg, par l'activité microbienne d'une variété d'espèces (surtout les bactéries sulfato-réductrices, BSR) aérobies et anaérobies ou par l'action de micro-organismes comme les algues et les levures (Choi et al., 1994, Mauro et al., 2002, Hammerschmidt et al., 2004, Celo et al., 2006, Coelho-Souza et al., 2006, Duran et al., 2008). Les BSR sont les agents méthylants les plus étudiés. Ce sont des bactéries anaérobies dont l'action est observée dans les sédiments marins, estuariens et d'eau douce ainsi que dans les zones marécageuses. L'entrée du Hg dans les BSR se faire principalement sous la forme d'un complexe neutre $(Hg_XS_y)°$ provenant de la réaction du iHg avec SO_4^{2-}. Si la concentration en sulfates est trop élevée, la formation du complexe $(Hg_XS_y)^{2-}$ est favorisée au détriment de la M, car ce complexe est non-assimilable par les bactéries (Jay et al., 2002). Si la concentration en sulfate est trop basse, le Hg va se lier à la matière organique dissoute et cette matière va être absorbée par les bactéries donc la M aura lieu. La M par BSR est inhibée par la présence du molybdate (MoO_4^{2-}) car il perturbe leur métabolisme énergétique (Fleming et al., 2006).

En présence d'acide acétique comme source de carbone, les BSR ont un potentiel de M plus fort, probablement en raison de l'utilisation de l'enzyme méthyltransférase. Ce processus consiste en un transfert du groupe carbanion (CH_3^-) de la méthylcobalamine vers le iHg par voie enzymatique par l'acétyl-coenzyme A, la forme activée de l'acide acétique (Choi et al., 1994, King et al., 2000).

Moins connues et quantitativement moins importantes que les réactions de méthylation et déméthylation bactériennes (ou biotiques), les réactions abiotiques ne sont néanmoins pas négligéables. La M abiotique fait intervenir des réactions chimiques ou photochimiques et a lieu dans les sédiments et la colonne d'eau (Monperrus et al., 2007b). La liaison du Hg avec un groupe méthyle peut se faire soit par transfert d'un carbocation (CH_3^+) ou d'un carbanion venant de donneurs de groupe méthyle (acides humiques, fulvique, méthanol, éthanol, etc.), soit par transméthylation avec un composé alkylé du plomb ou de l'étain (Gardfelt et al., 2003, Celo et al., 2006). Dans les eaux marines et estuariennes, la M du iHg par le trimethylétain est le processus le plus fréquent. Dans les milieux anaérobiques sera favorisée la M de Hg° par le méthyliodure avec

transfert d'un carbocation CH_3^+. En eaux douces, les attaques électrophiles ou nucléophiles entre la méthylcobalamine et iHg, sans intervention de bactérie ou enzyme sont les réactions de M abiotique les plus rencontrées (Celo et al., 2006, Chen et al., 2007). Enfin, les processus de M par des produits biogéniques (iodométhane, produits de dégradation du glucose (acétate, poprionate), métabolites halogénés, métaux méthylés) sont reportés. Généralement, la réaction du iHg avec les sulfures biogéniques forme le composé $(MeHg)_2S$ qui va se décomposer en Me_2Hg et HgS puis en MeHg (Baldi et al., 1995).

Déméthylation :

Les processus de déméthylation (D) sont parfaitement compris, contrairement aux processus de M. La D biotique, dominante dans les sédiments, est principalement liée aux activités microbiologiques et a lieu par lyase organomercurielle (Marvin-Dipasquale et al., 2000, Rodriguez Martin-Diomeadios et al., 2004). En intracellulaire, le processus de D est généré par des enzymes alors qu'en extracellulaire, elle est non enzymatique et est provoquée par les produits biogéniques. En milieu aérobie, et plus particulièrement en présence d'importantes quantités de iHg, la D se fait principalement par l'opéron-*mer*. Il s'agit d'un procédé réductif où la liaison covalente entre le groupe méthyle et le Hg est cassée par l'enzyme organomercurielle lyase codée par le gène *mer*-B. Le MeHg devient alors du CH_4 et du iHg qui sera réduit en Hg° par l'enzyme réductase codée par le gène *mer*-A (Barkay et al., 2003). En milieu anoxique et surtout lorsque la concentration en Hg est faible, un procédé oxydatif du MeHg par la médiation de bactéries anaérobiques est plus fréquent. Le MeHg va mimer l'acide acétique ou l'acétate d'ammonium et être dégradé à leur place, formant ainsi du CO_2 et du iHg qui sera de nouveau disponible pour être méthylé (Marvin-Dipascale et al., 2000, Barkay et al., 2003).

La D abiotique est principalement provoquée par photo-dégradation (photolyse UV, photocatalyse) mais peut également venir de réactions chimiques d'oxydation, hydrolyse ou transméthylation (Fitzerald et al., 2007). Ces processus sont dominants dans les lacs et terres humides fortement exposés à la lumière, où d'importantes quantités de Hg° sont volatilisées dans l'atmosphère en raison de ces réactions. La D est limitée par de trop fortes quantités de matières organiques en suspension car elles entravent l'entrée des radiations dans l'eau. Dans les océans, où les concentrations de chlore sont importantes, le MeHg est présent sous la forme de MeHgCl et est difficilement photodégradable. Néanmoins, cette espèce peut également être D par les radicaux libres (Whalin et al., 2007).

II.3.3 Bioamplification et bioaccumulation

Les gammes de concentrations en HgT relevées en 2006 dans l'air, l'eau, les sols, les sédiments, les poissons et les plantes sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Gamme de concentrations en HgT des différents compartiments de la nature (d'après INERIS 2006)

Milieu	Concentrations
Air	1 à 4 ng m^{-3}
Eau :	
- eaux souterraines	0,5 à 15 ng L^{-1}
- lacs	0,5 à 12 ng L^{-1}
- rivières	0,01 à 6 ng L^{-1}
- mers	0,05 à 3 ng L^{-1}
Sols	0,03 à 0,15 mg kg^{-1} m.s.*
Sédiments	< 0,4 ng kg^{-1} m.s.*
Poissons :	
- d'eau douce	0,2 à 7 mg kg^{-1} m.s.*
- de mer	0,01 à 1,50 mg kg^{-1} m.s.*
- thon, espadon	0,3 à 7 mg kg^{-1} m.s.*
Coquillages, crustacés	0,01 à 1 mg kg^{-1} m.s.*
Plantes	< 0,1 mg kg^{-1} m.s.*

*m.s. : masse sec

Les concentrations en HgT sont faibles pour l'ensemble des milieux, à l'exception des poissons, coquillages et crustacés. Chez les organismes aquatiques, la quantité de Hg présent sous forme méthylée varie selon l'espèce, l'âge, la taille des poissons et selon le niveau de contamination du lieu de pêche (Fitzerald et al., 2007), en raison de phénomènes de bioaccumulation et bioamplification comme le montre la figure 4. Chez les invertébrés, le pourcentage de MeHg varie généralement de 20 à 40% alors que chez les prédateurs, il peut atteindre 80% et plus (Morel et al., 1998).

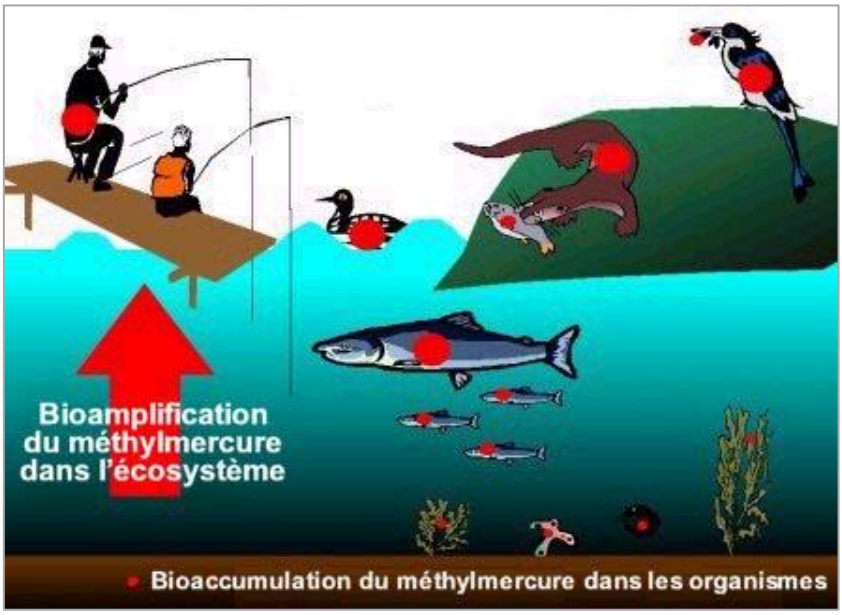


Figure 4 : Bioaccumulation et bioamplification du MeHg
(Site : http://www.ec.gc.ca/mercure-mercury/D64997D2-944E-4AE0-9914-0FCCC25DCC80/i-f-bom-f.jpg)

Le MeHg et le iHg sont absorbés par les organismes aquatiques, accumulés et excrétés (Morel et al., 1998, Kehrig et al., 2010, Bowling et al., 2011). La concentration en Hg dans n'importe quel organisme est relative à la concentration initialement absorbée, sa distribution dans les différents tissus et son élimination par l'organisme. Le MeHg possède un fort potentiel de bioaccumulation, ce qui représente le principal danger de ce composé car à partir d'un milieu peu pollué, les concentrations en MeHg peuvent devenir très importantes dans les organismes (PNUE 2005, Fitzgerald et al., 2007). Cette espèce est concentrée par le phytoplancton et le zooplancton puis bioaccumulée tout au long de la chaîne alimentaire comme vu précédemment sur la figure 4. En plus de la bioaccumulation a lieu un phénomène de bioamplification par lequel les organismes vivants concentrent le MeHg jusqu'à un million de fois, depuis les micro-organismes des réseaux trophiques jusqu'aux poissons prédateurs et les mammifères, par adsorption passive sur la surface du corps mais surtout par l'ingestion d'aliments (Gray, 2002, Kehrig et al., 2010). Le facteur de bioconcentration du MeHg dans le plancton par rapport à la concentration initialement présente dans l'eau peut atteindre 10^4 (Horvat et al.,1999).

Les facteurs déterminant la bioaccumulation du MeHg dans les écosystèmes aquatiques marins sont environnementaux (taux de MeHg, pH, composés organiques en décomposition, température), écologiques (niveau chaîne trophique et productivité) et physiologiques (respiration, assimilation). Pour entrer dans la chaîne alimentaire aquatique via les bactéries et le phytoplancton, le Hg doit traverser la membrane lipidique qui entoure les organismes unicellulaires. Ce passage se

fait principalement via des transporteurs transmembranaires. Morel et al (1998) ont reporté qu'à hautes concentrations, le iHg est transporté via une protéine merT dans les bactéries mer-porteuses. Watras et al (1998) ont montré qu'à tous les niveaux de la chaîne trophique, les concentrations en MeHg varient positivement avec les teneurs en $MeHg^+$ libre dans l'eau et particulièrement en présence de MeHgOH, concluant qu'un transport actif conduit les espèces Hg dans les phyto- et bacterio-planctons. L'entrée du Hg dans l'organisme peut également se faire par diffusion passive comme le montre la figure 5, le $HgCl_2$ et le MeHgCl étant les espèces Hg diffusant le plus rapidement. Après absorption par l'organisme, seul le MeHgCl sera efficacement transféré le long des différents niveaux du réseau trophique. En effet, le $HgCl_2$ se lie principalement aux membranes de l'organisme diatomique et est donc éliminé après absorption par un organisme plus avancé dans le réseau (ex : zooplancton). Le MeHgCl est lui associé à la partie soluble de la cellule diatomique et est facilement assimilé (Morel et al., 1998). En évoluant le long de la chaîne alimentaire, deux principaux nouveaux facteurs entrent en compte dans le phénomène d'absorption et de bioaccumulation, qui sont le régime alimentaire et la taille de l'organisme (Watras et al., 1998).

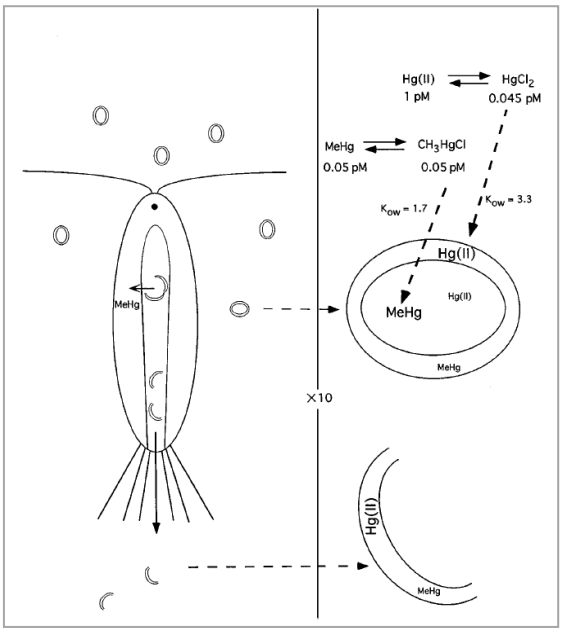


Figure 5 : Bioaccumulation du Hg à la 1ère étape de la chaîne alimentaire (Morel et al., 1998)

Dans l'organisme, la complexation du MeHg avec un acide aminé contenant un groupement thiol, comme la cystéine, est important pour contrôler la solubilité du composé dans le système intestinal et donc sa biodisponibilité et bioaccumulation.

Dans les poissons, les quantités de MeHg dans les muscles sont plus importantes que dans les lipides, montrant clairement que la bioaccumulation du MeHg n'est pas uniquement lié à son caractère liposoluble (Morel et al., 1998). En effet, la paroi intestinale semble avoir une grande

affinité pour le MeHg (taux d'absorption du MeHg variant entre 40 et 95 %), où il intègre alors le cytosol. La biodisponibilité, bioaccumulation et bioamplification du MeHg va dépendre de la taxinomie, la morphologie et l'ontogénie de l'organisme. De plus, plus la chaîne alimentaire comprendra de niveaux trophiques, plus les teneurs et pourcentage en MeHg des espèces supérieures seront élevés.

Les concentrations de MeHg et les facteurs de bioaccumulation du MeHg augmentent le long de la chaîne alimentaire tandis que les concentrations en iHg diminuent. Au premier stade de la chaîne alimentaire, les facteurs de bioamplification du MeHg varient entre 4,8 et 6,2. Cette étape est la plus importante du processus de bioaccumulation car au plus haut de la chaîne alimentaire, ces facteurs seront augmentés uniquement d'un facteur 2 à 4.

III. Toxicité du mercure

La toxicité de Hg dépend de sa forme. Le contact avec le Hg° liquide est cutané et donc accidentel (thermomètre cassé). Le Hg° gazeux est incolore, inodore et plus toxique car le contact se fait par inhalation (absorption pulmonaire comprise entre 75 et 85%), il est alors rapidement absorbé par les poumons et transporté dans les vaisseaux sanguins (PNUE 2005, INERIS 2006). L'exposition au iHg est faite par voie orale (accident, suicide) et le taux d'absorption par l'organisme est compris entre 7 et 15% (PNUE 2005, INERIS 2006). Cette espèce peut être à la base d'insuffisances rénales et de lésions gastro-intestinales. Le MeHg est la forme la plus toxique du Hg. L'exposition à ce composé se fait principalement par voie orale. Il est facilement absorbé (taux d'absorption = 95%) et difficilement excrété (70 à 80 jours de résidence dans l'organisme) par l'organisme vivant. De plus, il est facilement bioaccumulé et bioamplifié. Les principales cibles du MeHg sont le cerveau et le fœtus (PNUE 2005, INERIS 2006). La source majeure d'exposition au MeHg pour l'homme est la consommation de poisson et plus particulièrement de poissons piscivores. Les autres sources alimentaires contenant du Hg présentent essentiellement cet élément sous forme de iHg et à des teneurs beaucoup plus faibles (AFSSA 2002, Millour et al., 2011).

III.1 Devenir du méthylmercure dans l'organisme humain

L'absorption par voie orale est la principale voie d'exposition au MeHg (95% absorbé par l'organisme). Il est ingéré et absorbé par l'estomac et le tractus gastro-intestinal. Le MeHg peut alors se lier aux groupements thiols de certains ligands comme la cystéine ou l'albumine. Le complexe MeHg-cystéine mime la méthionine, un acide aminé présent dans l'organisme, ce qui

permet au Hg d'entrer dans les cellules et d'être distribué dans l'ensemble de l'organisme via le système sanguin. Il est ensuite excrété par la bile sous la forme d'un complexe MeHg-glutathionne, redistribuée par le système sanguin ou déméthylé et éliminé dans les fèces (Clarkson et al., 2007). Le Hg peut également se lier aux molécules constituant la cellule vivante (acide nucléique, protéines, etc.) modifiant ainsi leur structure et/ou inhibant leurs activités biologiques. Le MeHg se fixe préférentiellement aux cellules nerveuses et provoque par le biais de réactions d'oxydation leur dégénérescence. Par le biais de transporteurs, le MeHg peut également franchir la barrière hémato-encéphalique et s'accumuler dans le cerveau ou la barrière foeto-placentaire et inhiber l'activité des enzymes responsables de la croissance des neurones lors du développement du cerveau, provoquant des malformations et des retards dans le développement de l'enfant (Kerper et al., 1996, Morel et al., 1998, Budtz-Jorgensen et al., 2004, Clarkson et al., 2007, Grandjean et Perez, 2008, Bensefa-Colas et al., 2010).

III.2 Exposition chronique

L'organe cible de l'exposition au MeHg est le cerveau mais la vue, l'ouïe et les zones du cerveau impliquées dans la coordination motrice peuvent également être affectées. Des effets portant sur le système cardio-vasculaire et immunitaire ont été décrits (NRC 2000, Mozaffarian, 2009, Gardner et al., 2010) mais sont moins étudiés que les effets neurotoxiques. Des études sur une éventuelle relation entre une exposition au MeHg et une réponse cancérogène ont également été menées mais aucune corrélation n'a été démontrée (Crespo-Lopez et al., 2009, Wilson et al., 2009). Les premiers symptômes induits par l'exposition par voie orale au MeHg sont le plus souvent d'ordre neurologique : sensations de fourmillement au niveau des extrémités des membres, réduction du champ de vision, perte du goût, de l'odorat et de l'ouïe, irritabilité, perte de mémoire, difficulté à s'endormir et dépression. L'exposition est essentiellement chronique, le plus souvent après une consommation importante de nourriture contaminée en MeHg. Dans le cas le plus extrême, une contamination au MeHg peut entraîner la mort.

III.3 Indicateurs d'exposition au méthylmercure

Le temps de demi-vie corporelle du MeHg a été estimé à 70-80 jours et le temps de demi-vie sanguine à 48-53 jours (Cernichiari et al., 2007). Le MeHg est métabolisé en iHg puis excrété par les fèces (plus des 2/3 du MeHg absorbé) et les urines. Les indicateurs d'exposition au MeHg peuvent être les urines, le lait maternel, le foie, le sang total, le plasma ou les cheveux. Cependant, le sang et les cheveux sont les plus utilisés car les urines et le lait maternel sont des liquides

biologiques qui contiennent de fortes proportions de iHg. La détermination de la concentration en MeHg nécessite par conséquent le recours à une méthode d'analyse spécifique (NRC 2000). Le plus souvent, les indicateurs capillaires sont considérés comme étant les seuls bio-marqueurs d'une exposition au MeHg car contrairement aux échantillons sanguins, cette méthode est non-invasive et ne nécessite pas une surveillance médicale. Les indicateurs capillaires ont l'avantage d'être en mesure d'intégrer des paramètres de durée et de magnitude de l'exposition à leur évaluation. En effet, les concentrations de Hg dans les cheveux reflètent des expositions antérieures et dépendent du taux de croissance de la chevelure. Il existe une relation quasi linéaire entre la quantité de MeHg dans le sang et celle obtenue dans les cheveux qui ont poussé au cours de l'exposition. Ainsi, par la mesure de la concentration en Hg capillaire, avec la longueur de pousse du cheveu et par comparaison avec la concentration en Hg sanguin, une estimation de la durée de l'exposition et de son amplitude est faite (NRC 2000, Budtz-Jorgensen et al., 2004, Bensefa-Colas et al., 2010).

Pour l'estimation de l'exposition au MeHg chez le fœtus, plusieurs tissus et liquides biologiques ont été expérimentés : les coupes d'ongles maternelles, le cheveu maternel, le cerveau du fœtus et de l'enfant, le sang du cordon ombilical ou encore les tissus du cordon ombilical. Après de multiples essais d'analyse, il a été démontré que l'indicateur le moins invasif et le plus optimal pour la détermination de l'exposition au MeHg chez le fœtus et l'enfant en bas âge, est le cheveu de la mère (Grandjean et Pérez 2008).

III.4 Données cliniques

Les données cliniques et toxicologiques disponibles sont issues des observations effectuées à l'occasion des accidents de Minamata et Niigata au Japon dans les années 1960 et des intoxications massives survenues dans les années 1970 en Irak.

III.4.1 Intoxications de Minamata et Niigata au Japon

La neurotoxicité du MeHg est connue depuis l'intoxication de la population de Minamata au Japon. L'épidémie débuta en 1953 mais il fallu attendre 1968 pour que le gouvernement japonais reconnaisse le MeHg comme responsable de cette intoxication. Des milliers de personnes ont été atteintes de désordres neurologiques souvent irréversibles, suite à la consommation régulière de poissons contaminés par des rejets industriels de MeHg chloré (MeHgCl). Ce MeHg était utilisé comme catalyseur par la compagnie usinière Chisso pour la production d'acétaldéhyde. Neuf cents personnes ont trouvé la mort et encore aujourd'hui, environ 3000 personnes souffrent de la maladie

de Minamata, dont les effets comprennent des difformités physiques et des maladies mentales. Il a fallu plusieurs années pour déterminer l'agent causal de cette contamination, les données d'exposition disponibles sont donc difficilement interprétables (temps d'exposition, niveau d'exposition) et aucune association entre le niveau d'exposition et les signes cliniques n'a pu être établie (Eto et al., 2010).

Peu de temps après, une deuxième épidémie a eu lieu entre 1964 et 1965, à Niigata. L'agent causal a été identifié plus tôt et il existe des données sur les teneurs de MeHg dans le sang et les cheveux. Des études plus poussées sur la recherche d'effets tératogènes ont été faites et indiquent clairement que des enfants présentant des troubles sévères peuvent naître de mères chez lesquelles n'étaient observés que des symptômes discrets ou pas de symptômes (Oyanagi et Ikuta, 1993, AFSSA 2002).

III.4.2 Intoxication en Iraq

Pendant l'hiver de 1971-1972, 6530 personnes ont été hospitalisées et 460 sont mortes suite à la consommation de pain issu de graines traitées avec du MeHg utilisé comme fongicide. Par rapport aux intoxications survenues au Japon, l'intoxication en Iraq a été limitée à une courte période de temps, l'agent causal a été identifié rapidement et la méthode d'analyse est explicitée (spectrométrie d'absorption atomique). Il a donc pu être estimé que l'exposition prénatale à des niveaux de Hg correspondant à une teneur dans le cheveu maternel de 7 à 10 mg kg^{-1}, pouvait altérer le développement du système nerveux central. Néanmoins, si cela est vrai lors d'une exposition massive et de courte durée, l'extrapolation à une exposition chronique doit se faire avec prudence (Amin-Zaki et al., 1974, AFSSA 2002).

III.5 Données épidémiologiques

Le MeHg est un composé particulièrement dangereux pour les fœtus et les enfants en bas âge (jusqu'à deux ans, pendant la période du développement des fonctions cognitives) via l'allaitement puis l'alimentation diversifiée (Grandjean et Pérez 2008). Des études épidémiologiques (tests psychologiques ou de motricité) ont été faites dans de nombreuses populations consommatrices régulières de poisson afin de définir la relation entre l'exposition prénatale au MeHg et son association avec le développement de l'enfant (Budtz-Jørgensen et al., 2004). Trois grandes études peuvent être soulignées : Nouvelle-Zélande (tableau 2), Iles des Seychelles (tableau 3) et Iles Féroé (tableau 4).

Tableau 2 : Etude épidémiologique menée en Nouvelle-Zélande (d'après AFSSA 2002 et 2004).

Date de l'étude	1977-1978
Type de population	Hétérogène : 62% îles pacifiques, 27% maoris, 11% européens
Mise en place de l'étude	Cohorte exposée et non exposée Enfants à 4 ans (n = 31) puis à 6-7 ans (n = 61) 10 970 couples mère-enfant Consommation > 3 poissons par semaine Trois groupes : - Mères ayant une concentration capillaire en Hg de 3-6 mg kg^{-1} - Mères ayant une concentration capillaire en Hg < 3 mg kg^{-1} m.h.* et consommant peu de poisson - Mères ayant une concentration capillaire en Hg < 3 mg kg^{-1} m.h.* et étant grandes consommatrices de poissons
Indicateur biologique	L'ensemble du cheveu maternel
Type d'analyse	Mesure du MeHg par CV-AAS
Tests exercés	*Denver Developmental Screening Test*, tests de vision et de sensibilité
Conclusions	Prévalence des retards au développement plus important dans le groupe des enfants de mères ayant une exposition élevée (niveau supérieur à 6 mg kg^{-1}). Les principales variables permettant d'expliquer les différences de scores ont été attribuées à l'origine ethnique, l'éducation, l'âge de la mère et le sexe de l'enfant. L'exposition au Hg de la mère n'a pas pu être retenue comme facteur explicatif des retards comportementaux observés ultérieurement chez les enfants.

* m.h. = masse humide

Tableau 3 : Etude épidémiologique menée dans les Seychelles (d'après AFSSA 2002 et 2004).

Date de l'étude	1989-1990
Type de population	Hétérogène : îles pacifiques, africains, peu d'asiatiques
Mise en place de l'étude	Cohorte exposée et non exposée Etude pilote puis étude longitudinale en double aveugle avec évaluation à 6,5 mois, 19 mois, 29 mois, 66 mois et 96 mois 740 couples mère-enfant Consommation importante (10 à 14 repas / semaine) de poisson peu contaminé Tabac et alcool < 15%
Indicateur biologique	L'ensemble du cheveu maternel
Type d'analyse	Mesure du MeHg et iHg par CV-AAS
Tests exercés	Batterie de tests psychologiques appropriés à l'âge de l'enfant
Conclusions	Prise en considération des facteurs : sexe, habitat, allaitement maternel, poids à la naissance. Pas de mise en évidence de troubles significatifs du développement chez ces enfants, en rapport avec la teneur de Hg capillaire maternel. Une seconde étude révèle un effet bénéfique à la consommation de poisson de l'océan et ne constate aucun effet indésirable.

Tableau 4 : Etude épidémiologique menée dans les îles Féroé (d'après AFSSA 2002 et 2004).

Date de l'étude	1986-1987
Type de population	Homogène : grande majorité d'insulaire, quelques danois
Mise en place de l'étude	Cohorte exposée et non exposée Enfants à 7 ans (n = 917) en 1997 1 022 couples mère-enfant Consommation peu importante de poisson et mammifères moyennement contaminés Tabac et alcool < 26% Deux groupes : - 120 mères avec une concentration capillaire en Hg de 10-20 mg kg^{-1} m.h.* - 312 mères avec une concentration capillaire en Hg de 1-3 mg kg^{-1} m.h. (1,8 mg kg^{-1} m.h. en moyenne)
Indicateur biologique	L'ensemble du cheveu maternel, sang du cordon ombilical
Type d'analyse	Mesure du Hg par CV-AAS (cheveux) et GC-ECD (cordon)
Tests exercés	Batterie de tests psychologiques appropriés à l'âge de l'enfant
Conclusions	Observation d'une concentration élevée en PCB dans certains échantillons de lait. Cette étude évoque une relation entre l'exposition prénatale et un mauvais développement neurocomportemental, cependant il est impossible de déterminer si les effets observés résultent de l'exposition au MeHg, aux PCB ou à une combinaison des deux.

* m.h. = masse humide

L'étude épidémiologique menée en Nouvelle-Zélande n'a pas considéré l'origine ethnique, l'éducation, l'âge de la mère et le sexe de l'enfant. Il est donc impossible d'imputer un retard de développement neurocomportemental à une intoxication au Hg. L'étude faite aux Seychelles n'observe pas de corrélation entre le développement neurocomportemental de l'enfant et une exposition post-natale au Hg. Au contraire, elle soulève des effets bénéfiques constatés suite à la consommation de poissons de l'océan. Enfin, aucune conclusion ne peut être faite sur l'étude menée aux îles Féroé car de fortes concentrations de PCB dans le lait maternel ont été mesurées. Oken et al. (2008) ont mené une étude aux Etats-Unis sur les fonctions cognitives des enfants âgés de 3 mois à 6 ans et les résultats ont montré, pour une même population, des effets bénéfiques et néfastes liés à la consommation de poisson par la mère. En conclusion, les études épidémiologiques actuellement tangibles, réalisées dans le cadre d'exposition chronique, n'apportent pas de preuves quant à l'existence de troubles du développement neurocomportemental en lien avec une exposition au MeHg à travers la consommation de poisson. Néanmoins, l'étude d'Oken et al (2008) laisse suggérer que la consommation de poisson par la mère est bénéfique pour le développement du fœtus, à condition de bien choisir les espèces à consommer.

III.6 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 (INERIS 2006). Le tableau 5 présente les VTR publiées par différents organismes, pour une exposition chronique au MeHg par voie orale.

Tableau 5 : Valeurs toxicologiques de référence (d'après AFSSA 2002 et 2004, INERIS 2006, JECFA 2010).

Source	VTR	VTR révisée
US EPA	2,1 µg MeHg kg^{-1} p.c.* sem^{-1}	0,7 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1}
US FDA	2,8 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1}	-
JECFA	3,3 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1} 5 µg HgT kg^{-1} p.c. sem^{-1}	1,6 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1} 5 µg HgT kg^{-1} p.c. sem^{-1} puis 4 µg iHg kg^{-1} p.c. sem^{-1}
Canada	3,3 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1} 5 µg HgT kg^{-1} p.c. sem^{-1}	1,4 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1} 5 µg HgT kg^{-1} p.c. sem^{-1}

*Poids corporel

L'US EPA (Environmental Protection Agency) et l'US FDA (Food and Drug Administration) proposent des doses hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de MeHg de 0,7 µg MeHg kg^{-1}p.c.sem^{-1} et 2,8 µg MeHg kg^{-1} p.c sem^{-1} respectivement, en prenant en considération la sensibilité du développement neurocomportemental de l'enfant exposé in utero et en utilisant les données cliniques et épidémiologiques présentées aux paragraphes III.4 et III.5.

Le JECFA (joint FAO/WHO Expert Committee and Food Additives) a établi en 1990 des DHTP de 3,3 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1} et de 5 µg HgT kg^{-1} p.c. sem^{-1} en considérant l'effet neurotoxique du Hg en associant l'exposition au MeHg à un apport quotidien de cette substance (OMS 1990). Par la suite et afin d'apporter une précaution supplémentaire vis-à-vis de l'impact potentiel sur le développement neurologique du fœtus, la DHTP du MeHg a été abaissé en 2003 par le JECFA à 1,6 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1} (JECFA 2006). La DHTP pour la HgT a été retirée en 2010 par ce Comité et remplacé par une DHTP pour le iHg de 4 µg Hg kg^{-1} p.c. sem^{-1} (JECFA 2010). La nouvelle DHTP pour le iHg est considérée comme applicable pour une exposition au HgT par des aliments autres que les poissons et les crustacés. Pour ces derniers, la DHTP préalablement établi pour le MeHg est maintenue.

Le Canada applique la DHTP établi en 1990 par le JECFA pour l'ensemble de la population mais, dans le but de protéger le fœtus et l'enfant et a fixé en 1998 une DHTP de 1,4 µg MeHg kg^{-1} p.c. sem^{-1} pour les femmes enceintes et allaitantes.

III.7 Valeurs réglementaires

La Commission européenne a fixé des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires (règlements (CE) N°629/2008 modifiant le règlement (CE) N°1881/2006) (CE 2006 et 2008). La teneur maximale en mercure total dans les parties comestibles des produits de la pêche a été fixée à 0,5 mg/kg de poids frais, sauf pour certaines espèces pour lesquelles la valeur a été fixée à 1 mg/kg de poids frais (décision 93/351/CEE).

III.8 Evaluation de l'exposition humaine au mercure

Les estimations de l'exposition au mercure se font en croisant les données de consommation des personnes enquêtées avec les niveaux de contamination dans les aliments consommés (AFSSA 2002). Généralement, ces estimations sont faites sur le mercure total.

En France, le HgT dans les poissons a été estimé variant entre 0,06 et 0,381 mg kg^{-1} selon la nature du poisson (SCOOP 2004) ou à un niveau moyen de 0,062 mg kg^{-1} dans le groupe des poissons (Leblanc et al., 2005). Les récents résultats obtenus lors de la seconde étude sur l'alimentation totale française (EAT 2) présentent des résultats similaires avec une variation du HgT

allant de 0,005 à 0,702 mg kg^{-1} soit 0,065 mg kg^{-1} en moyenne dans le groupe des poissons et de 0,005 à 0,040 mg kg^{-1} soit 0,019 mg kg^{-1} en moyenne chez les crustacés (Millour et al., 2011). Les autres denrées alimentaires contiennent des niveaux inférieurs à 0,017 mg kg^{-1}, à l'exception des échantillons de chocolat analysés lors de la première EAT (EAT 1) qui présente un niveau moyen de HgT de 0,042 mg kg^{-1} (Leblanc et al., 2005). L'apport journalier moyen en HgT par la consommation de produits de la pêche chez l'adulte (« normoévaluants » de 15 ans et plus) a été estimé à 9 µg soit 21% de la DHTP par la méthode des repas dupliqués (Noël et al., 2003), à 8,48 µg soit 20% de la DHTP à partir des données des plans de surveillance (SCOOP 2004) et à 9,7 µg soit 23% de la DHTP par l'EAT 1 (Leblanc et al., 2005). Chez les enfants de 3 à 14 ans, l'apport journalier moyen en HgT est de 7,9 µg pour les enfants de 3 à 14 ans (soit 61% de la DHTP du HgT pour enfants de 3 à 8 ans, 13 kg et 22% de la DHTP du HgT pour enfants de 9 à 14 ans, 36 kg) (Leblanc et al., 2005).

En Europe, les estimations moyennes de HgT dans les produits de la mer varient considérablement d'une matrice à l'autre et selon les pays, allant de 0,02 mg kg^{-1} en Suède à 1,08 mg kg^{-1} en Norvège pour les poissons et les produits de la mer (SCOOP 2004). Les apports journaliers en HgT suite à la consommation de produits de la pêche varient de 0,19 µg soit 0,4% de la DHTP aux Pays Bas à 13,10 µg soit 31% de la DHTP au Portugal (SCOOP 2004) ; les données les plus complètes fournies par l'Allemagne et le Royaume-Unis indiquent que les produits de la mer contribuent à environ 30% de la diète journalière en mercure (SCOOP 2004).

Ces estimations ne prennent pas en compte le MeHg, l'espèce mercurielle la plus toxique pour l'homme. Il y ait exposé, essentiellement par la consommation de produits de la pêche. Les valeurs de contamination le plus souvent disponibles ne comportant que des teneurs exprimées en mercure total, le calcul d'exposition au MeHg est généralement fondé sur des hypothèses simplificatrices qui considèrent que le pourcentage moyen de mercure présent sous forme méthylée dans la chair des poissons varie de 70 à 100 % du HgT (AFSSA 2002, Usydus et al., 2009, Ström et al 2010). Ces suppositions ont pourtant été remises en cause par plusieurs études (Ministère japonais de la santé 2003, Dabeka et al 2004, Forsyth et al 2004, Kuballa et al., 2010). Leurs résultats montrent que le MeHg peut représenter une part moindre dans la teneur totale en Hg chez certains poissons, ce qui souligne que l'utilisation d'un facteur de conversion fixe pour estimer les niveaux de MeHg à partir des teneurs en HgT peut ne pas fournir une estimation précise de l'exposition. Cela renforce la nécessité de quantifier directement les espèces Hg par des méthodes de spéciation justes et précises afin d'améliorer l'évaluation des risques de santé

En France, une seule estimation de l'exposition humaine à partir de données d'occurrence quantifiées directement en MeHg a été réalisée très récemment (Sirot et al., 2008). Cette étude consistait à dresser un bilan de l'apport nutritionnel et de l'exposition aux éléments traces (dont le MeHg) et aux polluants organiques persistants des forts consommateurs de poissons et d'autres produits de la mer, via leurs habitudes de consommations alimentaires, et à analyser le risque encouru, au regard des bénéfices nutritionnels de ces mêmes habitudes de consommation, notamment les apports en acides gras polyinsaturés. Le MeHg dans les poissons a été estimé variant entre 0,020 et 0,944 µg kg^{-1} selon la nature du poisson ou à un niveau moyen de 0,147 µg kg^{-1}. Comme escompté, les poissons prédateurs contiennent les plus fortes teneurs de MeHg avec 0,944 µg kg^{-1} pour l'espadon, 0,574 µg kg^{-1} pour l'empereur, 0,330 µg kg^{-1}pour le thon et 0,315 µg kg^{-1}pour l'anguille. Pour ces espèces, les teneurs de MeHg n'ont toutefois pas dépassé la teneur maximale autorisée de 1 mg kg^{-1} (CE 2008), ce qui est rassurant étant donné que ces résultats sont obtenus à partir d'échantillons composites. Les poissons présentant les plus faibles teneurs en MeHg sont l'anchois (0,020 µg kg^{-1}), le saumon (0,038 µg kg^{-1}) et le lieu noir (0,041 µg kg^{-1}). Le MeHg dans les mollusques a été estimé variant entre 0,003 et 0,219 µg kg^{-1} selon la nature du mollusque ou à un niveau moyen de 0,061 µg kg^{-1}. Les plus fortes teneurs ont été retrouvées dans le poulpe (0,219 µg kg^{-1}) et le crabe (0,175 µg kg^{-1}) et les plus faibles dans les oursins de mer (0,003 µg kg^{-1}), les coquilles Saint Jacques (0,007 µg kg^{-1}) et les huîtres (0,007 µg kg^{-1}).

L'apport journalier moyen en MeHg chez l'ensemble de la population forte consommatrice de poissons et d'autres produits de la pêche à l'exception de la femme en âge de procréer (moins de 45 ans) a été estimé à 0,65 µg (± 0,64 µg) soit 41% de la DHTP (± 40%). Chez la femme en âge de procréer, l'apport journalier moyen en MeHg a été estimé à 0,39 µg (± 0,29 µg) soit 24% de la DHTP (± 18%) (Sirot et al., 2008).

D'après l'AFSSA et l'autorité européenne de sécurité des aliments (AESA) (AFSSA 2003 et 2006, AESA 2004), des dépassements notables de la DHTP semblent envisageables, notamment chez les enfants et les femmes en âge de procréer. En France, l'avis de l'AFSSA stipule qu'environ 2,8% et 14,7% des enfants en bas-âge (1-30 mois) de la population seule consommatrice des produits de la pêche sont susceptibles d'être exposées à un niveau supérieur à la DHTP (AFSSA 2003). L'étude CALIPSO semble également confirmer cette tendance car près d'un tiers (35%) des forts consommateurs français de produits de la mer sont susceptibles de dépasser la DHTP du MeHg (Sirot et al., 2008). Toutefois, les estimations basées sur les données d'imprégnation s'avèrent plus rassurantes ; seuls 2% des individus excéderaient cette DHTP (Sirot et al., 2008).

IV. Conclusion

Le Hg est un élément présent dans l'ensemble des compartiments de l'environnement, à des formes et concentrations dépendant des apports naturels et anthropiques de Hg, des paramètres environnementaux (pH, paramètres physicochimiques régulant la réactivité et la mobilité des contaminants) et des activités biologiques des organismes et micro-organismes aquatiques. Le MeHg, la forme la plus toxique du Hg, a une forte capacité de bioaccumulation et bioamplification dans les organismes biologiques. Il peut ainsi se trouver dans les poissons prédateurs/piscivores à des concentrations un million de fois supérieures aux concentrations initialement absorbées par le plancton et le phytoplancton. Par la consommation de produits de la pêche, l'homme, en bout de chaîne alimentaire, y est ensuite exposé. Les organismes cibles sont le cerveau et le fœtus. Les effets neurotoxiques et tératogènes sont les plus facilement observables. Néanmoins, des doutes ont été levés quant à des effets cardio-vasculaires, immunitaires et cancérigènes.

Afin de protéger la population générale et les catégories les plus fragiles, des études cliniques et épidémiologiques ont été menées ainsi que des études d'exposition due à la consommation de produits de la pêche. Elles ont données lieu à des réglementations, à des valeurs toxicologiques de référence et à des recommandations de consommation de certains produits alimentaires. Il faut néanmoins garder à l'esprit que les valeurs de contamination actuellement disponibles sont principalement fondées sur des teneurs exprimées en HgT. Le but de ce travail de thèse a été de mettre en place et de valider une méthode d'analyse de spéciation du Hg dans les produits de la pêche afin de pouvoir disposer à l'avenir de teneurs réelles en MeHg dans les poissons et fruits de mer. Ces données pourront par la suite compléter les données en HgT pour une meilleure évaluation des risques d'exposition humaine au mercure.

Partie II : Optimisation de la méthode de spéciation du mercure dans les produits de la pêche par DID et GC-ICP-MS

I. Introduction

Cette partie est consacrée aux principes des méthodologies utilisées et au développement d'une méthode d'analyse de spéciation des différents composés mercuriels par double dilution isotopique et couplage GC-ICP-MS qui ont fait l'objet de deux articles. Le premier (Article I) a été soumis au journal « International Journal of Environmental Analytical Chemistry ». Le second (Article II) a été accepté par la revue « Analytical and Bioanalytical Chemistry». Après avoir justifié le choix analytique retenu en détaillant l'état de l'art de la spéciation du mercure ainsi que le choix de la méthode d'extraction, nous exposerons les aspects théoriques et pratiques de l'optimisation des paramètres de séparation et de détection des espèces mercurielles et nous présenterons l'optimisation des paramètres analytiques pour la préparation des échantillons (marquages isotopiques, extraction, dérivation) dans les produits de la pêche et le traitement des données (selon trois techniques de quantification différentes). Puis, nous exposerons l'évaluation des performances analytiques lors de la validation de la méthode suivant deux normes françaises : l'ancienne NF V03-110 de 1998 (AFNOR 1998) et la nouvelle NF V03-110 de 2010 (AFNOR 2010).

II. Spéciation du mercure dans les produits de la pêche : état de l'art

Au cours des dernières décennies, de nombreuses revues de synthèse abordant la spéciation du Hg ont été publiées (Cano-Pavon et al, 1999, Carro et Mejuto, 2000, Harrington, 2000, Bouyssiere et al., 2002, Siepak et Boszke, 2004, Leermakers et al., 2005, Stoichev et al., 2006, Bjorn et al., 2007). Les méthodes analytiques développées font intervenir toutes sortes de techniques de préparation d'échantillon (solide-liquide (SLE), extraction assistée par micro-ondes (MAE), micro-extraction sur phase solide (SPME), etc.) (Sparr Eskilsson et Bjorklund, 2000, Gomez-Ariza et al., 2001, Diez et Bayona, 2008, Issaro et al., 2009), de séparation (chromatographie en phase gazeuse (GC), chromatographie en phase liquide (HPLC), etc.) (Carro et Mejuto, 2000, Harrington, 2000) et de détection (spectrophotométriques, spectroscopies atomiques, spectrométrie de masse (MS), etc.) (Lobinski et Adams, 1997, Bjorn et al., 2007). L'apparition de la spectrométrie de masse couplée à un plasma induit (ICP-MS) dans les années 90 a permis d'améliorer considérablement les performances analytiques et la qualité des mesures. La lecture de l'ensemble de ces travaux montre que l'utilisation d'une séparation par GC et d'une détection par ICP-MS est le couplage le plus répandu, en raison de ses capacités multi-élémentaires, de sa large gamme dynamique et de sa capacité à mener des analyses en dilution isotopique (ID) (Lobinski et Adams, 1997, Bouyssiere et al 2002, Wuilloud et al., 2004, Bjorn et al., 2007, Popp et al., 2010).

La mise en œuvre d'une technique d'analyse des espèces organomercurielles requiert des procédures qui comportent typiquement les étapes suivantes : extraction et/ou enrichissement de la matrice, dérivation, nettoyage (si nécessaire), séparation chromatographique et détection sélective. Chaque étape reste critique pour la justesse et la comparabilité des résultats finaux (Leermakers et al 2005). Les exigences requises pour déterminer la spéciation du Hg dans les matrices environnementales et biologiques sont très rigoureuses, nécessitant des limites de quantification (LQ) de l'ordre du ng L^{-1} ou du µg kg^{-1}, une spécificité importante pour éviter les interférences de la matrice tout en permettant la détermination simultanée des différentes espèces d'intérêt, une excellente justesse et fidélité (répétabilité et reproductibilité).

Il convient de noter qu'il n'existe, à notre connaissance, aucune méthode de spéciation du Hg normalisée ou validée en inter- et intra-laboratoire(s) en France et que par conséquent, il existe un réel besoin concernant le développement d'une méthode validée voire normalisée au niveau international, pour la production de données fiables des teneurs en MeHg dans les aliments. Il existe une methode normalisée américaine nommée « EPA Method 6800: elemental and speciated isotope dilution mass spectrometry » mais celle-ci n'est pas spécifique au mercure (EPA 6800).

II.1 Méthode de préparation d'échantillon

En amont de la séparation et de la détection des espèces mercurielles, une étape d'extraction pour la mise en solution des espèces du mercure contenues dans des 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.

Différentes méthodes d'extraction ont été envisagées dans la littérature pour la mise en solution des espèces mercurielles dans les aliments et les matrices biologiques et de nombreux articles de synthèse bibliographiques généralement exhaustifs se sont intéressés aux différentes méthodes d'extraction utilisées pour la détermination en spéciation des métaux lourds (dont le Hg) (Gomez Ariza et al., 2001, Baltussen et al., 2002, Diez et Bayona, 2008, Issaro et al., 2009). Les tableaux 6 à 9 présentent l'ensemble de ces études publiées depuis 1995 en distinguant principalement 4 méthodes : extraction solide-liquide (SLE), extraction assistée par micro-ondes (MAE), extraction assistée par sonication (SAE) et autres méthodes alternatives telles que la micro-extraction sur phase solide (SPME). Les réactifs utilisés et les matrices étudiées sont également indiqués dans ces tableaux. La signification des nombreuses abréviations utilisées, indispensables pour alléger ces tableaux, est indiquée dans la liste des abréviations.

II.1.1 Extractions solide/liquide (SLE)

Le premier protocole de SLE (Tableau 6) utilisé pour l'analyse du MeHg a été développé en 1966 par Westöö (Westöö, 1968, Cano-Pavon et al., 1999). Ce protocole consistait en une extraction acide des analytes par HCl suivi d'une extraction par le benzène. L'analyte était ensuite hydroxylé par une solution d'hydroxyde d'ammonium saturée en sulfate de sodium. Pour une séparation des composés mercuriels par chromatographie en phase gazeuse (GC), le mélange aqueux était acidifié par du HCl concentré et les analytes étaient extraits une nouvelle fois par le benzène. La majorité des procédures analytiques développées par la suite pour l'extraction acide du MeHg est basée sur la méthode de Westöö et a des rendements d'extraction compris entre 50 et 80%, à l'exception des travaux de Taylor et al. (2008) qui obtient un rendement d'extraction du MeHg de 101% après extraction acide par HNO_3. Ces taux de récupération généralement insuffisants s'expliquent par une hydrolyse partielle des tissus biologiques sous condition acide selon Lobinski et al. (1998).

Un intérêt croissant pour le développement d'une méthode permettant de déterminer simultanément les teneurs en iHg et en MeHg dans les poissons a été à l'origine de nouvelles

méthodes d'extraction. Plusieurs études utilisant des extractions alcalines par KOH/MeOH et par TMAH ont indiqué des taux de récupération en MeHg pouvant atteindre 97% (Ebdon et al., 2002, Qvarnstrom et Frech, 2002, Hintelmann et Nguyen, 2005, Yin et al., 2008, Kuballa et al, 2009). Les extractions alcalines sont désormais plus utilisées que les extractions acides car elles hydrolysent totalement les tissus biologiques en conservant les liaisons C-Hg intactes.

Tableau 6 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction SLE pour les matrices biologiques

Solvant (composition, volume)	Durée (min)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Taux de récupération (%)	Références
TMAH (2 ml, 25% m/v)	180	50 - 200	TORT-1, DOLT-2, DORM-1	100 (MeHg)	Liang et al., 1996
TMAH (25% m/v)	-	50	DORM-2, BCR-464	-	Leenaers et al., 2002
TMAH (2 ml , 25% m/v)	180	500	Poissons et produits de la mer	91 ± 19 (MeHg)	Kuballa et al., 2009
KOH/MeOH (20 ml, 25% m/v)	300	250	DORM-2	-	Yang et al., 2003a
KOH/MeOH (5 ml, 20% m/v)	-	20	DORM-2, TORT-2, NIST-1566b	96 ± 7 (MeHg)	Hintelmann et Nguyen, 2005
KOH (1,5 ml, 6M)	720	250	DORM-2, poissons et fruits de mer	91 - 102 (MeHg)	Li et al., 2008
KOH/MeOH (2 ml, 25% m/v)	720	200	DORM-2	103 (MeHg), 87 (EtHg), 75 (PhHg)	Yin et al., 2008
HCl (100 µl), NaCl (15 ml, saturée)	-	300	DOLT-2	-	Garcia Fernandez et al., 2000
HCl (5 ml)	-	1500	DOLT-2	-	Silva da Rocha et al., 2001
HNO_3 (2 ml)	-	50	DORM-2, TORT-2, NIST-2976, BCR-414, NIST 1566b	101 (MeHg), 98 (HgT)	Taylor et al., 2008
H_2O/MeOH (50% m/v), 2-mercaptoéthanol (0,01% m/v)	1440	-	DORM-2, BCR-464	-	Clough et al., 2005
2-mercaptoéthanol (0,1% m/v), KCl (0,15% m/v), HCl (0,1% v/v)	720	100	NIST-SRM-981, IAEA-436, DOLT-3	-	Wang et al., 2007

Même si les méthodes SLE classiques ont montré leur relative efficacité pour l'extraction des espèces mercurielles dans les matrices biologiques, elles restent néanmoins longues à mettre en œuvre et requièrent une importante consommation de solvant organique. L'utilisation d'appareil tel qu'un *digi*PREP permet toutefois de diminuer la durée d'extraction (2-3 h au lieu de 12-24h) (Gomez-Ariza et al., 2001). De plus, afin d'éliminer les matériaux insolubles, une étape supplémentaire de centrifugation-filtration ou de sonication est souvent inévitable et pourrait être responsable du tiers des erreurs expérimentales (Lobinski et al., 1998).

II.1.2 Extractions assistée par sonication (SAE)

De nombreux travaux effectués depuis 1995 utilisent la méthode d'extraction « classique » liquide-solide assistée par ultra sons (SAE) (Tableau 7).

Tableau 7 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction SAE pour les matrices biologiques

Solvant (composition, volume)	Durée (min)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Taux de récupération (%)	Références
TMAH (3 ml, 25% m/v)	60	20 - 100	TORT-1, TORT-2, DOLT-2, DORM-1	94 - 106 (MeHg)	Ebdon et al., 2002
TMAH (2 - 5 ml)	60 - 120	50 - 300	DOLT-2, TORT-1	-	Qvarnstrom et Frech, 2002
KOH/MeOH (20 ml, 25% m/v)	180	100 - 200	DORM-1, DORM-2	100	Cai et Bayona, 1995
KOH/MeOH (3 ml, 25% m/v)	180	20 - 100	TORT-1, TORT-2, DOLT-2, DORM-1	94 - 106 (MeHg)	Ebdon et al., 2002
KOH/MeOH (20 ml, 25% m/v) ou HCl (1 ml, 6M)	120, ou 5	50	CRM-7402a	-	Inagaki et al., 2008
KOH/MeOH (2 ml)	60	500	Poissons et produits de la mer	91 ± 19 (MeHg)	Kuballa et al., 2009
HCl (0,2 ml)	40	50	TORT-2, DOLT-2, BCR-463	90 (MeHg)	Tu et al., 2000
HCl (5 ml, 6M)	30	500	BCR-710, IAEA-350	-	Ipolyi et al., 2004
HCl (2 ml)	60	500	Poissons et produits de la mer	91 ± 19 (MeHg)	Kuballa et al., 2009
HCl (7M) ; protease type XIV (15 mg) + 2-mercaptoethanol (2.5% v/v)	5	50	CRM-463, moules, poisons zèbre	81-90	Lopez et al., 2010
HCl (10 ml, 0,10 % v/v) + L-cysteine (0,05% m/v) + 2-mercaptoethanol (0,10% v/v).	15	200	DOLT-3, Produits de la pêche	100	Batista et al., 2011
HAc (2 ml)	120	500	Poissons et produits de la mer	91 ± 19 (MeHg)	Kuballa et al., 2009
H_2SO_4 (0,5 ml)	30	100 - 500	Poissons et produits de la mer	-	Wilken et Falter, 1998

La sonication repose sur un phénomène de cavitation dont le fonctionnement a été expliqué pour la première fois en 1894 par Sir John Thornycroft et Sydney W. Barnaby. Le phénomène de cavitation consiste en la formation de cavités gazeuses dans un liquide où la pression en un lieu donné devient inférieure à celle de la vapeur de ce liquide, il y a donc un effondrement violant des bulles dans le liquide irradié (température = 4000 K, pression = 200 bar). L'utilisation de températures et pressions extrêmes causées par l'effondrement des bulles de vapeur fait que la SAE augmente la solubilité et la diffusion du mélange, favorisant la pénétration et le transport des analytes d'une phase vers l'autre. Ce phénomène combiné à l'énergie d'oxydation des radicaux libres formés par solvolyse explique la puissance et l'efficacité de la SAE (Luque-Garcia et al., 2003, Capelo-Martinez et al., 2004).

Autant d'extractions alcalines que d'extractions acides sont dénombrées, avec toutefois une nette préférence pour le TMAH, le mélange KOH/MeOH et l'HCl comme solvant d'extraction. Des taux de récupération légèrement plus élevés sont observés avec des extractions alcalines (100% en moyenne pour les extractions alcalines contre 91% pour les extractions acides) (Wilken et Falter 1998, Kuballa et al 2009, Lopez et al., 2010, Batista et al., 2011). Enfin, elles sont relativement rapides et moins consommatrices de solvant que la SLE.

Le principal inconvénient de la SAE est son manque de robustesse et de répétabilité. L'utilisation d'un bain d'ultrasons ne permet pas une distribution uniforme de l'énergie dans l'ensemble de l'échantillon, l'extraction peut donc être incomplète et non répétable (Capelo-Martinez et al., 2004). Les sondes sont plus performantes car la puissance des ultrasons est localisée, le volume d'échantillon est plus petit et le temps d'extraction est de quelques minutes, mais elles tendent à détruire les composés organométalliques et donc les risques de modification des espèces naturelles de l'échantillon sont non négligeables. Enfin, une étape de filtration est obligatoire après l'extraction, ce qui allonge le temps de préparation de l'échantillon (Luque-Garcia et al., 2003, Capelo-Martinez et al., 2004).

II.1.3 Extractions assistée par micro-ondes (MAE)

Le plus grand nombre des travaux effectués pour la détermination du Hg dans les produits de la pêche utilisent une méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE), avec une préférence pour l'extraction alcaline par le TMAH (Lobinski et al., 1998, Martin-Doimeadios et al., 2002, Arleny et al., 2007, Point et al., 2007, Monperrus et al., 2008) (Tableau 8).

Tableau 8 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction MAE pour les matrices biologiques

Solvant (composition, volume)	Durée (min)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Taux de récupération (%)	Références
TMAH (5 ml, 25% m/v)	20	200	CRM-464	-	Gerbersmann et al., 1997
TMAH (5 ml, 25% m/v)	1-4	100-500	CRM-463, DORM-1, TORT-1	102	Tseng et al., 1997
TMAH (5 ml, 25% m/v)	2,5	100-200	BCR-463	-	Lobinski et al., 1998
TMAH (5 ml, 25% m/v)	2	100-500	BCR-463, DORM-1, TORT-1	100	Tseng et al., 1998
TMAH (4 ml, 25% m/v)	3	100	TORT-1	-	Wasik et al., 1998
TMAH (5 ml, 25% m/v)	2,5	100 - 200	DORM-1, TORT-1	-	Slaets et al., 1999
TMAH (5 ml, 25% m/v)	2,5	200	DORM-1, CRM-463	100 (MeHg)	Martin-doimeadios et al., 2002
TMAH (5 ml, 25% m/v)	2	500	BCR-710	-	Monperrus et al., 2003
TMAH (2 ml, 25% m/v)	10	200	DORM-2, DOLT-3	92 - 105 (MeHg, iHg)	Berzas Nevado et al., 2005
TMAH (3 ml, 25% m/v)	4	100	Anguilles jaunes	-	Arleny et al., 2007
TMAH (3 ml, 25% m/v)	4,5	100	SRM 1947 et 1974b	-	Davis et al., 2007
TMAH (3,5 ml, 25% m/v)	4	250	DORM-2	107 (MeHg)	Garraud et al., 2007
TMAH (3 ml, 25% m/v)	3,5	200 - 250	SRMs 1566b, 2976, 1974a, 1974b	-	Point et al., 2007
TMAH (5 ml, 25% m/v)	4	200 - 250	CRM-463, CRM-464, IMEP-20	83 - 100 (MeHg)	Vidler et al., 2007
TMAH (5 ml, 25% m/v)	3	500	BCR-710	-	Monperrus et al., 2008
TMAH (5 ml, 25% m/v) ou KOH/MeOH (m/v)	2-4	100 - 500	CRM-463, DORM-1, TORT-1	102 (MeHg)	Tseng et al., 1997
6 mL KOH/MeOH 25%(m/v)	3	150	TORT-2, BCR-463	95 (MeHg)	Ramalhosa et al., 2001
TMAH (0,3 ml, 25% m/v) + eau MilliQ (2,7 ml) ; KOH/MeOH (2 ml, 25% m/v) ; ou HCl (2 ml, 5M)	20	300	DOLT-1, IMEP-20	97-99	Serofimovski et al., 2008
HNO_3 + MeOH/DDW (50%v/v), 2-mercaptoéthanol (0,01% m/v)	2	150	NIST 2710, DORM-2	50 (MeHg)	Clough et al., 2003
HNO_3/H_2O_2 (v/v)	30	400	BCR-463, CCQM-P39	-	Lee et Suh, 2005

Solvant (composition, volume)	Durée (min)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Taux de récupération (%)	Références
HCl (6 M)	5-15	200	DORM-1	100	Vazquez et al., 1999
HCl (10 ml, 3M)	10	200	TORT-1, DOLT-1, DORM-2, BCR-464	100 - 104 (MeHg)	Rodil et al., 2002
HCL (10 ml, 5M) + NaCl (0,25 M)	10	500	BCR-464, DOLT-3, and NIST 1946	100-120 (MeHg), 80-90 (iHg)	Reyes et al., 2009
HAc (5 ml)	10	50	SRM-1566b, 2977, 1946	-	Davis et al., 2004
HAc (17 M) + toluène (5-15 ml)	2-10	100	BCR-464, BCR-463	78-100 (MeHg)	Abuin et al., 2000
L-cystéine (25 ml, 0,05% m/v) + 2-mercaptoéthanol (0,05% m/v)	2	250	DORM-2	-	Chiou et al., 2001
2-mercaptoethanol, L-cysteine	3	150	DOLT-3, DORM-2	94-99	Chang et al., 2007

La MAE consiste à utiliser les propriétés de certains composés (solvants caractérisés par une constante diélectrique plus faible que la matrice considérée et relativement transparents 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'intérêts vont alors être solubilisés dans le solvant en un minimum de temps (Paré et al., 1994, Bélanger et Paré 2006).

La MAE permet de réduire significativement le temps conventionnel des SLE (de plusieurs heures à quelques minutes). En contrepartie, les échantillons doivent supporter d'importantes températures et pressions, ce qui peut provoquer leur destruction totale ou partielle (Szpunar et al., 1996). D'après l'étude de comparaison entre plusieurs méthodes d'extraction menée par Skip Kingston et al. (2008) sur le matériau de référence certifié BCR-464 (tissu de thon), l'extraction alcaline par MAE et TMAH présente le meilleur compromis en terme de rendement d'extraction, transformations inter-espèces engendrées (méthylation et déméthylation) et temps d'extraction, par rapport aux autres techniques d'extraction telles que l'extraction enzymatique, l'extraction acide ou la SAE.

II.1.4 Méthodes alternatives

La majorité des techniques alternatives a été décrite ou redécouverte dans les années 1990 et a fait l'objet de revues complètes et exhaustives (Gomez-Ariza et al., 2001, Baltussen et al., 2002, Diez et Bayona, 2008). Les méthodes telles que l'extraction en fluide supercritique (SFE), l'extraction par liquide pressurisé (PLE), l'extraction par sorption sur barreau magnétique (SBSE), la micro-extraction sur une goutte (SDME), etc. sont principalement axées sur l'analyse de matrices environnementales et/ou portent sur d'autres métaux que le Hg (étain et arsenic principalement).

La méthode alternative la plus rencontrée dans la littérature pour l'analyse en spéciation du Hg dans les produits de la pêche est la micro-extraction sur phase solide (SPME). L'extraction la plus souvent utilisée avant SPME est la SLE alcaline par le KOH-MeOH mais les trois modes d'extraction décrits précédemment (SLE, MAE SAE) sont utilisés (Cai et Bayona, 1995, Grinberg et al., 2003, Yang et al., 2003a) (Tableau 9).

Tableau 9 : Récapitulatif des principales méthodes d'extraction suivie d'une SPME pour les matrices biologiques

Technique extraction	Solvant (composition, volume)	Durée (min)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Taux de récupération (%)	Références
SLE	KOH/MeOH (25 mL , 25% m/v)	240	250	DOLT-2, TORT-2, DORM-2	94 - 100 (MeHg, EtHg, iHg)	Grinberg et al., 2003
SLE	KOH/MeOH (20 mL , 25% m/v)	240	250	DOLT-2, DOLT-3, DORM-2	-	Yang et al., 2003b
SLE	KOH/MeOH (20 mL , 25% m/v)	720	400	CCQM-K43, CCQM-P39	-	Yang et Sturgeon, 2005
SLE	KOH/MeOH (10 ml, 25% m/v)	120-300	200	DORM-2	100 (MeHg)	Carrasco et al., 2007
SLE	KOH/MeOH (10 ml, 25% m/v)	180	200	DORM-2, carpe	80 (MeHg)	Carrasco et al., 2009
SLE	HCl (5 ml, 3M) + NaCl (30 ml, saturée)	60	250	DORM-2, DOLT-2	-	Mester et al., 2000
SLE	HCL (3 ml, 2M)	50	400	DORM-2, BCR-464	-	Fragueiro et al., 2004
SLE	HCl (100 µl), NaCl (15 ml, saturée)	300	400	BCR-464, CCQM-P39	-	Centineo et al., 2006
SAE	KOH/MeOH (20 mL , 25% m/v)	180	100-200	DORM-1, DORM-2	30 (MeHg)	Cai et Bayona, 1995
SAE	KOH/MeOH (5 ml, 25% m/v) ou NaOH/MeOH (5 ml, 18% m/v)	180	250	BCR-464, TORT-2, BCR-710	92-95 (MeHg)	Jokai et al., 2005

Technique extraction	Solvant (composition, volume)	Durée (min)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Taux de récupération (%)	Références
SAE	KOH (10-20 ml, 25% m/v)	30	300-800	IAEA-142/TM, poissons, crabes, crevettes, bivalves	-	Mishra et al., 2007
MAE	HCl (10 ml, 3M)	10	200	TORT-1, DOLT-2, DORM-2, CRM-463	100 - 104 (MeHg)	Rodil et al., 2002
MAE	TMAH (5 ml, 25% v/m)	5	300	DORM-2, BCR-710, CRM-477	121 (iHg)	Jitaru et al., 2004
MAE	TMAH (3 ml, 25% m/v)	5	100-300	SRM 1947, 1974b	-	Davis et al., 2007

La SPME permet essentiellement de concentrer les analytes sur la fibre de l'aiguille SPME et de gagner en temps de préparation des échantillons, en permettant de combiner en une seule étape (allant de 5 à 30 min) la dérivation, le transfert de phase et l'injection de l'échantillon dans le GC. De plus, la SPME offre la possibilité d'un système automatisé (Grinberg et al., 2003, Yang et al., 2003b, Yang et Sturgeon, 2005, Carrasco et al., 2007 et 2009).

Par contre, cette technique est peu reproductible en raison d'une perte en stabilité des espèces causées par l'utilisation de pressions et/ou températures extrêmes, du très faible volume injecté (1 µL) et de sa phase stationnaire facilement dégradée (Mester et Sturgeon 2005). A l'exception de Carrasco et al. (2009) qui présente un rendement d'extraction de 80%, l'efficacité de la combinaison SLE par KOH-MeOH et SPME est parfaitement satisfaisante, avec des taux de récupération de l'ordre de 100% (Grinberg et al., 2003, Carrasco et al., 2007 et 2009).

II.1.5 Conclusion

MAE et SAE sont les techniques d'extraction les plus utilisées car elles permettent d'atteindre généralement des taux de récupération de plus de 95%. De plus, pour les extractions alcalines, les taux de transformations non-intentionnelles des espèces sont diminués de 6% par rapport aux autres techniques d'extraction (Skip Kinston et al., 2008). La MAE est d'avantage utilisée que la SAE car elle est plus robuste et plus facilement contrôlable. Notre choix se portera sur cette dernière technique d'extraction en milieu alcalin avec du TMAH (5 ml, 25% v/m) assisté par MAE.

II.2 Méthode de séparation et de détection

La majorité des techniques courantes d'analyses de spéciation du Hg est basée sur des couplages associant une technique de séparation adaptée à un détecteur spécifique (Carro et Mejuto, 2000, Cornelis et al., 2005, Leermakers et al., 2005). La chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (CGC) et la chromatographie liquide haute performance (HPLC) sont les techniques de séparation les plus utilisées (Carro et Mejuto, 2000, Szpunar et al., 2000, Cornelis et al., 2003).

II.2.1 Séparation par chromatographie liquide haute performance

Selon la littérature, la technique de séparation par HPLC permet de séparer les composés mercuriels avec une grande efficacité et en des temps d'analyse satisfaisants (Carro et Mejuto, 2000, Harrington, 2000, Boszke, 2005). Les deux principaux avantages de cette technique de séparation par rapport à la GC sont qu'elle ne requiert pas de dérivation des analytes et permet une injection directe des échantillons, à température ambiante. Selon les conditions de pH, les espèces mercurielles peuvent être cationiques, anioniques ou neutres, permettant leur séparation par chromatographie liquide échangeuse d'ion, à exclusion stérique ou par appariement d'ions en phase inversée. La phase mobile d'élution est généralement constituée d'un modificateur organique (méthanol et/ou acétonitrile le plus souvent), d'un agent chélateur ou d'appariement d'ion et dans quelques cas, d'une solution tampon (Harrington, 2000, Michalke, 2003, Percy et al., 2007).

La majorité des méthodologies HPLC reportées dans la littérature pour la spéciation du Hg utilise une séparation sur phase stationnaire inversée (« *Reverse Phase* » ou RP) et une élution en mode isocratique.

II.2.2 Les détecteurs de spectrométrie atomique couplés à l'HPLC

Le tableau 10 présente les principales études publiées en mode isocratique depuis 2001 en distinguant les matrices étudiées, les espèces séparées ainsi que les détecteurs employés et les limites de détection obtenues. A notre connaissance, le mode gradient est peu utilisé pour les matrices biologiques (Bramanti et al., 2005, Yin et al., 2008).

Afin de rendre les méthodes plus aisément comparables entre elles, les limites de détection absolues ont été préférées aux valeurs relatives, voire calculées afin d'éviter de faire intervenir les facteurs de dilution ou de concentration dus aux traitements de l'échantillon. Les temps de rétention 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.

Tableau 10 : Principales méthodes de HPLC-spectrométrie atomique pour les matrices biologiques

Matrices analysées	Espèces séparées (tr min)	Détecteur	LDa (pg Hg)	Références
DOLT-2, TORT-2	iHg (1,2), MeHg (3,8)	CV-AAS	1,7 - 3,4	Qvarnstrom et Frech, 2002
TORT-2, BCR-463	iHg (24), MeHg (19)	CV-AFS	0,010 ± 0,002	Ramalhosa et al., 2001
DORM-2	iHg (6,5), MeHg (5,2), EtHg (8,3), PhHg (10,5)	CV-AFS	0,30 - 0,17	Liang et al., 2003
Poisson	iHg, HgT	CV-AFS	200	Gill et al., 2004
DORM-2	iHg (3,7), MeHg (6), EtHg (9), PhHg (11)	CV-AFS	16-20	Bramanti et al., 2005
DORM-2	iHg (11,2), MeHg (6,1), EtHg (7,7), PhHg (9,5)	CV-AFS	0,019 – 0,027	Li et al., 2005
zooplancton	iHg, Mehg, EtHg, PhHg	CV-AFS	0,08 – 0,43	Margetinova et al., 2008

La CV-AAS et la CV-AFS sont deux techniques populaires pour l'étude de la spéciation du Hg par HPLC, avec une préférence marquée pour la détection par CV-AFS (Ramalhosa et al 2001, Liang et al 2003, Gill et al 2004, Bramanti et al 2005, Li et al 2005, Margetinova et al 2008). Cependant, la faible sensibilité de cette dernière technique (ng, sub-ng), combinée à d'importants effets de mémoire, la rend parfois inadapté pour l'analyse d'éléments à l'état de traces. Par conséquent, il est nécessaire de travailler avec la sensibilité maximale de l'appareil, ce qui génère un important bruit de fond sur l'ensemble du chromatogramme.

II.2.3 Les détecteurs de spectrométrie de masse couplés à l'HPLC

Le tableau 11 présente les principales études publiées depuis 1993 qui utilisent un couplage HPLC-spectrométrie de masse (Huang et Jiang, 1993, Clough et al., 2003, Vidler et al., 2007, Skip Kingston et al., 2008, Reyes et al., 2009, Batista et al., 2011).

Tableau 11 : Principales méthodes de HPLC-spectrométrie de masse pour les matrices biologiques

Matrices analysées	Espèces séparées (tr min)	Détecteur	LDa (pg Hg)	Références
DORM-1	iHg (7,6), MeHg (5,9), EtHg (12,3)	ICP-MS	70 – 160	Huang et Jiang, 1993
DORM-2	iHg (4,2), MeHg (2,8), EtHg (5,7)	ICP-MS	1,25 – 2,25	Chiou et al., 2001
DOLT-2, TORT-1	iHg, MeHg	ICP-MS	0,001 – 0,005	Qvarnstrom et Frech, 2002
DORM-2, NIST RM-50	iHg (1,3), MeHg (1,8)	ICP-MS	2,5	Rai et al., 2002
DORM-2, NIST-2710	iHg	ICP-MS	-	Clough et al., 2003
GBW 07601 IAEA MA-B-3/TM	iHg, MeHg	ICP-MS	-	Wang et al., 2005
SRM-1946	iHg (1,84), MeHg (3,21), EtHg (7,6)	ICP-MS	0,002 – 0,004	Hight et Chen, 2006
BCR-463, BCR-464, IMEP-20, NIES 13	iHg (2,8), MeHg (3,3)	ICP-MS	60 – 75	Vidler et al., 2007
DOLT-3, DORM-2	Hg^{2+}, MeHg, EtHg	ICP-MS	0,001 – 0,002	Chang et al., 2007
BCR-464	iHg (3,0), MeHg (1,9)	ICP-MS	0,046 – 0,086	Skip Kingston et al., 2008
Bonite	iHg (13.5), MeHg (6.2), EtHg (9), PhHg (8.3)	ICP-MS	0,12-0,26	Chen et al., 2009
BCR-464, DOLT-3, NIST 1946	iHg, Hg T MeHg	ICP-MS	0,002	Reyes et al., 2009
Moules, espadon, poissons zèbre	iHg (3,6), MeHg (5,6)	ICP-MS	-	Lopez et al., 2010
Produits de la pêche	iHg (0,7), MeHg (1,1)	ICP-MS	-	Batista et al., 2011

La grande limitation du couplage HPLC-ICP-MS est sa sensibilité. Celle-ci est limitée en raison de la faible efficacité de nébulisation de l'échantillon et de la présence d'importantes quantités de carbone ou de sels dans la phase mobile (Ponce de Leon et al., 2002, Caruso et al., 2003, Leermakers et al., 2005). La LD que peut atteindre le couplage HPLC-ICP-MS est de l'ordre du $pg.L^{-1}$ – $ng.L^{-1}$, alors qu'une LD de l'ordre du $fg.L^{-1}$ – $pg.L^{-1}$ est systématiquement atteinte par les couplages GC (Kot, 2000). En plus, le plasma est instable face aux vapeurs organiques et il existe des interférences polyatomiques telles que C-Ar ou $ArCl^{+}$. Pour parer à ce manque de sensibilité, l'échantillon peut être introduit sous forme de vapeurs froides mais cela ajoute une étape supplémentaire dans la préparation d'échantillon et donc annule le principal avantage de la HPLC par rapport à la GC, qui est une préparation d'échantillon plus simple (Leermakers et al., 2005, Vereda Alonso et al., 2008).

II.2.4 Séparation par chromatographie en phase gazeuse

A.J.P. Martin et A.T. James annoncèrent officiellement la naissance de la chromatographie en phase gazeuse en 1952. Cette technique a pris son essor en 1957 avec l'invention de la colonne capillaire par M.J.E. Golay. Suivi alors la création des détecteurs à ionisation de flamme (FID) en 1958 et des détecteurs à capture d'électron (ECD) en 1960. Plus récemment, la GC connaît un important succès dans le domaine de l'analyse en spéciation avec plusieurs revues qui ont répertorié les différents détecteurs couplés à la GC ainsi que les travaux réalisés pour la détermination d'éléments d'intérêt et de leur spéciation dans diverses matrices biologiques ou environnementales (Lobinski et Adams, 1997, Carro et Mejuto, 2000, Bouyssiere et al., 2002, Wuilloud et al., 2004, Popp et al., 2010).

La GC est la technique de séparation la plus utilisée pour la détermination des composés méthylés du Hg. Elle a une excellente sensibilité car l'échantillon est introduit dans sa totalité et sous forme de gaz dans le détecteur et possède un plus grand pouvoir de résolution que les autres techniques de séparation (HPLC, électrophorèse capillaire, séparation par fluide supercritique). Pour augmenter la stabilité thermique des composés ioniques organométalliques, ces derniers doivent être convertis par une réaction de dérivation en composés volatils non-polaires. Le choix du réactif de dérivation dépend de la nature de l'espèce à dériver, de sa concentration et de la matrice étudiée (Cano-Pavon et al., 1999, Carro et Mejuto, 2000, Leermakers et al., 2005).

La dérivation des espèces mercurielles par butylation par le chlorure de magnésium butylé (BuMgCl) ou par génération d'hydrure par le borohydrure de sodium ($NaBH_4$) ont été fréquemment utilisées par le passé. La dérivation par BuMgCl n'est que très peu utilisée à présent car la procédure de préparation d'échantillon est longue. En effet, cette dérivation ne peut se faire qu'en milieu anhydre, il faut donc procéder à plusieurs transferts de phase, ce qui impacte sur les taux de récupération (50% en moyenne) (Quevauviller, 1996, Emteborg et al., 1999, Garcia Fernandez et al., 2000, Snell et Quétel, 2005). La dérivation par le $NaBH_4$ est la moins couteuse et la plus rapide par rapport à l'ensemble des autres techniques de dérivation (Tseng et al., 1997 et 1998). Cependant, le $NaBH_4$ est peu utilisé en couplage GC-ICP-MS, méthode d'analyse la plus utilisée en spéciation du Hg, car les composés mercuriels hydrurés ont une stabilité thermique limitée (la température du plasma est trop élevée). De plus, les hydrures sont prompts aux interférences avec les autres métaux lourds et le $NaBH_4$ à une efficacité limitée sur les échantillons réels.

Les réactifs alkylés sont actuellement les réactifs de dérivation les plus utilisés car la dérivation a lieu en milieu aqueux, milieu naturel de la majeure partie des échantillons biologiques (Lobinski et Adams, 1997, Tseng et al., 1997). Le tétraéthylborate de sodium ($NaBEt_4$) est le réactif le plus populaire car très commercialisé et donc bon marché (Wasik et al., 1998, Slaets et al., 1999,

Martin-Doimeadios et al., 2002, Krystek et Ritsema, 2004, Point et al., 2007, Kuballa et al., 2009). Néanmoins, il manque de spécificité car le iHg et l'ethylmercure (EtHg) ont la même forme éthylée (Et_2Hg). Il permet donc d'analyser uniquement le MeHg. Enfin, sa pureté est parfois insatisfaisante ; la présence d'impuretés métalliques a été observée dans certains lots (Garcia Fernandez et al., 2000, Leermakers et al., 2005). Le tétrapropylborate de sodium ($NaBPr_4$) est de plus en plus sélectionné car il est plus pur, aussi efficace que $NaBEt_4$ et il permet d'analyser toutes les espèces mercurielles (Yang et al., 2003b, Monperrus et al., 2004 et 2008, Arleny et al., 2007, Carrasco et al., 2009). Par contre, étant moins abordable à l'achat, il est donc le plus souvent synthétisé en laboratoire. Comme pour le $NaBEt_4$, le pH de dérivation doit être compris entre 4,5 et 5 sinon la dérivation n'est pas efficace et dans le cas du $NaBPr_4$, le réactif peut se décomposer totalement ou partiellement (Huang, 2005). Enfin, le tétraphénylborate de sodium ($NaBPh_4$) est le troisième réactif alkylé le plus utilisé (Abuin et al., 2000, Grinberg et al., 2003, Davis et al., 2004, Inagaki et al., 2008, Chung et Chang, 2010). Certains le préféreront aux autres réactifs alkylés car il est le plus stable en solution aqueuse et donc une préparation journalière de la solution de dérivation n'est pas nécessaire. Le $NaBPh_4$ est moins cher que le $NaBEt_4$ et le $NaBPr_4$ et le pH de dérivation peut s'étendre de 4 à 10. De plus, les importants temps de rétention des composés phénylés offrent une séparation plus nette entre le pic de solvant et les espèces phénylées. En contrepartie, la séparation des différentes espèces est plus longue. Ce réactif est le moins utilisé car il est généralement peu connu.

Les colonnes multi-capillaires ont longtemps été utilisées puis abandonnées en raison de leurs réponses faibles et peu reproductibles, de la taille démesurée des pics et de leur manque de sélectivité (Lobinski et al 1997 et 1998, Carro et Mejuto 2000, Bouyssiere et al 2002, Cornelis et al., 2003). Elles ont été remplacées par les colonnes capillaires, plus sensibles, possédant une meilleure résolution et une sensibilité inégalable (Cornelis et al. 2003).

A noter que de nombreuses études ont également utilisé un piègeage cryogénique pour concentrer et piéger les espèces Hg dans un tronçon de colonne capillaire d'une dizaine de cm et où circule un flux d'azote liquide (Wasik et al., 1998, Tseng et al., 1997 et 1998, Leenaers et al., 2002, Jitaru et al., 2004). L'échantillon ainsi cryogènisé (-80°C à -100°C) est alors réchauffé puis les espèces de mercure contenues dans l'échantillon se désorbent selon leur température d'ébullition de la colonne GC vers la cellule du détecteur qui est généralement un spectromètre atomique SAA ou AFS (Lobinski et al., 1998, Wasik et al., 1998, Slaets et al., 1999, Leernaers et al., 2002, Hintelmann et Nguyen, 2005).

II.2.5 Les détecteurs de spectrométrie atomique couplés à la GC

Le tableau 12 présente les principales études publiées depuis 1996.

Tableau 12 : Principales méthodes GC-spectrométrie atomique pour les matrices biologiques

Détecteur	Colonne	Espèces séparées (tr min)	Matrices analysées	LDa (ng Hg)	Référence
AAS	-	iHg, MeHg	BCR-463, DORM-1, TORT-1	0,05	Tseng et al., 1997
pyro-AFS	SGL-1	MeHg	BCR-463	0,001	Cabanero Ortizet al., 2002
pyro-AFS	DB-1	MeHg (3,0), EtHg (3,6), PhHg (5,4)	DORM-2, TORT-1, TORT-2, DOLT-1, DOLT-2, NIST-8044	0,02 – 0,04	Ebdon et al., 2002
pyro-AFS	DB-5	iHg (3,1),MeHg (1,6)	DORM-2, DOLT-3	0,001 – 0,002	Berzas Nevado et al., 2005
pyro-AFS	DB-5	MeHg	BCR-464, TORT-2, BCR 710	-	Jokai et al., 2005
pyro-AFS	CP-CIL CB	MeHg	BCR-463, NIST-2977	2 – 4,5	Gomez-Ariza et al., 2005
pyro-AFS	-	MeHg	DORM-2, moules	6	Carrasco et al., 2008
CV-AFS	OV-5	MeHg	CRM-580, S19, BCR-463, BCR-464	0,001 – 0,002	Baeyens et al., 1999
CV-AFS	-	MeHg	IAEA-142, LUST-1, TORT-1, DOLT-2, DORM-1	-	Liang et al., 1996
FI-AES	ZB-1	MePhHg	Produits de la mer	3,05	Kuballa et al., 2009
FAPES	OV-3	iHg (5,9), MeHg (3,1)	DOLT-2, TORT-2, DORM-2	0,001 – 0,007	Moreno Jimenez et Sturgeon, 1997
FAPES	DB-5MS	iHg (2,9), MeHg (1,7), EtHg (2,4)	DORM-2, DOLT-2, TORT-2	0,058 – 0,138	Grinberg et al., 2003
GD-AES	-	iHg (8,4), MeHg (6,4), EtHg (7,2)	DORM-2, DOLT-2	0,001 – 0,003	Orellana Velado et al., 1998
GD-AES	SGE	iHg (5,5), MeHg (3,1) EtHg (4,0)	DORM-2, DOLT-2	0,2 - 0,3*	Orellana Velado et al., 2000
MIP-AES	-	iHg (0,8), MeHg (1,0)	BCR-464	0,6 – 2,5*	Gerbersmann et al., 1997
MIP-AES	DB-624	iHg (3,5), MeHg (2,7)	DOLT-2, BCR-463	0,22	Tu et al., 2000
MIP-AES	DB-5MS	iHg (8,1), MeHg (4,9)	TORT-1, DOLT-1, DORM-2	0,24 – 1,72	Rodil et al., 2002
MIP-AES	OV-1701	MeHg	CRM-580, BCR-463, DOLT-2	0,003	Landaluze et al., 2004

*LDa en pg Hg

Les phases stationnaires les plus utilisés dans un couplage entre la GC capillaire et un détecteur de spectrométrie atomique sont les DB, et plus particulièrement les colonnes DB-1 et DB-5 ou 5ms (Ebdon et al., 2002, Rodil et al., 2002, Grinberg et al., 2003, Berzas Nevado et al., 2005, Jokai et al., 2005). Ces deux types de colonnes sont apolaires et peuvent supporter des températures allant jusqu'à 350°C. Elles différent dans la composition de la phase stationnaire. Les colonnes DB-1 sont recouvertes à 100% d'un film de diméthylpolysiloxane tandis que le film des colonnes DB-5 et DB-5ms est un copolymère constitué de 95% de diméthylpolysiloxane et 5% de diphènyle. Par rapport aux autres colonnes utilisées pour ces couplages, les colonnes DB sont reconnues pour être plus inertes.

La complexité des matrices et les faibles concentrations à déterminer font que les techniques classiques de détection basées sur le changement des propriétés physico-chimiques de l'éluant (conductivité thermique ou électrique, indice de réfraction, absorption UV) souffrent d'importants bruits de fond. La seule option satisfaisante pour l'étude de la spéciation du Hg par GC est donc le couplage avec un détecteur sensible et possédant une spécificité élémentaire (Lobinski et Adams, 1997, Carro et Mejuto, 2000). Par conséquent, la détection par capture d'électrons (ECD), très utilisée dans les années 1980 (Tseng et al., 1997, Cano-Pavon et al., 1999, Gomez-Arisa et al., 2001, Leermakers et al., 2005), a été remplacée par la spectrométrie d'absorption atomique (AAS) et la spectrométrie de fluorescence atomique à vapeur froide (CV-AFS). Les détecteurs AAS sont relativement bon marché mais ils manquent de robustesse et les limites de détection (LD) obtenues sont généralement élevées (Pourreza et Ghanemi, 2009). Les dernières applications reportées dans la littérature et qui utilisent le couplage GC-AAS remontent à 1998. Depuis, les analyses de spéciation du Hg sont faites en analyse directe par AAS (Gil et al., 2005, Vereda Alonso et al., 2008, Pourreza et Ghanemi, 2009, Tuzen et al., 2009). Brièvement, les espèces mercurielles sont piégées dans une mini-colonne remplie de poudre agar-agar modifiée par du 2-mercaptobenzimidazole ou par une culture bactérienne (*S. aureus*) puis éluées séparément (Pourreza et Ghanemi, 2009, Tuzen et al., 2009). Le couplage GC-CV-AFS est devenu la principale méthode en routine pour l'analyse en spéciation du Hg. Le coût de l'analyse est faible et le fonctionnement de l'appareil simple. De plus, par rapport aux détecteurs AAS, les détecteurs AFS sont plus sensibles, sélectifs et robustes et moins sujets aux interférences. Le domaine de linéarité est également plus étendu. Toutefois, les détecteurs AFS, comme les détecteurs AAS, offrent des performances limitées et les analyses multi-élémentaires ou la dilution isotopique (ID) ne sont pas applicables.

La GC couplée à la spectrométrie d'émission atomique (AES) offre comme principal avantage de mener des analyses multi-élémentaires performantes avec une grande sensibilité. Les couplages GC-AES utilisent généralement une source à plasma induite par micro-ondes (MIP-AES)

ou une source à plasma induite par haute fréquence (ICP-AES). Une revue complète et exhaustive sur le couplage GC-AES, avec distinction entre ces deux sources de plasma a été écrite par Pereiro et Diaz (2002). En résumé, les plasmas MIP sont générés à partir d'hélium et les plasmas ICP à partir d'argon. Les plasmas MIP sont moins stables et plus sujets aux interférences que les plasmas ICP mais ils sont aussi moins puissants, permettant d'obtenir des informations moléculaires. De plus, la détection est aussi sensible (pg) que celle obtenue en GC-ICP-AES pour l'analyse du Hg et l'appareillage est moins coûteux à l'achat. Le couplage GC-MIP-AES est donc préférentiellement choisi au couplage GC-ICP-AES. Cependant, ils sont tous les deux peu à peu remplacés par le couplage de la GC à la spectrométrie de masse (MS) et plus particulièrement la GC couplée à un spectromètre de masse à plasma induit (ICP-MS).

II.2.6 Les détecteurs de spectrométrie de masse couplés à la GC

Le tableau 13 présente les principales études utilisant des détecteurs de spectrométrie de masse couplés à la GC.

Tableau 13 : Principales méthodes GC-spectrométrie de masse pour les matrices biologiques

Détecteur	Colonne	Espèces séparées (tr min)	Matrices analysées	LDa (ng Hg)	Référence
MS	DB-5MS	MeHg (3,7)	DORM-2	9,25	Yang et al., 2003b
MS	DB-5MS	MeHg	BCR-464	-	Pacheco-Arjona et al., 2008
MS	DB-5MS	iHg (10,5), MeHg (9,3)	SRM 1947, SRM 1566b, TORT-2		Chung et Chang, 2010
MS	DB-624	iHg (8,5), MeHg (6,4)	DORM-1, DORM-2	0,070 – 0,150	Cai et Bayona, 1995
MS	HP-5	MeHg	BCR-710, IAEA-350	0,003 – 0,010	Ipolyi et al., 2004
MS	HP-5	MeHg	SRMs 1947, 1974b	-	Davis et al., 2007
MS	HP-5MS	MeHg (3,3)	BCR-464, CCQM-P39	11,2	Centineo et al., 2006
MS	HP-5MS	iHg (4,7), MeHg (3,2)	BCR-464, DOLT-4	1	Castillo et al., 2010
ICP-MS	-	MeHg (1,1), Me_2Hg (0,3)	Poisson	0,15*	Wasik et al., 1998
ICP-MS	Multi-capillaire	MeHg	DORM-1, TORT-1	0,08*	Slaets et al., 1999
ICP-MS	BP-1	iHg (2), MeHg (1,2)	DOLT-2, CRM-463	1,3	Tu et al., 2000
ICP-MS	HP-1	iHg (1,1), MeHg (0,8)	DORM-2, CRM-464	0,02 – 1,50*	Leenaers et al., 2002
ICP-MS	HP-1	iHg, MeHg	SRMs 1566b, 2976, 2977, 1974a, 1974b	0,005	Point et al., 2007

Détecteur	Colonne	Espèces séparées (tr min)	Matrices analysées	LDa (ng Hg)	Référence
ICP-MS	HP-1	MeHg	SRMs 1947, 1974b	-	Davis et al., 2007
ICP-MS	HP-5	iHg (3,2), MeHg (2,7)	DOLT-2	0,1 – 0,6*	Garcia Fernandez et al., 2000
ICP-MS	HP-5	Hg° (1,0), iHg (2,8), MeHg (2,0)	DORM-2, BCR-414	2,8 – 4,6	Perna et al., 2005
ICP-MS	HP5-MS	iHg, MeHg, HgT	SRMs 1974a, 1566b	0,002 – 0,014	Point et al., 2008
ICP-MS	MXT-1	Hg° (0,5), MeHg (1,6), iHg (2,3)	BCR-463, DORM-1	0,020 – 0,030*	Martin-Doimeadios et al., 2002
ICP-MS	MXT-1	iHg (6,8), MeHg (5,4)	SRMs 1566b, 1946	0,002	Davis et al., 2004
ICP-MS	MXT-1	Hg° (0,6), iHg (2,2), MeHg (1,6)	DORM-1, BCR-463	-	Monperrus et al., 2004
ICP-MS	MXT-1	Hg° (0,5), iHg (2,2), MeHg (1,6)	BCR-710, IAEA-405	0,002 – 0,012	Monperrus et al., 2008
ICP-MS	MXT-1	iHg (2,8), MeHg (2,1)	DORM-2	0,75	Garraud et al., 2007
ICP-MS	MXT-5	Hg° (1,0), iHg (6,3), MeHg (4,2), EtHg (5,4)	DORM-2, DOLT-2, DOLT-3	0,525	Yang et al., 2003b
ICP-MS	MXT-5	Hg° (0,8), iHg (4,5), MeHg (3,1)	CCQM-K43, CCQM-P39	0,071	Yang et Sturgeon, 2005
ICP-MS	-	MeHg (1,2)	DORM-2, TORT-2, NIST-1566b	0,002	Hintelmann et Nguyen, 2005
ICP-MS	SE-54	MeHg (1,4), EtHg (2,1)	DORM-2	0,5 - 1,0*	Li et al., 2008

*LDa en pg Hg

Deux principaux types de colonne sont utilisés lors du couplage GC-ICP-MS : HP (HP-1, HP-5 et HP5-MS) ou MXT (MXT-1 et MXT-5) (Yang et al., 2003b, Davis et al., 2004, Monperrus et al., 2004 et 2008, Yang et Sturgeon, 2005). La différence entre ces deux types ne réside ni dans la phase stationnaire (95 à 100% diméthylpolysiloxane) ni au niveau de la polarité (apolaires) mais au niveau du traitement chimique qu'elles ont subit. Pour le type MXT, l'ensemble des colonnes proposé est en acier inoxydable rendu inerte par traitement *Silcoosteel* ou *sulfinert* (Restek) et toutes possèdent une haute stabilité thermique. Les colonnes HP sont moins résistantes à la chaleur. De plus, seule la colonne HP-5 est inerte mais avec une durée de vie faible. Enfin, les LDa les plus basses ont été obtenues sur une colonne MXT en GC-ICP-MS.

Dans la littérature, l'ionisation par impact électronique (EI) et l'ionisation par ICP sont les deux modes de détection les plus couramment rencontrés pour la détermination du MeHg dans les matrices biologiques. Le principal atout de la EI-MS est de préserver l'intégrité structurale des

composées, ce qui aide à l'élucidation de leur identité en cas de doute, mais elle reste beaucoup moins sensible que la détection par ICP-MS. L'ICP-MS possède une sensibilité incomparable (LDa de l'ordre du fg), une excellente spécificité, une capacité de mesure multi-élémentaire, une haute tolérance aux matrices complexes et permet d'appliquer la ID, ce qui offre une sûreté incomparable quant à la quantification des teneurs et la validation de la méthode (Bouyssiere et al., 2002, Wuilloud et al., 2004, Bjorn et al., 2007, Popp et al., 2010). De plus, l'ICP-MS est la seule technique de détection qui permet de réaliser l'analyse en spéciation de plusieurs éléments simultanément. Le couplage GC-ICP-MS a donc rapidement conquis le domaine de l'analyse élémentaire des composés à l'état de traces et ultra-traces, malgré la disponibilité de techniques concurrentes moins coûteuses, performantes mais offrant moins de possibilités d'action.

Il existe plusieurs types d'appareils ICP-MS. Tous ont en commun leur spécificité élémentaire, leur capacité d'analyse multi-élémentaire, une large gamme de linéarité, des faibles LD et la capacité d'opérer en ID (Bouyssiere et al., 2002, Ray et al., 2004, Wuilloud et al., 2004, Bjorn et al., 2007, Popp et al., 2010). L'appareil le moins coûteux et le plus répandu est le spectromètre de masse quadripolaire (ICP-MSq). Ces instruments ont un faible bruit de fond, une grande sensibilité et une grande vitesse de mesure. D'autres types de spectromètres de masse sont disponibles (à haute résolution, à temps de vol ou multicollecteur), qui possèdent des caractéristiques les rendant plus performants que l'ICP-MSq mais l'investissement et les coûts de fonctionnement pour ces appareils restent très élevés (Caruso et al., 2003).

II.2.7 Conclusion

Au vu des difficultés que représente l'introduction d'un échantillon liquide carboné dans un détecteur ICP-MS et comme les composés mercuriels sont relativement volatils, une séparation par GC semble plus avantageuse. Le couplage GC-ICP-MS est moins simple à mettre en place (intervention d'une ligne de transfert thermostatée) que le couplage HPLC-ICP-MS (connexion directe par un câble PEEK) mais l'échantillon est introduit dans sa totalité et sous forme de gaz. Cet avantage non négligeable permet d'atteindre des LDa de l'ordre du fg. Notre choix se portera donc sur un couplage GC-ICP-MS équipé d'une colonne MXT et sur l'utilisation d'un réactif alkylé, de préférence le $NaBPr_4$, comme agent de dérivation car il offre le meilleur compromis en termes d'efficacité et rapidité. Ce couplage a été préférentiellement choisi parmi les autres couplages présentés car il présente les meilleures performances analytiques mais aussi parce qu'il permet une analyse par dilution isotopique afin d'améliorer la justesse et la fiabilité des résultats.

II.3 La dilution isotopique

La dilution isotopique (ID) et ses applications pour l'analyse en spéciation du Hg dans les produits de la pêche sont présentés sous la forme d'une revue soumise dans le journal « Talanta » (revue I).

II.3.1 Principe

L'utilisation d'espèces enrichies isotopiquement (ou spikes) avec les détecteurs MS est une grande avancée d'un point de vue méthodologique car malgré les nombreuses amélioration des techniques de séparation et de détection pour l'analyse en spéciation d'un élément dans un système biologique, la quantification reste une étape difficile en raison des réactions de dégradation et de transformation (perte d'analytes, méthylation (M) et déméthylation (D)) pouvant survenir au cours de l'ensemble de la procédure analytique (Rodriguez-Gonzales et al., 2005). La spécificité isotopique de l'ICP-MS permet l'étude de ces phénomènes et donc généralise la mise en œuvre d'une quantification par ID. La technique ID-ICP-MS est reconnue par le Comité Consultatif pour la Quantité de Matière (CCQM) comme une méthode primaire (Ruiz Encinar et al., 2003, Rodriguez-Gonzales et al., 2005, Schaumloffel et Lobinski, 2005, Vogl, 2007, Meija et Mester, 2008, Sturup et al., 2008). La spécificité des détecteurs ICP-MS couplé à la GC améliore la justesse et la précision de la mesure des rapports isotopiques, entre autre en fournissant des pics parfaitement symétriques, critère indispensable pour une mesure exacte des teneurs en espèces étudiées.

La ID réfère directement à la masse et à la mole, les unités fondamentales du système international de mesure. Elle est par conséquent intrinsèquement supérieure aux autres méthodes, comparatives, utilisées pour la détermination des éléments traces. Elle est basée sur la mesure de rapports isotopiques dans des échantillons où la composition isotopique initiale a été altérée par l'ajout de quantités connues d'un ou plusieurs ajouts d'espèces isotopiquement enrichies (appelés « spikes »). Par conséquent et à condition que les spikes soient sous des formes chimiques équivalentes aux espèces endogènes et en équilibre isotopique avec elles, ils jouent le rôle d'étalons internes « idéaux », rendant les extractions quantitatives non obligatoires et facilitant la détection des réactions de transformations d'espèce. La ID est applicable aux éléments possédant au moins deux isotopes stables pouvant être analysés par MS sans interférences spectrales (Rodriguez Gonzales et al., 2005). De plus, elle nécessite une parfaite connaissance des structures et

compositions des différentes espèces présentes dans l'échantillon. Ainsi, les spikes utilisés doivent être analysés, parallèlement aux échantillons, afin de déterminer leurs concentrations exactes ainsi que leurs abondances isotopiques.

II.3.2 Modes de calcul

Deux grands modes de calculs sont utilisés en ID : non spécifique (species-unspecific isotope dilution analysis ou SU-IDMS) ou spécifique (species-specific ou SS-IDMS) à l'élément étudié. Le premier mode permet une quantification à partir de la mesure de rapports isotopiques modifiés (R_m) mais les pertes ou transformations ayant pu survenir durant la préparation d'échantillon ne sont pas corrigées car les spikes sont introduits en ligne au niveau de l'appareil d'analyse (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005). Le second mode se décompose en trois techniques de quantification distinctes : la dilution isotopique classique (isotope dilution analysis ou IDMS), la dilution isotopique appliquée spécifiquement à l'espèce étudiée (species specific isotopic dilution analysis ou SS-IDMS) et la déconvolution isotopique (isotopic pattern deconvolution ou IPD).

La IDMS consiste en l'ajout d'une espèce enrichie en un isotope dans l'échantillon. Le rapport isotopique R_m résultant est mesuré et injecté dans la formule de la dilution isotopique classique (formule 1). Plusieurs spikes peuvent être utilisés. Les pertes ou extractions non quantitatives seront corrigées mais pas les inter-conversions d'espèces car chaque concentration sera quantifiée indépendamment des autres.

$$c_s = c_{sp}\ \frac{m_{sp}}{m_s}\frac{M_s}{M_{sp}}\frac{A^b_{sp}}{A^a_s}\left(\frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \times R_s}\right) \qquad (1)$$

c_s, c_{sp} = concentrations de l'élément dans l'échantillon et le spike respectivement, m_s, m_{sp} = masses ajoutées d'échantillon et spike dans le mélange, M_s, M_{sp} = poids atomiques de l'élément dans l'échantillon et le spike, A^a_s = abondance isotopique de l'isotope a dans l'échantillon, A^b_{sp} = abondance isotopique de l'isotope b dans le spike, R_{sp} = $(A^a_{sp})/(A^b_{sp})$ = rapport isotopique a/b dans le spike, R_s = $(A^b_s)/(A^a_s)$ = rapport isotopique b/a dans l'échantillon

En SS-IDMS et IPD, les pertes d'analytes ou extractions non quantitatives seront corrigées ainsi que les inter-conversions d'espèces car les concentrations des espèces d'intérêt sont déterminées simultanément. Dans notre cas, deux spikes (^{201}MeHg et ^{199}iHg) sont ajoutés à l'échantillon. Ils devraient réagir à l'identique des espèces naturelles et subir les mêmes transformations. La mesure des espèces éventuellement produites par méthylation (M) et

déméthylation (D) (i.e. ^{201}iHg et ^{199}MeHg) va permettre de déterminer des facteurs de M et D et de corriger les concentrations. En SS-IDMS, trois isotopes sont étudiés (199, 201 et 202) tandis qu'en IPD, l'ensemble des isotopes du Hg est pris en considération. Dans le premier cas, la quantification est basée sur un bilan en masse alors que le second fait intervenir des régressions linéaires multiples. L'élucidation mathématique par calcul matriciel est donc plus complexe mais l'ensemble de ces informations permet aussi la détermination du biais en masse de l'analyse (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005).

II.3.3 Avantages et inconvénient

Contrairement aux autres stratégies de quantification telles que la calibration externe ou les ajouts dosés, et selon les paramètres de l'équation de la ID, des instabilités instrumentales telles qu'une dérive du signal ou un effet de matrice n'influenceront pas le résultat final (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005). Il faut toutefois rappeler que les paramètres tels que le biais en masse ou le temps mort du détecteur ne sont pas des instabilités instrumentales et doivent donc être contrôlés pour assurer une mesure exacte des rapports isotopiques.

L'incertitude de mesure sur la concentration dépend principalement de l'incertitude de mesure sur le rapport isotopique R_m. Par conséquent, en plus de la nécessité d'obtenir des pics parfaitement définis et symétriques, il est important de contrôler de façon exhaustive la valeur des blancs afin de vérifier qu'aucune contamination n'affecte ce rapport (Yang et Sturgeon, 2005).

Le facteur le plus important de la ID est l'équilibre isotopique entre l'échantillon et les spikes. Après atteinte de cet équilibre, une extraction non quantitative ou une perte d'espèce n'influera pas le résultat final car le rapport « R_m » est constant dans l'ensemble de l'échantillon. En pratique, cet équilibre isotopique peut être difficile à atteindre lorsque les espèces étudiées sont dans une matrice solide et que les spikes sont en solution. En effet, les spikes doivent être extraits avec la même efficacité que les espèces endogènes or ils vont tendre à être extraits plus facilement car ils ne sont pas liés à la matrice contrairement aux espèces naturelles. Dans ce cas, la perte d'analytes et/ou de spike avant équilibre isotopique complet peut être une importante source d'erreur, affectant la précision de la mesure du rapport isotopique (Clough et al., 2003, Monperrus et al., 2004 et 2008, Rodriguez-Gonzalez et al., 2005, Meija et Mester., 2008). L'unique méthode permettant de s'assurer que l'équilibre isotopique est atteint est une extraction quantitative des espèces d'origine dans un solvant d'extraction.

L'équilibre isotopique entre les espèces naturelles et ajoutées a fait l'objet de nombreuses optimisations et représente une des applications les plus importantes de la ID (Clough et al., 2003, Point et al., 2008). Plusieurs tests ont été menés afin d'évaluer la durée de contact nécessaire pour l'atteinte de l'équilibre isotopique entre une matrice solide dans un solvant d'extraction et des spikes en solution. Cette durée a été évaluée à 6 min par Rodriguez-Gonzalez et al. (2005).

Les concentrations calculées par SS-IDMS et IPD sont corrigées des éventuelles dégradations et/ou inter-conversions pouvant survenir. Malgré l'apparente complexité mathématique de l'IPD, cette approche conserve l'ensemble des avantages de la IDMS et de la SS-IDMS tout en apportant la possibilité de quantifier le biais en masse. La principale limite de la SS-IDMS et de l'IPD porte sur les matrices présentant d'importantes différences de concentrations entre les espèces. Cette distinction augmente l'incertitude sur les concentrations calculées et sur l'évaluation des taux de dégradation. Lorsque les concentrations en iHg et MeHg dans l'échantillon sont très différentes (rapport MeHg/iHg > 0,05), l'espèce minoritaire doit être pré-concentrée avant injection ce qui ajoute une étape supplémentaire de préparation d'échantillon et augmente donc l'incertitude (Monperrus et al 2008).

II.3.4 Conclusion

En conclusion, la dilution isotopique est un outil incomparable pour une excellente analyse en spéciation du mercure, que se soit pour des matrices biologiques ou environnementales.

III. Bilan sur l'état de l'art

L'étape de mise en solution des espèces Hg est fondamentale. Les méthodes d'extraction et de dérivation utilisées, tout en étant rapides, pratiques et robustes, ne doivent pas engendrer de modifications des espèces initialement présentes pour permettre une analyse non biaisée de la spéciation du Hg. Pour cela, une étape de marquage par des espèces du Hg enrichies isotopiquement dès le commencement de la préparation d'échantillon semble judicieux et offre un parfait contrôle des éventuelles modifications (perte d'analyte, méthylation, déméthylation) pouvant survenir au cours de la procédure analytique.

L'étude bibliographique des principales techniques d'extraction et de dérivation des espèces mercurielles 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, de l'utilisation de volumes de solvant plus

faibles impliquant moins de déchets et de risques de contamination et du fait qu'elle engendre peu de transformations inter-espèces. L'hydroxyde de tétraméthylammonium est le solvant le plus utilisé dans la littérature et semble le plus adapté à la mise en solution des formes mercurielles par MAE dans les produits de la pêche. La dérivation des espèces Hg par le tétrapropylborate de sodium ($NaBPr_4$) est la technique de dérivation la plus rencontrée dans la littérature en raison de ses applications qui s'étendent à toutes les espèces Hg (iHg, MeHg, EtHg, etc.), de sa pureté et de sa grande efficacité. Ces avantages par rapport aux autres techniques d'extraction et dérivation testées dans la littérature sont des atouts précieux pour de futures applications en analyse de routine.

L'application de la méthode sur des matrices alimentaires réelles nécessite une séparation simple et rapide des espèces et l'utilisation d'un détecteur spécifique, sensible et robuste. Le couplage entre la séparation par chromatographie capillaire en phase gazeuse et la détection par ICP-MS semble répondre de la façon la plus pertinente à ces critères. Parmi les colonnes chromatographiques les plus testées dans la littérature, il apparaît que la colonne MXT (Restek) semble être le choix le plus adapté pour une séparation simple, rapide et simultanée des composés inorganiques et organiques contenus dans des matrices réelles. L'ICP-MS permet d'appliquer la dilution isotopique ce qui confère une plus grande exactitude des résultats. D'après la revue I, le choix de la technique de calcul à appliquer dépendra de l'information recherchée.

Cette étude bibliographique a permis d'extraire de la littérature plusieurs paramètres qui semblent appropriés pour l'analyse en spéciation du Hg dans les produits de la pêche. La suite de cette étude s'est donc intéressée à évaluer la réelle pertinence de ces différents paramètres d'extraction, dérivation et quantification sur différents matériaux de référence certifiés de produits de la pêche. Une fois optimisée, la méthode analytique sera validée selon 2 normes françaises (AFNOR 1998 et 2010).

Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: a (critical) review

Stéphanie Clémens[a], Mathilde Monperrus[b], Olivier F.X. Donard[b], David Amouroux[b] and Thierry Guérin[a]*

[a] ANSES, Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort, Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, 23, Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France. stephanie.dafonseca@anses.fr, thierry.guerin@anses.fr

[b] Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux, IPREM UMR 5254 CNRS - Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc, 2, Avenue Pierre Angot, 64053 Pau Cedex, France. Mathilde.monperrus@univ-pau.fr, olivier.donard@univ-pau.fr, david.amouroux@univ-pau.fr

*Corresponding author. Tel.: +331 49 77 27 11; E-mail address: thierry.guerin@anses.fr

Abbreviations:

Species:

Hg°: elemental mercury

iHg: inorganic mercury

MeHg: methylmercury

THg: total mercury

Quantification:

EC: external calibration

M: methylation

D: demethylation

ID-MS: isotope dilution – mass spectrometry

IDMS: isotope dilution analysis

- SU-IDMS: species-unspecific isotope dilution analysis
- SS-IDMS: species-specific isotope dilution analysis
    - S-IDMS: simple isotope dilution analysis
    - M-IDMS: multiple isotope dilution analysis
        - D-IDMS: double isotope dilution analysis
        - D-SS-IDMS: double species-specific isotope dilution analysis
        - IPD: isotope pattern deconvolution

Analysis:

CV: cold vapour

EI-MS: electron impact mass spectrometry

ETV-ICP-MS: electrothermal vaporisation - inductively coupled plasma mass spectrometry

GC: gas chromatography

HPLC: high performance liquid chromatography

ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry

MAE: microwave assisted extraction

MC-ICP-MS: multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry

MIP-AES: microwave induced plasma-atomic emission spectrometry

SPME: solid phase micro-extraction

US: ultrasound

Abstract:

Mercury is a toxic compound that can contaminate humans through food and especially via fish consumption. Mercury's toxicity depends on the species, with methylmercury being the most hazardous form for humans. Hg speciation analysis has been and remains a widely studied subject because of the potential difficulty of preserving the initial distribution of mercury species in the analysed sample. Accordingly, many analytical methods have been developed and most of them incur significant loss and/or cross-species transformations during sample preparation. Therefore, to monitor and correct artefact formations, quantification by isotope dilution is increasingly used and provides significant added value for analytical quality assurance and quality control.

This review presents and discusses the two different modes of application of isotope dilution analysis for elemental speciation (i.e. species-unspecific isotope dilution analysis and species-specific isotope dilution analysis) and the different quantification techniques (i.e. classical and multiple spike isotope dilution analyses). Isotope tracers are thus used at different stages of sample preparation to determine the extent of inter-species transformations and correct such analytical artefacts. Finally, a synthesis of the principal methods used for mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis is presented.

Keywords: speciation, methylmercury, seafood, isotope dilution analysis, inter-species transformations

I. Introduction

Mercury (Hg) is an element occurring naturally in all environmental compartments. The Earth's crust is the primary source of Hg, releasing 2700 to 6000 tons of elemental Hg (Hg°) into the atmosphere every year [1]. The second natural Hg emission source is volcanic activity, accounting for up to 2000 tons of emitted Hg° [2, 3]. The available Hg concentration in the environment is increased by anthropogenic sources such as mineral exploitation (mining lead and zinc), combustion products (coal - fuel oil), industrial waste (chlorine industry, soda, etc.) and waste incineration [4, 5]. Mercury is used in a wide range of industrial sectors (batteries, cables and electrical switches, measurement devices, dental amalgams, lamps), which result in it being released into the environment.

Mercury is present in the environment as elemental mercury (Hg°), inorganic mercury (iHg) and organic mercury (mainly methylmercury, MeHg). Hg° and iHg are released into the air and deposited in soil, water and sediments. They are then transformed via biotic or abiotic reactions into MeHg. This species enters biota (plankton, phytoplankton) by passive absorption or via food. It then associates with the soluble part of the organism due to the complexation of MeHg with amino-acid containing a thiol (e.g. cysteine) and bioaccumulates. MeHg is also biomagnified, as iHg is not effectively retained by the organism [11]. Seafood is the primary source of human contamination by MeHg [11-13]. Over 90% of MeHg is absorbed through the gastrointestinal tract, then transferred into the bloodstream due to its complexation with thiol and to active transport, and distributed throughout the body. With oral exposure, the central nervous system is organic mercury's main target organ, particularly during foetal development. The toxic effects are alteration of sensory functions (sight, hearing), motor coordination, memory, attention and learning [13-15]. The toxicity of inorganic mercury causes renal lesions, neurotoxicity and cardiovascular disorders. In the most extreme cases, it can cause death as was the case in Minamata, Niigata and Iraq [16, 17].

As a safeguard for human health, maximum permissible levels of Hg in fish (0.50 or 1 mg kg^{-1} essentially for predatory fish) and shellfish (0.50 mg kg^{-1}) have been set by Regulation (EC) No 629/2008 to limit dietary exposure of consumers [18]. Furthermore, in 2003 the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) established a Provisional Tolerable Weekly Intake (PTWI) of 1.6 µg MeHg/kg bw and 5 µg THg/kg bw [19]. In 2010, the PTWI for THg was withdrawn by the Committee and replaced by a PTWI for inorganic mercury (iHg) of 4 µg/kg bw [20]. This new PTWI is applicable to dietary exposure to total mercury from foods other than fish and shellfish. For MeHg in these foods, the previously established PTWI should be applied.

Currently available contamination values in seafood are based on THg concentrations and evaluation of MeHg exposure is based on a simplifying assumption which considers that the average percentage of Hg present as methylated mercury in the flesh of fish is 84% of THg (MeHg = 0.84 THg) with a 15% variation around this value between species and within them, according to the fishing area [21]. This hypothesis was challenged by studies which have shown that MeHg may represent a smaller share of THg in some fish [22, 23]. This discovery confirms the need to estimate levels of MeHg, in addition to THg concentrations, to obtain more specific toxicological reference values and recommendations.

After a short summary of the most widely developed Hg speciation analysis methods, isotope dilution analysis (IDMS) will be introduced. The advantages and principal applications of this innovative quantification technique will then be presented and discussed.

II. Mercury speciation analysis

The methods developed to perform Hg speciation analysis involve the coupling of a powerful separation technique (liquid or gas chromatography, capillary electrophoresis) with a selective and sensitive (elemental) detection method (fluorescence spectrometry, plasma source coupled with emission spectrometry or mass spectrometry) [24-26]. Gas chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (GC/ICP-MS) has rapidly conquered the field of trace and ultra-trace elemental analysis due to the high resolving power of the capillary GC technology, which offers excellent separation of Hg species and the sensitive multi-elemental and multi-isotopic detection capabilities of ICP-MS. Furthermore, this analytical set-up offers the best opportunity to perform speciated isotope dilution mass spectrometry [25, 27].

Extraction and derivatisation steps are common for most sample preparation methods involved in Hg speciation analysis by GC-ICP-MS. The main extraction method used is microwave assisted extraction (MAE) due to its speed, efficiency and low occurrence of methylation (M) and demethylation (D) reactions [28-30]. For the derivatisation of Hg species, alkylating reagents such as sodium tetrapropylborate ($NaBPr_4$) and sodium tetraethylborate ($NaBEt_4$) are mainly used because derivation takes place in an aqueous medium, the natural environment of most biological samples [29, 31].

The recent development of IDMS has drastically improved the accuracy and quality of Hg speciation analysis results [25, 32, 33]. Indeed, the use of isotopically enriched species (i.e. spikes) as tracers overcame the traditional problems related to non-quantitative recoveries and the formation of Hg artefacts that particularly occur during the extraction and derivatisation steps [29, 34-38].

III. Isotope dilution analysis

Isotope dilution analysis (IDMS) directly refers to the mass and the mole, the fundamental units of the international system of measurement. This quantification technique is consequently inherently superior to other methods (i.e. the external calibration or standard addition methods) used for the determination of trace elements. In IDMS, quantification is based on the measurement of the isotope ratio, making quantitative recoveries unnecessary, in samples where the initial isotopic composition has been altered by the addition of known amounts of one or more spike(s). Provided that spikes are in equivalent forms to natural Hg species, and that complete isotope equilibrium with them was reached, they will act as "ideal" internal standards and rearrangement reactions will be easily detected.

This technique is used exclusively in combination with a mass spectrometer and especially an ICP-MS, because its specificity improves the accuracy and the precision of the measured isotope ratios. Moreover, sample preparation is generally simpler than with MS analysis. IDMS is considered to be a definitive method, offering accurate determination of Hg species with small uncertainties and has been the subject of numerous review articles [26, 27, 32, 39, 40]. Furthermore, it can be applied for routine tests but also for diagnostics or to assist in the development of new methods.

The use of spikes for trace element speciation analysis in biological and environmental matrices has increased considerably since the first experiments in the 1950s [41-43]. There are two different modes of IDMS application, i.e. species-unspecific (SU) or species-specific (SS) spiking mode, as explained in Figure 1.

III.1. Species-unspecific spiking mode isotope dilution analysis

The SU spiking mode was generally used because of a lack of commercially available isotopically enriched mercury species identical to the species of interest, and is exclusively limited to the correction of errors derived from the detection step. Indeed, after a complete separation of endogenous species, spikes were added to and mixed with the separated natural species, before the ionisation and detection process, in order to accurately measure the corresponding isotope ratio [27]. Nowadays, many Hg isotope tracers are available and the SU spiking mode is usually replaced by the SS spiking mode.

III.2. Species-specific spiking mode isotope dilution analysis

In SS spiking mode, species of interest will be marked by analogue species that have been modified isotopically during the sample preparation procedure. In this way, IDMS is applied specifically to one or more species, depending on whether the single or multiple IDMS technique is used (Figure 1). This powerful approach was first employed in 1985 by Unger and Heumann (1985) [44] to determine inorganic compounds (nitrite and nitrate traces) in food samples. The SS spiking mode has since mainly been used to analyse organometallic compounds such as MeHg [30, 35-38, 45, 46].

The prerequisites for using the SS spiking mode have previously been discussed in detail [47]. Briefly, the chemical identities of the sample and spike(s) must be fully known and a complete isotopic equilibrium between endogenous species and spike(s) must be quickly reached. Isotope tracers are most often added at the beginning of sample preparation to ensure optimum control of the whole analytical procedure.

Classical or simple isotope dilution analysis (S-IDMS) consists of the addition of one isotopically enriched species to the sample to alter the natural isotopic abundance of the endogenous species. Ideally, the amount of spike added to the sample should result in a mixed isotope ratio of endogenous species to spike close to 1. From the mixed isotope ratio obtained and the S-IDMS equation, quantification becomes possible [27, 35, 48]. S-IDMS enables the final result to be corrected for any loss or non-quantitative extraction and therefore achieves excellent accuracy and precision. However, inter-conversion reactions between species are not taken into account as only one spike is added. To evaluate and correct the final result for methylation and demethylation reactions, multiple-isotope dilution analysis (M-IDMS) must be used [37, 38, 49, 50]. In double isotope dilution analyses (D-IDMS), the sample is spiked with known amounts of two isotope tracers (e.g. ^{199}iHg and Me^{201}Hg) that will react identically to the studied species (^{202}iHg and Me^{202}Hg). Quantification is then based on the measurement of the mixed isotope ratios. D-IDMS is established as a baseline approach that allows the main analytical bias to be corrected and permits an accurate quantification of Hg species [35, 36, 38, 49, 51-53].

Data obtained by D-IDMS can be processed specifically for two species (i.e. double species-specific isotope dilution analysis or D-SS-IDMS) or for the whole system (i.e. isotope pattern deconvolution or IPD). For example, the D-SS-IDMS model can look at 3 isotopes (e.g. 199, 201 and 202) and 6 species (^{199}iHg, ^{201}iHg, ^{202}iHg, ^{199}MeHg, ^{201}MeHg and ^{202}MeHg). In this case, 6 mass conservation balances are established according to the equations below:

For iHg: $$N_m^{iHg} = \left(N_s^{iHg} + N_{sp}^{iHg}\right)(1-M) + \left(N_s^{MeHg} + N_{sp}^{MeHg}\right) D\,(1-M)$$

For MeHg: $$N_m^{MeHg} = \left(N_s^{MeHg} + N_{sp}^{MeHg}\right)(1-D) + \left(N_s^{iHg} + N_{sp}^{iHg}\right) M\,(1-D)$$

For example, for ^{199}iHg in the mixture (m), total mass (N_m^{iHg}) consists of the mass of iHg initially present in the sample (N_s^{iHg}) and the iHg from the spike (N_{sp}^{iHg}), taking into consideration M (loss of iHg by methylation) and D (gain in iHg by demethylation of ^{199}MeHg) reactions.

From the 6 mass balances, 4 mixed isotope ratios can be calculated with $R^{202/201}_{m,\ iHg}$ and $R^{202/199}_{m,\ Hg(II)}$ depending on the demethylation of MeHg and $R^{202/201}_{m,\ MeHg}$ and $R^{202/199}_{m,\ MeHg}$ and depending on the methylation of iHg. By a mathematical rearrangement as described in the publication of Monperrus et al. (2008) [49], M and D rates can be determined independently of the amount of endogenous species and final Hg species concentrations will be corrected for them.

In IPD, all the different isotopic models of spikes and endogenous species are considered [38, 54, 55]. The combination of isotope ratios of natural species, spikes and mixtures enable two over-determined systems of equations to be established for each species that can be expressed in matrix form. Then, the measured mass isotopomer distribution in the mixture for the different masses of species is deconvoluted by multiple linear regression applying least squares fitting and minimising error, to obtain the molar fractions from the three isotope patterns considered (i.e. the natural pattern, the iHg pattern and the MeHg pattern) and the interconversion factors M and D. Quantification is thus more accurate as potential cross-species transformations on unmarked species are corrected. However, the mathematical resolution becomes particularly complex and results are less precise than with D-SS-IDMS, because errors become more numerous when the number of parameters is increased [56]. D-SS-IDMS and IPD differ in their mathematical complexity and their ability to expand to deal with a large number of species, but the processing of all the element's isotopes allows the calculation of variance-covariance to determine the instrumental mass bias as effectively as by analysis of thallium, which is a significant advantage over other techniques of quantification by isotope dilution.

To conclude, despite the apparent mathematical complexity of the M-IDMS techniques (SS-IDMS and IPD), these approaches retain all the advantages of S-IDMS while providing powerful capabilities for quantification and correction of inter-conversion reactions.

III.3. Advantages and limitations of IDMS

IDMS can be only applied to elements with at least two stable isotopes that can be analysed by mass spectrometry without spectral interference [27]. IDMS is accurate only if a complete isotopic equilibrium between endogenous species and spikes is achieved. In practice, this can be

difficult as spikes tend to be extracted more efficiency than endogenous species because they are unrelated to the matrix [45, 53].

For Hg speciation analysis, many enriched standards have been developed and are available commercially, permitting the application of SS spiking mode. The exact isotopic composition of all added spikes is determined by monitoring the stability of concentrations by reverse isotope dilution analysis and the stability of isotopic abundances by isotope abundance analysis [27].

Uncertainty measurements associated with IDMS depend essentially on the uncertainty measurement of the mixed isotope ratio "R_m" [45, 57]. This parameter is calculated by dividing the peak area obtained for the most abundant natural isotope by the peak areas measured for the spike (e.g. $R^{202/201}_{Hg}$ for MeHg, $R^{202/199}_{Hg}$ for iHg, etc.). It is based on a multitude of other parameters such as detector mass bias, detector dead time, sensitivity of the detector, data acquisition parameters, peak shape, etc. This ratio is constant throughout the sample, which explains why quantitative extraction is not needed [27]. In return, "R_m" must be measured with high accuracy and precision in order to diminish systematic errors. It is therefore necessary to exhaustively monitor blank values to ensure that no contamination is affecting this ratio [58] and to regularly evaluate detector mass bias and dead time. To conclude, a lack of peak symmetry may affect the accuracy of "R_m" [59].

major limitation of M-IDMS is concentration differences between species. When iHg and MeHg concentrations are very different (ratio MeHg/iHg < 0.05), the minority species must be pre-concentrated prior to injection into the separation device which adds a further step to sample preparation and thus increases uncertainty. D-IDMS methodologies are able to provide both accurate and precise results for iHg and MeHg with similar relative concentrations, a condition that holds for most biotissues [49].

It should be noted that IDMS has been widely applied for over ten years but some points of this method are not yet fully understood. IDMS is based on the hypothesis that spikes act identically to natural endogenous species but this behaviour has not been proven despite numerous studies conducted in this area [47]. Furthermore, Meija et al. (2009) [60] recently raised the possibility of inter-isotope reactions that may occur between spikes and analytes during interconversion reactions. Over time, these reactions erase the dissimilarity of isotope patterns between the analytes involved and can result in identical isotopic signatures regardless of the initial amounts or interconversion rate constants, as illustrated in Figure 2. They conclude that due to the ability of multiple-spiking isotope dilution to correct for any interconversion, less effort is made to minimise them while vigilance should be maintained.

To conclude, IDMS has shown through numerous studies its ability to determine Hg species levels in seafood products with a high level of precision and accuracy. However, the analyst must remain critical regarding the final results and check their consistency, for example by applying total mercury analysis or by comparing the results obtained with those reported in the literature.

III.4. Evaluation of Hg speciation analysis in seafood using isotope dilution techniques

Many experiments using different stable isotope tracers have been carried out and methodologies have been developed over time. Table 1 shows some applications of Hg speciation analysis in seafood since 2000.

A slight preference for simple IDMS rather than multiple IDMS can be noted. However, the most recent applications involve species-specific labelling with several Hg isotopes, allowing for discrimination between species and investigation of M and D processes [27, 35, 38, 49, 50, 52, 53, 58, 82, 85, 87, 89].

The developed analytical methodologies using isotope tracers generally follow the common model presented in Figure 3.

The discussion below will focus on selected applications from Table 1, dealing with the optimisation of sample preparation for seafood analysis [45, 50, 52, 85, 92].

III.4.1 Evaluation of the lyophilisation/storage step

Applications of total Hg analysis and Hg speciation analysis in seafood are generally conducted on freeze-dried samples [93-96]. This preprocessing aims to homogenise samples and facilitate their transport and storage. Only two studies in the literature have examined the behaviour of freeze-dried samples compared to fresh samples. Yu et al. (2003) [92] studied the influence of various parameters including fresh and lyophilized materials on iHg and MeHg stability in environmental and biological samples, not using isotopic tracers. Analysis demonstrated that MeHg in fresh and dried fish muscle and CRMs showed good stability over time and against thermal cycling. However, if fresh shellfish was repeatedly frozen and thawed, losses of MeHg could occur. This study concluded that these two textures are equivalent in terms of species conservation [92].

Some years later, Point et al. (2007) [52] analysed iHg, MeHg and THg in biological CRMs including three freeze-dried (FD) and two fresh-frozen (FF) materials, by S-IDMS and D-SS-IDMS. For S-IDMS determination, FF and FD materials were not always commutable as MeHg concentrations tend to be overestimated in FD materials due to methylation of iHg. The source of

this transformation appeared to be linked to the type of acid used to adjust the pH. In D-SS-IDMS determination, MeHg, iHg and THg concentrations were systematically in good agreement with certified values and the materials were commutable. Consequently, this study showed that several parameters of the analytical procedure can cause the formation of artefacts of mercury and demonstrated the value of using D-SS-IDMS analysis instead of S-IDMS.

To conclude, Yu et al. (2003) [92] and Point et al. (2007) [52] evaluated the potential difference in behaviour between freeze-dried and fresh matrices but they did not study the impact of the freeze-drying process on species (e.g. degraded species or transformation reactions). To the authors' knowledge, no studies dealing with Hg species and the freeze-dried process have been published. There is thus a lack of information about this topic.

III.4.2 Evaluation of the spiking procedure/isotopic equilibrium

The isotope equilibrium must be complete and reached quickly otherwise a difference in the extraction efficiency between natural species and spikes will result, yielding errors in the measurement of "R_m". If the sample is a liquid, equilibration by gentle agitation should be sufficient. If it is a solid material, precautions should be taken to prevent preferential extraction of the spiked species over the natural species [27, 37].

Clough et al. (2003) [45] assessed isotope equilibration by determining MeHg and THg concentrations in DORM-2. The spike ($Me^{199}Hg$) in a solution containing 2% of HNO_3 was equilibrated in a solution of 50:50 H_2O:MeOH (v/v) containing 0.01% of 2-mercaptoethanol to which DORM-2 was added. The mixture was agitated at 25°C by a magnetic stirrer and aliquots were taken at different times, extracted by MAE and detected by HPLC-Q-ICP-MS. To determine whether equilibration was attained, measured "$R^{200/199}{}_m$" was compared to the theoretical mixed isotope ratio ($R^{200/199}{}_m = 1$). During the first few minutes, "$R^{200/199}{}_m$" rose drastically until a plateau at 6 minutes was reached, meaning that complete isotope equilibrium had been reached. Furthermore, calculated MeHg and THg concentrations were in good agreement with certified values, while extraction recovery was 53%, which demonstrated that complete extraction of analytes is not necessary for accurate quantification by IDMS, when spiking takes place in a solution.

Later, Point et al. (2008) [53] were interested in the influence of a complexing ligand on isotope equilibrium. ^{201}iHg, $Me^{202}Hg$ and their cysteine-complexed analogues ($^{201}Hg(Cys)_2$ and $Me^{202}HgCys$) were compared in terms of reactivity and inter-species transformations induced on a FF and a FD biological CRM. MeHg and iHg concentrations obtained were in good agreement with certified values, except for iHg concentrations for CRMs spiked with cysteine-complexed solutions

in which a systematic over-estimation was observed. For all experiments, negligible methylation rates were noted. For CRMs spiked with labile spike solutions, D rates of 1.8% for the FD material and 16% for the FF material were obtained while for standard reference materials (SRMs) spiked with cysteine-complexed spike solutions, D rates of 7.5% for SRM 1566b and 33% for SRM 1974a were observed. They concluded that with the FF and FD matrices, directly spiking without extraction solvent can give accurate results if samples and spikes are homogenised and if an equilibration time of 15 min is applied. Furthermore, for iHg species, cysteine-complexed species have an influence on isotope equilibrium and transformations.

These studies have shown that a complete isotopic equilibrium can be reached whether samples are in a solid or a liquid medium. Point et al. (2008) [53] have shown the importance of the spikes chosen, because they can produce M and D reactions. Equilibrium can be achieved relatively quickly, and once established, it allows accurate quantification, corrected for transformations, despite low extraction rates.

III.4.3 Evaluation of the extraction/derivation steps

As it is difficult to completely avoid species transformations and non-quantitative extraction, it is important to optimise the analytical procedure to minimise such phenomena and/or to correct for their effects. It has been shown that extraction and derivation steps are precursors of M and D reactions and are consequently regularly reviewed [34, 38, 50, 85, 97].

Reyes et al. (2008) [50] evaluated different protocols for the extraction of mercury species from BCR-464 by HPLC-ICP-MS detection. For all the procedures, samples were spiked with ^{199}iHg and Me^{200}Hg and equilibrated 1 h before extraction. Data were processed by external calibration (EC) and M-IDMS. With EC determination, only MeHg and THg concentrations determined after alkaline extraction using sonication were in good agreement with certified values because of the non-quantitative extraction of the other techniques. With M-IDMS quantification, these problems were automatically corrected and the MeHg concentrations obtained for all extraction procedures were in good agreement with the reference values, except for acid extraction using HNO_3 where the MeHg concentration was too high. All the procedures showed similar percentages of M (3 – 6%) and D (0.8 – 6%), except for two procedures which led to more transformation reactions; i.e. HNO_3 and MAE, with 18% of M, and CH_3COOH and MAE with 27% of D. This study highlighted that isotope dilution is able to ignore non-quantitative extraction and also showed that inter-species transformations may be purely related to the extraction technique used.

Later on, Reyes et al. (2009) [85] optimised an acid MAE (HCl/NaCl) procedure for the determination of iHg and MeHg in three CRMs and six freeze-dried fish tissue samples. Data were processed by external calibration; ID applied after extraction (DSAE) and ID applied before extraction (DSBE). Irrespective of which of the 3 techniques was used, MeHg and iHg concentrations of the 3 CRMs were in good agreement with references values, except for the iHg concentration in NIST-1946. For real fish samples, good agreement was observed between THg concentrations obtained by mercury speciation analysis and THg analysis, although the MeHg values were significantly lower in some of the analysed samples when calculated by DSAE compared to results obtained by EC and DSBE. These differences were probably due to an incomplete isotopic equilibration. Negligible D rates were noted for all CRMs and fish samples. M reactions were observed with higher rates obtained using DSBE than DSAE, showing that M reactions occurred during the extraction step. Furthermore, percentages of M were higher in real tissues than in CRMs because of differences in particle sizes and protein denaturation, showing the matrix-dependent nature of M reactions. Except for DOLT-3, iHg concentrations in the studied matrices were largely lower than MeHg concentrations, consequently M reactions did not affect quantification by external calibration. In samples where iHg concentrations were higher, traditional quantification by EC could be biased.

Castillo et al. (2010) [38] determined iHg and MeHg concentrations in BCR-464 and DOLT-4 by GC-EI-MS after optimisation of the extraction and derivation steps. For the first stage, MAE methods using TMAH and different temperatures and extraction times were compared. MeHg and iHg concentrations obtained were in good agreement with certified values but significant demethylation rates were observed after a short irradiation time. To determine the source of these transformations, ^{199}iHg and Me^{201}Hg were added before and after extraction. For both experiments, there was no significant difference between the results obtained, showing that transformation reactions were not induced by the extraction but by the derivatisation process. Ethylation and propylation were then evaluated in a second stage. It was observed that D decreased faster with the increase of microwave irradiation when propylation was used. The authors concluded that in the presence of non-irradiated TMAH, D reactions occur during the derivatisation step, even if they are reduced by the use of propylation.

These results demonstrate that transformation reactions are dependent on many parameters, including the extraction and derivation steps, matrix, species form and concentrations, solvent used, etc. Consequently, it is not possible to develop an optimised preparation procedure suitable for all types of matrices, hence the need to apply multiple spiking methodologies for the determination of MeHg and iHg in biological samples.

V. Conclusion

Mercury is a toxic compound that can contaminate humans through food and especially via the consumption of predatory fish. Hg speciation analysis has been and remains a widely studied subject. The main difficulty of such an analysis is in preserving the initial distribution of Hg species in the sample because of losses and/or cross-species transformations that may occur during the analytical procedure. To monitor and correct these artefact formations, quantification by isotope dilution is increasingly used. Once complete isotope equilibration between spikes and natural species in the sample has been achieved, three calculation methods can be used (i.e. S-IDMS, SS-IDMS and IPD). Most of the time, for mercury speciation, two spikes are used to determine the MeHg and iHg species. Potential methylation and demethylation reactions are then detected and corrected.

Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) is a major step forward in the world of speciation analysis. It allows the accurate quantification of mercury species and contributes to the understanding of the biogeochemical cycle of this element. However, it is not an absolute method because many fundamental steps of this technique remain difficult to control fully (identical reaction of spikes and natural species, complete isotopic equilibrium). It is therefore necessary to remain rigorous by developing quantitative methods with limited cross-species transformations and by regularly monitoring parameters such as blank purity, mass bias and dead time detector.

VI. Acknowledgments

The authors would like to thank the National Research Agency (ANR, “Contaminants, Environnement et Santé” programme) for their financial support in the framework of the IDEA project.

References

[1] J.C. Varekamp, P.R. Buseck, Appl. Geochem. 1 (1986) 65-73.

[2] J. Nriagu, C. Becker, Sci. Total Environ. 304 (2003) 3-12.

[3] M.S. Gustin, S.E. Lindberg, K. Austin, M. Coolbaugh, A. Vette, H. Zhang, Sci. Total Environ. 259 (2000) 61-71.

[4] E.G. Pacyna, J.M. Pacyna, F. Steenhuisen, S. Wilson, Atmos. Environ. 40 (2006) 4048-4063.

[5] AMAP/UNEP, Arctic monitoring and assessment programme, UNEP chemical branch (2008) pp 159. http://www.chem.unep.ch/mercury/Atmospheric_Emissions/Technical_background_report.pdf Accessed 13 July 2011

[6] R.C. Rodriguez Martin-Doimeadios, E. Tessier, D. Amouroux, R. Guyoneaud, R. Duran, P. Caumette, O.F.X. Donard, Mar. Chem. 90 (2004) 107-123.

[7] V. Celo, D.R.S. Lean, S.L. Scott, Sci. Total Environ. 368 (2006) 126-137.

[8] W.F. Fitzgerald, C.H. Lamborg, C.R. Hammerschmidt, Chem. Rev. 107 (2007) 641-662.

[9] M. Ranchou-Peyruse, M. Monperrus, R. Bridou, R. Duran, D. Amouroux, J.C. Salvado, R. Guyoneaud, Geomicrobiol. J. 26 (2009) 1-8.

[10] R. Bridou, M. Monperrus, P.R. Gonzalez, R. Guyoneaud, D. Amouroux, Environ. Toxicol. Chem. 30 (2011) 337-344.

[11] F.M.M. Morel, A.M.L. Kraepiel, M. Amyot, Annu. Rev. Ecol. Syst. 29 (1998) 543-566.

[12] L. Bensefa-Colas, P. Andujar, A. Descatha, Rev. Med. Interne 32 (2010) 416-424.

[13] S. Ceccatelli, E. Daré, M. Moors, Chem.-Biol. Interact. 188 (2010) 301-308.

[14] NRC, Toxicological effects of methylmercury, National Academy Press, Washington, DC, 2000.

[15] P. Grandjean, M. Perez, Int. J. Environ. Health 2 (2008) 417-428.

[16] K. Oyanagi, F. Ikuta, Brain Nerve 45 (1993) 241-244.

[17] K. Eto, M. Marumoto, M. Takeya, Neuropathol. 30 (2010) 471-479.

[18] EC, Amending Regulation (EC) N° 1881/2006 laying down maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation N° 629/2008, Oj N° 364, 20.12.2006, 2008.

[19] JECFA, Summary and conclusions of the sixty-seventh meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee and Food Additives (JECFA), JECFA 67/SC, 2008. ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/jecfa67_final.pdf Accessed 13 july 2011

[20] JECFA, Evaluation of certain contaminants in food (Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 959, 2011. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_959_eng.pdf Accessed 13 july 2011

[21] ANSES, AVIS de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition au mercure des femmes enceintes et allaitantes et des jeunes enfants. Saisine n° 2002-SA-0014, 2002.

[22] R. Dabeka, A.D. McKenzie, D.S. Forsyth, H.B.S. Conacher, Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Expo. Risk Assess. 21 (2004) 434-440.

[23] T. Kuballa, M. Moellers, K. Schoeberl, D.W. Lachenmeier, Eur. Food Res. Technol. 232 (2010) 1-6.

[24] T. Stoichev, D. Amouroux, R.C. Rodriguez Martin-Doimeadios, M. Monperrus, O.F.X. Donard, D.L. Tsalev, Appl. Spectrosc. Rev. 41 (2006) 591-619.

[25] E. Bjorn, T. Larsson, L. Lambertsson, U. Skyllberg, W. Frech, AMBIO J. Human Environ. 36 (2007) 443-451.

[26] D. Amouroux, F. Seby, M. Monperrus, F. Pannier, C. Mendiguchia, C. Benoit-Bonnemason, O.F.X. Donard (Eds.), Chemical marine monitoring: policy framework and analytical trends. Chapter 5: chemical species. In press. First edition. John Wiley and Sons, Ltd, 2011.

[27] P. Rodriguez-Gonzalez, J.M. Marchante-Gayon, J.I. Garcia Alonso, A. Sanz-Medel, Spectrochim. Acta B 60 (2005) 151-207.

[28] C.M. Tseng, A. De Diego, F.M. Martin, D. Amouroux, O.F.X. Donard, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 743-750.

[29] C.M. Tseng, A. De Diego, J.C. Wasserman, D. Amouroux, O.F.X. Donard, Chemosphere 39 (1999) 1119-1136.

[30] L.H. Reyes, J.L.G. Mar, A. Hernandez-Ramirez, J.M. Peralta-Hernandez, J.M.A. Barbosa, H.M.S. Kingston, Microchim. Acta 172 (2011) 3-14.

[31] García Fernández R., Montes Bayón M., García Alonso J. I., Sanz-Medel A., J. Mass Spectrom. 35 (2000) 639-646.

[32] S. Sturup, H.R. Hansen, B. Gammelgaard, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 541-554.

[33] P. Rodriguez-Gonzalez, J.I. Garcia Alonso, J. Anal. At. Spectrom. 25 (2010) 239-259.

[34] R. Falter, H. Hintelmann, P. Quevauviller, Chemosphere 39 (1999) 1039-1049.

[35] R.C. Rodriguez Martin-Doimeadios, T. Stoichev, E. Krupp, D. Amouroux, M. Holeman, O.F.X. Donard, Appl. Organomet. Chem. 16 (2002) 610-615.

[36] R.C. Rodriguez Martin-Doimeadios, M. Monperrus, E. Krupp, D. Amouroux, O.F.X. Donard, Anal. Chem. 75 (2003) 3202-3211.

[37] M. Monperrus, E. Krupp, D. Amouroux, O.F.X. Donard, R.C. Rodriguez Martin-Doimeadios, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 261-272.

[38] Ã. Castillo, P. Rodriguez-Gonzalez, G. Centineo, A.F. Roig-Navarro, J.I. Garcia Alonso, Anal. Chem. 82 (2010) 2773-2783.

[39] D. Schaumloffel, R. Lobinski, Int. J. Mass Spectrom. 242 (2005) 217-223.

[40] M. Popp, S. Hann, G. Koellensperger, Anal. Chim. Acta 668 (2010) 114-129.

[41] R.E. Ferguson, Combust. Flame 1 (1957) 431-437.

[42] A.A. Smales, R.K. Webster, Anal.Chim. Acta 18 (1958) 587-596.

[43] A.A. Plentl, E.A. Friedman, Am. J. Obstet. Gynecol. 84 (1962) 1242-1252.

[44] M. Unger, K.G. Heumann, Fresenius Z. Anal. Chem. 320 (1985) 525-529.

[45] R. Clough, S.T. Belt, E.H. Evans, B. Fairman, T. Catterick, Anal. Chim. Acta 500 (2003) 155-170.

[46] M.L. Avramescu, J. Zhu, E. Yumvihoze, H. Hintelmann, D. Fortin, D.R.S. Lean, Environ. Toxicol. Chem. 29 (2010) 1256-1262.

[47] J. Meija, Z. Mester, Anal. Chim. Acta 607 (2008) 115-125.

[48] H. Kipphardt, P. De Bièvre, P.D.P. Taylor, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 330-341.

[49] M. Monperrus, P. Rodriguez Gonzalez, D. Amouroux, J.I. Garcia Alonso, O.F.X. Donard, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 655-666.

[50] L. H. Reyes, G. M. Mizanur Rahman, T. Fahrenholz, H.M. Skip Kingston, Anal. Bioanal. Chem. 390 (2008) 2123-2132.

[51] J.P. Snell, I.I. Stewart, R.E. Sturgeon, W. Frech, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 1540-1545.

[52] D. Point, W.C. Davis, J.I. Garcia Alonso, M. Monperrus, S.J. Christopher, O.F.X. Donard, P.R. Becker, S.A. Wise, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 787-798.

[53] D. Point, J. Ignacio Garcia Alonso, W. Clay Davis, S.J. Christopher, A. Guichard, O.F.X. Donard, P.R. Becker, G.C. Turk, S.A. Wise, J. Anal. At. Spectrom. 23 (2008) 385-396.

[54] J. Meija, L. Yang, J.A. Caruso, Z. Mester, J. Anal. At. Spectrom. 21 (2006) 1294-1297.

[55] P. Rodriguez-Gonzalez, J.I. Garcia Alonso, J. Anal. At. Spectrom. 25 (2010) 239-259.

[56] L. Ouerdane, Z. Mester, J. Meija, Anal. Chem. 81 (2009) 5075-5079.

[57] C.S.J. Wolff Briche, C. Harrington, T. Catterick, B. Fairman, Anal. Chim. Acta 437 (2001) 1-10.

[58] L. Yang, R.E. Sturgeon, J. Anal. At. Spectrom. 20 (2005) 724-729.

[59] C.P. Ingle, B.L. Sharp, M.S.A. Horstwood, R.R. Parrish, D.J. Lewis, J. Anal. At. Spectrom. 18 (2003) 219-229.

[60] J. Meija, L. Ouerdane, Z. Mester, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 199-205.

[61] I. Gelaude, R. Dams, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, Anal.Chem. 74 (2002) 3833-3842.

[62] M. Wang, Y. Zhang, W.Y. Feng, M. Guan, B. Wang, J.W. Shi, M.T. Zhu, B. Li, Y.L. Zhao, Z.F. Chai, Chin. J. Anal. Chem. 35 (2007) 945-948.

[63] S. Sturup, C. Chen, J. Jukosky, C. Folt, Int. J. Mass Spectrom. 242 (2005) 225-231.

[64] C.J. Park, H. Do, J. Anal. At. Spectrom. 23 (2008) 997-1002.

[65] L. Huguet, S. Castelle, J. Schafer, G. Blanc, R. Maury-Brachet, C. Reynouard, F. Jorand, Sci. Total Environ. 408 (2010) 1338-1348.

[66] R.D. Wilken, R. Falter, Appl. Organomet. Chem. 12 (1998) 551-557.

[67] M. Resano, I. Gelaude, R. Dams, F. Vanhaecke, Spectrochim. Acta B 60 (2005) 319-326.

[68] Q. Tu, J. Qian, W. Frech, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 1583-1588.

[69] S.J. Christopher, S.E. Long, M.S. Rearick, J.D. Fassett, Anal. Chem. 73 (2001) 2190-2199.

[70] S.H. Lee, J.K. Suh, Microchem. J. 80 (2005) 233-236.

[71] D.S. Vidler, R.O. Jenkins, J.F. Hall, C.F. Harrington, Appl. Organomet. Chem. 21 (2007) 303-310.

[72] L. Yang, Z. Mester, R.E. Sturgeon, J. Anal. At. Spectrom. 18 (2003) 431-436.

[73] L. Yang, V. Colombini, P. Maxwell, Z. Mester, R.E. Sturgeon, J. Chrom. A 1011 (2003) 135-142.

[74] R. Clough, S.T. Belt, B. Fairman, T. Catterick, E.H. Evans, J. Anal. At. Spectrom. 20 (2005) 1072-1075.

[75] M. Monperrus, R.C.R. Martin-Doimeadios, J. Scancar, D. Amouroux, O.F.X. Donard, Anal. Chem. 75 (2003) 4095-4102.

[76] M. Jimenez Moreno, J. Pacheco-Arjona, P. Rodriguez-Gonzalez, H. Preud'Homme, D. Amouroux, O.F.X. Donard, J. Mass Spectrom. 41 (2006) 1491-1497.

[77] H. Hintelmann, H.T. Nguyen, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 360-365.

[78] J.P. Snell, C.R. Quétel, J. Anal. At. Spectrom. 20 (2005) 447-454.

[79] N. Poperechna, K.G. Heumann, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 153-159.

[80] G. Centineo, P. Rodriguez-Gonzalez, E.B. Gonzalez, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, N.F. Cardona, J.L. Aranda Mares, S.B. Nebot, Anal. Bioanal. Chem. 384 (2006) 908-914.

[81] H. Garraud, V. Vacchina, F. Seby, J. Dumont, V. Sirot, T. Guérin, J.-C. Leblanc, Ann. Toxicol. Anal. 19 (2007) 71-80.

[82] K. Inagaki, T. Kuroiwa, T. Narukawa, T. Yarita, A. Takatsu, K. Okamoto, K. Chiba, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2047-2054.

[83] S.W.C. Chung, B.T.P. Chan, J. Chrom. A 1218 (2010) 1260-1265.

[84] J. Qvarnstrom, W. Frech, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 1486-1491.

[85] L.H. Reyes, G.M.M. Rahman, H.M.S. Kingston, Anal. Chim. Acta 631 (2009) 121-128.

[86] A.G. Bravo, J.L. Loizeau, S. Bouchet, A. Richard, J.F. Rubin, V.G. Ungureanu, D. Amouroux, J. Dominik, Environ. Sci. Pollut. Res. 17 (2010) 1422-1432.

[87] V.F. Taylor, B.P. Jackson, C.Y. Chen, Anal. Bioanal. Chem. 392 (2008) 1283-1290.

[88] S. Clémens, M. Monperrus, O.F.X. Donard, D. Amouroux, T. Guérin, Anal. Bioanal. Chem. (2011) 1-13, in press.

http://dx.doi.org/10.1007/s00216-011-5040-1 Accessed 13 july 2011

[89] L. Perna, A. LaCroix-Fralish, S. Sturup, J. Anal. At. Spectrom. 20 (2005) 236-238.

[90] W. Davis, S. Christopher, R. Pugh, O. Donard, E. Krupp, D. Point, M. Horvat, D. Gibičar, Z. Kljakovic-Gaspic, B. Porter, M. Schantz, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2335-2341.

[91] C. Mead, T.M. Johnson, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1529-1538.

[92] L.P. Yu, X.P. Yan, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 245-253.

[93] I. Arleny, H. Tabouret, P. Rodriguez-Gonzalez, G. Bareille, O.F.X. Donard, D. Amouroux, Mar. Pollut. Bull. 54 (2007) 1031-1036.

[94] S. Mishra, S. Bhalke, I.V. Saradhi, B. Suseela, R.M. Tripathi, G.G. Pandit, V.D. Puranik, Chemosphere 69 (2007) 972-978.

[95] J. Bustamante, A. Albisu, L. Bartolome, A. Prieto, A. Atutxa, S. Arrasate, E. Anakabe, A. de Diego, A. Usobiaga, O. Zuloaga, Int. J. Environ. Anal. Chem. 90 (2010) 722-736.

[96] B.L. Batista, J.L. Rodrigues, S.S. De Souza, V.C. Oliveira Souza, F. Barbosa Jr, Food Chem. 126 (2011) 2000-2004.

[97] C.M. Tseng, A. De Diego, F.M. Martin, D. Amouroux, O.F.X. Donard, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 743-750.

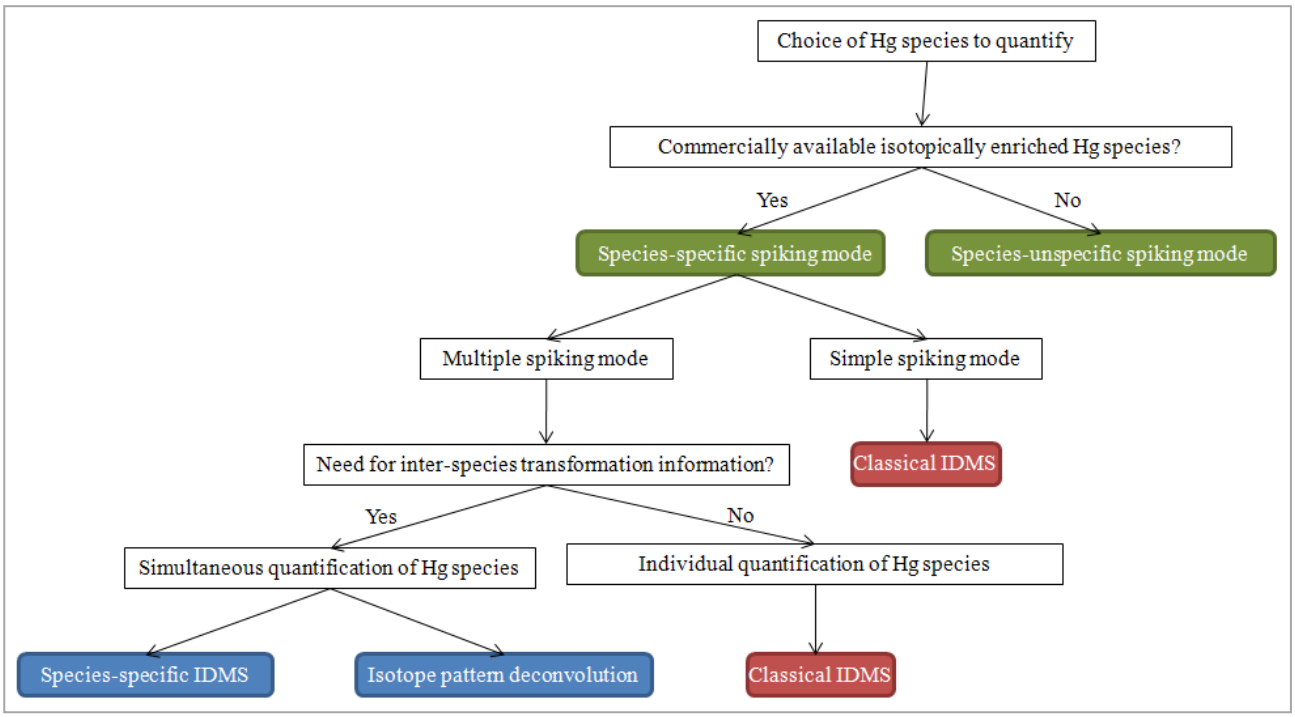


Figure 1: Flowchart on IDMS

Color figures are being intended for color reproduction on the Web

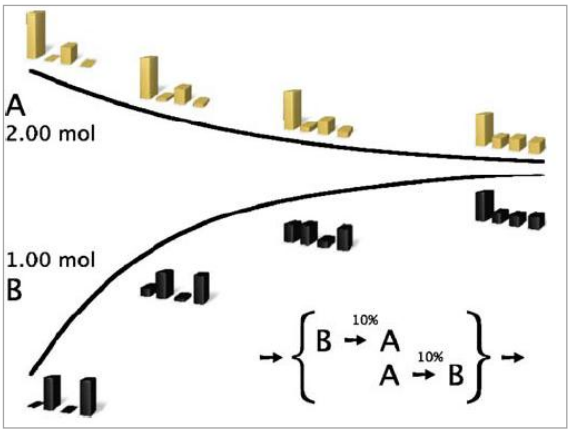


Figure 2: Consequences of interconversion of two compounds A and B on their isotope patterns (source: [60])

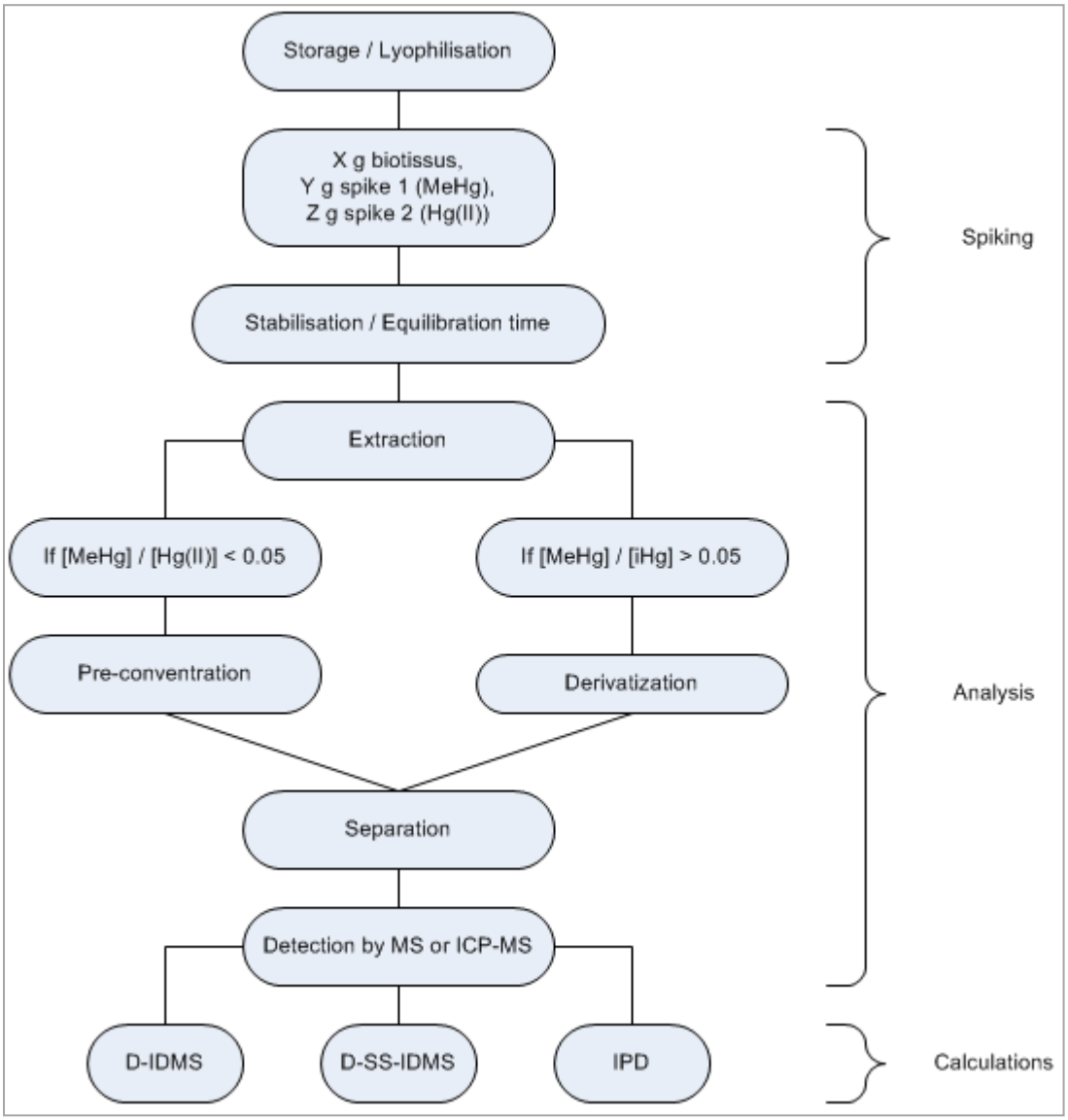


Figure 3: Schematic flow diagram of isotope dilution protocol for mercury speciation analysis in solid samples

Table 1: Examples of mercury speciation analysis in biological matrices using isotopic tracers

Reference materials/ biological tissues	ID procedure	Extraction/derivatisation	Separation - detection	Figure of merit	Reference
DORM-2, BCR-463, TORT-2	US spiking mode, ^{200}Hg(II)	Solid sampling	ETV-ICP-MS	LOD(MeHg) = 2 ng.g^{-1} LOD(THg) = 6 ng.g^{-1} RSD$_r$[1] = 5-14%	[61]
IAEA-436, DOLT-3	S-IDMS, ^{198}Hg	0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol or 0.15% (w/v) KCl or 0.1% (v/v) HCl	ICP-MS	-	[62]
Zooplankton, aquatic samples	S-IDMS, ^{199}iHg	2:1 HNO_3/HCl (v/v)	CV-ICP-MS	LOD(Me^{201}Hg) = 0.6 ng.L^{-1} LOD(^{200}iHg) = 1.4% ng.L^{-1} RSD$_r$ = 0.6 – 1.4%	[63]
DORM-2, NIST-1566b, KRISS tuna CRM	S-IDMS, ^{199}iHg	TMAH/$SnCl_2$	CV-ICP-MS	LOD = 0.018 ng.g^{-1}	[64]
IAEA-407, plankton (FF[2])	S-IDMS, ^{199}iHg	HCl + US/propylation	GC-ICP-MS	LOD = 0.05 pmol.L^{-1} RSD$_r$ = 5%	[65]
Trout (FF), cuttlefish (FF)	S-IDMS, ^{200}iHg	Distillation with H_2SO_4 + HCl	HPLC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 15 pg.g^{-1} RSD$_r$ = 5%	[66]
Freshwater fish (FF)	S-IDMS, ^{200}Hg	Solid sampling	ETV-ICP-MS	LOD = 6 ng.g^{-1} RSD$_r$ = 10%	[67]
DOLT-2, BCR-463, TORT-2	S-IDMS, ^{201}iHg	HCl + US /Ethylation + SPME	GC-MIP-AES or GC-ICP-MS	CV$_r$ = 6%	[68]
NIST-1946 (FF)	S-IDMS, ^{201}iHg	HNO_3/$HClO_4$ + MAE/$SnCl_2$ reduction	CV-ICP-MS	RSD$_r$ = 0.62%	[69]
BCR-463, CCQM-P39	S-IDMS, ^{202}Hg	HNO_3/H_2O_2 (v/v) + MAE	ICP-MS	RSD$_r$ = 0.5%	[70]
BCR-463, BCR-464	S-IDMS, ^{202}Hg	25% (m/v) TMAH + MAE	HPLC-ICP-MS	LOD (MeHg) = 0.5 µg.g^{-1} RSD$_r$ = 6%	[71]
DOLT-2	S-IDMS, ^{202}iHg	HCl/ethylation, propylation or butylation	GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 100-200 fg LOD(iHg) = 500-600 fg RSD$_r$(MeHg) = 0.3-4.2% RSD$_r$(iHg) = 0.1-7.0%	[31]
DORM-2, DOLT-2, DOLT-3	S-IDMS, Me^{198}Hg	25% (m/v) KOH/MeOH / Propylation + SPME	GC-ICP-MS	LOD = 2.1 ng.g^{-1} RSD$_r$ = 0.65%	[72]
DORM-2	S-IDMS, Me^{198}Hg	25% (m/v) KOH/MeOH / Propylation + SPME	GC-MS	LOD = 37 ng.g^{-1} RSD$_r$ = 2.1%	[73]

Reference materials/ biological tissues	ID procedure	Extraction/derivatisation	Separation - detection	Figure of merit	Reference
DORM-2	S-IDMS, $Me^{199}Hg$	50: 50 (v/v) H_2O:CH_3OH + 0.01% 2-mercaptoethanol	HPLC-ICP-MS	RSD_r = 11%	[45]
DORM-2, BCR-464	S-IDMS, $Me^{199}Hg$	50: 50 (v/v) H_2O:CH_3OH + 0.01% 2-mercaptoethanol	HPLC-CV-MC-ICP-MS	RSD_r = 0.45%	[74]
BCR-463, DORM-1	S-IDMS, $Me^{201}Hg$	25% (m/v) TMAH + MAE / Ethylation	GC-ICP-MS	LOD = 20-30 fg RSD_r = 0.3%	[35]
CRM-710	S-IDMS, $Me^{201}Hg$	25% (m/v) TMAH + MAE / Ethylation	GC-ICP-MS	LOD = 0.11 $\mu g.kg^{-1}$ RSD_r = 1.7 – 2.8	[75]
BCR-464, CRM-477	S-IDMS, $Me^{201}Hg$	25% (m/v) TMAH + MAE or (3/1, v/v) AcOH/MeOH + MAE / Ethylation	GC-EI-MS	-	[76]
DORM-2, TORT-2, SRM-1566b, zoobenthos, zooplankton	S-IDMS, $Me^{201}Hg$	4M HNO_3/Ethylation	GC-ICP-MS	LOD = 1 $ng.g^{-1}$ RSD_r = 2.3-7.5%	[77]
CCQM-P39	S-IDMS, $Me^{202}Hg$	HCl or TMAH/BuMgCl	GC-ICP-MS	RSD_r = 1.4%	[78]
BCR-463, DORM-2, Mussels, prawns, tuna, plaice, pollock, shark	S-IDMS, $Me^{202}Hg$	25% (m/v) TMAH/Ethylation, propylation	GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 1.4 $ng.g^{-1}$	[79]
BCR-464, CCQM-P39	S-IDMS, $Me^{202}Hg$	HCl/Propylation + SPME	GC-EI-MS	LOD = 28 $ng.g^{-1}$	[80]
DORM-2, molluscs, crustaceans, fish, prepared fish meals	S-IDMS, $Me^{202}Hg$	25% (m/v) TMAH + MAE / Propylation	GC-ICP-MS	LOD = 0.3 $ng.g^{-1}$ CV_R = 5%	[81]
NMIJ CRM 7402-a	S-IDMS, $Me^{202}Hg$	25% (m/v) KOH/MeOH + US or HCl + US/Propylation, phenylation	GC-ICP-MS	RSD_r = 1.6%	[82]
SRM 1947, 1566b, TORT-2, oyster, mullet	S-IDMS, $Me^{201}Hg$	1,5% (w/v) pancreatin solution/phenylation + SPME	GC-ICP-MS	LOD (MeHg, EtHg) = 0.3 $\mu g.kg^{-1}$ RSD_r < 15%	[83]
SRM 1566b, 2976, 2977and 1974a, b (FF)	S-IDMS /D-IDMS, $Me^{202}Hg$, ^{201}IHg	25% (m/v) TMAH + MAE / Ethylation	GC-ICP-MS	LOD = 5 $pg.g^{-1}$ RSD_r = 1.3-4.0%	[52]
DOLT-2, TORT-1	D-IDMS, $Me^{198}Hg$, ^{201}IHg	25% (m/v) TMAH + US + L-cysteine	HPLC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 1 pg LOD(IHg) = 5 pg RSD_r = 5%	[84]

Reference materials/ biological tissues	ID procedure	Extraction/derivatisation	Separation - detection	Figure of merit	Reference
BCR-464	D-IDMS, $Me^{200}Hg$, ^{199}IHg	a) 25% (m/v) TMAH + US, b) 25% (m/v) KOH/MeOH + US, c) 25% (m/v) TMAH + MAE, d) HCl + US, e) HNO3 + MAE, f) HAc + MAE, g) L-cysteine extraction, h) protease XIV, enzymatic extraction	HPLC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 0.78 µg.L^{-1} LOD(IHg) = 0.46 µg.L^{-1}	[50)
BCR-464, DOLT-3, NIST-1946 (FF)	D-IDMS, $Me^{200}Hg$, ^{199}IHg	HCl + MAE	HPLC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 16 µg.kg^{-1} LOD(IHg) = 9 µg.kg^{-1}	[85]
Bleak, asp, carp, perch, roach, pikeperch	D-IDMS, $Me^{201}Hg$, ^{199}IHg	25% (m/v) TMAH + MAE / Ethylation	GC-ICP-MS		[86]
Mussel tissue, golden grey mullet, anchovy, zooplankton, sea urchin, oyster tissue, BCR-710	D-IDMS, $Me^{201}Hg$, ^{199}IHg	25% (m/v) TMAH + MAE / Propylation, ethylation	GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 20 pg.L^{-1} LOD(IHg) = 120 pg.L^{-1}	[49]
Aquatic invertebrates, small fish	D-IDMS, $Me^{201}Hg$, ^{199}IHg	HNO_3 at 50°C/Ethylation	GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 72 pg.g^{-1} LOD(IHg) = 540 pg.g^{-1} RSD_r = 0.72-5.1%	[87]
BCR-464, DOLT-4	D-IDMS, $Me^{201}Hg$, ^{199}IHg	25% (m/v) TMAH + MAE / Propylation, ethylation	GC-EI-MS, GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 8.8 ng.g^{-1} LOD(IHg) = 9.2 ng.g^{-1} CVr = 2-7%	[38]
BCR-464, DOLT-4, TORT-2, seafood	D-IDMS, $Me^{201}Hg$, ^{199}IHg	25% (m/v) TMAH/propylation	GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 1.2 µg.kg^{-1} LOD(THg) = 1.4 µg.kg^{-1}	[88]
DORM-2, BCR-414	D-IDMS, $Me^{201}Hg$, ^{201}IHg	25% (m/v) KOH/MeOH + US / Ethylation	GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 2.8 ng LOD(IHg) = 4.6 ng	[89]
SRM 1947, SRM 1946, SRM 1974a, 1974b	D-IDMS, $Me^{202}Hg$, ^{201}IHg	a) 25% (m/v) TMAH + MAE/Ethylation b) HCl + MAE/Phenylation + SPME	a) GC-ICP-MS, b) GC-MS		[90]
SRM 1974a, 1566b	D-IDMS, $Me^{202}Hg$, ^{201}IHg, $MeCys^{202}Hg$, $^{201}CysIHg$	25% (m/v) TMAH + MAE or US/Ethylation, propylation or ethylation	GC-ICP-MS	LOD(MeHg) = 9 pg LOD(IHg) = 22 pg	[53]
DORM-2, DOLT-2	D-IDMS, ^{196}Hg, ^{204}Hg	BrCl	MC-CV-ICP-MS		[91]

[1]Relative standard deviation in repeatability conditions; [2]fresh-frozen

IV. Mise en place du couplage

IV.1 Préambule

Cette étude a débuté par une formation théorique et pratique de trois mois au sein de l'équipe LCABIE. Après habilitation sur la méthode d'analyse en spéciation du Hg par dilution isotopique et GC-ICP-MS à l'aide de MRCs biologiques et sédimentaires, des échantillons réels d'anguilles et civelles ont été analysés. La majorité des travaux effectués au cours de cette formation ont fait l'objet de plusieurs communications par affiches lors de colloques internationaux (Cf. « Communication ») et par écrit avec un article soumis au journal « International Journal of Environmental Analytical Chemistry » (article I). Par la suite, le couplage GC-ICP-MS a été installé au sein du laboratoire CIME de l'ANSES-LSA.

IV.2 Le couplage GC-ICP-MS

IV.2.1 Séparation par GC

Principe :

Une fois les espèces mercurielles dérivées afin qu'elles soient plus stables thermiquement, l'échantillon est introduit sous forme liquide en tête de colonne par une micro-seringue qui va traverser le septum pour déposer l'échantillon dans l'injecteur. Cet injecteur est constitué d'un liner situé en amont de la colonne. Le laboratoire LCABIE utilise un injecteur *splitless* (sur un GC Thermo Fisher). L'échantillon est vaporisé et mélangé dans le gaz porteur durant quelques secondes dans le liner avant d'être transféré à 95% dans la colonne. Les 5% restant sont évacués par l'ouverture de la vanne de fuite. Le laboratoire CIME utilise quant à lui un injecteur *on-column* (sur un GC Agilent), il n'y a donc pas d'étape de vaporisation. L'échantillon est directement mélangé au gaz vecteur et injecté à froid sur la colonne. Une fois volatilisés, les différents composés de l'échantillon vont être emportés par le gaz porteur (ou gaz vecteur) à travers la colonne et se séparer les uns des autres en fonction de leur affinité avec la phase stationnaire. La colonne capillaire utilisée par les deux équipes est une colonne apolaire *MXT-1* (Restek) en acier inoxydable de 30 m de longueur, 0,53 mm de diamètre interne et recouverte d'un film inerte *Crossbond 100% diméthylpolysiloxane* de 1 µm d'épaisseur. Plus un composé a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne et donc plus son temps de rétention sera important. Dans le cas des espèces mercurielles, le MeHg éthylé ou propylé (MeEtHg, MePrHg) est moins

lourd et moins volumineux que le iHg éthylé ou propylé (Et_2Hg, Pr_2Hg), il sortira donc avec un temps de rétention plus court.

Points critiques et optimisation :

Le principal point critique de la GC est le système d'injection. Lors de l'utilisation d'un injecteur « *on column* », l'ensemble de l'échantillon est introduit à froid dans la colonne. Une injection à froid permet de limiter les pics « traînants » et améliore la répétabilité et la reproductibilité de l'injection. Pour cela, la température dans l'injecteur, au moment de l'injection, doit être inférieure à la température d'ébullition du solvant afin de concentrer la goutte de solvant en entrée de colonne. Le volume injecté est ensuite libéré en augmentant rapidement la température de l'injecteur, en utilisant une grande vitesse d'injection et une seringue de 10 µL pour injecter un volume de 1 µL afin d'augmenter l'ampleur du mouvement. Une injection rapide de l'échantillon dans la colonne permet d'éviter qu'il s'étale le long de la colonne.

Le programme de montée en température du four utilisé au laboratoire LCABIE a été appliqué, soit un pallier de 60 °C pendant 1 min, suivi d'une montée en température de 60 °C min^{-1} jusqu'à atteindre 280 °C maintenus pendant 1 min. Par contre, la température initiale de l'injecteur a été fixée à 75 °C afin que cette température soit inférieure à la température d'ébullition du solvant (isooctane, $T_{éb}$ = 99 °C), puis un programme de montée en température est lancé avec une rampe de 120 °C min^{-1} (rampe maximale acceptée par l'injecteur) jusqu'à atteindre 280 °C, température finale de chauffe du four.

IV.2.2 Interface entre le GC et l'ICP-MS.

Les premiers travaux d'analyse en spéciation par le couplage GC-ICP-MS ont été publiés au milieu des années 80 (Van Loon et al., 1986). Les applications dans ce domaine et à partir de ce couplage connaissent depuis une popularité croissante et exponentielle. De nombreuses interfaces ont été développées qui connectent la sortie de la colonne du GC à l'entrée de la torche de l'ICP-MS. La condition de base que doit absolument respecter une interface est que les analytes soient maintenus sous forme gazeuse pendant le transport de la colonne du GC à l'ICP, afin qu'il n'y ait pas de condensation dans l'interface. Ceci est le plus souvent réalisé par chauffage permanent de la ligne de transfert afin d'éviter la formation de points froids. Néanmoins, il est à noter que certaines interfaces ont été conçues avec un transporteur d'aérosol comme l'explique Bouyssiere et al. (2002) dans une revue consacrée au couplage GC-ICP-MS et ses applications en spéciation.

Principe :

Le couplage GC-ICP-MS se divise en trois parties comme le montre la figure 6, soit le GC, l'interface et l'ICP-MS.

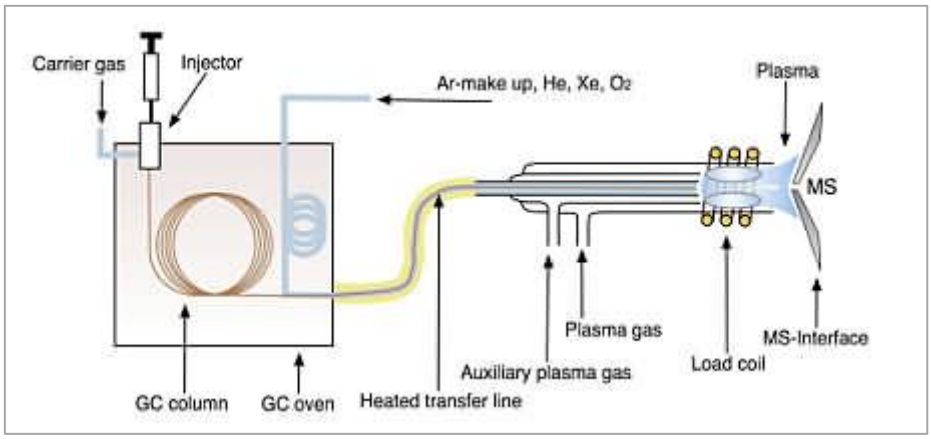


Figure 6: Schéma du couplage GC-ICP-MS (http://www.speciation.net/Public/Document/2007/08/11/2930.html)

Le GC est relié à la torche de l'ICP-MS par une ligne de transfert en acier inoxydable de longueur pouvant varier de 0,5 m à 1 m (0,85 m pour le couplage GC-ICP-MS de CIME, ligne commerciale, Thermo Fisher). Cette ligne de transfert est enveloppée d'un manteau thermostaté maintenu par un bloc chauffant à une température égale à la température la plus haute du programme de chauffe du four du GC. Un débit de gaz d'appoint dit gaz « make up » (argon (Ar), 300-350 ml min^{-1}) est introduit en sortie de colonne afin de s'additionner au débit de gaz porteur (hélium (He), 25 ml min^{-1}) pour assurer le transport des analytes gazeux du GC vers la torche. La figure 7 illustre ce montage.

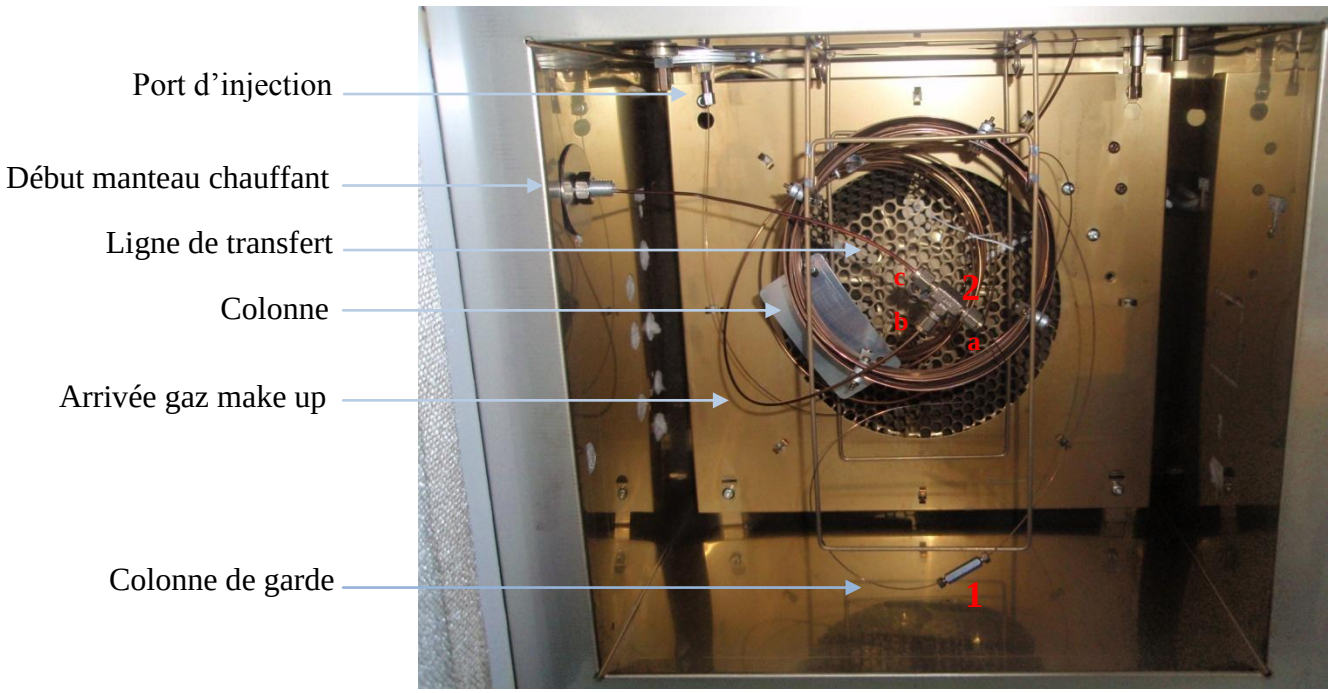


Figure 7 : Photographie du four du GC en couplage GC-ICP-MS

Les consommables en acier inoxydable utilisés pour le couplage sont passivés et traités *silcosteel* ou *sulfinert* (restek) afin de limiter les sites actifs. Les analytes sont injectés dans la colonne, vaporisés puis transportés par l'He le long de la colonne à des vitesses variables selon l'espèce. Ils traversent une première connexion (notée **1** sur la figure 7) qui relie la colonne à une colonne de garde *MXT* (restek) en acier inoxydable, de longueur variable selon la longueur de la ligne de transfert, de 0,28 mm de diamètre interne et 0,53 mm de diamètre externe. Cette colonne de garde est située après la colonne de séparation pour deux raisons. Premièrement, il n'existe pas à ce jour de pièce « T » (connexion **2** de la figure 7) proposant deux entrées de diamètre 1/16" (connexion avec la ligne de transfert (point **2c**) et l'arrivée du gaz make up (point **2b**)) et une entrée de diamètre suffisant pour connecter la colonne *MXT-1*. Par contre, Restek propose un « T » avec deux entrées de 1/16" et une entrée de 0,53 mm (point **2a**). Deuxièmement, la colonne s'encrasse rapidement au niveau de la ligne de transfert. La colonne de garde traverse la connexion « T » et se termine un peu avant la fin du manteau chauffant. A cet endroit, l'He et le gaz make up s'additionnent et les analytes sont poussés dans la torche à plasma.

Points critiques et optimisation :

La formation de points froids dans la ligne de transfert peut provoquer la condensation des analytes à cet endroit. L'interface entre le GC et la torche doit donc être constamment et suffisamment chauffée, sans dégrader les analytes par action thermique. La colonne de garde est connectée à la sortie de la colonne et traverse la ligne de transfert. Elle s'arrête à quelques centimètres avant la fin du manteau chauffant afin que le gaz porteur, suppléé par le gaz make up, transporte les analytes jusqu'au plasma. Une représentation schématique de l'interface entre le GC et l'ICP-MS est présentée en figures 8 et 9.

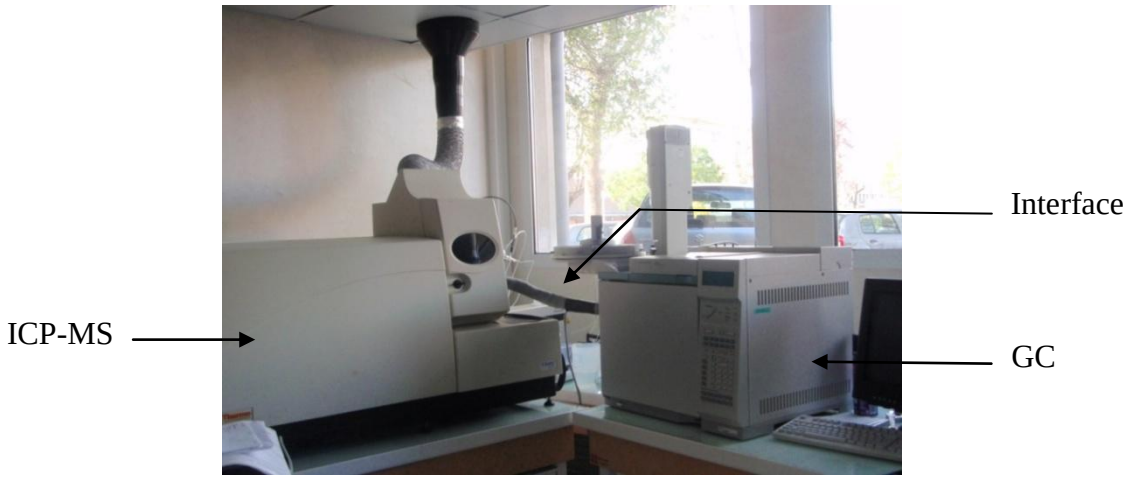


Figure 8 : couplage GC-ICP-MS

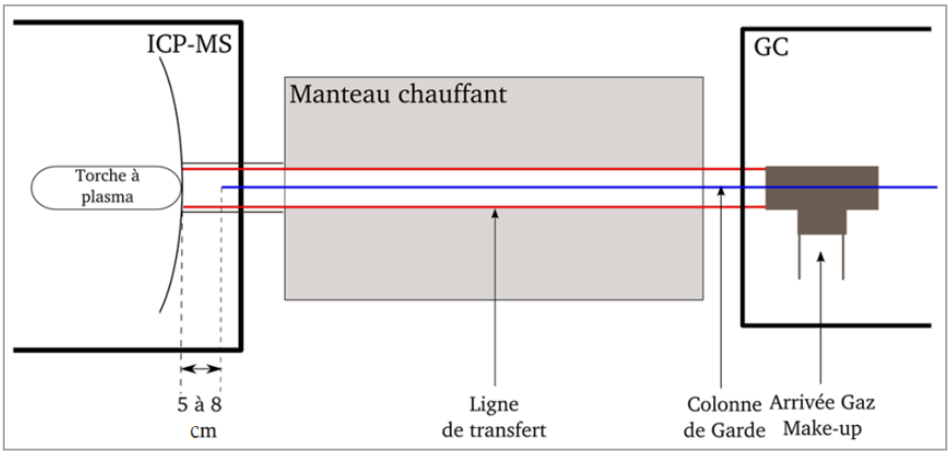


Figure 9 : Interface du couplage GC-ICP-MS

La distance entre la fin de la colonne de garde et la fin de la ligne de transfert peut être optimisée afin d'améliorer la sensibilité de la détection et la forme des pics. Plus cet espace est grand, plus le mélange perd en puissance en raison des pertes de charges et plus la sensibilité du couplage baisse. Pour conserver des conditions correctes d'analyse, la colonne de garde doit s'arrêter entre 5 à 8 cm avant la fin du manteau.

Le débit du gaz make up est également un facteur influençant la sensibilité de l'analyse. Plusieurs débits allant de 25 à 300 ml min^{-1} (25, 100, 200, 250, 300 ml min^{-1}) ont été testés. Pour des débits inférieurs à 200 ml min^{-1}, la sensibilité du couplage est insuffisante pour détecter les espèces Hg. Les chromatogrammes obtenus pour une solution standard naturellement enrichie en MeHg et iHg de 2 µg kg^{-1} pour des débits de gaz make up de 200, 250 et 300 ml min^{-1} sont présentés en figures 10 à 12.

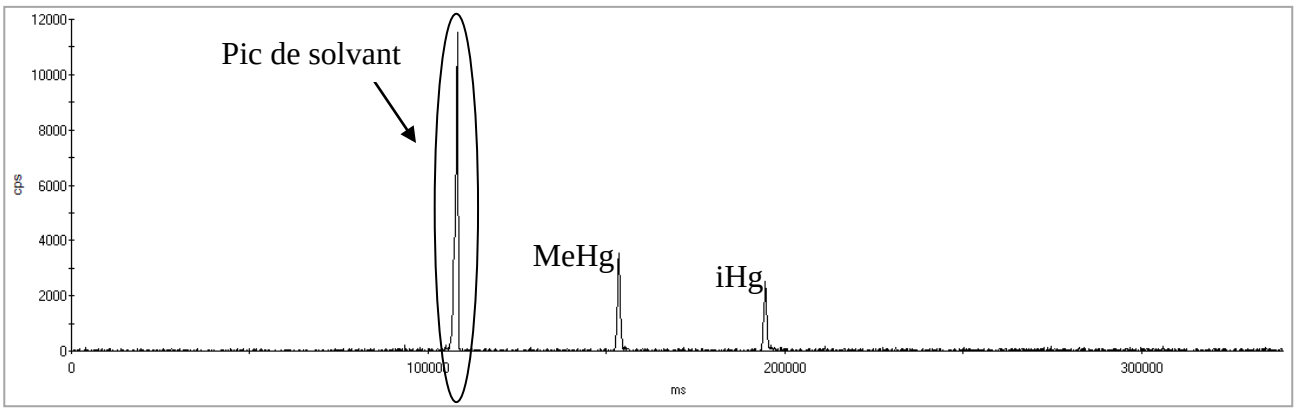


Figure 10 : Débit de gaz make up de 200 ml min^{-1}

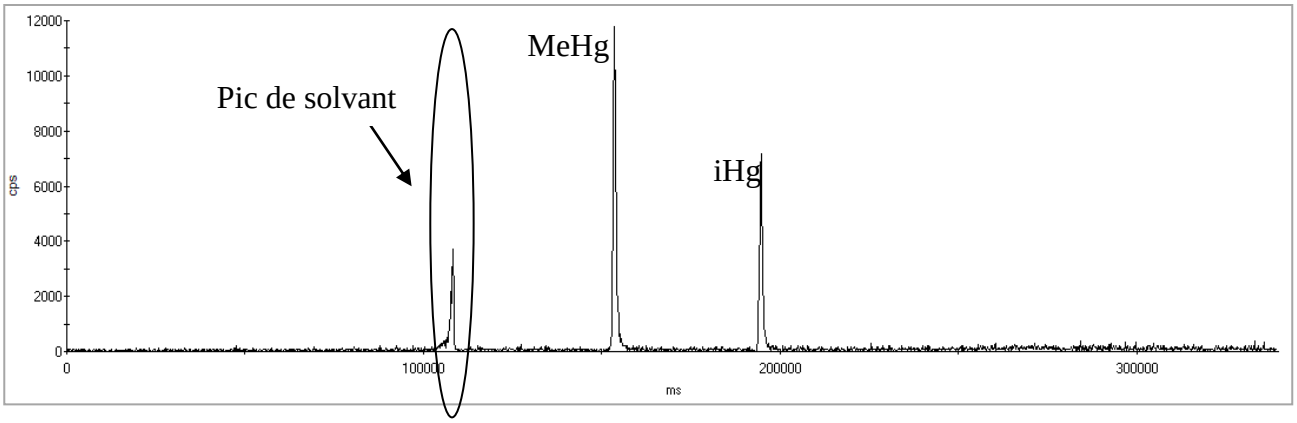


Figure 11 : Débit de gaz make up de 250 ml min^{-1}

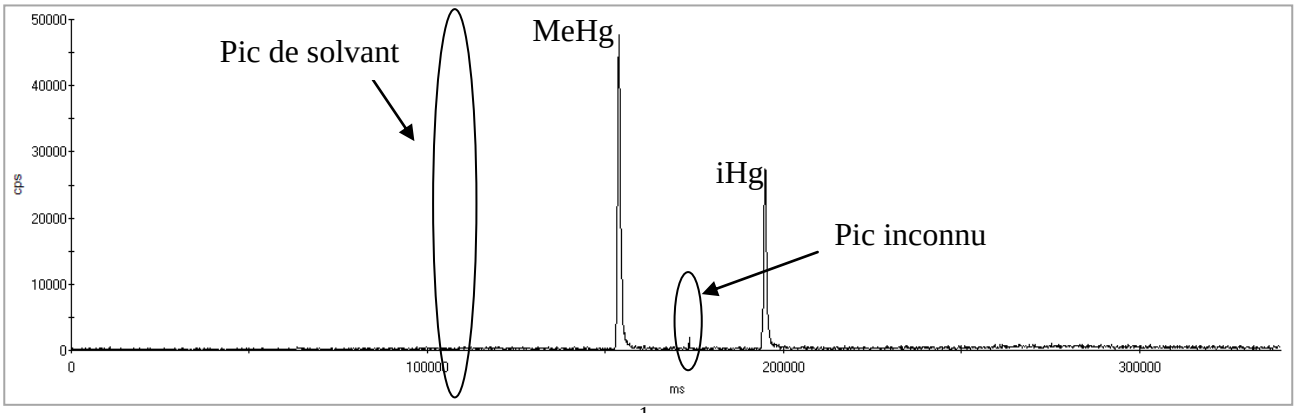


Figure 12 : Débit de gaz make up de 300 ml min^{-1}

Lorsque le débit de gaz make up augmente, une disparition de la fluctuation de la ligne de base sous l'action de la perturbation du plasma lors de la combustion du solvant (notée « pic de solvant » sur les figures) est observée. De plus, une importante augmentation des hauteurs de pics est observée car le couplage devient plus sensible. Sur la figure 12 est constatée avec l'augmentation de la sensibilité du couplage, l'apparition d'un pic inconnu de faible intensité entre le MeHg et le iHg. Son temps de rétention étant différent des temps de rétention des espèces étudiées, il ne perturbe pas l'intégration des pics. Il s'agit probablement d'un résidu évacué de la colonne ou d'un artéfact d'éthylmercure dans la solution standard ou le réactif de dérivation. La sensibilité atteinte avec un débit de gaz make up de 300 ml min^{-1} est satisfaisante pour une bonne intégration des pics de Hg, toutefois des débits plus élevés n'ont donc pas été testés. Néanmoins, nous avons constaté par la suite que des débits pouvant atteindre jusqu'à 400 ml min^{-1} peuvent être utilisés pour l'analyse d'échantillons possédant de très faibles concentrations en Hg.

IV.2.3 Détection par ICP-MS

Les appareils de détection optique (AES) ont été les premiers à utiliser un plasma de gaz rares induits par haute fréquence (Inductively Coupled Plasma ou ICP), comme source d'atomisation. Quelques années après (1984), un couplage entre l'ICP, utilisé pour dissocier les molécules et ioniser les atomes et un spectromètre de masse, a été élaboré puis commercialisé. Plusieurs revues récentes ont répertorié les études fondamentales et développements pour ce type d'appareils (Bacon et al., 2008, Beauchemin, 2010), ainsi que les travaux réalisés pour la détermination d'éléments d'intérêt et de leur spéciation dans diverses matrices biologiques, alimentaires ou environnementales (Moldovan et al., 2004, Waddell et al., 2005, Lobinski et al., 2006, Taylor et al., 2008 et 2010)

Principe :

L'ICP-MS est le couplage d'une source à plasma et d'un spectromètre de masse. Il peut se décomposer en quatre parties distinctes : la torche à plasma, l'interface et les lentilles ioniques, le spectromètre de masse et le système de détection, comme le montre la figure 13.

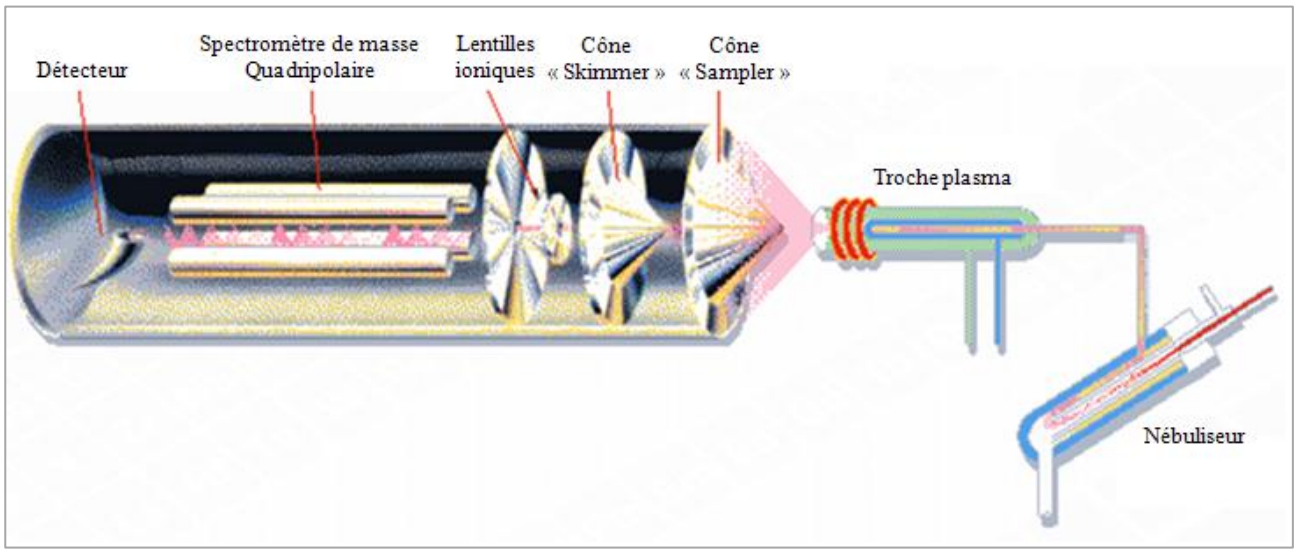


Figure 13 : Représentation schématique d'un ICP-MS

- La torche à plasma

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

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 ou ICP.

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

$$Ar + X \rightarrow Ar + X^{+*} \text{ ou } e^- + X \rightarrow X^+ + e^- + e^- \text{ ou } Ar^+ + X \rightarrow Ar + X^{+*}$$

avec : Ar = atome d'argon, X = atome d'analyte, * = état excité, $^+$ = état ionisé, e^- = électron

- L'interface et les lentilles ioniques

Située entre le plasma et le spectromètre de masse, l'interface est constituée de deux cônes successifs, généralement en nickel ou en platine, percés d'un orifice en leur centre, afin de permettre le passage sélectif des espèces. Un premier cône, appelé échantillonneur (ou « sampler ») pénètre dans la décharge et permet d'extraire les ions 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 précèdent, 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.

La portion de plasma ainsi prélevée (soit globalement 1% des ions formés par le plasma) est passée d'un milieu à température très élevées et à pression atmosphérique, à un milieu à température ambiante et sous vide, compatible avec le fonctionnement du spectromètre de masse.

- 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 simultanée des éléments étudiés, mais son mode de fonctionnement reste séquentiel.

- Le système de détection

Les ions sélectionnés par le quadripôle, sont ensuite détectés. Dans les systèmes multipolaires, des multiplicateurs d'électrons, qui consistent en un ensemble de plaques qui lorsqu'elles sont frappées par un ion, libèrent un électron tout en renvoyant cet ion sur une autre plaque qui libérera également un électron, entraînant une réaction en chaîne. 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.

Points critiques et optimisation :

La ID permet de corriger la majorité des biais analytiques (effets de mémoire, dérive du signal ou autres instabilité instrumentale), mais pas le biais en masse et le temps mort du détecteur (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005, Monperrus et al., 2008).

Le temps mort d'un système de détection (τ) est le temps pendant lequel le système est inactif après l'arrivée d'une première particule. Si une deuxième particule arrive pendant ce temps, elle ne sera pas détectée et risquera même de biaiser la mesure de la première particule. Le facteur τ dépend du détecteur et de l'électronique associée. Il est calculé d'après la formule 3 :

$$I_{corr\ (cps)} = \frac{I_{mes\ (cps)}}{1 - I_{mes\ (cps)} \times \tau\ (s)} \qquad (3)$$

Avec I_{corr} l'intensité du pic corrigée de τ, et I_{mes} l'intensité mesurée.

Le facteur τ est déterminé expérimentalement par mesure des rapports isotopiques $R_{Hg}^{202/201}$ et $R_{Hg}^{202/199}$ à différentes concentrations et en appliquant la formule 3, en faisant varier la valeur du facteur τ (de 0 à 100 ms par exemple). Le facteur τ réel est celui pour lequel aucune variation du rapport isotopique en fonction de la concentration est observé (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005). Ce facteur doit être évalué après chaque changement de détecteur.

Le biais en masse (a) est caractérisé par la différence entre le rapport isotopique mesuré et le rapport isotopique théorique. Lors de la formation du plasma, les ions les plus légers subissent une discrimination par rapports aux plus lourds. Cette discrimination instrumentale est due au procédé d'ionisation ou à une différence de détection par le spectromètre de masse et est issue d'une séparation par « nozzle separation effect » ou d'une séparation par effet de charge (Heumann et al 1998). Les ions les plus légers sont envoyés à la périphérie du plasma et sont donc plus facilement exclus lors du passage à travers l'interface de l'ICP-MS (Hill et al 2000).

Ce phénomène est dépendant du temps et donc le facteur correctif *a* doit être évalué régulièrement. Il existe deux méthodes pour le déterminer : l'analyse d'un échantillon de composition isotopique connue ou certifiée, entre chaque mesure de l'échantillon (Ruiz Encinar et al., 2000) ou l'analyse en continu (analyse simultanée avec l'échantillon) d'un étalon interne de composition isotopique certifiée (Martin-Doimeadios et al., 2002, Monperrus et al., 2008). Nous avons choisi d'ajouter en continu une solution liquide de Tl, par l'entrée haute de la torche, parallèlement à l'introduction sous forme de gaz des analytes (figure 14).

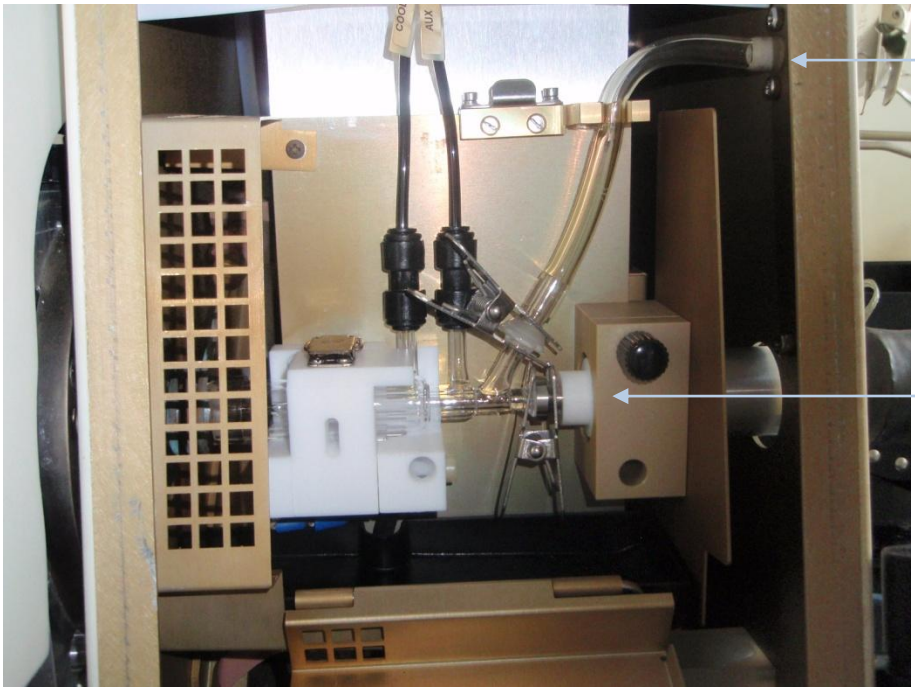


Figure 14 : Photographie de la torche en couplage GC-ICP-MS

Le biais en masse est calculé à partir de la formule 4.

$$a = \left(R_{th} \middle| R_{exp}\right)^{\left(1/M(205) - M(203)\right)-1} \qquad (4)$$

avec Rt_h = rapport théorique 205/203 du Tl figurant sur le certificat du fabriquant, R_{exp} = rapport expérimental 205/203 mesuré au niveau de la fenêtre de temps de sortie du pic, *M(205) et M(203)* = masse moléculaire du Tl pour les isotopes 205 et 203

Pour le MeHg et le iHg, plusieurs valeurs de biais en masse (a_1, a_2, a_3, a_4…, a_n) sont calculées dans les plages d'intégration des pics correspondants, soit pour différentes mesures de rapports R_{th}/R_{exp} comme le montre la figure 15.

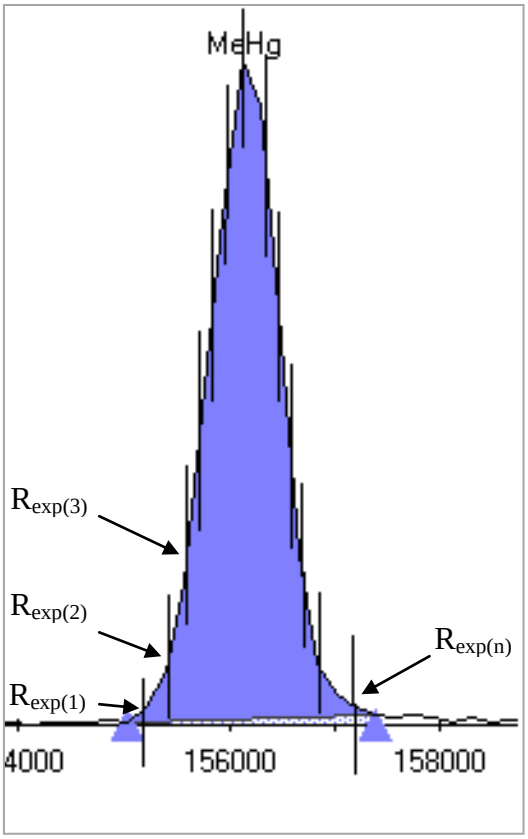


Figure 15 : Evaluation du biais en masse du MeHg dans le BCR-464, à différent valeurs R_{exp} dans la plage d'intégration du pic

Le biais en masse conservé est égal à la moyenne des valeurs a_1, a_2, a_3, …, a_n et est jugé acceptable si l'écart-type de mesure est inférieure à 5% de sa valeur, critère défini par notre laboratoire.

Par exemple :

si a = -0,0169 ± 0,0662

alors 5% de -0,0169 = -0,000845

donc 0,0662 > 5% de a

Non acceptable

Si l'estimation faite est jugée inacceptable, le biais en masse est de nouveau déterminé en prenant en compte une plus grande plage d'intégration.

Le biais en masse peut également être déterminé par IPD. La prise en considération de plus d'isotope que les trois strictement requis offre la possibilité de corriger le résultat final des erreurs systématiques telles que les discriminations de masse (Rodriguez-Gonzalez et al., 2010). Dans cette détermination, les écarts entre les rapports mesurés et les rapports théoriques sont considérés comme étant uniquement liés au bais de masse.

Après détermination du biais en masse, les rapports isotopiques mesurés sont corrigés de la discrimination de masse par la formule 5.

$$R_{corr} = \frac{R_{mes}}{1 + a\,\Delta m} \qquad (5)$$

avec *Rcorr* = rapport isotopique corrigé, *Rmes* = rapport isotopique mesuré, *a* = biais en masse, *Δm* = différence entre les deux masses isotopiques étudiés (ex : 202-201 ou 202-199)

Un parfait contrôle de ces deux paramètres assure une mesure correcte des rapports isotopiques modifiés.

V. Conditions expérimentales

L'objectif de cette étude a été d'optimiser la méthode de préparation d'échantillon afin qu'elle soit efficace, simple et rapide en engendrant peu ou pas de transformations inter-espèces (méthylation, déméthylation). Ce chapitre traite du marquage de l'échantillon par les solutions standards enrichies en un isotope, de l'extraction et de la dérivation. Une partie des travaux a été menée au sein du laboratoire LCABIE à Pau.

Les réactifs et matériels utilisés dans cette étude sont détaillés dans les articles I et II.

V.1 Instrumentation

Laboratoire LCABIE :

Le système micro-ondes semi-ouvert utilisé dans cette étude est le système Discover fabriqué et commercialisé par la société *CEM* (Saclay, France). Ce système est équipé d'un passeur automatique d'échantillon à 24 positions et de récipients de digestion en verre de 22 mL. Une centrifugeuse Rotofix 32A fabriquée et commercialisée par la société *HettichLab* (Chasse Sur Rhone, France) a été utilisée pour la séparation des phases aqueuse et organique. Un pH-mètre WTW series pH 720 fabriqué et commercialisé par la société *Inolab* (Froges, France) a été utilisé pour ajuster le pH des solutions avant dérivation.

Laboratoire CIME :

Deux systèmes d'extraction ont été utilisés :

- Un système micro-onde fermé Multiwave fabriqué et commercialisé par la société Anton Paar (Courtaboeuf, France) et équipé d'un rotor à six récipients de digestion en quartz de 50 mL.
- Un système de digestion *digi*PREP fabriqué et commercialisé par la société *SCP Science* (Courtaboeuf, France) et pouvant recevoir 48 *digi*TUBES.

Une centrifugeuse Universal 320 fabriquée et commercialisée par la société *Hettich* (Tuttlingen, Germany) a été utilisée pour la séparation des phases aqueuse et organique. Un pH-mètre Seven Easy fabriqué et commercialisé par la société *Mettler Toledo* (Viroflay, France) a été utilisé pour ajuster le pH des solutions avant dérivation.

V.2 Echantillons et matériaux de référence certifiés

Les Matériaux de Référence Certifiés (MRC) utilisés dans cette étude, TORT-2 (Hépatopancréas de homard), BCR-464 (Thon) et DOLT-4 (foie d'aiguillat), sont commercialisés par la société *LGC Standard* (Molsheim, France). Le TORT-2 a de faibles concentrations en MeHg et iHg (152 µg kg^{-1} et 118 µg kg^{-1} respectivement) alors que le DOLT-4 présente de plus fortes teneurs (1330 µg MeHg kg^{-1} et 1250 µg iHg kg^{-1}). Le BCR-464 est certifié avec une faible teneur en iHg (120 µg kg^{-1}) et une forte teneur en MeHg (5120 µg kg^{-1}).

Les solutions de référence certifiées enrichies en un isotope, IES-Hg199 et IES-MMHg201, sont commercialisées par la société *ISC Science* (Oviedo, Espagne).

V.3 Préparation des échantillons avant analyse

V.3.1 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 le laboratoire LCABIE : rinçage à l'eau MilliQ, décontamination dans un bac d'acide HNO_3 à 10% pendant 1 h dans un bain à ultrasons, rinçage à l'eau MilliQ, décontamination dans un second bac d'acide HNO_3 à 10%

pendant 1 h dans un bain à ultrasons, rinçage à l'eau MilliQ, décontamination dans un bac d'acide HCl à 10% pendant 1 h dans un bain à ultrasons, rinçage à l'eau MilliQ et séchage en étuve à 40°C.

V.3.2 Préparation chimique des échantillons

Laboratoire LCABIE :

a) Marquage des échantillons avant extraction : une prise d'essai de 0,25 g (échantillon sec) ou 0,5 g (échantillon frais) est introduite dans les récipients en verre du système à micro-ondes. Le TMAH (5 ml), le spike ^{199}iHg et le spike ^{201}MeHg (volumes et concentrations calculés selon la teneur en HgT de l'échantillon) y sont ajoutés et pesés. Les récipients sont scellés et placés dans le passeur automatique du système de digestion par micro-ondes. Un programme en température de 75 °C pendant 4 minutes est appliqué. Les récipients sont introduits un par un dans le four et le système est équipé d'une sonde de température et de pression afin de contrôler ces deux paramètres pendant le chauffage.

b) Marquage des échantillons après extraction : la préparation est identique à la préparation d'échantillon *a)*, à l'exception que les deux spikes sont ajoutés à l'échantillon après l'étape d'extraction et à des volumes différents, prenant en compte la dilution de l'échantillon dans le solvant d'extraction.

c) Traitement des échantillons après extraction : les échantillons sont refroidis à la température ambiante puis une prise aliquote (volume calculé selon la concentration en HgT de l'échantillon) est prélevée dans un tube en verre de 22 ml (*Interchim*, France) contenant 5 ml d'une solution tampon acétate à pH 4. Le pH est contrôlé et ajusté à 4 avec du HCl. Des volumes d'isooctane (dépendant de la concentration en HgT de l'échantillon) et de réactif de dérivation ($NaBEt_4$ 1% ou $NaBPr_4$ 1%, 0,5 ml) y sont ajoutés. Les tubes sont vigoureusement agités manuellement pendant 5 minutes puis centrifugés à 3500 tours par minute et à température ambiante pendant 5 minutes. La phase supérieure (organique) est prélevée et placée dans un vial d'injection (*Agilent*, France) pour analyse par GC-ICP-MS. Il est conservé dans le noir à 4 °C si l'analyse ne se fait pas immédiatement.

Laboratoire CIME :

Les préparations chimiques des échantillons utilisées pour cette partie sont détaillées dans l'article II.

Laboratoires LCABIE et CIME :

Les concentrations et abondances isotopiques des deux solutions de spikes sont mesurées respectivement par dilution isotopique inversée et par analyse en abondance isotopique :

d) Analyse par dilution isotopique inversée : le spike ^{201}MeHg est quantifié à partir d'une solution standard naturelle de MeHgCl et le spike ^{199}iHg est quantifié à partir d'une solution standard naturelle de $HgCl_2$. Des volumes (5 ml) de solution tampon acétate de pH 4 sont introduits dans deux tubes en verre de 22 ml (*Interchim*, France). Dans le premier tube sont pesées les solutions ^{201}MeHg et MeHgCl et dans le second les solutions ^{199}iHg et $HgCl_2$, en volumes et concentrations dépendant des concentrations théoriques des spikes. Les deux tubes sont ensuite traités comme décris au paragraphe V.3.2 .c*) Traitement des échantillons après extraction*), sans subir d'extraction préalable.

e) Analyse en abondance isotopique : des volumes (5 ml) de solution tampon acétate de pH 4 sont introduits dans deux tubes en verre de 22 ml (*Interchim*, France). Dans le premier tube est ajouté le spike ^{201}MeHg et dans le second le spike ^{199}iHg en volumes dépendant des concentrations théoriques des spikes. Les deux tubes sont ensuite traités comme décris au paragraphe V.3.2.c*) Traitement des échantillons après extraction*), sans subir d'extraction préalable.

V.4 Quantification des espèces mercurielles

Laboratoire LCABIE :

L'ICP-MS est un X-SERIES 2 (Thermo Scientific) équipé d'une torche double entrée et d'un cône Xs. Le système chromatographique utilisé est un chromatographe gazeux Trace GC Ultra (Thermo Scientific) équipé d'un passeur automatique d'échantillon. Le GC est relié à la torche de l'ICP-MS par une ligne de transfert fabriquée au laboratoire. Le GC et l'ICP-MS sont reliés électroniquement par une carte dite « Trigger » permettant de synchroniser le temps mort avec l'injection de l'échantillon dans la colonne. Les conditions opératoires utilisées sont présentées dans le tableau 14.

L'acquisition des données a été réalisée en mode « temps résolu » (Time-Resolved-Analysis ou TRA). Le logiciel de traitement des données « TST » crée au sein du laboratoire LCABIE a été utilisé pour l'intégration des aires de pics. Les données sont traitées par D-IDMS et IPD à partir d'une feuille de calcul développée conjointement par le laboratoire LCABIE et l'Université d'Oviedo.

Tableau 14 : Mode opératoire utilisé au LCABIE

Paramètres GC	
Mode d'injection	Splitless
Température d'injection	250°C
Volume d'injection	2 µl
Colonne	MXT-1 Silcosteel, 30m x i.d. 0,53 mm x df 1,0 µm
Gaz porteur	He, 25 ml min^{-1}
Gaz make up	Ar, 300 ml min^{-1}
Programme de température	60 °C (1 min) - 60°C min^{-1} - 280°C (1 min)
Ligne de transfert	
Longueur du manteau	0,5 m
Colonne de garde	Silcosteel, i.d. 0,28 mm, o.d. 0,53 mm
Ligne de transfert	Silcosteel, i.d. 1,0 mm, o.d. 1/16 in
Paramètres ICP- MS	
Puissance rf	1250 W
Débits des gaz :	
Plasma	15 l min^{-1}
Auxiliaire	0,9 l min^{-1}
Nébuliseur	0,6 l min^{-1}
Isotopes, "dwell time"	Hg (202, 201, 200, 199, 198), 30 ms
	Tl (203, 205), 5 ms

Laboratoire CIME :

L'ICP-MS utilisé pour cette étude est un X-SERIES 2 (Thermo Scientific) équipé d'une torche double entrée et d'un cône Xs. Le système chromatographique utilisé est un GC 6890N, (Agilent) équipé d'un passeur automatique d'échantillon 7683 CN, (Agilent). Le GC est relié à la torche par une ligne de transfert commerciale (Restek).

Les conditions opératoires utilisées sont identiques à celles présentées dans le tableau 14, à l'exception de l'injection. Un volume d'injection de 1 µl est introduit dans un injecteur « *on-column* » à 75 °C puis une rampe de montée en température de 120 °C min^{-1} est appliquée jusqu'à atteindre 280 °C. L'acquisition des données a été réalisée en mode « temps résolu » (Time-Resolved-Analysis ou TRA). Le logiciel chromatographique de l'ICP-MS (*Plasmalab*) a été utilisé pour l'intégration des aires de pics. Les données sont traitées par S-IDMS et IDP avec la même feuille de calcul que le laboratoire LCABIE. Certaines données ont également été traitées par D-SS-IDMS à partir d'une feuille de calcul développées au sein du laboratoire LCABIE.

Commun au deux laboratoires :

Entre chaque solution analysée, un rinçage de la seringue est effectué avec de l'isooctane. La colonne et la colonne de garde sont régulièrement nettoyées en injectant une dizaine de fois de l'isopropanol. Elles sont également régulièrement régénérées par application d'un mode opératoire préconisé par le constructeur ; un débit d'He de 2,5 ml min^{-1} va circuler pendant 15 à 20 minutes dans la colonne afin d'évacuer toutes traces d'air puis la colonne va être chauffée selon le programme suivant : 10°C min^{-1} jusqu'à 320°C, maintenue pendant 2 à 3h.

VI. Résultats et discussion

Les travaux présentés en VI.1 ont été menés au sein du laboratoire LCABIE à Pau et ont fait l'objet d'un article soumis au journal « International Journal of Environmental Analytical Chemistry » (Article I). Le reste des travaux a été mené au sein du laboratoire CIME à Maisons-Alfort et a également fait l'objet d'un article accepté par «Analytical and Bioanalytical Chemistry » (Article II).

VI.1 Optimisation de l'étape de marquage isotopique

L'objectif de cette étude a été de déterminer l'efficacité du marquage isotopique des espèces mercurielles sur la quantification des taux de transformation. Les analyses ont été menées sur 3 prises d'essai analysées en triplicat de deux matériaux de référence certifiés (DOLT-4 et BCR-464). Lors de cette étude, les pourcentages de méthylation (M) et déméthylation (D) induits par les étapes d'extraction et de dérivation ont également été évalués.

Quatre méthodes de préparation d'échantillon ont été utilisées :

(1) Marquage isotopique des espèces mercurielles avant extraction MAE et dérivation par propylation.

(2) Marquage isotopique des espèces mercurielles avant extraction MAE et dérivation par éthylation.

(3) Marquage isotopique des espèces mercurielles après extraction MAE et dérivation par propylation.

(4) Marquage isotopique des espèces mercurielles après extraction MAE et dérivation par éthylation.

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article I et reportés sous forme graphique dans les figures 16 et 17. Les valeurs de référence certifiées sont représentées par un trait rouge et les intervalles de tolérance définis par les fabricants par des plages bleues. Les concentrations en HgT sont obtenues en sommant le MeHg et le iHg. Ces teneurs en HgT sont utilisées plutôt que les teneurs en iHg car elles sont certifiées et fournies avec un écart-type.

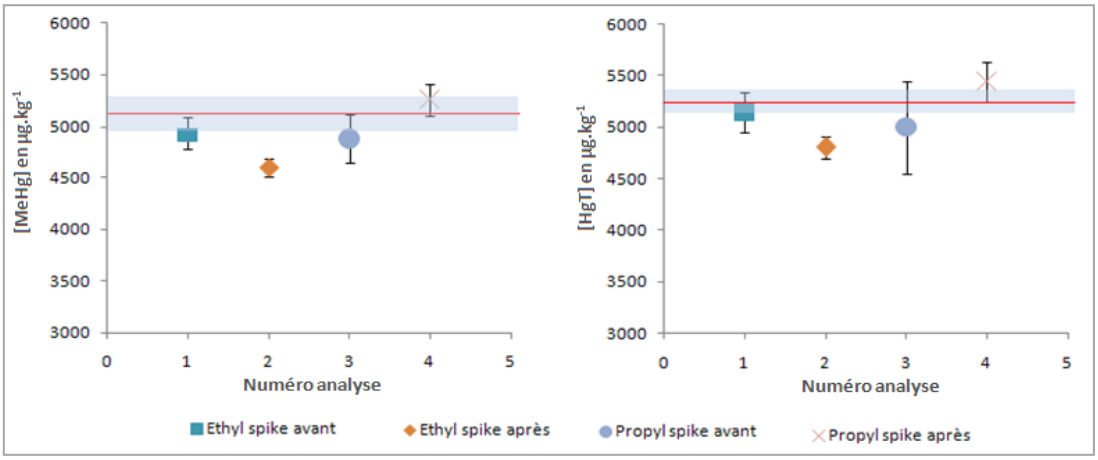


Figure 16 : Analyses du BCR-464 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 2 techniques de marquage et de dérivation

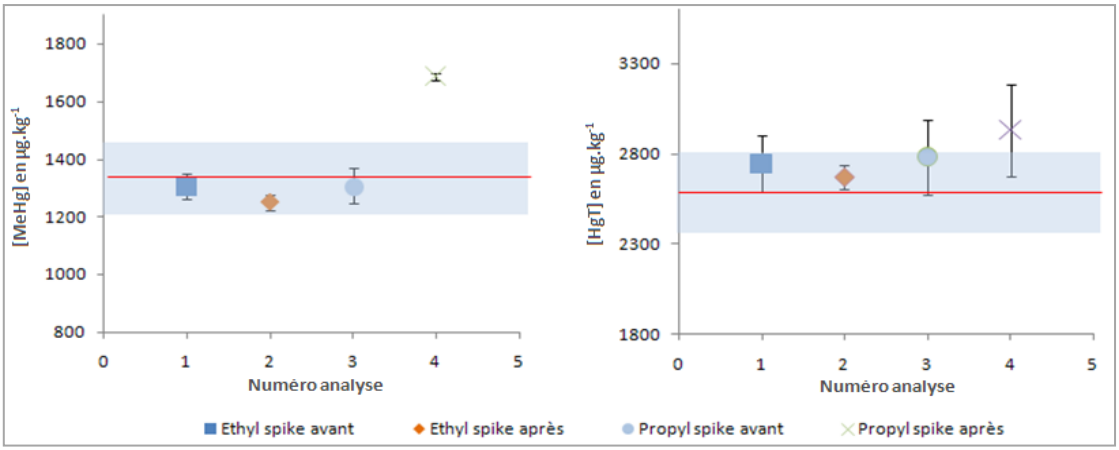


Figure 17 : Analyses du DOLT-4 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 2 techniques de marquage et de dérivation

Les concentrations obtenues en marquant l'échantillon avant l'étape d'extraction sont généralement en meilleur accord avec les teneurs certifiées que les concentrations obtenues en marquant l'échantillon après extraction. De plus, il n'y a pas de différence notable entre les teneurs obtenues par spike avant et propylation et celles obtenues par spike avant et éthylation.

Les taux de méthylation (M) et de déméthylation (D), présentés dans l'article I, permettent de constater la formation d'artéfacts durant l'étape d'extraction. En effet, particulièrement pour le

DOLT-4, les taux de M augmentent lorsque l'échantillon est spiké avant extraction (8% en éthylation et en propylation), par rapport aux taux calculés en marquant l'échantillon après extraction (0,9% en éthylation et 2% en propylation).

En conclusion, un marquage de l'échantillon avant l'étape d'extraction est préférable. Cette technique sera donc conservée pour le restant de l'étude. Par contre, cette étude ne permet pas de choisir entre le tétrapropylborate de sodium ($NaBPr_4$) et le tétraéthylborate de sodium ($NaBEt_4$). Néanmoins, le $NaBEt_4$ manque de spécificité. En effet, il peut être utilisé que pour la détermination du MeHg car les formes éthylées du iHg et de l'EtHg ne sont pas distinguables, les espèces dérivées étant toutes deux l'Et_2Hg. De plus, la pureté de ce réactif de dérivation a été remise en question par Garcia-Fernandez et al (2000) et par Leermarkers et al (2005) qui ont noté la présence d'impuretés métalliques dans certains lots commercialisés. Par conséquent, le $NaBPr_4$ sera retenu comme réactif de dérivation pour les travaux à venir.

VI.2 Optimisation de l'étape d'extraction

L'objectif de cette étude a été d'évaluer trois techniques communes d'extraction en comparant leur efficacité, vitesse et aptitude à conserver l'intégrité des échantillons.

Les caractéristiques de ces techniques sont :

(1) Extraction assistée par micro-ondes (MAE) : rapide (quelques min), efficace mais violente. Peut provoquer la destruction totale ou partielle de certains analytes (Tseng et al., 1997). Peut recevoir 6 échantillons avec le système Multiwave utilisant des matras en quartz.

(2) L'extraction solide-liquide par *digi*PREP (SLE) : relativement lente (2 h) mais moins agressive que la MAE. Peut recevoir 48 échantillons.

(3) L'extraction solide-liquide à température ambiante (ERT) : très lente (24 h) mais non agressive. Pas de limitation en nombre d'échantillon.

Les extractions solide/liquide sont reconnues pour être fortes consommatrices de solvants mais dans ces travaux, les volumes de TMAH sont inchangés, quelque soit la technique d'extraction utilisée.

Le mode opératoire appliqué au sein du laboratoire CIME pour des analyses en HgT pour la SLE a été conservé, avec néanmoins une légère augmentation de la température d'extraction pour

une meilleure efficacité (85°C pendant 2 h au lieu de 80 °C pendant 2 h). Après recherche bibliographique, la durée de la ERT a été fixée à une nuit (Clough et al., 2005, Yang et Sturgeon, 2005, Li et al., 2008, Yin et al., 2008). Pour plus de rigueur, la mise en contact des analytes avec la matrice se fait systématiquement à 17 h et la poursuite de la préparation des échantillons à 9 h le lendemain.

Trois programmes MAE ont été sélectionnés d'après l'article de Abranko et al. (2005) et comparés : 160 W (4 min), 120 W (8 min) et 60 W (3 min). Les figures 18 à 20 présentent les chromatogrammes obtenus pour la détermination du MeHg et du iHg du DOLT-4 par MAE et en utilisant les conditions opératoires énoncées.

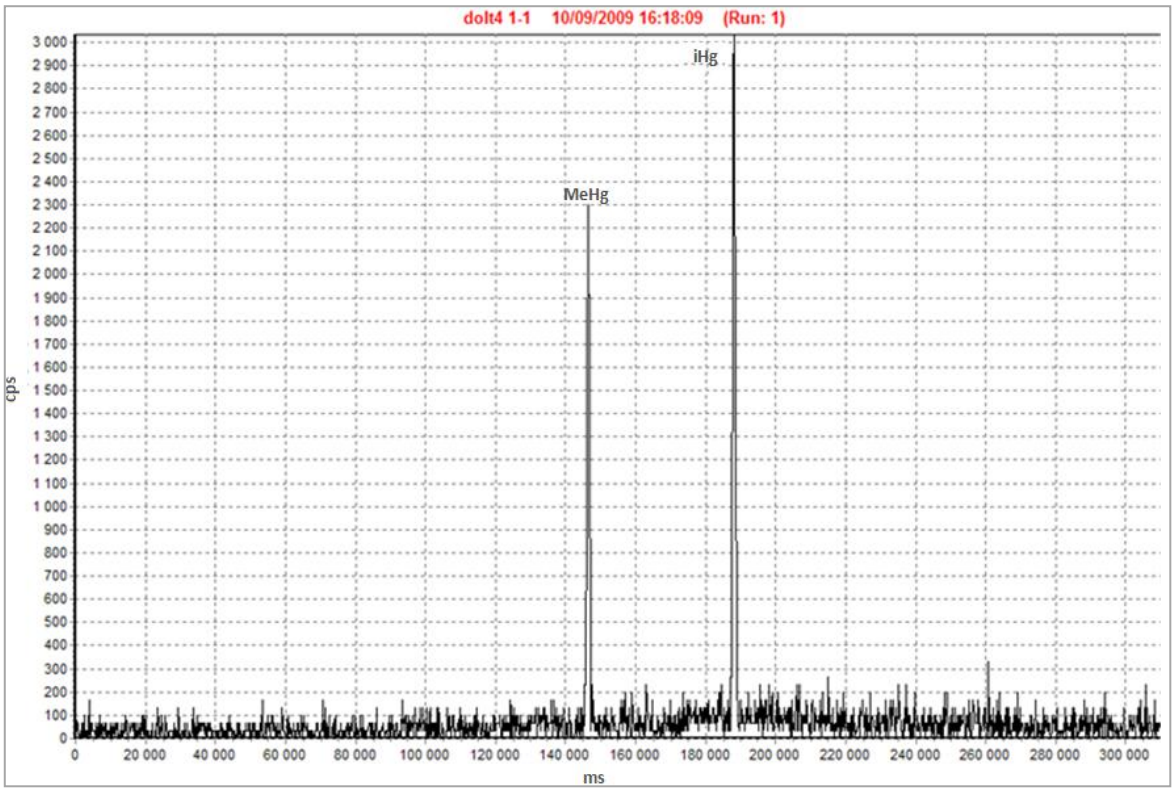


Figure 18 : MAE 160W (4 min)

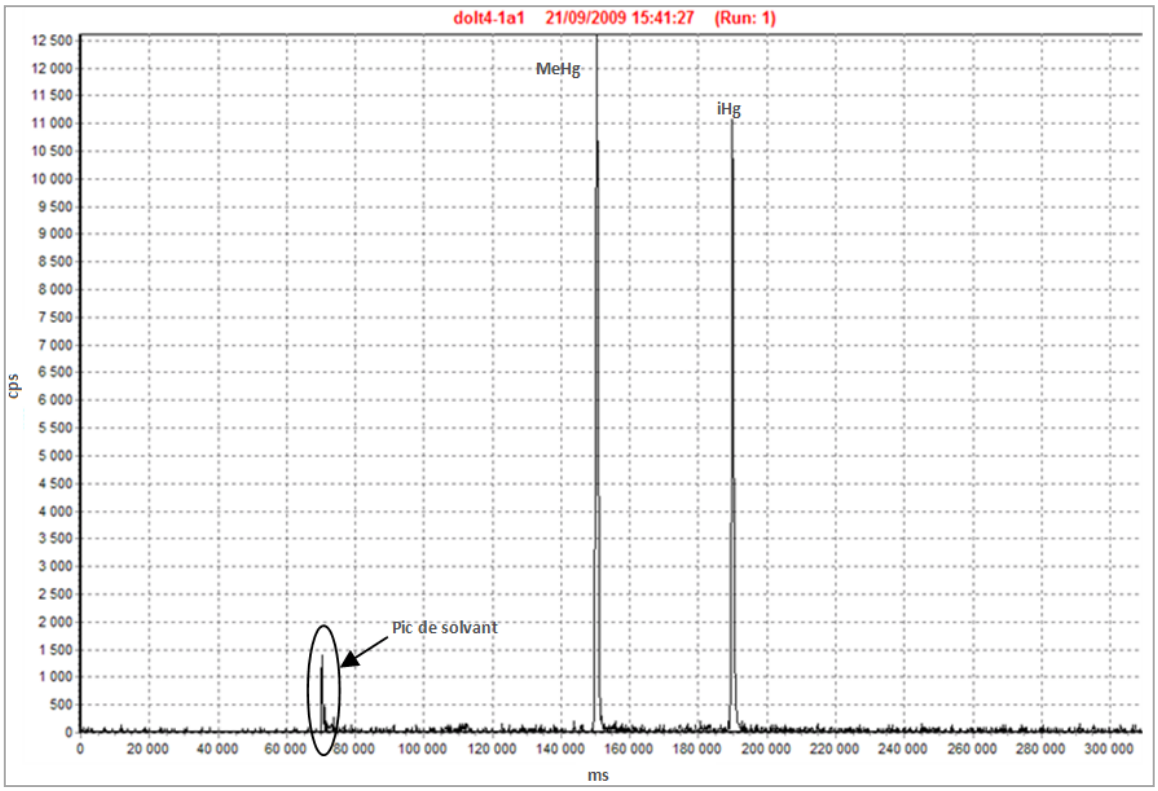


Figure 19 : MAE 120W (8 min)

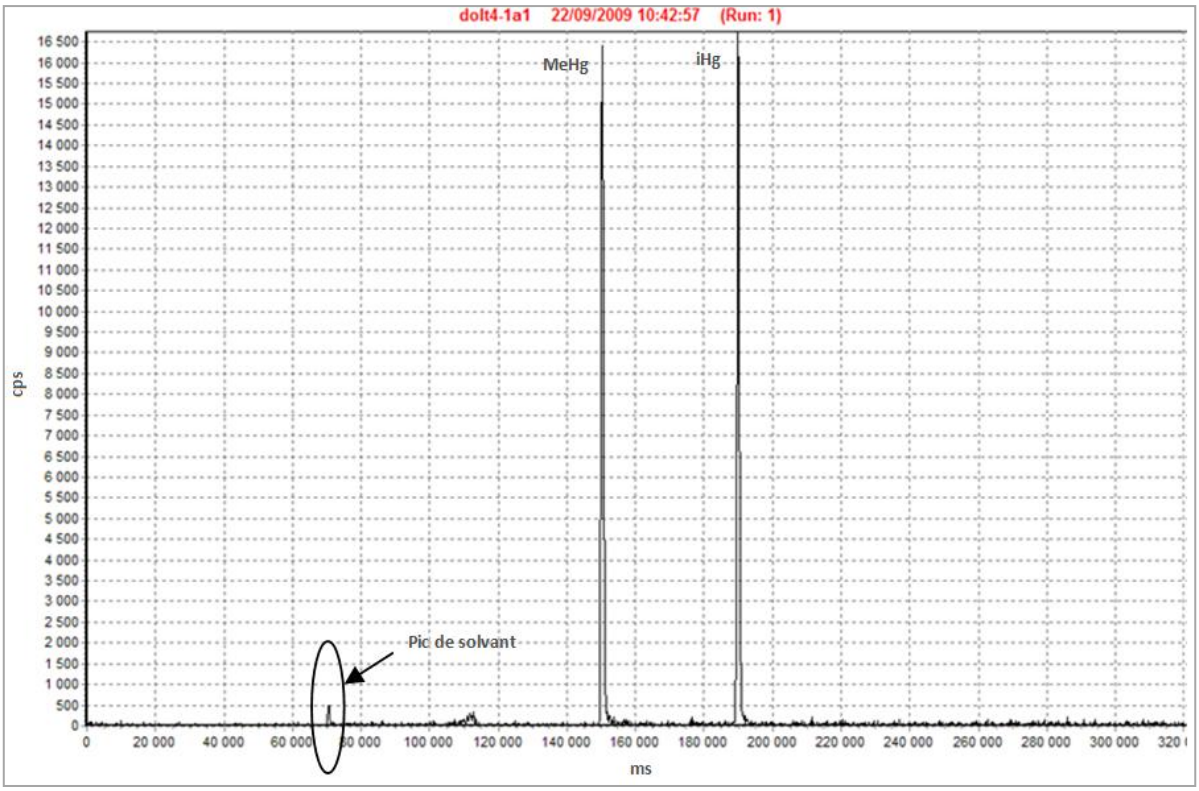


Figure 20: MAE 60W (3 min)

Les chromatogrammes indiquent que les plus hautes intensités de pic sont observées avec une extraction MAE à 60W pendant 3 minutes qui semble être le mode opératoire le plus efficace pour l'extraction du MeHg et du iHg dans le BCR-464. En effet une diminution de l'intensité des pics est constatée avec l'augmentation de la puissance de l'irradiation. L'extractions MAE à 60 W durant 3 minutes est donc retenue.

Après définition des modes opératoires à utiliser, les trois méthodes d'extraction ont été évaluées en analysant trois MRCs (BCR-464, DOLT-4, TORT-2) en double et à des jours différents (n = 6). Les résultats obtenus pour le MeHg et le HgT par D-IDMS sont présentés graphiquement dans les figures 21 à 23.

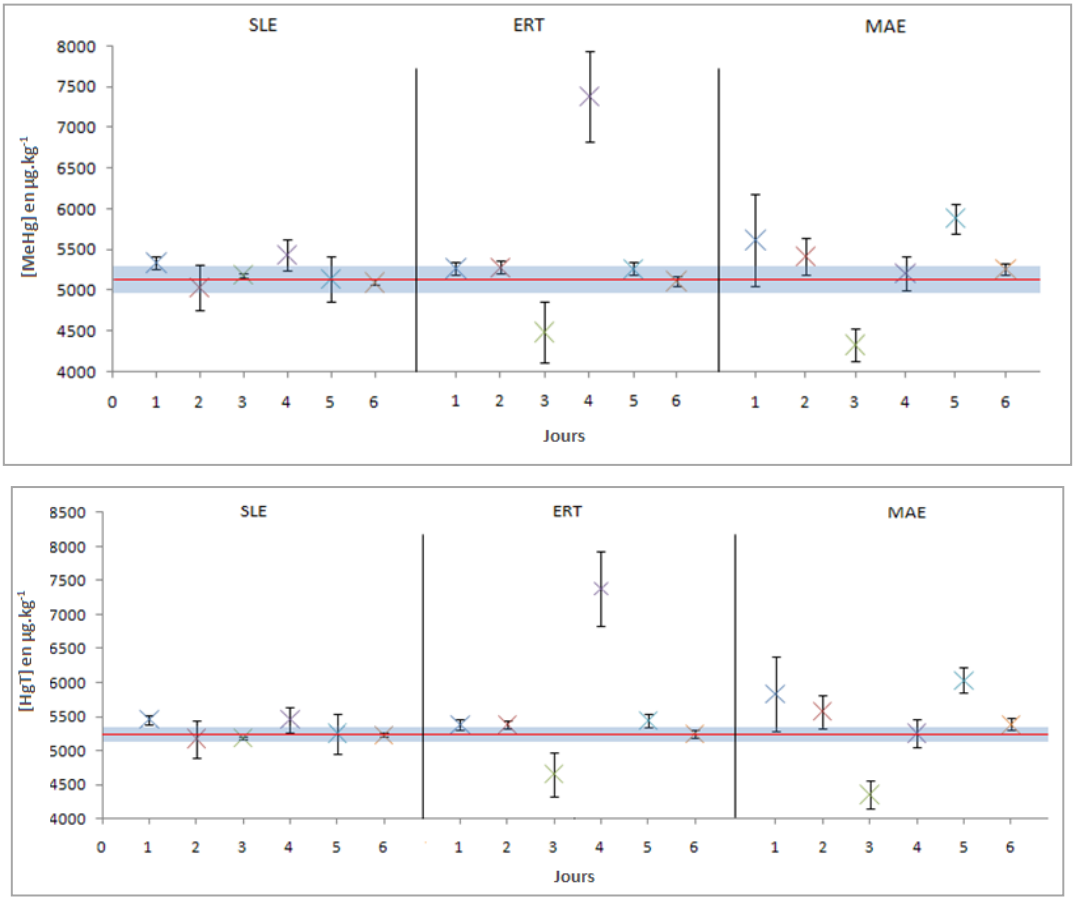


Figure 21 : Analyse du BCR-464 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

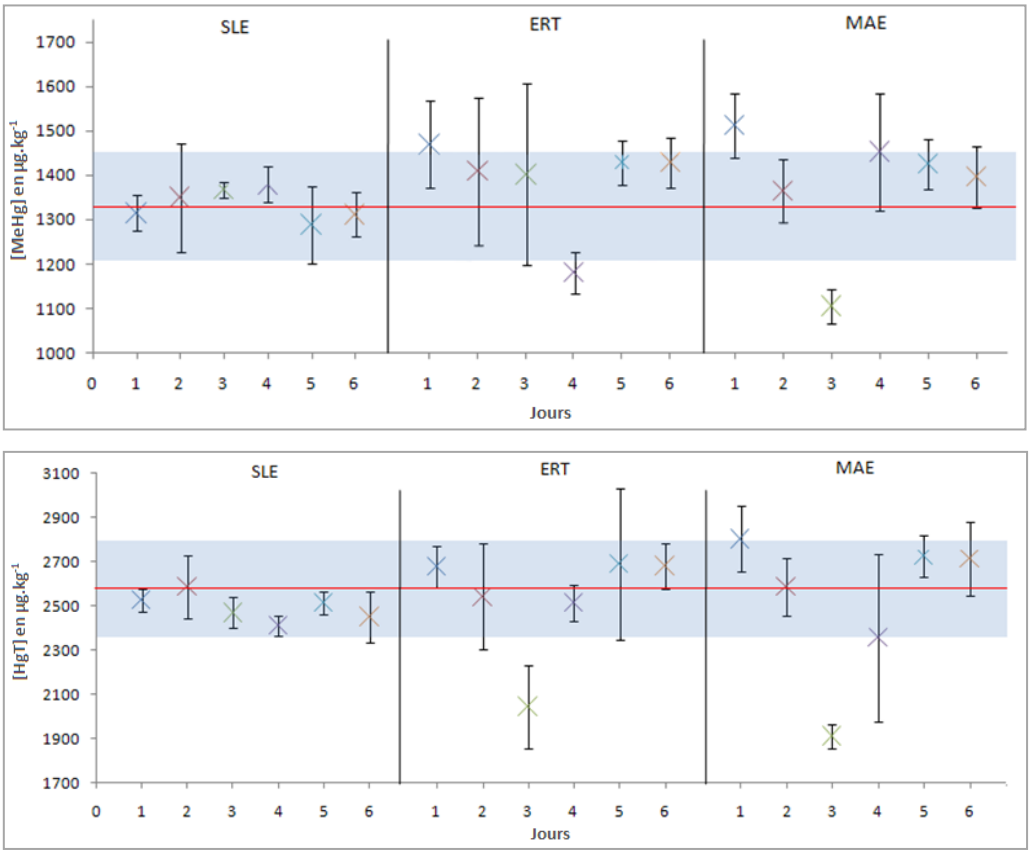


Figure 22 : Analyse du DOLT-4 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

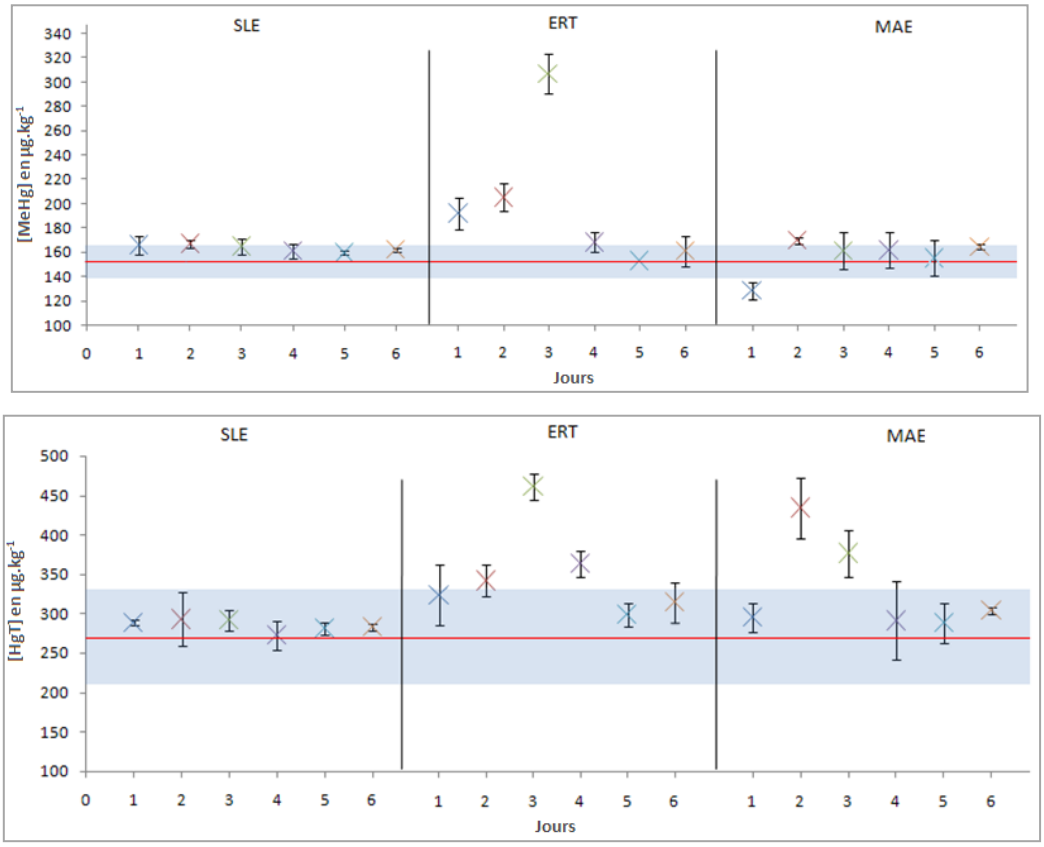


Figure 23 : Analyse du TORT-2 (en µg kg^{-1}). Comparaison entre 3 techniques d'extraction

La MAE et l'ERT présentent de nombreuses teneurs en Hg en désaccord avec les teneurs certifiées, ce qui démontre leur manque de justesse et fidélité. De plus, les écart-types calculés sont relativement grands, avec des écart-types obtenus par MAE globalement supérieurs aux écart-types obtenus par ERT. Par contre, la SLE est juste pour les trois MRCs et les écart-types relativement faibles traduisent une répétabilité acceptable de la méthode. Toutefois, la littérature a reporté des analyses avec extraction par MAE pour ces 3 MRCs qui fournissent d'excellents résultats (Ramalhosa et al., 2001, Rodil et al., 2002, Clough et al., 2003, Berzas-Nevado et al., 2005, Vidler et al., 2007, Reyes et al., 2009). Il serait par conséquent intéressant de refaire cette comparaison à partir d'un système micro-ondes plus récent.

Les trois techniques d'extractions ont également été comparées en prenant en considération les transformations inter-espèces engendrées. Les taux de méthylation (M) et déméthylation (D) calculés pour chaque extraction et MRCs sont présentés dans le tableau 2 de l'article II. Les résultats indiquent des taux de M et D globalement similaires entre les trois techniques d'extraction avec toutefois des taux légèrement plus faibles en SLE.

Quelque soit l'extraction considérée, les taux de M dans le BCR-464 semblent aberrants (-191% pour la SLE, -248% pour la ERT et -27% pour la MAE). Ce phénomène peut s'expliquer par l'importante différence de concentration entre le MeHg et le iHg. Si le rapport entre ces deux espèces est supérieur à 0,05 (MeHg ≥ 95%), la quantification de M est biaisée (Monperrus et al., 2008). Dans le cas du BCR-464, 98% du Hg est méthylé. Par conséquent, le pic de iHg est relativement faible, rendant la quantification difficile en augmentant les erreurs d'intégration, comme le montre la figure 24. Pour ce type de matrice, une juste quantification des taux de M est faite en quantifiant séparément les deux espèces mercurielles, soit en extrayant le MeHg de l'échantillon et en concentrant le iHg.

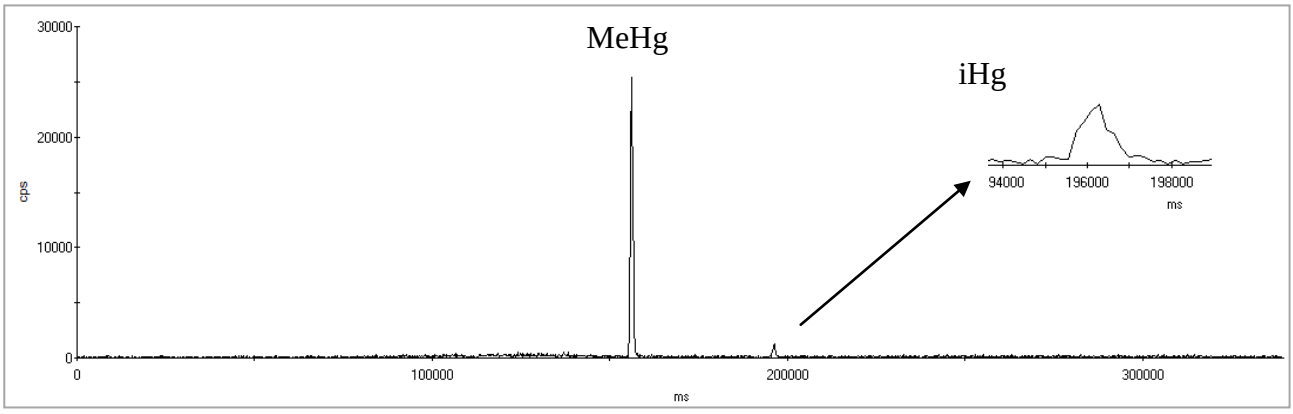


Figure 24 : Exemple de chromatogramme obtenu sur le BCR-464 après extraction SLE (m/z 202).

En conclusion, trois techniques d'extraction ont été comparées en termes d'efficacité, rapidité et transformations engendrées à l'aide de trois MRCs. Ces trois MRCs ont été choisis en fonction de leurs concentrations en MeHg et en iHg et de leurs pourcentages en MeHg de façon à représenter au mieux les variations possibles de ces paramètres dans les échantillons réels. L'extraction solide-liquide par *digi*PREP (SLE) à 85°C pendant 2 h a été conservée pour le restant de l'étude car elle est la plus juste et fidèle. De plus, elle engendre moins de transformations inter-espèces que les deux autres techniques d'extraction.

VI.3 Optimisation de l'étape de dérivation

Une première étude a déjà été menée sur l'étape de dérivation et discutée dans le paragraphe VI.1. Il a alors été choisi que la dérivation des espèces Hg serait réalisée par le tétrapropylborate de sodium ($NaBPr_4$). Cette seconde étude a pour but d'améliorer les conditions de dérivation en optimisant l'étape d'agitation de l'échantillon afin de la rendre plus applicable en routine. Il est à noter que cette étude n'influence en rien la quantification par IDMS ni l'exactitude des résultats car les spikes sont ajoutés avant extraction.

La majorité des applications présentées dans la littérature utilise une agitation manuelle rigoureuse (RMA) pour favoriser la mise en contact entre les espèces mercurielles et l'agent de dérivation ainsi que le transfert de phase (Gomez-Ariza et al., 2005, Monperrus et al., 2008, Castillo et al., 2010). Il parait néanmoins légitime de s'interroger quant à la répétabilité et la reproductibilité de cette technique. De plus, à moins de mettre en place un dispositif précaire consistant à mettre plusieurs échantillons dans un sac, une main ne peut pas agiter plus de 3 tubes à la fois. C'est pour ces raisons que deux autres dispositifs d'agitation ont été étudiés :

(1) Agitation à l'aide d'un vortex (VA) : agitation mécanisée mais l'utilisateur doit être présent et la capacité du plateau est faible (10 échantillons maximum).

(2) Agitation à l'aide d'un plateau rotatif (RA) : totalement automatisée et pouvant recevoir 46 tubes. La figure 25 présente cet appareil pour une meilleure représentation de son fonctionnement.



Figure 25 : Système d'agitation rotative (RA)

En RMA, le temps d'agitation de 5 minutes reporté dans la littérature est conservé. Certains laboratoires utilisent une agitation VA mais aucun temps d'agitation n'est communiqué (Davis et al., 2007, Point et al., 2007). Un temps de 5 minutes sera donc également appliqué.

Pour la RA, trois temps de dérivation (7, 10 et 15 min) ont été testés chacun trois fois, sur le DOLT-4. Les résultats obtenus pour le MeHg et le HgT par D-IDMS et IPD lors de ces agitations RA sont présentés en figure 26.

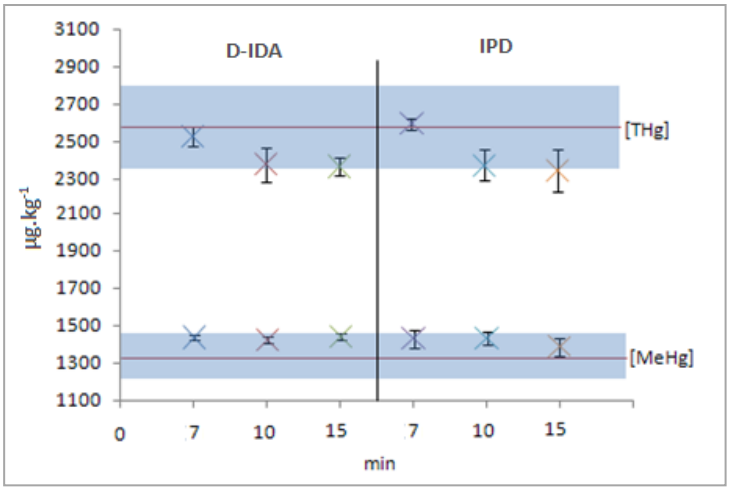


Figure 26 : Analyse du DOLT-4 par RA (en µg kg^{-1}), D-IDMS et IPD

Les teneurs en MeHg et HgT sont en accord avec les teneurs certifiées. La teneur en MeHg est constante dans le temps tandis que la teneur en HgT diminue. Il peut donc être conclu que la

teneur en iHg dans la phase organique diminue avec l'augmentation du temps d'extraction. Un temps d'extraction de 7 min est conservé en RA.

Afin d'étudier uniquement les variations dues aux modes d'agitation testés, chaque MRC (DOLT-4, BCR-464 et TORT-2) a été extrait une seule fois puis l'extrait a été aliquoté 5 fois par mode d'agitation. Chaque aliquot a ensuite été analysé 3 fois et les figures 27 à 29 présentent les résultats obtenus en MeHg et HgT sur chaque aliquot avec leur écart-type respectif.

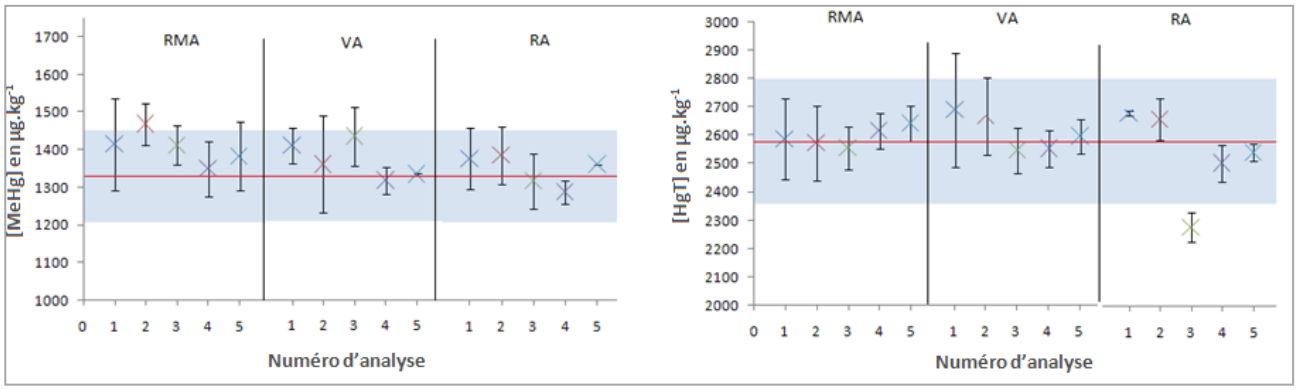


Figure 27 : Analyse du DOLT-4 (en µg kg^{-1}), comparaison entre 3 techniques d'agitation

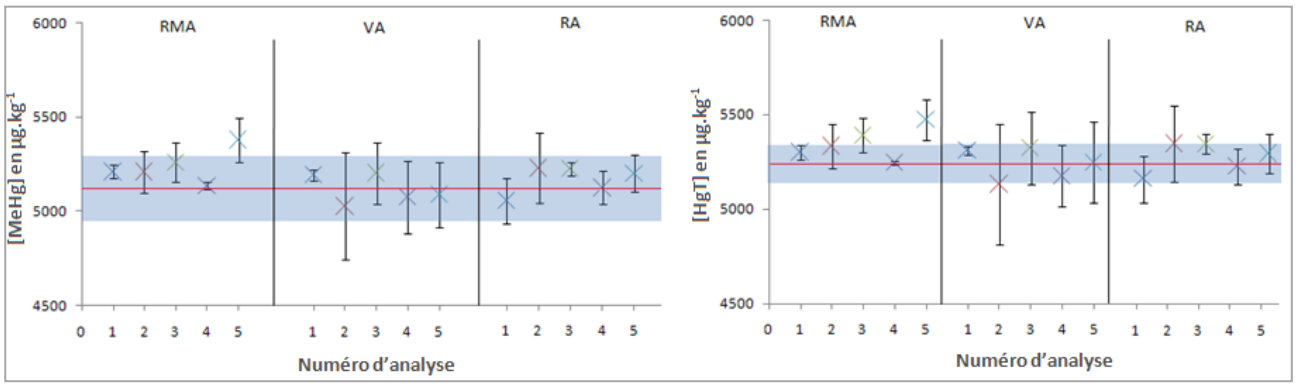


Figure 28 : Analyse du BCR-4, comparaison entre 3 techniques d'agitation

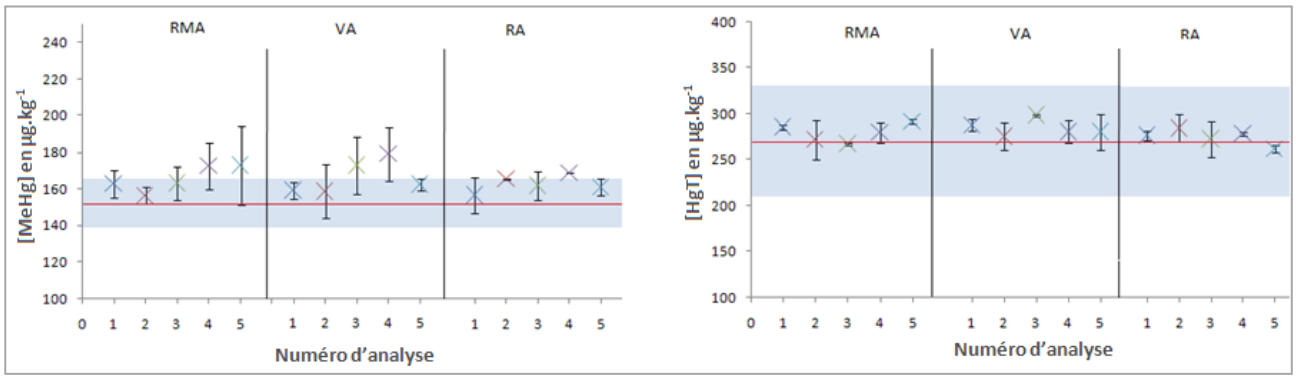


Figure 29 : Analyse du TORT-2, comparaison entre 3 techniques d'agitation

Les résultats issus des trois techniques d'agitation sont globalement proches. Néanmoins, la RMA montre plusieurs teneurs en désaccord avec les teneurs certifiées. Les écart-types en VA sont plus grands qu'en RA, traduisant une répétabilité et reproductibilité plus faibles. Les trois techniques d'agitation sont dans l'ensemble fidèles mais la RA semble plus précise. Il faut toutefois noter une teneur en HgT trop faible pour le DOLT-4 (figure 27). A la vue des autres résultats, cette valeur peut être supposée aberrante. La concentration en MeHg est en accord avec la teneur certifiée donc l'erreur porte sur le iHg qui a probablement été mal dérivé.

En conclusion, la précision de trois techniques d'agitation pour favoriser le transfert de phase des analytes de la phase aqueuse vers la phase organique a été comparée. L'agitation à l'aide d'un plateau rotatif (RA pendant 7 min) semble la méthode d'agitation la plus performante.

VI.4. Evaluation des différentes techniques de calcul par dilution isotopique

Comme expliqué dans la revue I, trois techniques de calcul par dilution isotopique (ID) peuvent être appliquées :

(1) La double dilution isotopique (D-IDMS) corrige les résultats finaux des extractions non-quantitatives et des pertes d'analytes.
(2) La double dilution isotopique spécifique à l'espèce (D-SS-IDMS) corrige les résultats finaux des extractions non-quantitatives et des pertes d'analytes. Elle quantifie les réactions inter-espèces pouvant intervenir entre les isotopes 199, 201 et 202.
(3) La déconvolution isotopique (IPD) corrige les résultats finaux des extractions non-quantitatives et des pertes d'analytes. elle quantifie les réactions inter-espèces pouvant intervenir entre l'ensemble des isotopes du mélange et permet d'estimer le biais en masse de l'appareil.

Ces trois techniques ont été appliquées sur les données brutes de 3 MRCs (DOLT-4, BCR-464 et TORT-2). Chaque MRC a été analysé trois fois et en triplicata. Ces MRCs ont été préparés selon la préparation d'échantillon optimisée (marquage isotopique, SLE avec TMAH, propylation avec RA). Les résultats de cette étude sont présentés dans l'Article II. Pour plus de commodité, le tableau 4 de l'article a été reporté ici (tableau 15).

Tableau 15 : Concentrations en MeHg et HgT (mg kg^{-1}) pour les trois MRCs (n = 3).

		MeHg	HgT	M (%)	D (%)
TORT-2	**Valeur certifiée**	**0,152 ± 0,13**	**0,270 ± 0,060**	-	-
	D-IDMS	0,165 ± 0,007	0,292 ± 0,013	-	-
	IPD	0,160 ± 0,002	0,272 ± 0,004	4	3
	D-SS-IDMS	0,164 ± 0,017	0,288 ± 0,023	0	2
DOLT-4	**Valeur certifiée**	**1,33 ± 0,12**	**2,58 ± 0,22**	-	-
	D-IDMS	1,29 ± 0,09	2,51 ± 0,05	-	-
	IPD	1,28 ± 0,12	2,39 ± 0,10	3	4
	D-SS-IDMS	1,29 ± 0,15	2,47 ± 0,29	-1	3
BCR-464	**Valeur certifiée**	**5,12 ± 0,17**	**5,24 ± 0,10**	-	-
	D-IDMS	5,10 ± 0,30	5,24 ± 0,35	-	-
	IPD	5,18 ± 0,35	5,28 ± 0,35	-196	3
	D-SS-IDMS	5,27 ± 0,33	5,33 ± 0,33	-65	1

Les concentrations en MeHg et HgT calculées par D-SS-IDMS et IPD sont en accord avec les teneurs certifiées. Les trois MRCs présentent de faibles taux de transformation, la quantification par D-IDMS permet donc également une détermination juste des espèces mercurielles. Comme vu précédemment au chapitre IV.2.3, les taux M obtenus pour le BCR-464 sont aberrants en raison de la trop grande différence de concentration entre le MeHg et le iHg dans ce MRC.

Plusieurs études présentées dans la littérature ont montré que la M et la D sont des réactions dépendantes de la matrice étudiée (Point et al., 2007 et 2008, Skip Kinston et al., 2008, Castillo et al., 2010). Par conséquent, les observations faites sur les 3 MRCs ne peuvent pas être étendues à toutes les matrices. Néanmoins, cette comparaison permet de conclure que la D-IDMS peut être appliquée aux matrices connues pour ne pas engendrer de transformations inter-espèces, comme par exemple ces trois MRCs, afin d'alléger la procédure analytique. Pour les autres matrices, une quantification par IPD ou D-SS-IDMS est préférable.

VI.4.1 Quantification des taux de méthylation et déméthylation

L'efficacité de la D-SS-IDMS et de l'IPD à quantifier les transformations a été évaluée à partir des mêmes données brutes. Les taux de M et de D calculés par triplicata d'injection (un même vial injecté trois fois) et pour les trois MRCs sont très variables. Un exemple de ces fluctuations est présenté dans le tableau 16.

Tableau 16 : M et D calculés pour chaque MRCs pour un triplicata d'injection

	DOLT-4		TORT-2		BCR-464	
	D-SS-IDMS	**IPD**	**D-SS-IDMS**	**IPD**	**D-SS-IDMS**	**IPD**
M (%)	1,1	1,3	4,3	6,7	-340	-34
	1,6	2,3	-0,36	4,9	-12	-96
	4,2	4,0	-7,3	-2,9	192	-99
Moyenne	**2,3**	**2,5**	**-1,1**	**2,9**	**-53**	**-77**
Ecart-type	1,7	1,3	5,8	5,1	269	37
CV (%)	**74%**	**52%**	**527%**	**176%**	**508%**	**48%**
D (%)	9,4	9,9	1,1	0,80	0,95	1,3
	6,3	6,3	1,0	2,9	0,53	8,3
	3,0	3,8	7,4	7,9	-1,1	2,6
Moyenne	**6,2**	**6,7**	**3,2**	**3,9**	**0,13**	**4,1**
Ecart-type	3,2	3,1	3,7	3,7	1,1	3,7
CV (%)	**52%**	**46%**	**116%**	**95%**	**846%**	**90%**

Ces résultats montrent que les coefficients de variation peuvent varier jusqu'à plus de 800%. Ces variations des taux de M et D pour un même triplicata d'injection, ont également été observées au sein du laboratoire LCABIE à Pau (cf. Article I). Elles semblent toutefois plus accentuées au laboratoire CIME, probablement en raison de la vétusté du GC, et plus particulièrement d'une probable défaillance du port d'injection. En effet, des problèmes de répétabilité, plus marqués dans le cas d'une calibration par droite d'étalonnage, ont été constatés, ainsi que de fortes contaminations du port d'injection par le Hg et des difficultés d'alignement entre l'aiguille du GC, l'insert d'injection et la colonne de séparation.

Afin de déterminer la source de ces fluctuations, la première action menée a été de s'assurer de la fiabilité des feuilles de calculs. L'IPD permettant d'obtenir plus d'information que la D-SS-IDMS (concentrations, taux de M et de D, biais en masse), les investigations se sont portées uniquement sur cette technique de calcul.

VI.4.2 Vérification de la fiabilité des feuilles de calculs par IPD

L'IPD fait intervenir des régressions linéaires multiples et l'élucidation mathématique par calcul matriciel se fait par l'action de la fonction « solveur » du logiciel Excel. La feuille de calcul par IPD peut donc être vue comme une « boite noire », les possibilités d'action de l'utilisateur étant très limitées. La figure 30 présente une capture d'écran faite sur un calcul IPD pour le BCR-464. Les uniques lieux d'interactions avec cette feuille de calcul sont les plages grises et la case « square sum of residuals » notée **1** sur la figure. Les cases grises sont remplies par l'utilisateur à partir des données brutes obtenues durant l'analyse (aires sous le pic, pesées, abondances isotopiques et concentrations des spikes). La fonction solveur est ensuite appliquée à la case notée **1**. Les concentrations en MeHg et iHg de l'échantillon sont calculées en prenant en considération les taux de M et de D (notées F1 et F2 sur la feuille). Le biais en masse est également calculé et apparaît dans la case **2**.

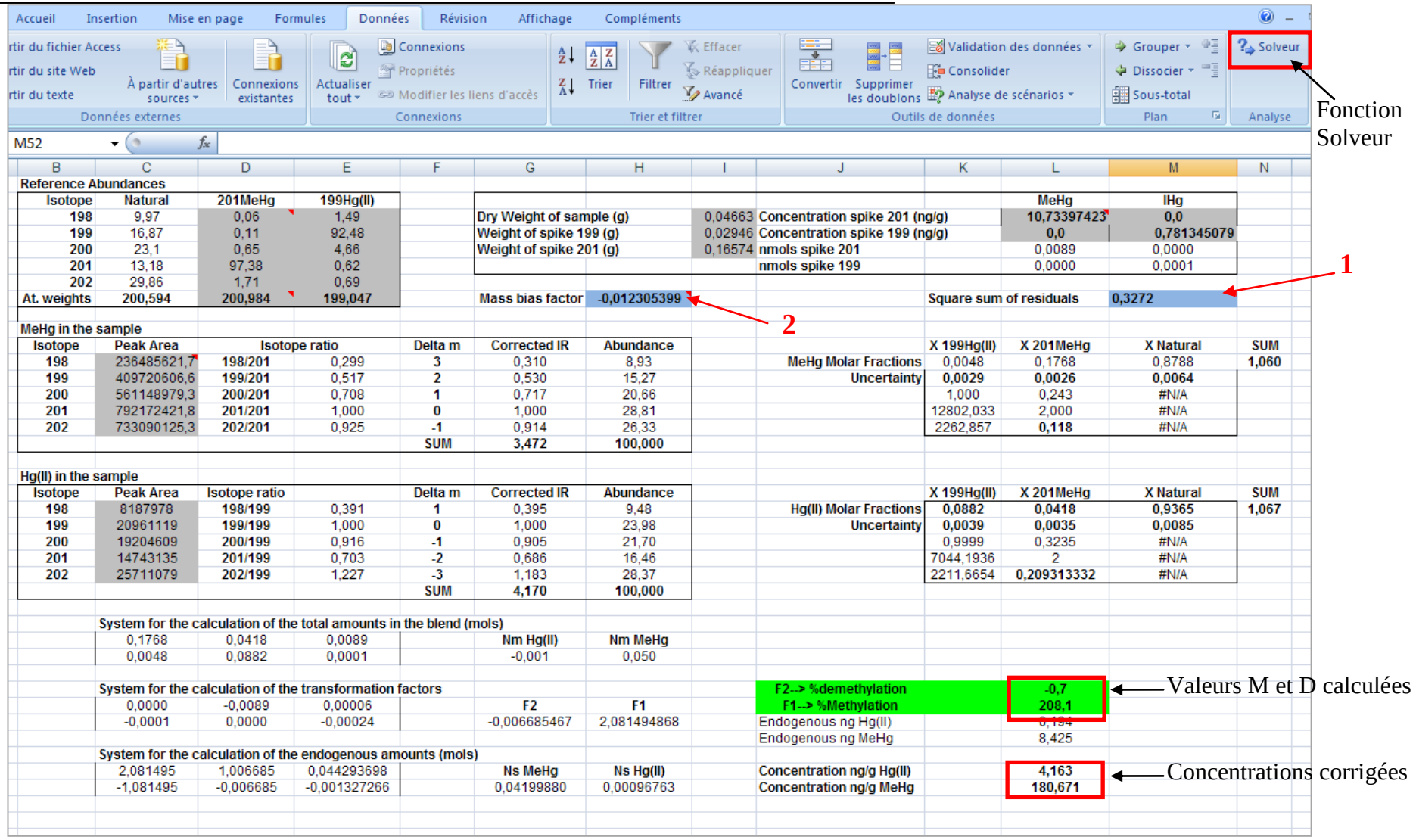


Figure 30 : Capture d'écran sur la feuille de calcul par IPD

Les feuilles de calcul utilisées permettent de calculer sur une même feuille jusqu'à 3 résultats. Si on calcule les 3 résultats sur une même feuille, 6 configurations possibles d'activation de la fonction solveur sont possibles :

- Activation du premier calcul, du second et du troisième
- Activation du second calcul, du premier puis du troisième
- Activation du troisième calcul, du premier puis du second
- Etc.

L'ordre d'activation de la fonction sur une même feuille modifie-t-il les résultats ?

Et obtenons-nous les mêmes résultats si une feuille de calcul distincte est utilisée pour chaque résultat ?

Afin de répondre à ces questions, des tests ont été réalisés sur une série de résultats bruts issus d'une analyse dont les résultats sont présentés dans le tableau 17 avec :

Cas 1 : trois calculs par feuille

Cas 2 : un seul calcul par feuille

Tableau 17 : Evaluation des feuilles de calculs IPD sur un triplicata d'injection

µg kg^{-1}	N° résultat	iHg (mg kg^{-1})	MeHg (mg kg^{-1})	HgT (mg kg^{-1})	M (%)	D (%)
Cas 1 : 1 feuille, 3 calculs	1	0,112	5,63	5,74	-356	10
	2	0,119	5,32	5,44	-311	6
	3	0,083	5,67	5,75	-641	29
Cas 2 : 1 feuille, 1 calcul	1	0,112	5,63	5,74	-356	10
	2	0,171	6,58	6,75	-725	20
	3	0,121	7,12	7,24	-367	78

Dans le cas 1, l'ordre d'activation des fonctions solveur testé selon 3 configurations différentes présentées ci-dessus ne modifie pas les concentrations et taux calculés (résultats non montrés). Par contre, les résultats obtenus sont différents entre le cas 1 et le cas 2, à l'exception du premier résultat. Ces données ont ensuite été envoyées au laboratoire LCABIE afin que l'étude soit reproduite à partir de leurs feuilles de calcul. Ils ont obtenus des résultats identiques aux notres.

En conclusion, une différence de quantification a été mise en évidence entre les cas 1 et 2. Par conséquent, les calculs IPD seront dorénavant faits en appliquant un seul calcul par feuille (cas 2) dans les 2 laboratoires.

VI.4.3 Analyse statistiques des sources d'erreur

Pour la mesure par IPD des teneurs mercurielles et des taux de M et de D, une détermination de divers paramètres, dont la plupart sont entachés d'erreurs influant sur le résultat final, est nécessaire (pesées, concentrations et abondances isotopiques des spikes, aires de pics, etc.). Une évaluation de l'erreur globale de la méthode et les pourcentages d'erreur associés à chaque paramètre a été menée d'après la méthode de calcul de la propagation d'incertitude de Kragten (Eurachem, 2000).

Les figures 31 à 33 présentent les bilans statistiques obtenus pour le DOLT-4, le TORT-2 et le BCR-464.

	Kragten0	Kragten1	Kragten2	Kragten3	Kragten4	Kragten5	Kragten6	Kragten7	Kragten8
Paramètre		X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	nmols spike 201	nmols spike 199
X 199Hg(II)	0.017878856	0.0436021	0.01787886	0.01787886	0.017878856	0.01787886	0.01787886	0.017878856	0.017878856
X 201MeHg	0.158519251	0.15851925	0.18211457	0.15851925	0.158519251	0.15851925	0.15851925	0.158519251	0.158519251
X Natural	0.900160223	0.90016022	0.90016022	0.95640471	0.900160223	0.90016022	0.90016022	0.900160223	0.900160223
X 199Hg(II)	0.140600247	0.14060025	0.14060025	0.14060025	0.144257285	0.14060025	0.14060025	0.140600247	0.140600247
X 201MeHg	-0.004980608	-0.00498061	-0.00498061	-0.00498061	-0.004980608	-0.00162609	-0.00498061	-0.004980608	-0.004980608
X Natural	0.930402831	0.93040283	0.93040283	0.93040283	0.930402831	0.93040283	0.93839903	0.930402831	0.930402831
nmols spike 201	0.322564847	0.32256485	0.32256485	0.32256485	0.322564847	0.32256485	0.32256485	0.323004847	0.322564847
nmols spike 199	0.281249801	0.2812498	0.2812498	0.2812498	0.281249801	0.2812498	0.2812498	0.281249801	0.281255581

Résultats	**Kragten 0**	**Kragten1**	**Kragten2**	**Kragten3**	**Kragten4**	**Kragten5**	**Kragten6**	**Kragten7**	**Kragten8**
F2--> %demethylation	**-2.7**	-2.1	-2.7	-2.7	-2.6	-0.9	-2.7	-2.7	-2.7
F1--> %Methylation	**13.3**	32.2	11.6	13.3	13.3	13.0	13.3	13.3	13.3
Concentration ng/g Hg(II)	**1496.7**	1488.2	1491.7	1499.4	1458.9	1470.9	1509.2	1496.7	1496.7
Concentration ng/g MeHg	**1241.7**	965.8	1081.3	1331.0	1246.6	1245.0	1240.1	1243.4	1241.7

Erreurs		**a**	**b**	**c**	**d**	**e**	**f**	**g**	**h**
Ecarts / Kragten 0		-0.6	0.1	0.0	-0.1	-1.8	0.0	0.0	0.0
		-18.9	1.7	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
		8.5	5.0	-2.8	37.8	25.8	-12.5	0.0	0.0
		275.9	160.3	-89.3	-4.9	-3.3	1.6	-1.7	0.0

Incertitude	**Erreur globale**	**a²**	**b²**	**c²**	**d²**	**e²**	**f²**	**g²**	**h²**	**Somme des erreurs**
F2--> %demethylation	**1.9**	0.34	0.00	0.00	0.00	3.25	0.00	0.00	0.00	3.59
F1--> %Methylation	**19.0**	358.16	2.94	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	361.15
Concentration ng/g Hg(II)	**48.5**	72.60	24.52	7.61	1428.45	665.45	155.84	0.00	0.00	2354.46
Concentration ng/g MeHg	**331.4**	76097.77	25701.33	7978.52	23.90	11.13	2.61	2.87	0.00	109818.14

Source d'incertitude (%)									
F2--> %demethylation	10	0	0	0	90	0	0	0	
F1--> %Methylation	99	1	0	0	0	0	0	0	
Concentration ng/g Hg(II)	3	1	0	61	28	7	0	0	
Concentration ng/g MeHg	69	23	7	0	0	0	0	0	

Figure 31 : Bilan de l'étude kragten pour le DOLT-4

	Kragten0	Kragten1	Kragten2	Kragten3	Kragten4	Kragten5	Kragten6	Kragten7	Kragten8
Paramètre		X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	nmols spike 201	nmols spike 199
X 199Hg(II)	-0.008068537	0.00537287	-0.00806854	-0.00806854	-0.008068537	-0.00806854	-0.00806854	-0.008068537	-0.008068537
X 201MeHg	0.151675808	0.15167581	0.16400529	0.15167581	0.151675808	0.15167581	0.15167581	0.151675808	0.151675808
X Natural	0.912127106	0.91212711	0.91212711	0.94151707	0.912127106	0.91212711	0.91212711	0.912127106	0.912127106
X 199Hg(II)	0.124369488	0.12436949	0.12436949	0.12436949	0.135664233	0.12436949	0.12436949	0.124369488	0.124369488
X 201MeHg	0.006659369	0.00665937	0.00665937	0.00665937	0.006659369	0.01701977	0.00665937	0.006659369	0.006659369
X Natural	0.942442614	0.94244261	0.94244261	0.94244261	0.942442614	0.94244261	0.96713884	0.942442614	0.942442614
nmols spike 201	0.036880471	0.03688047	0.03688047	0.03688047	0.036880471	0.03688047	0.03688047	0.037320471	0.036880471
nmols spike 199	0.026628701	0.0266287	0.0266287	0.0266287	0.026628701	0.0266287	0.0266287	0.026628701	0.026634481

Résultats	**Kragten 0**	**Kragten1**	**Kragten2**	**Kragten3**	**Kragten4**	**Kragten5**	**Kragten6**	**Kragten7**	**Kragten8**
F2--> %demethylation	**4.1**	3.7	4.1	4.1	3.8	10.5	4.1	4.1	4.1
F1--> %Methylation	**-7.1**	4.7	-6.5	-7.1	-7.1	-6.6	-7.1	-7.2	-7.1
Concentration ng/g Hg(II)	**152.6**	153.3	153.1	152.4	139.9	141.4	156.7	152.6	152.6
Concentration ng/g MeHg	**186.9**	168.1	172.9	192.5	185.9	186.1	187.2	189.1	186.9

Erreurs		**a**	**b**	**c**	**d**	**e**	**f**	**g**	**h**
Ecarts / Kragten 0	0	0.5	0.0	0.0	0.3	-6.4	0.0	0.0	0.0
	0	-11.8	-0.5	0.0	0.0	-0.5	0.0	0.1	0.0
	0	-0.7	-0.5	0.2	12.7	11.2	-4.2	0.0	0.0
	0	18.8	14.0	-5.6	0.9	0.8	-0.3	-2.2	0.0

Incertitudes	**Erreur globale**	**a^2**	**b^2**	**c^2**	**d^2**	**e^2**	**f^2**	**g^2**	**h^2**	**Somme des erreurs**
F2--> %demethylation	**6.4**	0.21	0.00	0.00	0.12	40.87	0.00	0.00	0.00	41.20
F1--> %Methylation	**11.8**	138.96	0.28	0.00	0.00	0.22	0.00	0.01	0.00	139.47
Concentration ng/g Hg(II)	**17.4**	0.53	0.29	0.05	160.52	124.52	17.44	0.00	0.00	303.34
Concentration ng/g MeHg	**24.2**	352.01	196.34	31.85	0.87	0.68	0.09	4.97	0.00	586.81

Source d'incertitude (%)									
F2--> %demethylation		1	0	0	0	99	0	0	0
F1--> %Methylation		100	0	0	0	0	0	0	0
Concentration ng/g Hg(II)		0	0	0	53	41	6	0	0
Concentration ng/g MeHg		60	33	5	0	0	0	1	0

Figure 32 : Bilan de l'étude kragten pour le TORT-2

	Kragten0	Kragten1	Kragten2	Kragten3	Kragten4	Kragten5	Kragten6	Kragten7	Kragten8
Paramètres		X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	X 199Hg(II)	X 201MeHg	X Natural	nmols spike 201	nmols spike 199
X 199Hg(II)	-0.084553229	0.007611373	-0.08455323	-0.084553229	-0.084553229	-0.084553229	-0.08455323	-0.084553229	-0.084553229
X 201MeHg	0.166003328	0.166003328	0.250543725	0.166003328	0.166003328	0.166003328	0.16600333	0.166003328	0.166003328
X Natural	1.041099305	1.041099305	1.041099305	1.24261939	1.041099305	1.041099305	1.0410993	1.041099305	1.041099305
X 199Hg(II)	-0.118780377	-0.118780377	-0.11878038	-0.118780377	-0.039424983	-0.118780377	-0.11878038	-0.118780377	-0.118780377
X 201MeHg	0.1055207	0.1055207	0.1055207	0.1055207	0.1055207	0.178311515	0.1055207	0.1055207	0.1055207
X Natural	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.140667047	1.3141795	1.140667047	1.140667047
nmols spike 201	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.230481828	1.23048183	1.230921828	1.230481828
nmols spike 199	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.026692102	0.0266921	0.026692102	0.026697882

Resultats	**Kragten 0**	**Kragten1**	**Kragten2**	**Kragten3**	**Kragten4**	**Kragten5**	**Kragten6**	**Kragten7**	**Kragten8**
F2--> %demethylation	**-86.2**	2.1	-45.6	-86.2	391.3	-338.7	-86.2	-86.2	-86.2
F1--> %Methylation	**-4371.2**	207.0	-2264.7	-4371.2	6839.0	-10300.6	-4371.2	-4372.7	-4370.3
Concentration ng/g Hg(II)	**-154.9**	-81.5	-177.6	-113.4	703.2	-16.8	-211.0	-154.9	-154.9
Concentration ng/g MeHg	**2443.9**	6252.3	1266.2	4593.5	22591.7	5684.9	1126.5	2444.8	2443.9

Erreurs		**a**	**b**	**c**	**d**	**e**	**f**	**g**	**h**
Ecarts / Kragten 0		-88.2	-40.6	0.0	-477.4	252.5	0.0	0.0	0.0
		-4578.2	-2106.5	0.0	-11210.2	5929.4	0.0	1.5	-0.9
		-73.4	22.7	-41.4	-858.1	-138.0	56.1	0.0	0.0
		-3808.4	1177.7	-2149.5	-20147.8	-3241.0	1317.5	-0.9	0.0

Incertitude	**Erreur globale**	**a²**	**b²**	**c²**	**d²**	**e²**	**f²**	**g²**	**h²**	**Somme des erreurs**
F2--> %demethylation	**548.8**	7783.83	1647.89	0.00	227938.95	63768.31	0.00	0.00	0.00	301138.97
F1--> %Methylation	**13646.4**	20960046.20	4437379.35	0.00	125669586.97	35157383.09	0.00	2.35	0.86	186224398.82
Concentration ng/g Hg(II)	**875.3**	5386.14	515.11	1715.87	736279.83	19051.67	3148.24	0.00	0.00	766096.87
Concentration ng/g MeHg	**20944.8**	14503611.51	1387080.30	4620448.56	405933183.92	10503759.60	1735720.29	0.76	0.00	438683804.95

Source d'incertitude (%)									
F2--> %demethylation		3	1	0	76	21	0	0	0
F1--> %Methylation		11	2	0	67	19	0	0	0
Concentration ng/g Hg(II)		1	0	0	96	2	0	0	0
Concentration ng/g MeHg		3	0	1	93	2	0	0	0

Figure 33 : Bilan de l'étude kragten pour le BCR-464

Dans l'encadré « paramètres » :

Les paramètres étudiés lors de cette étude sont :

- En orange : fractions molaires de MeHg pour les isotopes 199, 201 et 202
- En jaune : fractions molaires de iHg pour les isotopes 199, 201 et 202
- En vert : les nombre de moles de spikes ^{199}iHg et ^{201}MeHg ajoutés dans l'échantillon.

Dans la colonne « kragten 0 » est reportée les paramètres initiaux du calcul IPD. Les différents paramètres étudiés ont été modifiés un par un, en ajoutant à chaque valeur son incertitude maximale. Par exemple, pour un paramètre égale à a ± Δa, la valeur modifiée sera a + Δa. Les paramètres modifiés sont notés de « Kragten 1 » à « Kragten 8 » et sont inscrits dans les cases rouges.

Dans les encadrés « résultats » :

Dans le premier encadré est reporté en « kragten 0 » les taux de méthylation et déméthylation ainsi que les concentrations iHg et MeHg réellement obtenus. Les « Kragten 1 » à « Kragten 8 » fournissent les résultats obtenus après modification d'un paramètre.

Dans le second encadré, l'écart entre la valeur réelle et la valeur modifiée est calculée (exemple : « Kragten 0 » - « Kragten 1 »).

Dans l'encadré « incertitude » :

Pour chaque paramètre modifié, les incertitudes associées sont définies par le carré de l'écart à la valeur réelle et sont notées de a² à h². L'erreur globale est ensuite calculée d'après la formule 6 suivante :

$$Erreur\ globale = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2 + d^2 + e^2 + f^2 + g^2 + h^2} \qquad (6)$$

Dans l'encadré « source d'incertitude (%) » :

La contribution de chaque paramètre dans l'erreur globale est déterminée d'après la formule 7 suivante :

$$\%\ incertitude = \frac{100 \times (a^2, b^2, c^2, \dots, h^2)}{Somme\ des\ erreurs} \qquad (7)$$

Une représentation graphique des sources d'incertitude liées aux déterminations des concentrations de MeHg et iHg et des taux M et D du TORT-2 est présentée en figure 34.

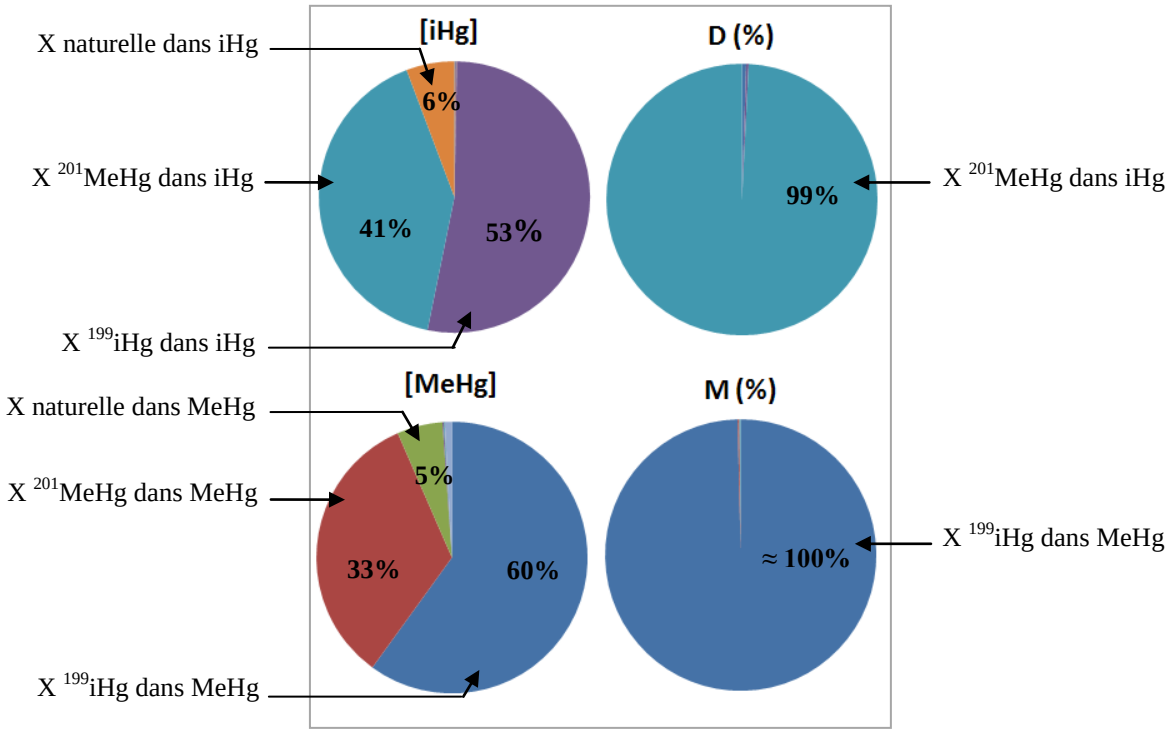


Figure 34 : Représentation graphique de l'étude kragten sur le TORT-2

L'erreur globale associée à la concentration en iHg du TORT-2 est issue à 53% de la fraction molaire de iHg du spike ^{199}iHg, à 41% de la fraction molaire de iHg du spike ^{201}MeHg et à 6% de la fraction molaire de iHg naturellement présent dans l'échantillon. L'erreur globale associée à la concentration en MeHg est à 60% issue de la fraction molaire de MeHg dans le spike ^{199}iHg, à 33% de la fraction molaire de MeHg du spike ^{201}MeHg, à 5% de la fraction molaire de MeHg naturel et à 1% de la quantité de ^{201}MeHg ajoutée dans l'échantillon, les 1% restants sont répartis entre les 4 paramètres restants. Enfin, l'erreur globale associée au facteur de M est à 100% liée à la fraction molaire de MeHg dans le spike ^{199}iHg donc à la mesure du rapport $R_{Hg}^{202/199}$ et pour le facteur D, elle est à 99% liée à la fraction molaire de iHg dans le spike ^{201}MeHg soit à la mesure du rapport $R_{Hg}^{202/201}$.

Des résultats similaires ont été obtenus pour le DOLT-4. D'après le calcul IPD, les fractions molaires de iHg sont directement liées aux rapports isotopiques modifiés $R_{Hg}^{198/199}$, $R_{Hg}^{199/199}$, …, $R_{Hg}^{202/199}$ et les fractions molaires de MeHg aux rapports isotopiques modifiés $R_{Hg}^{198/201}$, $R_{Hg}^{199/201}$,

…, $R_{Hg}^{202/201}$. Ces rapports isotopiques sont quant à eux liés aux quantités de spikes ajoutés dans l'échantillon. Ces observations sont en accord avec des travaux précédemment publiés (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005, Monperrus et al., 2008).

Pour le BCR-464, un autre bilan d'incertitude apparaît comme le montre la figure 35.

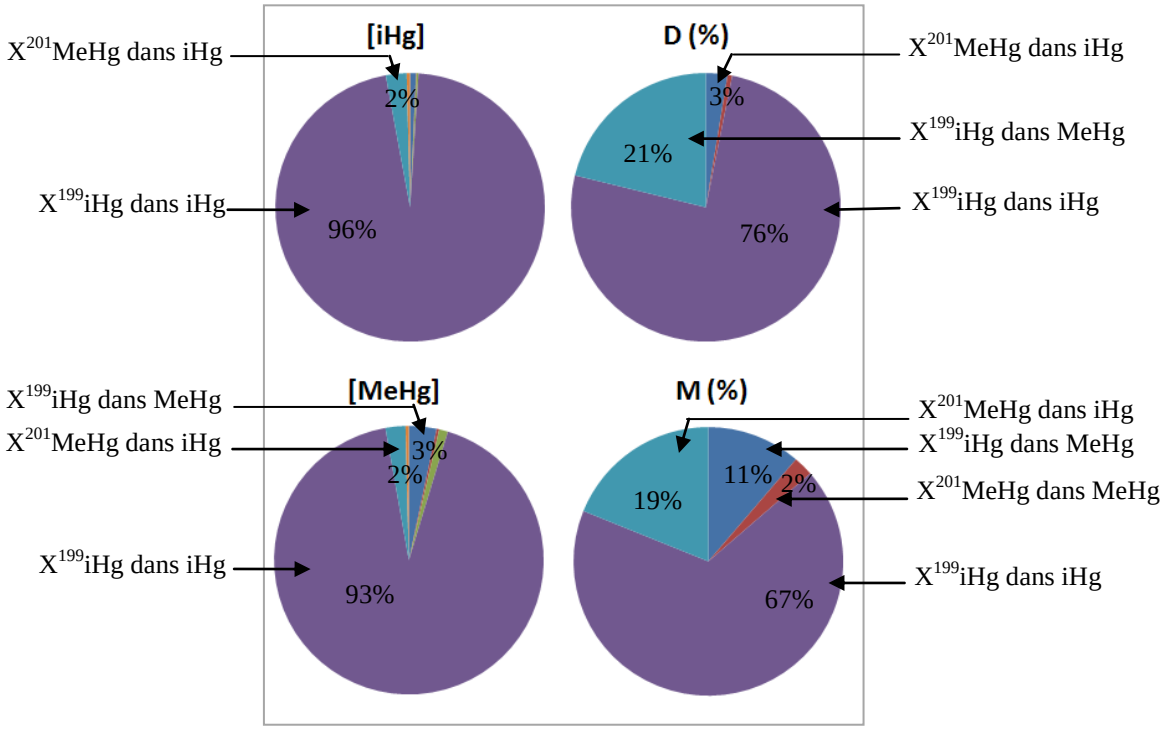


Figure 35 : Représentation graphique de l'étude kragten sur le BCR-464.

Les concentrations en Hg et les taux de transformation ont une incertitude majoritairement imputable à la fraction molaire de iHg provenant du spike ^{199}iHg. Cette singularité par rapport aux deux autres MRCs trouve probablement son origine dans la grande différence de concentration entre le MeHg et le iHg dans ce MRC.

En conclusion, une corrélation entre les fractions molaires des différentes espèces, les rapports isotopiques modifiés et les quantités de spike ajoutées a été mis en évidence. Cela est en accord avec les observations préliminaires faites par Alasonati et al. (2011) (partenaire du projet ANR IDEA, LNE de Paris) par le biais d'une communication par affiche durant la « Winter conference 2011 » à Saragosse. Sur ce poster, l'IPD est défini sous le modèle 2. Les données brutes utilisées sont issus d'analyses menées sur le DOLT-4 par le laboratoire LCABIE. Alasonati et al. (2011) supposent que les incertitudes sur la quantification des concentrations en Hg et des taux M et D sont liées à l'estimation des fractions molaires et que ce fait semble être prédominant lorsque les spikes sont ajoutés à l'échantillon selon un rapport théorique R_m égale à 1. En effet, l'estimation des

fractions molaires est moins précise lorsque les concentrations des espèces endogènes et celles des spikes sont trop différentes. Il est d'ailleurs montré que pour diminuer l'incertitude totale (ou erreur globale), il est préférable d'ajouter les spikes à concentrations égales aux concentrations des espèces endogènes, ce qui amène à des rapports isotopiques modifiés de l'ordre de 0,3 et non de 1.

A l'heure actuelle, aucun nouveau résultat n'a permis d'étayer les hypothèses émises. Néanmoins, à la vue de ces résultats et observations préliminaires, il semble préférable d'ajouter les spikes à l'échantillon, en concentrations équivalentes aux concentrations des analytes endogènes afin d'obtenir des rapports isotopiques modifiés de l'ordre de 0,3. Cette découverte ayant été faite rétroactivement par rapport à l'ensemble de ce sujet de thèse, des rapports R_m théoriques de 1 ont été appliqués dans les travaux de la partie III.

VII Validation interne de la méthode d'analyse

Suite aux résultats précédents, les conditions optimisées d'extraction et de dérivation semblaient adaptées à la spéciation de l'Hg dans les produits de la pêche et ont pu être utilisées pour la validation de la méthode analytique. Cette validation interne a été menée conformément aux normes NFV 03-110 de 1998 et 2010 (AFNOR, 1998 et 2010) et NF EN 13804 (AFNOR, 2002). Les critères d'évaluation définis concernent les limites de détection et de quantification, la spécificité, la justesse, la fidélité (en terme de répétabilité et de reproductibilité intra-laboratoire), ainsi que l'approche récente du profil d'exactitude. Dans le cas des analyses par dilution isotopique, une calibration interne par ajout de standard Hg enrichis isotopiquement est appliquée. Par conséquent, cette technique ne fait pas intervenir de calibration externe par droite d'étalonnage et donc la linéarité n'est pas évaluée. Pour ces mêmes raisons, la spécificité de la méthode n'a pas été étudiée.

Pour rappel, la validation de la méthode GC-ICP-MS a été faite en utilisant une quantification par D-IDMS après marquage isotopique de l'échantillon avant extraction SLE assistée par *digi*PREP avec du TMAH puis dérivation de l'extrait par le NaBPr4 et agitation par agitateur rotatif pendant 7 min.

VII.1 Mise en place de la procédure de validation de la méthode

La validation d'une méthode d'analyse est définie comme « *la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les exigences particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies* » (Feinberg, 2009).

VII.1.1 Espèces analysées et matériaux utilisés

La méthode a été validée pour le MeHg et pour le iHg (par le biais d'une appréciation des différents critères de la validation à partir des concentrations en HgT car les MRCs utilisés ne possède qu'une valeur indicative de iHg). Les concentrations en HgT ont été calculées en faisant la somme des espèces mercurielles (HgT = ∑MeHg + iHg).

Les matériaux de référence certifiés (MRC) utilisés dans cette étude sont le BCR-464, le DOLT-4 et TORT-2. Les échantillons réels utilisés sont issus de l'étude EAT 2 et sont des tissus de thon, saumon, lieu-colin, poisson pané, crevette, moule et huître.

VII.1.2 Qualification de l'appareil

L'ICP-MS n'étant pas exclusivement utilisé pour l'analyse en spéciation du Hg, le couplage GC-ICP-MS est régulièrement découplé puis re-couplé. L'opérationnalité du couplage est donc vérifiée après chaque couplage. Premièrement, le bon fonctionnement de l'ICP-MS seul est vérifié par l'analyse d'un MRC selon la méthode d'analyse accréditée ANSES LSA CIME 08. Après validation de l'ensemble des contrôles qualité internes définis pour cette méthode, les deux appareils sont couplés suivant la notice interne d'utilisation NU-CIME 26. Le bon fonctionnement du couplage est alors vérifié par calibration externe et analyse d'un blanc et d'un MRC, sans utilisation de la ID. Linéarité, répétabilité, justesse et effets de mémoire sont alors évalués. Après validation de ces paramètres, le couplage est jugé opérationnel.

VII.1.3 Paramètres de mesure

Deux prises d'essais par échantillon sont traitées systématiquement et chaque échantillon préparé est analysé en double. La vérification de la concentration et de l'abondance isotopique de chaque spike est effectuée quotidiennement. Le contrôle d'un blanc et d'un MRC est systématiquement introduit dans chaque série d'essai.

VII.2 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.

Les LD sont calculées conformément à la norme NF EN 13804 (AFNOR, 2002). Les limites de détection et de quantification ont été estimées comme, respectivement, 3 et 6 fois l'écart-type de la moyenne des 16 blancs spikés et exprimées en µg kg^{-1} pour une prise d'essai de 5 g. Les différentes dilutions intervenant dans la préparation d'échantillon ne sont pas prises en compte car les spikes ont été ajoutés avant extraction. La LQ pour le MeHg est de 1,2 µg Hg kg^{-1} et de 1,4 µg Hg kg^{-1}pour le HgT.

Les LQ de cette étude sont relativement proches de celles rapportées par Tu et al. (2000), Hintelmann et Nguyen (2005) et Poperechna et Heumann (2005) et meilleures que celles obtenues dans les travaux de Yang et al. (2003a), Perna et al. (2005) et Castillo et al. (2010). Quelques études ont toutefois estimé des LD inférieures (Monperrus et al., 2008, Point et al., 2008, Taylor et al., 2008). En général, la grande variabilité entre les LD peut être attribuée à des différences méthodologiques, telles que le nombre de blancs analysés, la période de temps sur laquelle l'étude a été faite (le même jour, à court-terme (conditions de répétabilité) ou à long-terme (conditions de reproductibilité) etc.).

VII.3 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). La vérification de la stabilité de la répétabilité s'effectue au moyen du test de Cochran (AFNOR, 1998). Dans cette étude, les coefficients de répétabilité ont été évalués selon les critères définis ci-dessus, en analysant deux MRCs (le DOLT-4 et le TORT-2) 10 fois et en double sur 1 journée et en analysant 10 produits de la pêche différents et en double sur 2 jours, tel que :

$$CV_r = 100 \times \sqrt{S_r^2 / X_f} \qquad (8)$$

avec X_f : moyenne des valeurs observées, et s^2_r : variance de répétabilité

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 18.

Tableau 18 : Evaluation de la répétabilité et test de Cochran

Matrices			MeHg	HgT
DOLT-4	Répétabilité	**CV_r (%)**	**2,2**	**2,4**
	Test de Cochran	Max (s) ou log max $(s)^2$	0,3282	0,5009
		Valeur critique	0,7180	0,7180
TORT-2	Répétabilité	**CV_r (%)**	**2,6**	**3,8**
	Test de Cochran	Max (s) ou log max $(s)^2$	0,3852	0,6474
		Valeur critique	0,7180	0,7180
Echantillons réels	Répétabilité	**CV_r (%)**	**2,4**	**2,2**
	Test de Cochran	Max (s) ou log max $(s)^2$	0,1482	0,6581
		Valeur critique	0,7180	0,7180

Les CVr estimés sont compris entre 2,2 et 2,6% pour le MeHg et entre 2,2 et 3,8% pour le HgT. Le test de Cochran montre que les variances pour l'ensemble des matrices étudiées sont homogènes avec max $(s)^2$ ou log max $(s)^2$ inférieurs à la valeur critique. La répétabilité des mesures est donc considérée comme acceptable pour le MeHg et le iHg.

VII.4 Fidélité intermédiaire de reproductibilité

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 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 cette étude, tous les tests ont été réalisés au laboratoire par la même personne et sur un même appareil. La reproductibilité n'a donc pas pu être établie selon l'ensemble des exigences définis ci-dessus ; on parle dans ce cas de reproductibilité interne. La reproductibilité interne a été évaluée sur 3 MRCs (DOLT-4, TORT-2, BCR-464) analysés 10 fois en double et sur une période de 7 mois. Les résultats sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Evaluation de la reproductibilité interne

Matrices			MeHg	HgT
DOLT-4	Ecart-type de reproductibilité Reproductibilité	s_R **CV_R (%)**	0,037 **2,9**	0,071 **2,8**
TORT-2	Ecart-type de reproductibilité Reproductibilité	s_R **CV_R (%)**	0,005 **2,8**	0,017 **5,3**
BCR-464	Ecart-type de reproductibilité Reproductibilité	s_R **CV_R (%)**	0,098 **1,7**	0,099 **1,7**

Les CV_R estimés sont compris entre 1,7 et 2,9% pour le MeHg et entre 1,7 et 5,3% pour le HgT. Les CV_R du DOLT-4 et du TORT-2 sont bien supérieurs ou égales aux CVr présentés dans le tableau 18. La reproductibilité des mesures est donc considérée comme acceptable pour le MeHg et le iHg.

Le CV_R moyen calculé à partir des CV_R estimés ci-dessus (soit 3%) va être utilisé 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. Pour les incertitudes élargies, le calcul se fera selon la formule 9 suivante :

$$Incertitudes = \frac{(k \times X_f \times CV_R)}{(100 \times \sqrt{n})} \quad (9)$$

Par exemple, pour un CV_R de 3% et pour une probabilité p = 0,95 (k = 2), l'incertitude sera de 6 % autour du résultat affiché pour une mesure (n = 1) et de 4% si les mesures sont faites en double (n = 2).

Pour les intervalles de confiance (IC), le calcul se fera selon la formule 10 suivante :

$$IC = M \pm \left(k \times \frac{CV_R \times M}{100 \times \sqrt{n}}\right) \quad (10)$$

avec IC : intervalle de confiance, M : moyenne ou valeur de référence de la teneur en élément, k : facteur d'élargissement choisi égal à 3 pour un niveau de confiance de 99 %, CV_R : coefficient de variation de reproductibilité intra-laboratoire de la méthode, n : nombre de répétitions de l'analyse du matériau de référence.

VII.5 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. L'objectif est de s'assurer que les teneurs mesurées par GC-ICP-MS ne sont pas significativement différentes des valeurs définies dans le MRC. Les résultats sont présentés dans le tableau 20.

Tableau 20 : Evaluation de la justesse pour le MeHg et HgT

MRC		MeHg	Moy	sd	CV (%)	IC	
DOLT-4	MeHg	valeur obtenue	**1,35**	0,01	**0,9**		
		valeur de référence	1,33	0,04	3,0	1,21	1,45
		comparaison plan D	1,33	0,04	2,9	1,22	1,44
	HgT	valeur obtenue	**2,58**	0,07	**2,5**		
		valeur de référence	2,58	0,07	2,8	2,36	2,8
		comparaison plan D	2,58	0,07	2,8	2,36	2,8
TORT-2	MeHg	valeur obtenue	**0,156**	0,003	**2,0**		
		valeur de référence	0,152	0,004	2,9	0,139	0,165
		comparaison plan D	0,152	0,005	2,8	0,137	0,167
	HgT	valeur obtenue	**0,293**	0,017	**5,2**		
		valeur de référence	0,270	0,020	7,4	0,210	0,330
		comparaison plan D	0,270	0,017	5,3	0,222	0,318

Que ce soit pour le MeHg ou pour HgT, les moyennes obtenues sont comprises dans les intervalles de confiance (IC) calculés avec le CV_R de la méthode (intervalle de la ligne comparaison plan D) autour de la valeur de référence pour les deux MRCs. Ces valeurs sont également incluses dans les intervalles de confiance des 2 MRCs qui sont équivalents aux nôtres. Enfin, les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à ceux spécifiés dans la reproductibilité de la méthode. Selon la norme V03-110, la justesse des mesures est donc considérée comme acceptable pour le MeHg, le iHg et par conséquent pour le HgT (AFNOR, 1998).

VII.6 Profil d'exactitude

Une nouvelle stratégie de validation de méthode décrite dans la nouvelle norme NF V03-110 permet d'évaluer son profil d'exactitude (AFNOR, 2010). L'exactitude est la somme de la justesse (biais en statistique) et de la fidélité (erreur systématique). Le profil d'exactitude utilise les critères de performances qui découlent de ces deux paramètres pour définir l'erreur totale de la méthode analytique. Ainsi s'ajoute à l'intervalle défini par les critères de performances, un intervalle d'acceptation en adéquation avec l'objectif de la méthode. Le profil d'exactitude permet de définir les critères de performances de la méthode à différents niveaux de concentrations.

Lors de cette étude, 3 MRCs (TORT-2, DOLT-4 et BCR-464) ont été analysés 6 fois en double, et sur une période de 3 mois. Les profils d'exactitude pour le MeHg et le HgT sont présentés dans l'article II et reportés en figures 36 et 37. Les limites d'acceptabilité de la méthode ont été fixées à 15% pour l'ensemble des espèces mercurielles avec une probabilité fixée à 95%.

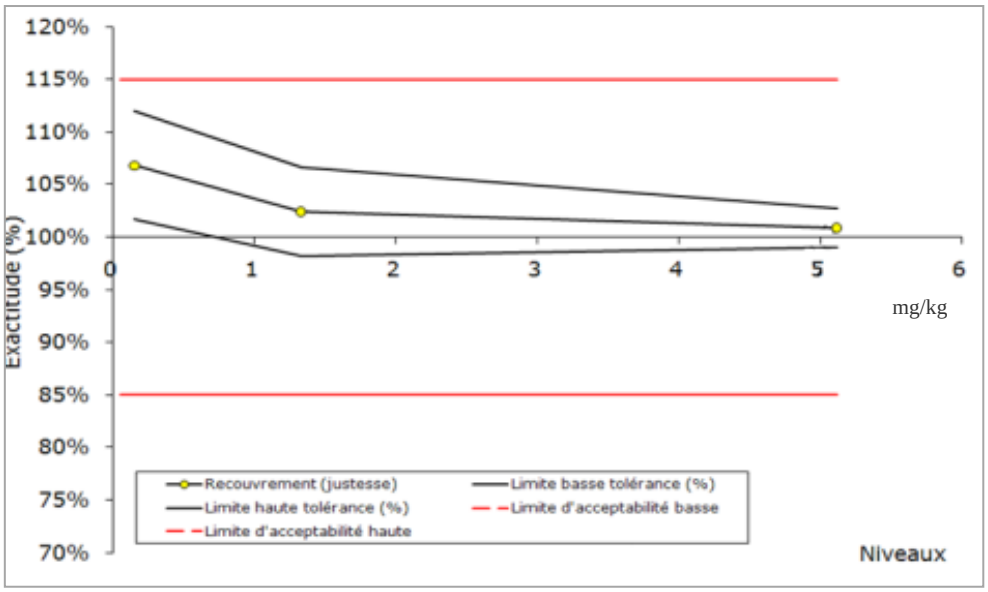


Figure 36 : Profil d'exactitude du MeHg

Pour le MeHg, les limites de tolérance à 95% sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans un domaine de validité qui s'étend approximativement de 0,15 mg kg^{-1} à 5,12 mg kg^{-1}. La méthode est donc considérée validée dans ce domaine.

Par ailleurs, la fidélité varie en fonction de la concentration puisque son coefficient de variation passe de 0,8% (pour la concentration la plus forte) à 1,85% (pour la concentration la plus faible). La justesse est également dépendante de la concentration car le biais de justesse varie de 0,9% à 6,8%, le biais le plus élevé étant obtenu pour la plus faible concentration de MeHg. Ces observations soulignent l'intérêt de procéder aux calculs niveau par niveau. Néanmoins, comme le

montre le profil d'exactitude, ces deux constatations n'ont pas d'influence importante sur la validité de la méthode car les limites de tolérance restent comprises dans les limites d'acceptabilité.

Les CV_r et CV_R moyens obtenus par cette nouvelle approche sont estimés respectivement de 1,3% et de 1,5% pour le MeHg.

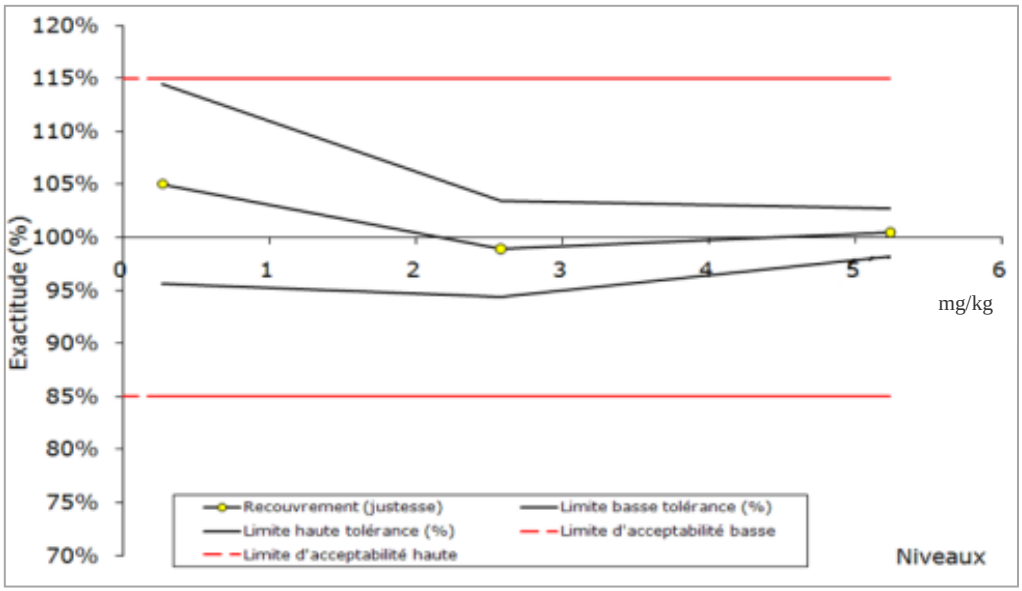


Figure 37 : profil d'exactitude du HgT

Concernant HgT, les limites de tolérance à 95% sont comprises entre les limites d'acceptabilité dans un domaine de validité qui s'étend approximativement de 0,27 mg kg^{-1} à 5,24 mg kg^{-1}. La méthode est donc validée dans ce domaine.

La fidélité varie en fonction de la concentration de 0,9% (pour la concentration la plus forte) à 3,5% (pour la concentration la plus faible). Par ailleurs, le biais de justesse varie de manière acceptable en fonction de la concentration de 0,5% pour la concentration la plus forte à 5% pour la plus faible.

Les CV_r et CV_R moyens obtenus par cette nouvelle approche sont estimés respectivement de 1,7% et de 2,2% pour le MeHg.

VII.7 Conclusion sur la validation de méthode

Le tableau 21 récapitule l'ensemble des paramètres de validation réalisés à partir des deux normes NF V03-110.

Tableau 21 : Bilan de la validation de méthode

		MeHg	HgT
LOQ	(µg Hg kg^{-1})	1,2	1,4
Répétabilité (NFV 03-110 : 1998)	CV_r (%) ($n \geq 10$)	2,4	2,8
Reproductibilité (NFV 03-110: 1998)	CV_R (%) ($n \geq 10$)	2,5	3,3
Profil d'exactitude (NFV 03-110: 2009)	CV_r (%) ($n \geq 5$) CV_R (%) ($n \geq 5$) U (%) (k = 2)	1,3 1,5 1,6	1,7 2,2 2,3

Les CV_R moyens calculés selon l'ancienne norme NF V03-110 (AFNOR, 1998) sont plus élevés que ceux calculés à partir de la nouvelle norme. Ces écarts étaient attendus et s'expliquent probablement par les différences des durées d'évaluation. En effet, pour l'ancienne norme, les analyses ont été menées sur une période de 7 mois alors que pour la nouvelle, les analyses ont été étalées sur une durée de 3 mois seulement.

Des CV_r moyens plus grands sont également obtenus selon l'ancienne norme NF V03-110. Cette différence, moins marquée, est probablement imputable au nombre d'analyses menées pour l'évaluation de ce critère (10 analyses pour l'ancienne norme contre 6 pour la nouvelle).

La méthode d'analyse en spéciation du mercure par ID et GC-ICP-MS présentée est validée en termes de fidélité intermédiaire et de justesse pour le MeHg, le iHg et le HgT. On peut donc conclure à la capacité de la méthode à quantifier exactement ces espèces dans les produits de la pêche sur le domaine de validité allant de 0,152 à 5,12 mg kg^{-1} pour le MeHg et de 0,270 à 5,24 mg kg^{-1} pour le HgT. La comparaison des 2 normes NF V03-110 nous a permis de constater qu'elles indiquent des conclusions similaires, malgré des approches très différentes.

VIII. Conclusions et perspectives

Les espèces Hg peuvent être modifiées lors des différentes étapes constituant la préparation d'échantillon. Notre choix s'est donc porté sur une analyse par dilution isotopique. L'influence de ce marquage isotopique sur la procédure analytique a donc été étudiée dans un premier temps en ajoutant les spikes à des moments différents de la préparation d'échantillon. Ces travaux ont montré que des modifications de la distribution naturelle de l'échantillon pouvaient survenir dès l'étape d'extraction. Les spikes ont donc été par la suite ajoutés avant celle-ci.

La mise en solution des espèces Hg dans les matrices biologiques a ensuite été étudiée. Après étude bibliographique, le choix tendait à porter sur une méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) car elle offre une extraction satisfaisante des espèces Hg avec peu de modification des composés initialement présents dans les matrices. Néanmoins, des limitations liées à l'ancienneté de l'appareil micro-ondes disponible au sein du laboratoire CIME mena à une étude de comparaison entre trois techniques d'extraction que sont la MAE, l'extraction solide-liquide à température ambiante (ERT) et l'extraction solide-liquide assistée par un *digi*PREP (SLE). Cette dernière approche est apparue comme simple, robuste et relativement rapide car elle permet l'extraction simultanée de 46 échantillons. La SLE par *digi*PREP avec du TMAH a donc été choisie comme technique d'extraction.

Suivie une étude de la dérivation des espèces Hg. Après étude bibliographique, le choix porta sur une dérivation par alkylation, technique définie comme permettant d'obtenir des composés possédant une excellente stabilité thermique et ce avec des transferts des espèces Hg de la phase aqueuse vers la phase organique satisfaisants, sans modification des composés initialement présents dans les matrices. Dans un premier temps, le tétrapropylborate de sodium ($NaBPr_4$) a été comparé au tétraéthylborate de sodium ($NaBEt_4$). Les deux réactifs se sont avérés d'une efficacité similaire mais le $NaBPr_4$ a été conservé plutôt que le $NaBEt_4$ car il est moins limitant. L'étape d'agitation des échantillons a également été optimisée en testant 3 techniques différentes (agitation manuelle rigoureuse, agitation à l'aide d'un vortex, agitation à l'aide d'un plateau rotatif). Une agitation mécanique rotative a été selectionnée car c'est la méthode qui s'est avérée la plus juste et reproductible et qu'elle peut s'appliquer en routine, contrairement à l'agitation manuelle.

Enfin, les différentes techniques de traitement des données par ID ont été appliquées à un ensemble de données provenant de l'analyse de MRCs. Une quantification juste des concentrations

par la D-IDMS est systématique, pour les trois matrices étudiées. Des problèmes de répétabilité de mesure et parfois de cohérence des résultats ont été soulevé avec les deux autres techniques (D-SS-IDMS et IPD). Une étude statistique selon Kragten a permis de déterminer que l'origine de ces difficultés réside dans la mesure des fractions molaires. Une seconde étude statistique, récemment menée par le LNE et encore à l'état d'ébauche, laisse supposer que les difficultés rencontrées peuvent être diminuées en modifiant la technique de marquage des échantillons par les spikes. En effet, il semblerait plus probant d'ajouter les espèces enrichies en un isotope en concentrations égales aux espèces naturelles, ce qui amènerait à des rapports isotopiques altérés de l'ordre de 0,3 plutôt que de 1. Il serait intéressant, par la suite, de pousser plus en avant cette hypothèse afin de déterminer si la modification de ces rapports isotopiques permettra de résoudre les difficultés de quantification des taux de méthylation et de déméthylation rencontrées notamment dans le cas d'échantillons où les 2 espèces sont en proportions tres differentes.

La méthode d'analyse par GC-ICP-MS optimisée (marquage isotopique avant extraction, extraction solide-liquide par *digi*PREP avec du TMAH, propylation avec agitation rotative, quantification par dilution isotopique double) a été validée dans les produits de la pêche selon les normes françaises NF V03-110 de 1998 et de 2010 (AFNOR, 1998 et 2010), dans un domaine de concentrations allant de 0,152 à 5,12 mg kg^{-1} de MeHg et de 0,118 à 1,25 mg kg^{-1} de iHg, soit un domaine en HgT allant de 0,270 à 5,24 mg kg^{-1}. L'évaluation des performances analytiques de la méthode a permis de démontrer que les conditions de préparation d'échantillons optimales déterminées étaient satisfaisantes. Cette évaluation confirme également qu'une quantification par D-IDMS est parfaitement capable de fournir une quantification juste et fidèle des teneurs en Hg dans les produits de la pêche.

A ce jour, la quantification par IDMS utilisant l'IPD n'a toutefois pas permis l'évaluation précise des taux de transformation des essais menés au sein du laboratoire CIME. Néanmoins, cette étude a permis d'entrevoir deux axes d'amélioration qui seront à étudier à l'avenir pour tenter d'améliorer la quantification par IDMS utilisant l'IPD : la première serait d'utiliser des rapports isotopiques théoriques de 0,3 plutôt que de 1 et la deuxième serait d'acheter un nouveau chromatographe gazeux afin d'évaluer la part d'erreur apportée par la vetusté du port d'injection sur les taux de transformation mesurés.

Partie III : Applications de la méthode à des études sur la spéciation du mercure dans des matrices biologiques

I. Introduction

Cette troisième partie du manuscrit a pour but de montrer la viabilité et la justesse de la méthode ainsi que son applicabilité en routine sur des matrices réelles diverses de produits de la pêche. Par conséquent, après validation de la méthode d'analyse, des contrôles qualités internes (CQI) ont été mis en place et compléter par des contrôles qualités externes (CQE) conformément à la norme ISO 17025:2005 (ISO 2005) et au système d'assurance qualité (AQ) mis en place au sein du LNR « métaux » de l'ANSES pour toutes nos activités, qu'elles soient de référence ou de recherche (Cf. également chapitre IV).

Par la suite, une première application a été menée au sein du laboratoire LCABIE sur des échantillons réels lyophilisés mais non dégraissés (contrairement aux MRC étudiés), d'anguilles et civelles prélevés dans l'estuaire de l'Adour situé au sud-ouest de la France afin de s'assurer que la méthode de spéciation est applicable à l'analyse d'échantillons réels (Cf. Article I). Nous nous sommes ensuite questionné sur l'influence de la lyophilisation sur la distribution des espèces mercurielles car ce procédé, utilisé dans l'étude précédente, est couramment utilisé pour l'échantillonnage. Cette application a été menée sur différentes matrices de produits de la pêche et en collaboration avec le LCABIE. Pour finir et d'après les observations faites après étude du

procédé de lyophilisation, nous avons décidé d'analyser les échantillons lyophilisés de l'étude EAT 2, plutôt que les matières fraiches (Millour et al., 2011) (Cf. Article II). Les données d'occurrence ainsi obtenues pourraient par la suite être utilisées pour une évaluation plus juste de l'exposition humaine au MeHg via la consommation de produits de la pêche

II. Contrôles qualités internes (CQI) mis en place

Lors de chaque série d'analyses d'échantillons réels, un blanc d'extraction pour surveiller une éventuelle contamination ou détecter des effets de mémoire, un MRC pour vérifier la justesse et la mesure du rapport isotopique $^{203}Tl/^{205}Tl$ pour calculer le biais en masse et vérifier la stabilité du signal dans le temps, sont systématiquement utilisés comme CQI. Enfin, les concentrations et les abondances isotopiques des spikes ^{199}iHg et $^{201}MeHg$ sont vérifiées par dilution isotopique inversée et par analyse des abondances isotopiques (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005).

Concernant le suivi de la justesse, une carte de contrôle a été mise en place sur le DOLT-4 selon la procédure CIME VII.03 du 05 décembre 2008 « Cartes de contrôles » et la norme NF X 06-031-0 : décembre 1995 (AFNOR 1995) (Figure 38). Les limites de surveillance sont calculées comme M ± 2s, les limites d'action comme M ± 3s, l'intervalle de confiance comme M ± (k x CVR x M) avec M la valeur certifiée, s l'écart-type, k = 3 (p = 99%) et CVR le coefficient de fidélité intermédiare de reproductibilité estimé lors de la validation de la méthode à 1,5% pour le MeHg et 2,2% pour le THg.

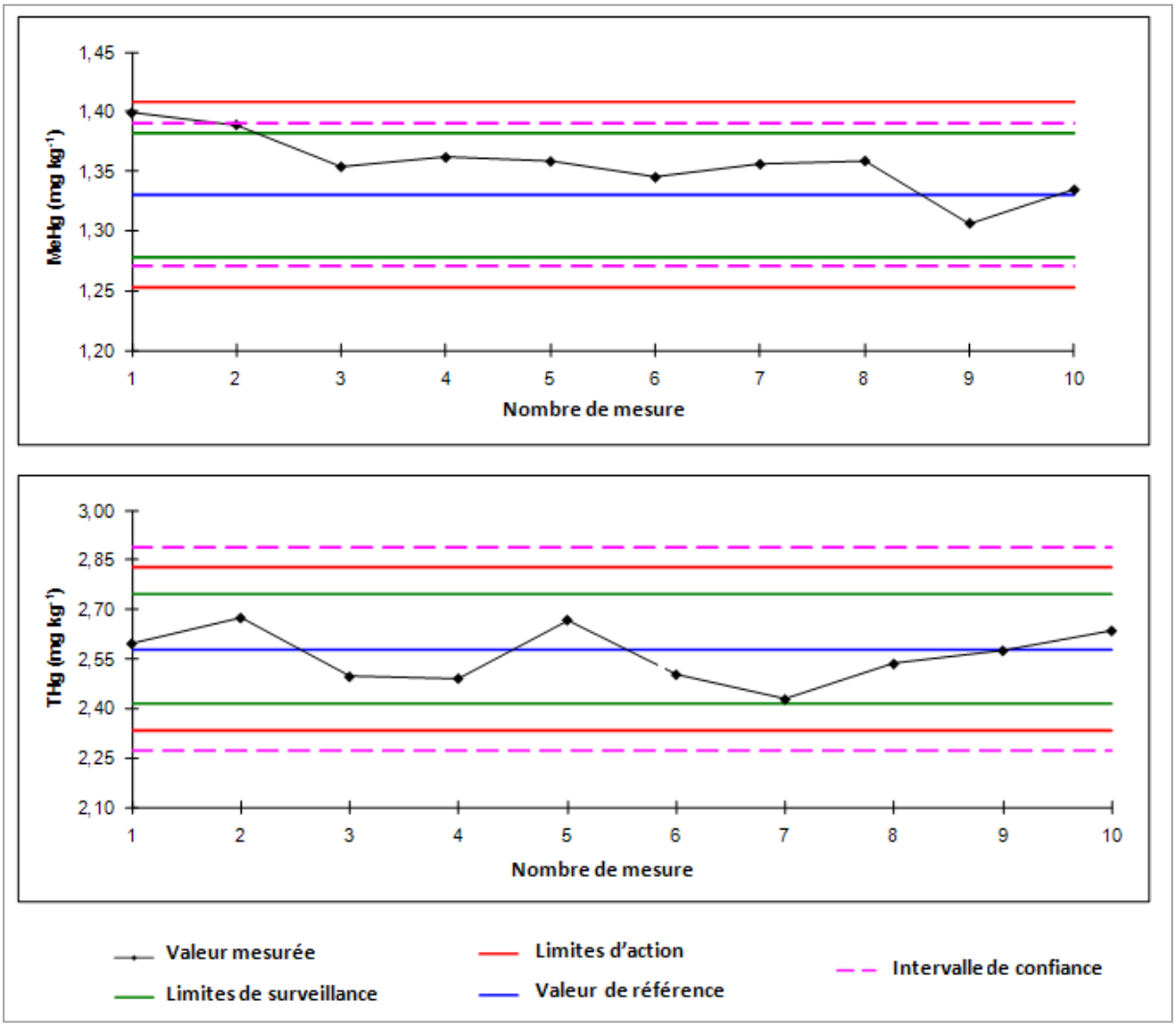


Figure 38 : Cartes de contrôle du DOLT-4 pour le MeHg et le HgT (n = 10).

Les résultats indiquent que les concentrations trouvées sont généralement dans l'intervalle de confiance du fabriquant. Les valeurs moyennes obtenues sur le DOLT-4 pour le MeHg et HgT sont respectivement de 1,36 et de 2,56 mg kg^{-1} avec un écart-type relatif de 1,9% et de 3,2%, respectivement (n = 10). Cependant, il faut noter que les deux premières valeurs de MeHg se situent entre la limite supérieure de surveillance et la limite supérieure d'action, mais comme les limites d'action restent inférieures à l'intervalle de tolérance de la valeur certifiée du DOLT-4 (1,33 ± 0,12 $mg.kg^{-1}$), aucune action corrective n'a été nécessaire. Ces données démontrent une justesse satisfaisante de la méthode lors de l'analyse d'échantillons réels.

Aucune dérive de la stabilité du signal des isotopes du thallium n'a été mise en évidence lors de ces analyses et le contrôle des blancs n'a montré aucune contamination significative en mercure lors de ces essais.

III. Contrôles qualités externes (CQE) effectués

Les CQE sont complémentaires aux CQI mis en place, afin d'évaluer régulièrement la méthode sur des échantillons réels à teneurs inconnues de l'élément d'intérêt. Ce type d'exercice est communément appelé « Essais interlaboratoires d'aptitude (Eilas) ou essais d'aptitude » ou « Comparaison interlaboratoires (CIL) », à ne pas confondre avec « Essais interlaboratoires de validation ». Selon les organismes organisateurs d'Eilas, la matrice et le contaminant d'intérêt, plusieurs dizaines à plusieurs centaines de laboratoires y participent. Après traitement statistique et éventuellement, élimination des valeurs aberrantes, une valeur consensuelle correspondant à la moyenne des valeurs observées, sert de valeur de « référence ». Les Eilas permettent à chaque participant de vérifier sa justesse et de comparer ses données au moyen d'une évaluation externe et d'entreprendre d'éventuelles actions correctives, en cas de résultat non-conforme. Les résultats de chaque participant sont généralement évalués en calculant des Z-scores à partir de l'équation 11 :

$$Z = \frac{\left(\overline{Xf} - \overline{Xc}\right)}{\left(s_R \middle| \sqrt{n}\right)} \qquad (11)$$

avec $\overline{Xf}$ = résultat expérimental, $\overline{Xc}$ = valeur certifiée, s_R = écart-type de reproductibilité, n = nombre de résultats expérimentaux

Les Z-scores sont interprétés comme :

- $|Z| \leq 2$, résultats conformes
- $2 < |Z| \leq 3$, résultats questionnables
- $|Z| > 3$, résultats non conformes.

Au cours de ces travaux, nous avons participé à 2 Eilas organisés par le CSL-FAPAS (FAPAS, 2010) sur un échantillon de thon en conserve, en mai 2010 et par l'IRMM (Geel, Belgique), sur le matériau IMEP-109 de produit de la pêche pour déterminer, entre autres, le MeHg et HgT.

L'Eila organisé par le FAPAS a compté 56 participants issus de 27 pays dont 16 laboratoires ont participé à la détermination de la teneur en MeHg. Cinq techniques analytiques différentes ont été utilisées pour la détermination du MeHg (analyseur automatique de Hg, CV/HG-AAS, GC-ECD, GC-ICP-MS et HPLC-ICP-MS). Le tableau 5 de l'article II présente les valeurs cibles et les

résultats obtenus. En complément, la figure 39 présente les Z-scores obtenus pour le MeHg par les 16 laboratoires participants. Le code laboratoire CIME est le n°15.

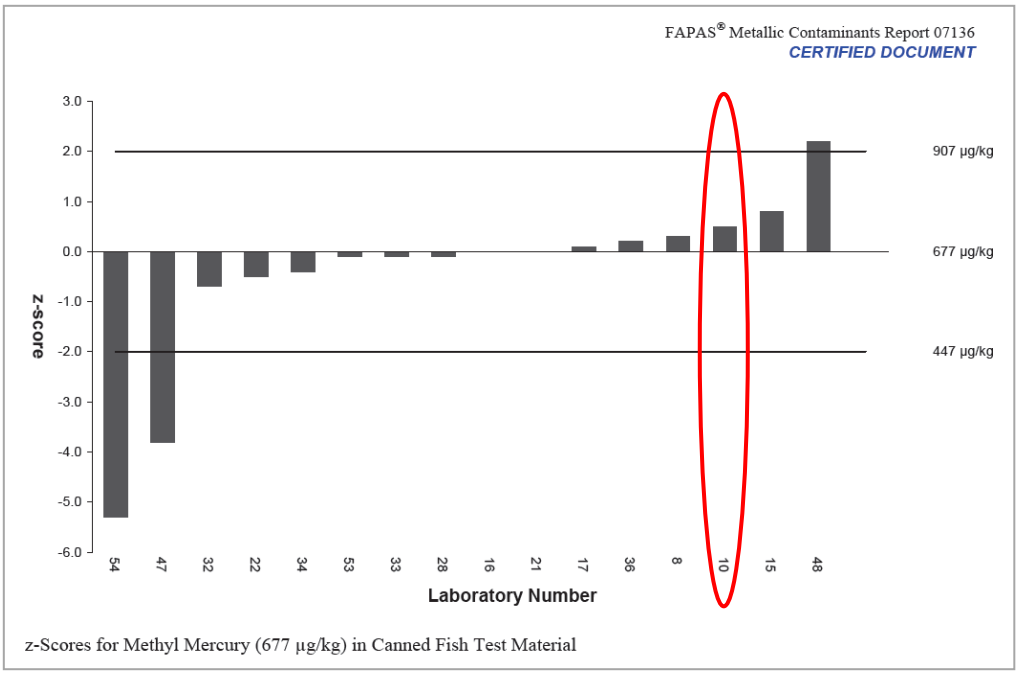


Figure 39 : Z-scores pour le MeHg sur l'échantillon de thon en conserve (FAPAS, 2010)

Sur 16 laboratoires participants, 13 laboratoires, dont le notre (Z-score = 0,8), ont obtenu des résultats conformes. Le laboratoire n°48 a eu un résultat questionnable et les laboratoires n°47 et 54 ont eu des résultats non conformes. Parmi les laboratoires jugés conformes, 5 d'entres eux (n° 10, 16, 17, 32 et 33) ont utilisé une méthode accréditée.

Concernant l'Eila IMEP 109 (IRMM, 2010), 38 participants issus de 27 pays ont participé mais seuls 5 laboratoires ont déterminé la teneur en MeHg dans l'échantillon. Un couplage HPLC-ICP-MS a été utilisé par les laboratoires n°13 et 38. Le laboratoire n°7 a utilisé un analyseur de mercure et détection SAA. Enfin, notre laboratoire (n° 1) et le laboratoire n° 10 ont utilisé un couplage GC-ICP-MS. La figure 40 présente les teneurs en MeHg observées (mg kg^{-1}). La ligne noire présente la teneur certifiée du MRC DOLT-4 ($X_{réf}$) qui a été utilisé lors de cet Eila. L'intervalle de tolérance du MRC ($X_{réf} \pm U_{réf}$) est spécifié par les lignes vertes. L'intervalle cible défini par les organisateurs de l'Eila est caractérisé par les lignes rouges.

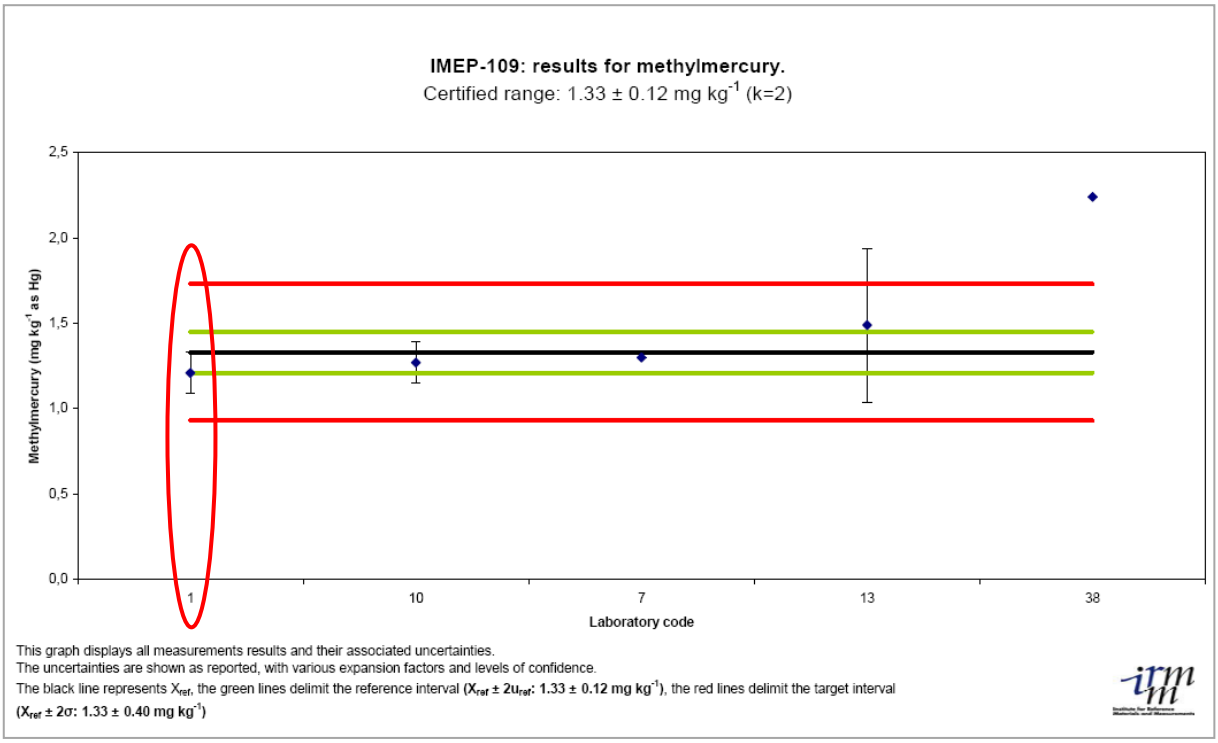


Figure 40 : Teneurs en MeHg obtenus de l'IMEP-109 (IRMM, 2010)

Les teneurs en MeHg observées sont conformes pour 4 laboratoires dont le notre (Z-score = 0,6), et le laboratoire n° 38 a rendu un résultat non-conforme avec un Z-score > 3.

Les résultats obtenus pour le MeHg et le HgT lors de ces 2 Eilas sur des échantillons de poissons sont satisfaisants, démontrant la justesse de notre méthode validée. A noter qu'aucun Eila n'a porté sur les autres produits de la mer (mollusques, coquillages…) au cours de cette période. Nous avons également participé à un troisième Eila organisé par le FAPAS sur une matrice de poisson, dont le traitement des données statistiques est actuellement en cours.

IV. Applications

IV.1 Etude des échantillons lyophilisés d'anguilles et de civelles

Cette étude a été menée au sein du laboratoire de Pau lors de mon stage de formation de 3 mois sur la technique GC-ICP-MS. Cette étude a fait l'objet d'un article (Article I) sous presse dans le journal « International Journal of Environmental Analytical Chemistry ».

IV.1.1 Contexte de l'étude

L'anguille est un poisson migrateur de grand intérêt écologique. Selon son âge, son alimentation varie (d'abord du plancton puis des crustacés, des mollusques et des poissons) ainsi que sa physionomie (poids : jusqu'à 3 kg, longueur : jusqu'à 1,5 m, longévité : 10 ans, graisse : 30% poids corporel en moyenne pour les anguilles argentées de plus de 500 g) font qu'elle tend à bioaccumuler et bioamplifier les polluants dans son organisme. Elle devient donc un parfait indicateur de pollution de l'environnement aquatique de part ses évolutions marines et estuariennes (lieux et durées) qui peuvent être évaluées par l'étude de ses otolithes (os de l'oreille interne) (Tabouret et al., 2010, Daverat et al., 2011).

Depuis les années 1980, la population des anguilles diminuent drastiquement en raison de surpêches et de changements climatiques (Dekker, 2000, Feunteun 2002). Elles sont classées comme espèces menacées d'extinction depuis juin 2007. Le cycle biologique de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) est détaillé dans l'article I et résumé dans la figure 41.

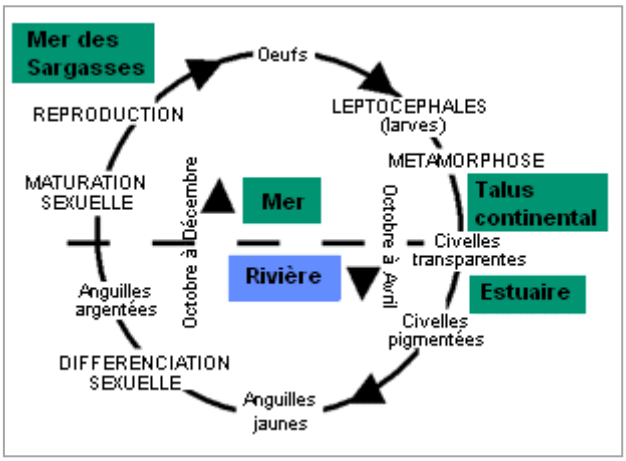


Figure 41 : Cycle biologique de l'anguille (source : http://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr/milieux-continentaux/poissons/anguille-migrateur.php)

Dans cette étude, les teneurs en espèces Hg et butylétains (BuSn) d'échantillons réels d'anguilles et de civelles ont été déterminées par analyse GC-ICP-MS et quantifiées par D-IDMS et IPD. Les échantillons étudiés concernaient 2 stades de l'espèce *Anguilla anguilla* (civelles et anguilles jaunes) prélevés le long de l'estuaire de l'Adour dans le Sud-ouest de la France. Les civelles ont été prélevées la nuit en milieu marin, à Moliets et dans des rivières, à Urt en décembre 2004 et avril 2005. Les anguilles jaunes ont été prélevées le long de la rivière de l'Adour, à Redon, Saint Laurent de Gosse, Termi et Cauneille de juillet 2005 à juillet 2007. Le muscle des anguilles jaunes et les civelles entières ont été séparément lyophilisés et homogénéisés avant analyse. Une description plus détaillée des matériels et méthodes utilisés pour cette étude, ainsi qu'une présentation des sites de prélèvement, de la méthode analytique et des résultats obtenus sont faites dans l'article I. Seuls les résultats en mercure sont présentés et discutés dans ce paragraphe. Il est à noter qu'à notre connaissance, aucun article dans la littérature n'a concerné des études de spéciation du Hg dans les civelles (stade juvénile de l'anguille). Les résultats présentés ici sont les premières données d'occurrence pour cette matrice.

IV.1.2 Résultats expérimentaux

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article I.

Intern. J. Environ. Anal. Chem.
Vol. ??, No. ?, Month?? 2011, 1–17

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Simultaneous determination of mercury and butyltin species using a multiple species-specific isotope dilution methodology on the European, *Anguilla anguilla* glass eel and yellow eel

P. Navarro[a], S. Clemens[b], V. Perrot[a], V. Bolliet[c], H. Tabouret[a], T. Guerin[b], M. Monperrus[a]* and D. Amouroux[a]

[a]*Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, UMR 5254 IPREM-CNRS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc Pau Pyrénées, 2 Avenue Président Pierre Angot, 64053 Pau, France;* [b]*Laboratoire de sécurité des Aliments, Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, Agence nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, ANSES-LSA-CIME 23 Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France;* [c]*UMR ECOBIOP INRA-UPPA, Station d'Hydrobiologie, INRA, Quartier Ibarron, 64310 Saint Pée sur Nivelle, France*

(*Received 26 April 2011; final version received 14 September 2011*)

A methodology to simultaneously determine mercury (MeHg, IHg) and butyltin (TBT, DBT, MBT) compounds in eel samples was assessed and validated using multiple isotopically enriched species. The developed methodology was able to analyse simultaneously the organometal species accurately and precisely and to correct for the potential transformations/degradations of the different species during the various steps of the analytical procedure. Low detection limits were achieved (0.007–0.17 µg Hg kg^{-1} for mercury (Hg) species and 0.42–0.71 µg Sn kg^{-1} for tin (Sn) species) allowing analysis of low-mass samples and thus the analysis at the individual organism scale, including glass eels for which samples dry weight ranged from 60 to 100 mg. The methodology was validated with certified reference materials (BCR-464, BCR-477, BCR-710, DOLT-4 and NIST-2977) and applied to the analysis of these pollutants in two developmental stages of the European eel, *Anguilla anguilla*: individual whole glass eels and muscle tissue from yellow eels. The Adour estuary (South-west France) was selected to monitor the bioaccumulation of organometal species in these organisms, according their developmental stage, their morphological parameters and the sampling site. The results suggest that the accumulation of methylmercury in glass eel tissue is related to weight, with higher concentrations in smaller individuals. Butyltin concentrations were very close to the limit of detection, and no significant differences were detected between glass and yellow eels.

Keywords: speciation; mercury; butyltin; eel; isotopicdilution

1. Introduction

The European eel (*Anguilla anguilla*) is a catadromous species of major ecological and economic significance [1]. Over the last three decades, it has suffered a dramatic population decline [2], being outside safe biological limits throughout all of Europe [3].

*Corresponding author. Email: mathilde.monperrus@univ-pau.fr

ISSN 0306-7319 print/ISSN 1029-0397 online
© 2011 Taylor & Francis
http://dx.doi.org/10.1080/03067319.2011.629349
http://www.tandfonline.com

Different factors have been involved in this decline, including overfishing of glass eels, climate/current changes, habitat destruction, migration barriers and pollution [4,5].

A. anguilla has a life cycle that goes through different stages and habitats, i.e. different environmental conditions (oxygen availability, salinity, exposure to anthropogenic compounds) [6]. This species spawns in the Sargasso Sea and the resulting larvae (leptocephali) use ocean currents (mainly the Gulf Stream) to migrate to European coastal areas. The leptocephalus stage is a key developmental stage, characterised by the accumulation of energy stores for metamorphosis [7] and estuarine migration. When the leptocephali reach the continental shelf, they metamorphose into glass eels which enter estuaries mostly from October to April/May on the French Atlantic coast and then migrate up estuaries without feeding [8]. They progressively acquire green and brown pigments and become yellow eels that colonise the watershed for a long freshwater growth phase. Eels then undergo a second metamorphosis and become silver eels, and return to the Sargasso Sea where they reproduce and die [9]. Because glass eels and silver eels do not feed during estuarine and reproductive migrations, both leptocephali and yellow eels must accumulate energy reserves during their growth phase [10]. In addition, yellow eels feed on benthic macro-invertebrate predators during their early years, and are thus exposed to contaminants accumulated and adsorbed in sediments [10]. When they reach more than 30–40 cm, eels become top piscivorous predators[11] and can swim throughout the entire water column. Therefore, due to its high fat content and local benthic feeding behaviour, the sub-adult stage is considered extremely prone to the bioaccumulation of pollutants [12], and has been used as an indicator of pollution in aquatic environments [13–17].

Industrial contamination of river systems by toxic metals can have long-term effects on the metal body burdens of resident fish. This is particularly true in the case of mercury (Hg), which is not only converted from a relatively toxic inorganic species to a very toxic organometal species (methylmercury, MeHg) at low concentration levels, but also bioaccumulates and biomagnifies in aquatic biota [18,19]. The behaviour of organotin compounds (OTs), i.e. tributyltin (TBT), is similar. OTs have been considered endocrine-disrupting chemicals and they have been extensively used as biocides in wood preservatives, antifouling paints and fungicides [20], all released directly to the aquatic environment. Fish and seafood products can be important sources of energy, protein, ω-3 fatty acids, trace elements and vitamins, but also of environmental contaminants [21–23] such as Hg and Sn species that are bound to proteins in biological tissues. Therefore, the accumulation of organomercury and tin (Sn) compounds through food chain has been found in organisms at higher trophic levels, i.e. fish, marine mammals, birds and humans. Moreover, their uptake within a given population can vary with size and age and it is therefore valuable in ecosystem studies to analyse individual organisms.

The determination of organometal species in complex environmental matrices requires extensive sample preparation prior to instrumental analysis, and is one of the main concerns in speciation analysis. The sample preparation step, including extraction of the species from the matrix and derivatisation, is prone to non-quantitative reactions, unpredictable analyte losses, contamination and species interconversions [24,25]. Optimised sample preparation is necessary, not only to reduce the time involved, but also because each step adds a potential source of error. Sample preparation becomes even more critical at the low concentrations required for ultra-trace level analysis, as it can account for a significant proportion of the variability of a particular methodology [26]. The use of speciated isotope dilution for the determination of a wide range of elemental species, even in complicated matrices [27], can overcome these problems in

sample preparation. This quantification approach is considered a definitive method that provides highly accurate and precise data and can also correct for possible losses and species transformations. Recently, several methodologies based on the use of multiple-spiking species-specific isotope dilution analysis have been developed [28–30]. Depending on the number of species to be analysed simultaneously and the transformation rates to be estimated, different numerical approaches can be used. A recent numerical approach based on isotopic pattern deconvolution developed by Rodríguez-González *et al.* [30,31] has been demonstrated to be a powerful and versatile approach, not only for monitoring the species degradation processes, but also for accurate quantification.

In this study, we optimised several steps of the sample preparation procedure and compared two species determination approaches.Owing to small quantities of sample and low concentration levels, samples were analysed using gas chromatography - inductively coupled plasma-mass spectrometry (GC-ICP-MS) because it offers high sensitivity and low detection limits. In combination with isotope dilution, the methodology validated was used to assess the impact of these contaminants in two developmental stages of European eels from the Adour estuary, i.e. glass and yellow eels. Both stages were analysed to determine the concentrations of organomercury and organotin compounds and establish differences in the accumulation patterns of MeHg and butyltin compounds. The glass and yellow eels were collected in different locations along the Adour estuary (south-western France), which is influenced by urban development and industrial activities downstream, and agriculture and fisheries activities upstream (the river has several floodplains which are natural habitats for *A. anguilla*) [32].

2. Experimental

2.1 *Environmental samples*

The samples studied in this work were two stages of the species *Anguilla anguilla* (glass eels and yellow eels) collected along the Adour River estuary in south-western France (see Figure 1). The estuary is affected by a dynamic macrotidal regime, reaching up to

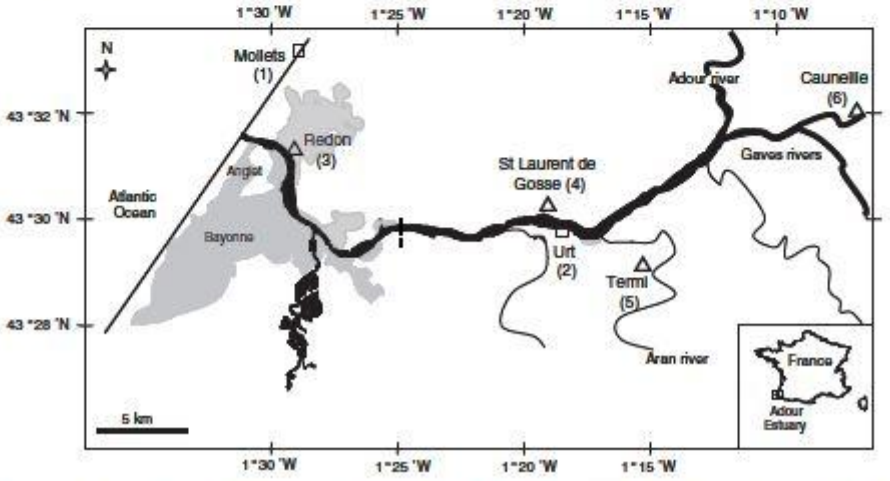


Figure 1. Map of the sampling sites. Glass eel sampling sites are indicated by open squares (□) and yellow eel sampling sites by open triangles (Δ).

70 km upstream. The upstream part of the estuary flows through agricultural areas, while the downstream part is within the urban development of the city of Bayonne and is subject to urban and industrial inputs. In a previous study, Stoichev *et al.* [33] reported chronic Hg contamination in sediments with some specific sedimentation areas where inorganic mercury (IHg) can be converted into MeHg, especially during low discharge periods and warm weather conditions. The determination of Hg and butyltin (BuSn) species concentrations in sediments in the Adour estuary has shown concentrations ranging 0.01–0.23 ng Hg g^{-1} for MeHg, 25–477 ng Hg g^{-1} for IHg, 0.09–8.95 μg Sn g^{-1} for TBT and 0.43–2.23 μg Sn g^{-1} for DBT [34]. For benthic macrofauna in the Adour estuary concentrations were less than 0.12 μg Hg kg^{-1} for MeHg, ranging from 25 to 200 μg Hg kg^{-1} for IHg, 0.25 to 0.40 μg Sn kg^{-1} for TBT and 20 to 30 μg Sn kg^{-1} for dibutyltin (DBT) [34]. Other study carried out by Lespes *et al.* [35] reported BuSn concentration values along the Adour estuary in sediments ranging <0.1–3.6 μg Sn kg^{-1} for TBT, <0.1–7 μg Sn kg^{-1} for DBT and 13–39 μg Sn kg^{-1} for MBT and in dissolved phase 0.2–30 ng Sn L^{-1} for TBT, <0.2–33 ng Sn L^{-1} for DBT and 0.7–35 ng Sn L^{-1} for MBT. In addition, Arleny *et al.* [36] found values ranging from 80 to 450 μg Hg kg^{-1} for MeHg and from 3 to 160 μg Hg kg^{-1} for IHg in European yellow eels caught in the same estuary. Therefore, *A. anguilla* appears to be an effective bioaccumulator of MeHg, even in moderately contaminated aquatic environments.

Glass eels were collected at night in two sites: station 1 (Moliets), a marine site, which is a sandy beach on the Atlantic coast, 30 km away from the mouth of the Adour River, in December 2004 ($N = 20$); station 2 (Urt), located 21 km from the mouth of the Adour River, i.e. half way between the mouth of the river and the upstream limit of tidal influence (salinity <0.5 ‰), in December 2004 ($N = 20$) and in April 2005 ($N = 20$).

Yellow eels were sampled from four sites along the river. At station 3 (Redon), located at the mouth of the river, under tidal influence and affected by urban and industrial activities, yellow eels were caught in July 2005 ($N = 12$) and in July 2007 ($N = 2$). At station 4 (Saint Laurent de Gosse), a human-modified floodplain subject to agricultural activities that is connected to saline water and flooded twice a year, the individuals were collected in July 2006 ($N = 3$). At station 5 (Termi), another floodplain connected to the Adour River by a tributary and not affected by saline water, yellow eels were caught in April 2006 ($N = 3$), in July 2006 ($N = 3$), in October 2006 ($N = 3$) and in July 2007 ($N = 3$). At Station 6 (Cauneille), one of the three main tributaries of the Adour River, outside any tidal influence, the individuals were sampled in October 2006 ($N = 2$).

On the morning following their capture, glass eels were transported to the laboratory, anaesthetised by immersion in a solution of 0.036 mL L^{-1} clove oil, weighed (Sartorius CP 153 balance, ±1 mg), and their length was measured. Then, they were killed by lethal immersion and immediately frozen at −20°C until lyophilisation. Glass eels weighed around 70 mg (dry weight) and each individual was ground by hand. The yellow eels were transported to the laboratory in cool boxes and then dissected. Eel muscle tissues were lyophilised and homogenised before analysis.

2.2 *Chemicals*

TBT chloride (96%), DBT dichloride (97%) and monobutyltin trichloride (MBT) (95%) were obtained from Sigma-Aldrich, whereas the MeHg standard was obtained from Strem Chemicals (Newburyport, MA, USA). The stable isotopes and isotopically enriched

species used were purchased from ISC Science (Oviedo, Spain): IHg enriched in ^{199}Hg (91%), MeHg enriched in ^{201}Hg (96.5%) and a mix of MBT, DBT and TBT enriched in ^{119}Sn (82.4%). DBT enriched in ^{118}Sn and TBT enriched in ^{117}Sn were obtained from LGC Limited (Teddington, UK). All stock solutions were kept in the dark at −20°C until use and were prepared by dissolving the corresponding salt either in acetic acid for butyltin compounds or in methanol for MeHg and in ultrapure water (1% HCl) for IHg. Working solutions of the butyltin compounds were prepared daily before analysis by dilution of the stock solutions with a 3:1 mixture of acetic acid:methanol. For Hg, the working solutions were prepared daily by dissolving the corresponding stock solution with 1% HCl in ultrapure water.

Hydrochloric acid (HCl, 33–36%, ultrex® II ultrapure reagent) and glacial acetic acid (HAc, Instra-analyzed®) were purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Methanol (MeOH, chromasolv®) was obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). Ammonium hydroxide (NH_4OH, puriss p.a.) and tetramethylammonium hydroxide (TMAH, 25% in water, traceselect) were purchased from Fluka (Steinheim, Germany) and sodium acetate trihydrate (NaAc, puriss p.a.) from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Sodium tetraethylborate and sodium tetrapropylborate (98%) were purchased from Galab (Geesthacht, Germany).

The certified reference materials used for validating the methodology were BCR-464 (tuna fish, Hg species), BCR-477 (mussel tissue, BuSn species), BCR-710 (oyster tissue, BuSn species) purchased from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium), DOLT-4 (dogfish liver, Hg species) obtained from the National Research Council Canada (NRCC, Ottawa, Canada) and SRM-2977 (mussel tissue, Hg species) from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA).

2.3 *Intrumentation*

The extraction of the organometallic species from solid matrices was carried out using an Explorer focused microwave system from CEM Corporation (Mathews, NC, USA); this system ensures accurate control of temperature and pressure inside the glass vial. The simultaneous determination of Hg and BuSn species was performed in a Thermo XSeries 2 inductively coupled plasma-mass spectrometer (ICP-MS) coupled to a gas chromatograph (GC) (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) by a commercial GC-ICP-MS interface (Silcosteel®,0.5 m length, inner i.d. 0.28 mm and o.d. 0.53 mm, outer i.d. 1.0 mm and o.d. 1,6 mm, Thermo Fisher). The sample (2 µL) was injected in the splitless mode at 250°C into a (30 m x 0.53 mm × 1 µm) MXT® Silcosteel® column (Restek, Bellefonte, PA, USA). The carrier gas used was helium at 25 mL min^{-1}. The temperature program used for the chromatographic separation was as follows: temperature increase at 60°C min^{-1} from 60°C to 280°C. The ICP-MS parameters used for the analysis were as follows: nebulizer, plasma and auxiliary flows 0.6, 15 and 0.9 L min^{-1}, respectively; radiofrequency power 1250 W; isotopes for Hg analyses 198, 199, 200, 201 and 202 (Tl, 203 and 205); isotopes for Sn analyses 116, 117, 118, 119 and 120 (Sb, 121 and 123); a dwell time of 25 ms for Hg and Sn isotopes and 5 ms for Tl and Sb. The performance of the instrument was optimised with liquid standards, and the isotopes of Tl and Sb were measured to check the mass bias in each chromatographic run [37].

2.4 *Sample preparation and analysis*

A 250 mg subsample for analyses of yellow eels or whole glass eels was accurately weighed in an extraction tube and 5 mL of TMAH were added to the tube. The appropriate amount of isotopically enriched Hg (^{199}IHg and ^{201}MeHg) and BuSn species (^{118}DBT and ^{117}TBT) was added. The microwave extraction conditions were 70°C for 4 minutes with stirring [38]. After cooling, the extracts were centrifuged at 3500 rpm for 5 min and an aliquot of the extracted solution was added to 22 mL glass vials containing 5 mL of HAc/NaAc buffer (pH 5, 0.1 mol L^{-1}). The pH was then re-adjusted with ultrapure HCl to pH 5 for simultaneous analysis. Propylation of the species was carried out by adding 1 mL of iso-octane and 0.25 mL of $NaBPr_4$ 5% (w/v) freshly prepared daily, and the vial was manually shaken for 5 min. The organic phase was recovered, transferred to a chromatographic vial and kept at −20°C until analysis. The GC-ICP-MS analysis was then performed within 24 h [39]. At least one blank was also run in each batch of analyses.

The concentrations and the transformation factors were calculated using the isotope pattern deconvolution (IPD) approach previously applied for quantification of BuSn species [31] and Hg species [30]. The concentrations were compared to those calculated using the classical isotope dilution analysis (IDA) approach [34].

3. Results and discussion

3.1 *Evaluation and validation of the methodology using multiple isotopically enriched species*

Various steps of the sample preparation procedure were evaluated: the extraction and derivatisation steps were studied because they are the main processes during which species transformations can occur. Species transformations were assessed by adding the multiple spike solution before and after extraction. After comparison of the two spike addition conditions, the analytical step during which the transformation takes place (extraction or derivatisation) was determined as well as the type of conversion (methylation of IHg, demethylation of MeHg and debutylation of BuSn species) that may have occurred.

The type of derivatisation reagent (sodium tetraethyl borate or sodium tetrapropyl borate) was also studied because the use of different reagents can affect derivatisation performance and induce conversion between species [40]. The spiking procedure and the derivatisation reagent effect were evaluated by comparing concentrations and transformation factors obtained with the two different quantification approaches described above.

Hg species - Table 1 gives the results obtained for the certified reference materials for the different test conditions. The experimental concentrations obtained by classical isotope dilution (IDA) approaches are not significantly different ($p > 0.05$) from the certified values for total Hg and MeHg in DOLT-4, except for MeHg when spike was added after extraction with any derivatisation reagent. Concentrations obtained from IPD approach were statistically different ($p < 0.05$) from certified values in most of the conditions tested. For tuna fish (BCR-464) only the propylated extract spiked before the extraction matched the certified value, probably owing to the complexity of this matrix. This can be explained by a non-quantitative extraction for this complex matrix under the extraction conditions used in this study. Even if the isotopically enriched analogues are added at the beginning of the procedure, the IDA and IPD approaches are not able to properly correct the concentration values when the analytes are not extracted completely.

Table 1. Concentrations (μg Hg kg^{-1} dry weight ± standard deviation ($N = 3$)) obtained for Hg speciation in several certified reference materials under different conditions (spiking before/after the extraction and ethylation/propylation) using either the isotope dilution (IDA) or isotope pattern deconvolution (IPD) approach. % met, percentage of methylation (IHg transformation to MeHg); % demet, percentage of demethylation (MeHg transformation to IHg).

	Derivatisation reagent	Spiking procedure	IDA		IPD			
			Total Hg	MeHg	Total Hg	MeHg	% met	% demet
BCR 464	Certified value		5240 ± 100	5117 ± 158				
	ethylation	before	4825 ± 192	4625 ± 158	4635 ± 734	4497 ± 661	423 ± 243	4 ± 3
		after	4503 ± 102	4314 ± 88	4404 ± 147	4232 ± 143	117 ± 21	0.2 ± 0.2
	propylation	before	5101 ± 157	4927 ± 155	4983 ± 370	4859 ± 364	205 ± 120	4 ± 0.9
		after	4685 ± 319	4569 ± 233	4483 ± 685	4375 ± 683	108 ± 37	0.3 ± 0.1
DOLT-4	Certified value		2580 ± 220	1330 ± 120			108 ± 37	
	ethylation	before	2581 ± 156	1228 ± 44	2601 ± 174	1228 ± 119	8 ± 6	3 ± 2
		after	2513 ± 67	1177 ± 27	2547 ± 58	1177 ± 31	0.9 ± 0.7	3.5 ± 0.8
	propylation	before	2615 ± 210	1280 ± 61	2628 ± 202	1265 ± 112	8 ± 4	4 ± 2
		after	2756 ± 256	1586 ± 44	2777 ± 188	1634 ± 61	2 ± 2	3.0 ± 0.8
BCR-710	Certified value		260 ± 50*	107 ± 8				
	ethylation	after	235 ± 16	95 ± 8	228 ± 13	92 ± 11	5 ± 1	8 ± 5
	propylation	after	255 ± 22	96 ± 14	267 ± 45	105 ± 14	4 ± 2	4 ± 2
NIST-2977	Certified value		101 ± 4	36.6 ± 1.0				
	propylation	before	99 ± 7	37 ± 2	101 ± 3	37 ± 1	1 ± 1	4 ± 1

*indicative value.

Regarding the spiking procedure, experimental values for total Hg and MeHg for both calculation approaches were not significantly different from the certified materials values when the enriched species were added before extraction in the case of DOLT-4. The methylation and demethylation factors were generally higher when the spike was added to the sample before the extraction step. IHg was partially methylated during the extraction process with yields reaching 8% for DOLT-4. Similar methylation yields during extraction have been described by Hammerschmidt and Fitzgerald [41]. In contrast, demethylation factors were similar for both spiking procedures for DOLT-4, suggesting that demethylation is not related to the extraction procedure, but to the derivatisation step. In the case of BCR-464, demethylation generally occurred during the extraction step under both ethylation and propylation conditions. Aberrant methylation factors for tuna fish can be attributed to very low concentration of IHg (123 ng g^{-1}) compared to high concentration of MeHg (5117 ng g^{-1}). As reported before by Monperrus *et al*. for IDA calculation [29], these results demonstrate that IPD methodology does not provide accurate results for the quantification of methylation when there is a huge difference between MeHg and IHg concentrations. Species transformations, especially in the case of an extremely high excess of one of the elemental species, must be carefully monitored in order to obtain accurate results [42]. In this case, the high methylation factors are due to an overestimation of the 199MeHg from the spiked 199IHg in the presence of high natural levels of MeHg. The results from DOLT-4 BCR-464, BCR-710 and NIST-2977 confirm that methylation or demethylation reactions strongly depend on the matrix, as Hinojosa Reyes *et al*. [43] demonstrate for various fish tissues.

Regarding the derivatisation reagent, for DOLT-4, no significant differences ($p > 0.05$) were found between ethylation and propylation when the spike was added before the extraction but significant differences were observed when the spike was added after the extraction step for both THg and MeHg, and only for THg in the case of BCR-710. In the case of BCR-464, ethylation showed significant differences ($p < 0.05$) from propylation in both spiking before and after the extraction and for both THg and MeHg. As reported in other studies [30,44], the ethylation reagent can induce demethylation or methylation during the derivatisation step. For the studied CRMs, transformation factors were not significantly different between both derivatisation reagents for BCR-464 but they were differences for DOLT-4 in demethylation factor when the spike was added after extraction and for the oyster tissue in methylation factor.

No significant differences between the concentrations calculated using the two quantification approaches were observed. However, although the IDP approach properly corrects for transformations among species and gives the corrected concentrations given these transformations, results were more repeatable using the IDA calculation, with standard deviations ranging between 2.0–4.9% and 2.9–15.8% for MeHg calculated by IDA and IPD, respectively, and between 2.1–13.6% and 2.9–16.1% for IHg, respectively. This can be explained by the poor repeatability of the transformation factors which affect the repeatability of the degradation-corrected concentrations of total Hg and MeHg. The repeatability of the transformation factors may be affected by the complexity of the mathemathical IPD model, which takes the contribution of all the monitored isotopes into account.

BuSn species – Table 2 gives the results for oyster tissue (BCR 710) and mussel tissue (BCR 477). For oyster tissue, ethylation and propylation reagents were tested adding the spike after the extraction step. IDA concentrations were not statistically different ($p > 0.05$) from the certified values for both derivatisation reagents, except for DBT

Table 2. Concentrations ($\mu g\,Sn\,kg^{-1}$ dry weight ± standard deviation ($N=3$)) obtained for butyltin species in certified reference materials using the isotope dilution analysis (IDA) or isotope pattern deconvolution (IPD) approach. % debutyl, percentage of debutylation (TBT transformation to DBT); % butyl, percentage of butylation (DBT transformation to TBT).

			IDA		IPD			
	Derivatisation reagent	Spiking procedure	TBT	DBT	TBT	DBT	% debutyl	% butyl
BCR-710	Certified value		54 ± 8	42 ± 8				
	ethylation	after	52 ± 7	33 ± 7	47 ± 8	30 ± 6	−3.8 ± 2.0	−3.3 ± 8.3
	propylation	after	51 ± 4	62 ± 10	47 ± 8	58 ± 10	0.2 ± 4.9	3.8 ± 9.3
BCR-477	Certified value		901 ± 78	785 ± 61				
	ethylation	before	851 ± 25	781 ± 17	778 ± 26	736 ± 14	0.7 ± 0.4	−0.1 ± 1.0
		after	784 ± 94	592 ± 67	736 ± 90	553 ± 61	1.7 ± 0.2	−0.05 ± 1.4

using propylation. For mussel tissue, spike addition was studied with the ethylation reagent only. The addition of the spike before the extraction gave IDA concentrations in agreement with the certified values for both TBT and DBT. This can be attributed to a better equilibrium between endogenous and spiked species when the spike was added before the extraction. The addition before showed significant differences from the addition after the extraction for both TBT and DBT species.

Regarding butylation/debutylation factors, no significant yields were observed except for mussel tissue. Debutylation factors were different ($p < 0.05$) [Q] ital between ethylation and propylation and, between spike before and after the extraction. Very low debutylation factors were detected (0.7–1.7%) in the case of mussel tissue. The ethylation reaction showed a more coherent transformation yield, because butylation reactions are very improbable. The results determined by IPD and IDA were comparable with similar relative standard deviations ranging from 2.2 to 12.0% and 1.9 to 12.2%, respectively.

The overall results for CRMs confirm that the sooner the enriched species are added to the matrix, the more their behaviour is similar to the natural species against transformations or non-quantitative reactions. Thus, to correct for possible losses/transformations of species, the spike should be added before the extraction step. These results also highlight that transformation yields strongly depend on the matrix. Methodologies using isotopically enriched species are thus necessary to evaluate the analytical procedure for any real sample. Therefore, the simultaneous analysis of speciation of Hg and BuSn compounds in real fish samples was performed by adding the spike before the extraction step and using tetrapropyl borate as the derivatisation reagent. It should be noted that when the analysis of speciation for only BuSn species wants to be performed, tetraethyl borate should be used as derivatisation reagent.

3.2 *Analytical performance of the simultaneous analysis*

The limits of detection (LODs) of the methodology were determined by isotope dilution in spiked extraction blanks. The LODs were calculated based on blank runs ($N=9$) as three times the standard deviation of the blank, following IUPAC recommendations. Contributions to the blank thus come from reagents and vessels and were significantly

Table 3. Analytical performance of the Hg and Sn speciation analysis. Recoveries are expressed as percentages, and LODs as $\mu g\,Hg\,kg^{-1}$ or $\mu g\,Sn\,kg^{-1}$ ($N=9$). The repeatability values shown are relative standard deviations (%).

Recovery	THg	MeHg	TBT	DBT
BCR 464	89	89	–	–
DOLT 4	101	93	–	–
BCR-710	95	94	94	89
NIST 2977	98	101	–	–
BCR 477	–	–	95	100
Repeatability	2.1–8.0	2.7–8.3	2.9–7.0	2.2–6.3
LODs	0.24	0.07	0.58	0.42

higher for IHg and butyltin species than for MeHg (Table 3). LODs for the transformation factors were determined using isotope deconvolution patterns in standard solutions containing 1 $\mu g\,L^{-1}$ of each Hg and BuSn species. They were calculated as three times the standard deviation of the transformation yields for the standard solutions. Low LODs for the transformation factors were obtained (0.7% for demethylation, 0.3% for methylation, 0.5% for debutylation and 0.4% for butylation).

Accuracy and precision of the multiple-spike methodology proposed in this study were estimated by analysing the different CRMs following the best assay conditions as determined above (isotopically enriched species added before extraction and propylborate used as derivatisation reagent for the simultaneous analysis of Hg and BuSn species). At least three independent replicates of each CRM were carried out to evaluate recovery and repeatability. Recoveries were estimated at 79% for DBT in BCR-710 and up to 101% for THg in DOLT-4 by IDA approach. Repeatability of the assay ranged from 2.1 to 8.3% for Hg species and from 2.2 to 7.0% for BuSn species. Thus, the assay conditions determined here were adequate for analysing organomercury and butyltin species at very low concentration levels in various animal tissues (mussel, oyster, tuna or fish liver). The very low LODs achieved by this methodology allow the analysis of Hg and butyltin species in fish samples even for samples of very low mass.

3.3 *Assessment of the multiple-spike methodology in real eel samples*

The eel samples were analysed by the analytical multiple-spike methodology described herein and the two quantification approaches (IDA and IPD) were applied. The results were compared in terms of accuracy and precision of the concentration values. The results of the analysis on 10 yellow eel individuals and 10 glass eel individuals injected in triplicate are given in Table 4. The eels were randomly selected from the different sampling sites. The IHg concentration values obtained using IPD were significantly different (Student's t test, $p < 0.05$) from those obtained by IDA, suggesting that IPD provides a better correction of the degradation processes. In contrast, the MeHg concentrations were not different (Student's t test, $p > 0.05$) whether they were calculated using IDA or IPD. Regarding the interconversion processes, demethylation reactions generally took place during the analysis procedure, ranging from 0.5 to 3.9%. Higher and not-so-homogeneous percentages of methylation were calculated, typically from 1.0 to 9.5%, but also up to

Table 4. Concentrations (μg Hg kg^{-1} dry weight ± standard deviation (N = 3)) obtained for Hg speciation in real eel samples using the isotope dilution (IDA) or the deconvolution pattern (IPD) approach. % met, percentage of methylation; % demet, the percentage of demethylation.

		IDA		IPD			
		IHg	MeHg	IHg	MeHg	% met	% demet
Yellow eel	Stream water	23.5 ± 0.9	601 ± 18	10.5 ± 0.1	597 ± 10	7.7 ± 3.6	2.0 ± 0.2
	(Termi, station 5)	27.6 ± 0.4	673 ± 17	15.3 ± 2.0	829 ± 13	<LOD	2.4 ± 0.2
		51.1 ± 0.7	1444 ± 40	15.8 ± 5.7	1244 ± 15	9.3 ± 2.4	2.3 ± 0.2
		24.9 ± 1.5	385 ± 4	8.1 ± 0.5	391 ± 2	9.5 ± 1.0	3.6 ± 0.2
		23.4 ± 0.7	431 ± 6	17.8 ± 2.3	534 ± 9	<LOD	2.2 ± 0.2
	Estuary	14.1 ± 0.1	329 ± 9	7.7 ± 0.4	308 ± 2	4.5 ± 1.6	1.9 ± 0.2
	(Redon, station 3)	28.7 ± 1.9	610 ± 14	9.3 ± 1.9	635 ± 16	<LOD	3.4 ± 0.4
		29.1 ± 2.2	574 ± 8	14.6 ± 1.9	591 ± 10	2.9 ± 2.8	2.6 ± 0.3
		41.9 ± 0.2	1125 ± 32	15.1 ± 3.2	1082 ± 27	<LOD	2.7 ± 0.3
		62.8 ± 3.4	960 ± 25	22.2 ± 5.4	1004 ± 31	6.0 ± 4.1	3.9 ± 0.4
Glass eel	Estuary	15.6 ± 0.3	137 ± 1	10.9 ± 0.4	138 ± 2	1.0 ± 0.9	3.5 ± 0.1
	(Urt, station 2)	21.3 ± 0.4	150 ± 2	18.0 ± 0.4	150 ± 1	1.3 ± 0.6	1.6 ± 0.1
		10.0 ± 1.8	126 ± 5	7.8 ± 2.2	121 ± 3	47 ± 11	0.7 ± 0.5
		14.5 ± 1.5	154 ± 12	13.9 ± 1.0	156 ± 8	22 ± 1	0.5 ± 0.1
		18.2 ± 1.8	147 ± 25	16.5 ± 1.8	143 ± 20	15 ± 15	0.9 ± 0.1
	Sea	11.9 ± 1.2	111 ± 14	10.4 ± 1.6	111 ± 7	<LOD	2.0 ± 1.4
	(Moliets, station 1)	7.5 ± 0.7	81 ± 6	7.5 ± 0.5	83 ± 9	<LOD	0.8 ± 0.4
		22.8 ± 0.5	149 ± 1	18.6 ± 0.5	150 ± 1	<LOD	3.1 ± 0.2
		17.6 ± 0.7	118 ± 2	14.5 ± 0.4	119 ± 2	<LOD	3.0 ± 0.1
		15.6 ± 0.3	137 ± 1	10.9 ± 0.4	138 ± 2	1.0 ± 0.9	3.5 ± 0.1

see Figure 1 for sampling site locations.

47% in the case of glass eels caught in Urt. As in section 3.1. the best option selected regarding accuracy and repeatability was IDA approach, we only took into account the concentrations calculated by this approach from now on.

3.4 *Concentration levels in glass and yellow eel samples from the adour river estuary*

3.4.1 *Concentration levels in two eel life cycle stages*

The mean values of Hg and butyltin compounds found in glass eels and yellow eels at the different sampling sites are summarised in Table 5. First, concentrations of each pollutant were very similar in both stages of *A. anguilla* and for all sampling sites. No significant differences were observed among the four sampling sites for yellow eels or among the two glass eel sampling sites (Student's t test, $p > 0.05$). Hg species concentrations in yellow eels were roughly six times higher than in glass eels, independent of the sampling site. Thus, eels accumulate not only MeHg but also IHg in their tissues. This relationship between Hg accumulation (both MeHg and IHg) and age is in agreement with other studies [45,46] where accumulation was studied.

In contrast, TBT concentrations were higher in glass eels than in yellow eels, suggesting that TBT does not accumulate in eels and dissipates from the tissues. TBT concentrations in eels caught in the downstream end of the estuary near Redon were slightly higher than those collected in other upstream river sites. The downstream estuary is located in an

Table 5. Mean values ± standard deviation (µg kg^{-1} dry weight) obtained for glass and yellow eels for each sampling site.

		N	MeHg	IHg	% MeHg	TBT	DBT	MBT	Length range (mm)	Weight range (g)
Yellow eel	Redon (station 3)	14	652 ± 265	33 ± 13	95 ± 1	1.3 ± 1.3	7 ± 5	2.3 ± 0.9	240–550	26–287
	St Laurent de Gosse (station 4)	3	488 ± 160	37 ± 8	93 ± 1	0.8 ± 0.3	<LOD	0.9 ± 0.4	280–550	31–231
	Termi (station 5)	12	705 ± 312	34 ± 14	95 ± 1	0.9 ± 0.2	13 ± 10	1.0 ± 0.3	220–392	15–145
	Cauneille (station 6)	2	630 ± 60	26 ± 7	96 ± 1	0.5 ± 0.1	40 ± 16	0.7 ± 0.3	336–374	62–85
Glass eel	Urt (station 2)	40	116 ± 32	4.5 ± 2.5	96 ± 2	5.6 ± 2.0	5.6 ± 3.2	2.4 ± 1.9	62–80	0.04–0.1
	Moliets (station 1)	20	117 ± 21	6.6 ± 5.1	93 ± 5	8.2 ± 4.3	2.7 ± 2.3	2.2 ± 2.0	63–81	0.05–0.1

see Figure 1 for sampling site locations.

industrial and urban area and is subject to direct anthropogenic inputs [47]. For glass eels, the concentration of TBT was higher in individuals caught seaward when compared to the more upstream samples. Ohji *et al.* [48] described a similar pattern for liver tissues in *A. japonica*.

Table 6 shows that only a few studies have determined Hg and BuSn species in eels. MeHg and total Hg concentration values found in the present study were similar to those found by Arleny *et al.* [36] in the same area of the Adour estuary and those found by Redmayne *et al.* [49] for the same eel life cycle stage. Concentrations found in muscle tissue by Le *et al.* [46] in Vietnam are higher but the eels analysed in their study were in a more advanced life cycle stage (silver eel). The elevated levels of Hg found in their study can be related to the high accumulation rate in prey consumed by eels and to the energy-storing phase of young eels. Moreover, the liver of silver eels accumulates mainly IHg, which may be related to the detoxification and excretion function of the liver, while muscle has a high affinity for organic Hg, i.e. MeHg [18,45].

Only a few studies on butyltin species have been conducted in eels. The values found in this work are of the same order as those found by Guérin *et al.* [50] in eels bought at four markets in four French cities. The values from Ohji *et al.* [48] are higher than those that we report here because they were analysed in the eel liver, which is one of the organs in which organometals accumulate. Moreover, the values of BuSn concentrations found in the present study were much lower than those found in the literature for animal tissues (snails, mussels, oyster, fish and macro-invertebrates) from European estuaries [34,51–53].

3.4.2 *Bioaccumulation versus biometric factors*

In Figure 2a, MeHg concentrations in yellow eel samples are plotted against individual eel length. The concentrations increased with length (r^2 0.7741, correlation coefficient 0.8798) showing a statistically significant relationship between MeHg concentration and eels' length at the 99% confidence level ($p < 0.01$). This corroborates a bioamplification of MeHg according to length, as previously observed by Arleny *et al.* [36].

In the case of glass eels, even if an inverse statistically significant relationship between MeHg concentrations and their length (Figure 2b) was observed at the 99% confidence level ($p < 0.01$), the correlation between the variables was relatively weak (correlation coefficient 0.4397). This relationship occurred both for marine and estuarine glass eels, suggesting that its origin is not related to estuarine migration but to sea-stage. MeHg may have been passively assimilated by leptocephali through their gills or through feeding during oceanic migration. However, if assimilated through feeding, accumulation should have increased with weight: the more leptocephali consume, the more they accumulate. On the other hand, this result may also come from maternal transfer of Hg. Eels may have accumulated pollutants during their entire life cycle and store them in adipose tissue. During reproductive migration, the silver eel does not feed and relies on its energy stores. When fat is being mobilised, accumulated pollutants are concentrated, as demonstrated for PCBs in the European silver eel [54]. Thus, when arriving at the spawning site, a high level of organic pollutants may be maternally transferred to eggs. During leptocephalus oceanic migration, a dilution effect may occur with weight gain. The more they consume, the more their MeHg concentration is diluted. However, MeHg contamination may also restrict growth (development, haematology, appetite and behaviour) depending on individual variation as noted above [55,56]. Further investigations are now required to address this issue.

Table 6. Concentration values found in the present study and in the literature for eel muscle or liver[a] tissue (µg Hg/Sn kg^{-1} wet weight).

Species	Location	MeHg	Total Hg	TBT	DBT	MBT	Reference
A. anguilla (glass eel)	Adour estuary (France)	20–59	21–62	0.8–4.3	0.2–2.5	0.2–2.3	this work
A. anguilla (yellow eel)	Adour estuary (France)	77–361	83–374	0.2–1.0	0.3–8.1	0.2–0.7	
A. anguilla	River (UK)	–	104–255	–	–	–	Edwards *et al.* (1999) [18]
A. dieffenbachii	River (New Zealand)	80–500	117–651	–	–	–	Redmayne *et al.* (2000) [49]
A. anguilla	River (Belgium)	–	60–245	–	–	–	Maes *et al.* (2005) [12]
A. anguilla (yellow eel)	Adour estuary (France)	80–450	120–480	–	–	–	Arleny *et al.* (2207) [36]
A. anguilla	Lesina lagoon (Italy)	–	130–240	–	–	–	Storelli *et al.* (2007) [14]
A. marmorata (silver eel)	River (Vietnam)	510	389–623	–	–	–	Le *et al.* (2010) [46]
		160[a]	225–1004[a]				
A. anguilla	Markets? (France)	–	–	1.6	1.1	0.1	Guérin *et al.* (2007) [50]
A. japonica (yellow eel)	Estuary (Japan)	–	–	12–27[a]	18–85[a]	13–75[a]	Ohji *et al.* (2006) [57]

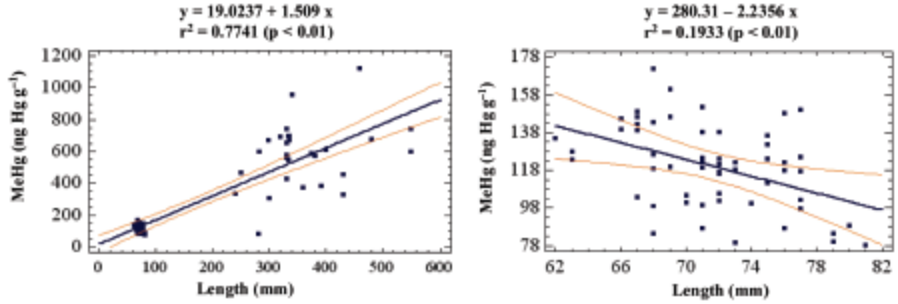


Figure 2. MeHg concentrations (ng Hg g^{-1} dry weight) according to individual length (a) in yellow eels and (b) in glass eels.

4. Conclusions

A methodology for the simultaneous determination of organomercury and butyltin compounds in eels was optimised. The developed methodology was able to accurately and precisely analyse organometal species using multiple species-specific isotope dilution and apply appropriate corrections for potential transformations between species during the analytical procedure. Low detection limits were achieved (0.007–0.17 µg Hg kg^{-1} for Hg species and 0.42–0.71 µg Sn kg^{-1} for Sn species) allowing the analysis of individual samples with low mass, even in the case of early young life cycle stages, where samples may only weigh 60–100 mg. This type of methodology is necessary to directly correlate the contaminant load with individual biological and behavioural parameters that can fluctuate greatly among individuals.

Acknowledgements

This work was financially supported by the ANR "Contaminants, Environnement et Santé" program as part of the project IDEA. P. Navarro is grateful to the Basque Government (Education, Universities and Research Department) for her postdoctoral fellowship.

References

[1] V.L. Maria, A.C. Correia, and M.A. Santos, Environ. Int. **29**, 923 (2003).
[2] C. Briand, D. Fatin, G. Fontenelle, and E. Feunteun, Fish. Manag. Ecol. **10**, 377 (2003).
[3] R. Stone, Science **302**, 221 (2003).
[4] E. Feunteun, Ecol. Eng. **18**, 575 (2002).
[5] W. Dekker, ICES J. Mar. Sci. **57**, 938 (2000).
[6] J. Schmidt, Philos. Trans. R. Soc. London, A **211**, 179 (1922).
[7] E. Pfeiler, Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. **123**, 113 (1999).
[8] P. Elie, Thèse de 3ème Cycle, Université Rennes, 1979.
[9] F.W. Tesch, *The eel*, 5th ed (Blackwell Science Ltd., Oxford, 2003).
[10] R. Van der Oost, F.J. Van Schooten, F. Ariese, H. Heida, K. Satumalay, and N.P.E. Vermeulen, Environ. Toxicol. Chem. **13**, 859 (1994).
[11] P. Michel and T. Oberdorff, Cybium **19**, 5 (1995).

[12] G.E. Maes, J.A.M. Raeymaekers, C. Pampoulie, A. Seynaeve, G. Goemans, C. Belpaire, and F.A.M. Volckaert, Aquat. Toxicol. **73**, 99 (2005).
[13] E. Has-Schön, I. Bogut, and I. Strelec, Arch. Environ. Contam. Toxicol. **50**, 545 (2006).
[14] M.M. Storelli, G. Barone, R. Garofalo, and G.O. Marcotrigiano, Food Chem. **100**, 1337 (2007).
[15] T. Robinet and E. Feunteun, Ecotoxicology **11**, 265 (2002).
[16] F. Pierron, M. Baudrimont, M. Lucia, G. Durrieu, J.-C. Massabuau, and P. Elie, Ecotoxicol. Environ. Saf. **70**, 10 (2008).
[17] H. Tabouret, G. Bareille, A. Mestrot, N. Caill-Milly, H. Budzinski, L. Peluhet, P. Prouzet, and O.F.X. Donard, J. Environ. Monitor, **[redacted]**, DOI: 10.1039/c0em00684j (2011).
[18] S.C. Edwards, C.L. MacLeod, and J.N. Lester, Environ. Monit. Assess. **55**, 371 (1999).
[19] A.F. Castoldi, T. Coccini, S. Ceccatelli, and L. Manzo, Brain Res. Bull. **55**, 197 (2001).
[20] M. Duft, U. Schulte-Oehlmann, M. Tillmann, and L. Weltje, J. Oehlmann, Coast. Mar. Sci. **29**, 95 (2005).
[21] R.P. Mason, J.R. Reinfelder, and F.M.M. Morel, Environ. Sci. Technol. **30**, 1835 (1996).
[22] K. Fent and W. Meier, Arch. Environ. Contam. Toxicol. **22**, 428 (1992).
[23] I. Sahuquillo, M.J. Lagarda, M.D. Silvestre, and R. Farre, Food Addit. Contam. **24**, 869 (2007).
[24] R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, E. Krupp, D. Amouroux, and O.F.X. Donard, Appl. Organomet. Chem. **74**, 2505 (2002).
[25] D. Point, J.I. García Alonso, W. Clay Davis, S.J. Christopher, A. Guichard, O.F.X. Donard, P.R. Becker, G.C. Turk, and S.A. Wise, J. Anal. At. Spectrom. **23**, 385 (2008).
[26] K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, and R.M. Smith, J. Chromatogr. A **1153**, 36 (2007).
[27] K.G. Heumann, Anal. Bioanal. Chem. **378**, 318 (2004).
[28] P. Rodríguez-González, A. Rodríguez-Cea, J.I. García Alonso, and A. Sanz-Medel, Anal. Chem. **77**, 7724 (2005).
[29] M. Monperrus, P. Rodríguez-González, D. Amouroux, J.I. García-Alonso, and O.F.X. Donard, Anal. Bioanal. Chem. **390**, 655 (2008).
[30] A. Castillo, P. Rodriguez-Gonzalez, G. Centineo, A.F. Roig-Navarro, and J.I. Garcia-Alonso, Anal. Chem. **82**, 2773 (2010).
[31] P. Rodríguez-González, M. Monperrus, J.I. García Alonso, D. Amouroux, and O.F.X. Donard, J. Anal. At. Spectrom. **22**, 1373 (2007).
[32] P. Gomez-Mourelo, C. R. Biologies **328**, 367 (2005).
[33] T. Stoichev, D. Amouroux, J.C. Wasserman, D. Point, A.D. Diego, G. Bareille, and O.F.X. Donard, Estuar. Coast. Shelf Sci. **59**, 511 (2004).
[34] M. Monperrus, D. Point, J. Grall, L. Chauvaud, D. Amouroux, G. Bareille, and O. Donard, J. Environ. Monitor. **7**, 693 (2005).
[35] G. Lespes, C.H. Bancon-Montigny, S. Aguerre, and M. Potin-Gautier, Rev. Sci. Eau **18**, **47** (2005).
[36] I. Arleny, H. Tabouret, P. Rodríguez-González, G. Bareille, O.F.X. Donard, and D. Amouroux, Mar. Pollut. Bull. **54**, 1031 (2007).
[37] M. Monperrus, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, J. Scancar, D. Amouroux, and O.F.X. Donard, Anal. Chem. **75**, 4095 (2003).
[38] M. Jimenez-Moreno, J. Pacheco-Arjona, P. Rodríguez-González, H. Preud'Homme, D. Amouroux, and O.F.X. Donard, J. Mass. Spectrom. **41**, 1491 (2006).
[39] M. Monperrus, E. Tessier, S. Veschambre, D. Amouroux, and O. Donard, Anal. Bioanal. Chem. **381**, 854 (2005).
[40] R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, M. Monperrus, E. Krupp, D. Amouroux, and O.F.X. Donard, Anal. Chem. **75**, 3202 (2003).
[41] C.R. Hammerschmidt and W.F. Fitzgerald, Anal. Chem. **73**, 5930 (2001).
[42] N. Poperechna and K.G. Heumann, Anal. Bioanal. Chem. **383**, 153 (2005).
[43] L. Hinojosa Reyes, G.M. Mizanur Rahman, and H.M. Skip Kingston, Anal. Chim. Acta **631**, 121 (2009).
[44] N. Demuth and K.G. Heumann, Anal. Chem. **73**, 4020 (2001).

[45] P. Szefer, M. Domagala-Wieloszewska, J. Warzocha, A. Garbacik-Wesolowska, and T. Ciesielski, Food Chem. **81**, **73** (2003).
[46] D.Q. Le, D.C. Nguyen, H. Harino, N. Kakutani, N. Chino, and T. Arai, Arch. Environ. Contam. Toxicol. **59**, 282 (2010).
[47] C. Bancon-Montigny, G. Lespes, and M. Potin-Gautier, Water Res. **38**, 933 (2004).
[48] M. Ohji, H. Harino, and T. Arai, Estuar. Coast. Shelf Sci. **84**, 28 (2009).
[49] A.C. Redmayne, J.P. Kimb, G.P. Closs, and K.A. Hunter, Sci. Total Environ. **262**, 37 (2000).
[50] T. Guérin, V. Sirot, J.L. Volatier, and J.C. Leblanc, Sci. Total Environ. **388**, 66 (2007).
[51] J.L. Gómez-Ariza, M.M. Santos, E. Morales, I. Giráldez, D. Sánchez-Rodas, N. Vieira, J.F. Kemp, J.P. Boon, and C.C. Ten-Hallers-Tjabbes, Chemosphere **64**, 1100 (2006).
[52] M. Üveges, P. Rodríguez-González, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Mede, and P. Fodor, Microchem. J. **85**, 115 (2007).
[53] J. Strand and J.A. Jacobsen, Sci. Total Environ. **350**, 72 (2005).
[54] V. van Ginneken, A. Palstra, P. Leonards, M. Nieveen, H. van den Berg, G. Flik, T. Spanings, P. Niemantsverdriet, G. van den Thillart, and A. Murk, Aquat. Toxicol. **92**, 213 (2009).
[55] A.S. Friedmann, E.K. Costian, D.L. MacLatchy, W. Stansley, and E.J. Washuta, Ecotoxicol. Environ. Saf. **52**, 117 (2002).
[56] D. Raldua, S. Diez, J.M. Bayona, and D. Barcelo, Chemosphere **66**, 1217 (2007).
[57] M. Ohji, H. Harino, and T. Arai, Estuar. Coast. Shelf Sci. **69**, 270 (2006).

IV.1.3 Discussion

Malgrè des taux de méthylation élevés (1,0 à 9,5%, résultats présentés dans le tableau 4 de l'article I), les concentrations en MeHg calculées par IPD et par D-IDMS ne sont pas significativement différentes. Par contre, une différence de quantification entre la D-IDMS et l'IPD a été constatée pour le iHg (taux de déméthylation = 0,5 à 3,9%). Les résultats IPD ont donc été conservés. Les principaux résultats de l'étude sont présentés dans le tableau 5 de l'article I et ont été reportés ci-dessous (tableau 22).

Tableau 22: Valeurs moyennes obtenus pour les anguilles et civelles (en µg Hg kg^{-1})

	Localisation	n	MeHg	iHg	%MeHg	Longueur (mm)	Poids (g)
Anguilles jaunes	Estuaire	14	652 ± 265	33 ± 13	95 ± 1	240 - 550	26 - 287
	St Laurent de Gosse	3	488±160	37 ± 8	93 ± 1	280 - 550	31 - 231
	Cours d'eau	12	705 ± 312	34 ± 14	95 ± 1	220 - 392	15 - 145
	Cauneille	2	630 ± 60	26 ± 7	96 ± 1	336 - 374	62 - 85
Civelles	Estuaire	40	116 ± 32	4.5 ± 2.5	96 ± 2	62 - 80	0.04 - 0.1
	Mer	20	117 ± 21	6.6 ± 5.1	93 ± 5	63 - 81	0.05 - 0.1

Pour chaque stade de l'anguille, les concentrations en iHg et MeHg sont similaires, quelque soit les sites de prélèvement. Les concentrations en MeHg et iHg des anguilles jaunes sont en moyenne 6 fois supérieures aux concentrations mesurées dans les civelles, confirmant un phénomène de bioaccumulation du Hg relatif à l'alimentation, au poids, à l'âge et au taux de graisse de l'organisme. Ces observations sont renforcées par une étude de la concentration en Hg en fonction du poids de l'anguille (Cf. article I). Il est en effet constaté que les teneurs en MeHg augmentent avec le poids corporel.

Les données individuelles de chaque anguille et civelle montrent une nette différence de pourcentage de MeHg entre les deux stades (tableau 23).

Tableau 23 : Pourcentages de MeHg d'après les données par IPD du tableau 4 de l'article I

		iHg	MeHg	∑Hg	% MeHg
Anguilles	Cours d'eau	10,5	597	608	98
		15,3	829	844	98
		15,8	1244	1260	99
		8,1	391	399	98
		17,8	534	552	97
	moyenne	**13,5**	**719**	**733**	**98**
	sd	4,0	333	335	1
	Estuaire	7,7	308	316	98
		9,3	635	644	99
		14,6	591	606	98
		15,1	1082	1097	99
		22,2	1004	1026	98
	moyenne	**13,8**	**724**	**738**	**98**
	sd	5,7	318	323	1
Civelles	Mer	10,9	138	149	93
		18,0	150	168	89
		7,8	121	129	94
		13,9	156	170	92
		16,5	143	160	90
	moyenne	**13,4**	**142**	**155**	**91**
	sd	4,1	13	17	2
	Estuaire	10,4	111	121	91
		7,5	83	90,5	92
		18,6	150	169	89
		14,5	119	134	89
		10,9	138	149	93
	moyenne	**12,4**	**120**	**133**	**91**
	sd	4,3	26	29	2

En moyenne, 98% du HgT est présent sous forme méthylé chez les anguilles prélevées dans les cours d'eau et l'estuaire, contre 91% chez les civelles. Ces résultats laissent supposer un phénomène de bioamplification.

Une discussion de comparaison entre les résultats obtenus pour les anguilles lors de cette étude et les résultats retrouvés dans la littérature a été faite dans l'article I. Les teneurs et pourcentages en MeHg déterminés dans cette étude sont généralement en accord avec les données présentées dans d'autres travaux.

IV.1.4 Conclusion

La méthode analytique développée dans cette étude a été appliquée avec satisfaction à des échantillons réels et s'est montrée suffisamment sensible pour permettre l'analyse des faibles masses de civelles (60 à 100 mg). De plus, la comparaison faite entre une quantification par IPD et une quantification par D-IDMS a mis en évidence des phénomènes de méthylation du iHg et donc une quantification plus juste et précise par IPD. Enfin, en plus de l'intérêt de cette étude a montrer l'applicabilité de la méthode d'analyse de spéciation du Hg dans des matrices réelles, l'analyse de deux stades d'évolution de l'anguille a permis d'observer le caractère de bioaccumulation et de bioamplification du MeHg dans cette espèce.

IV.2 Impact de la lyophilisation sur la spéciation du Hg

IV.2.1 Contexte de l'étude

Comme cela fût le cas pour l'application précédemment présentée et pour la majeure partie des applications en HgT et en spéciation du Hg dans les produits de la pêche, les analyses ont généralement lieu sur des échantillons lyophilisés et homogénéisés (Arleny et al., 2007, Mishra et al., 2007, Bustamante et al., 2010, Batista et al., 2011). Cette étape de prétraitement a pour but d'homogénéiser et de faciliter le conditionnement et l'éventuel transport des échantillons. Pourtant et malgré une utilisation intensive de ce procédé d'échantillonnage, seulement deux études semblent s'être intéressées au comportement des échantillons lyophilisés par rapport aux échantillons frais (Yu et Yan, 2003, Point et al., 2007). Yu et Yan (2003) ont évalué, parmi d'autres paramètres, l'influence de la texture de la matrice (fraîche ou lyophilisée) sur la stabilité du iHg et du MeHg lors du stockage des échantillons. Les résultats ont indiqué que les échantillons frais et lyophilisés étaient équivalents en terme de stabilité des espèces Hg mais qu'une congélation – décongélation répétée des matrices fraiches favorisait la perte de MeHg. Enfin, l'étude de Point et al. (2007) sur la quantification par S-IDMS et D-SS-IDMS, des teneurs en iHg, MeHg et HgT sur 3 MRCs lyophilisés et 2 MRCs frais a montré une surestimation du MeHg dans les échantillons lyophilisés en raison de l'acide utilisé pour l'extraction, montrant un comportement différent de ce type de matrice par rapport aux matrices fraîches. En raison du peu de données publiées dans la littérature, une évaluation des pertes potentielles ou transformations inter-espèces ayant pu survenir durant la lyophilisation a été réalisée.

Dans un souci de clarté et afin d'alléger ce paragraphe, la description des conditions expérimentales appliquées a été faite en annexe (Annexe I).

IV.2.2 Résultats expérimentaux et discussion

Les résultats de l'étude, obtenus par les deux partenaires, sont présentés dans le tableau 24. Les plages bleues correspondent aux résultats d'analyses menées sur les échantillons frais (étape 1), les plages blanches correspondent aux échantillons marqués isotopiquement puis lyophilisés (étape 2) et les plages orange représentent les échantillons lyophilisés puis marqués isotopiquement (étape 3).

Tableau 24 : Concentrations et écart-types en MeHg et HgT (mg kg^{-1}) des 2 laboratoires

	Analyses		MeHg	∑ Hg	% MeHg	M (%)	D (%)
Julienne	D-IDMS	CIME	0,462 ± 0,014	0,481 ± 0,017	96	-	-
	IPD		0,457 ± 0,005	0,464 ± 0,007	98	3 ± 6	1 ± 0,3
	D-IDMS	LCABIE	0,430 ± 0,009	0,531 ± 0,035	81	-	-
	IPD		0,435 ± 0,009	0,443 ± 0,019	98	-13 ± 5	23 ± 4
	D-IDMS	CIME	0,379 ± 0,036	0,410 ± 0,033	92	-	-
	IPD		0,368 ± 0,031	0,389 ± 0,023	95	-0,1 ± 4	3 ± 0,3
	D-IDMS	LCABIE	0,395 ± 0,020	0,472 ± 0,055	84	-	-
	IPD		0,393 ± 0,019	0,401 ± 0,022	98	2 ± 3	15 ± 7
	D-IDMS	CIME	0,510 ± 0,014	0,536 ± 0,017	95	-	-
	IPD		0,469 ± 0,005	0,481 ± 0,005	98	349 ± 127	-2 ± 1
	D-IDMS	LCABIE	0,387 ± 0,049	0,483 ± 0,028	80	-	-
	IPD		0,384 ± 0,047	0,390 ± 0,044	98	-1 ± 1	24 ± 9
Thon	D-IDMS	CIME	0,880 ± 0,028	0,912 ± 0,029	96	-	-
	IPD		0,899 ± 0,007	0,930 ± 0,012	97	-127 ± 6	5 ± 0,2
	D-IDMS	LCABIE	0,811 ± 0,010	0,939 ± 0,020	86	-	-
	IPD		0,809 ± 0,007	0,838 ± 0,012	100	-1 ± 1	13 ± 6
	D-IDMS	CIME	0,768 ± 0,023	0,817 ± 0,022	94	-	-
	IPD		0,762 ± 0,008	0,794 ± 0,004	96	59 ± 70	-0,002 ± 0,12
	D-IDMS	LCABIE	0,723 ± 0,048	0,820 ± 0,043	88	-	-
	IPD		0,719 ± 0,038	0,738 ± 0,038	97	-0,4 ± 2	10 ± 4
	D-IDMS	CIME	0,904 ± 0,040	0,949 ± 0,045	95	-	-
	IPD		0,914 ± 0,081	0,953 ± 0,092	96	90 ± 243	-2 ± 1
	D-IDMS	LCABIE	0,708 ± 0,026	0,772 ± 0,033	92	-	-
	IPD		0,715 ± 0,034	0,738 ± 0,038	97	-4 ± 3	-4 ± 3
Bar loup	D-IDMS	CIME	0,404 ± 0,022	0,424 ± 0,020	95	-	-
	IPD		0,405 ± 0,009	0,417 ± 0,011	97	-54 ± 73	2 ± 0,1
	D-IDMS	LCABIE	0,336 ± 0,020	0,426 ± 0,038	79	-	-
	IPD		0,330 ± 0,017	0,335 ± 0,011	99	-1 ± 3	26 ± 6
	D-IDMS	CIME	0,360 ± 0,001	0,377 ± 0,003	95	-	-
	IPD		0,354 ± 0,010	0,364 ± 0,010	97	8 ± 17	-0,3 ± 1
	D-IDMS	LCABIE	0,325 ± 0,015	0,364 ± 0,024	89	-	-
	IPD		0,324 ± 0,013	0,328 ± 0,013	99	-3 ± 5	10 ± 2
	D-IDMS	CIME	0,409 ± 0,014	0,428 ± 0,017	96	-	-
	IPD		0,378 ± 0,015	0,385 ± 0,014	98	660 ± 148	2 ± 0,3
	D-IDMS	LCABIE	0,316 ± 0,009	0,367 ± 0,029	86	-	-
	IPD		0,317 ± 0,01	0,320 ± 0,011	99	-2 ± 2	15 ± 5

Les taux de M calculés sont peu exploitables, principalement en raison d'écart-types importants, probablement dus aux grandes différences de concentrations entre l'iHg et le MeHg comme expliqué par Monperrus et al (2008) et précédemment dans la partie II paragraphe VI.4.

Les résultats obtenus par le laboratoire CIME n'indique aucune réaction de déméthylation, quelque soit la matrice étudiée ou la procédure analytique utilisée, à l'exception d'un taux de D de 5% noté pour le thon lors de l'analyse du produit frais. Par contre, les résultats du laboratoire LCABIE indiquent d'important taux de D (D moyen = 16%) sur l'ensemble des échantillons, à l'exception du thon lyophilisé puis spiké (D = -4 ± 3%). Des taux de D minimum de 10% pour le thon et le bar-loup spikés puis lyophilisés et un taux maximum de 26% pour le bar-loup frais sont observés. Le phénomène de D est constaté quelque soit la procédure analytique utilisée et la matrice étudiée, il semble donc que ces réactions soient liées à la méthode d'extraction MAE comme cela a été précédemment constaté lors de l'étude présenté dans l'article I.

La figure 42 présente les résultats de chaque matrice analysée en spéciation par les 2 laboratoires. Les résultats en rouge et bleu foncés correspondent aux concentrations en iHg et MeHg calculés par D-IDMS du laboratoire CIME et ceux en clairs correspondent aux résultats du laboratoire LCABIE calculés par IPD. L'appellation « Frais » correspond à l'étape 1, « Spikes + lyoph » à l'étape 2 et « Lyoph + spikes » à l'étape 3. Les barres vertes représentent les concentrations en mercure total des échantillons frais par une méthode ICP-MS accréditée (Noël et al., 2005).

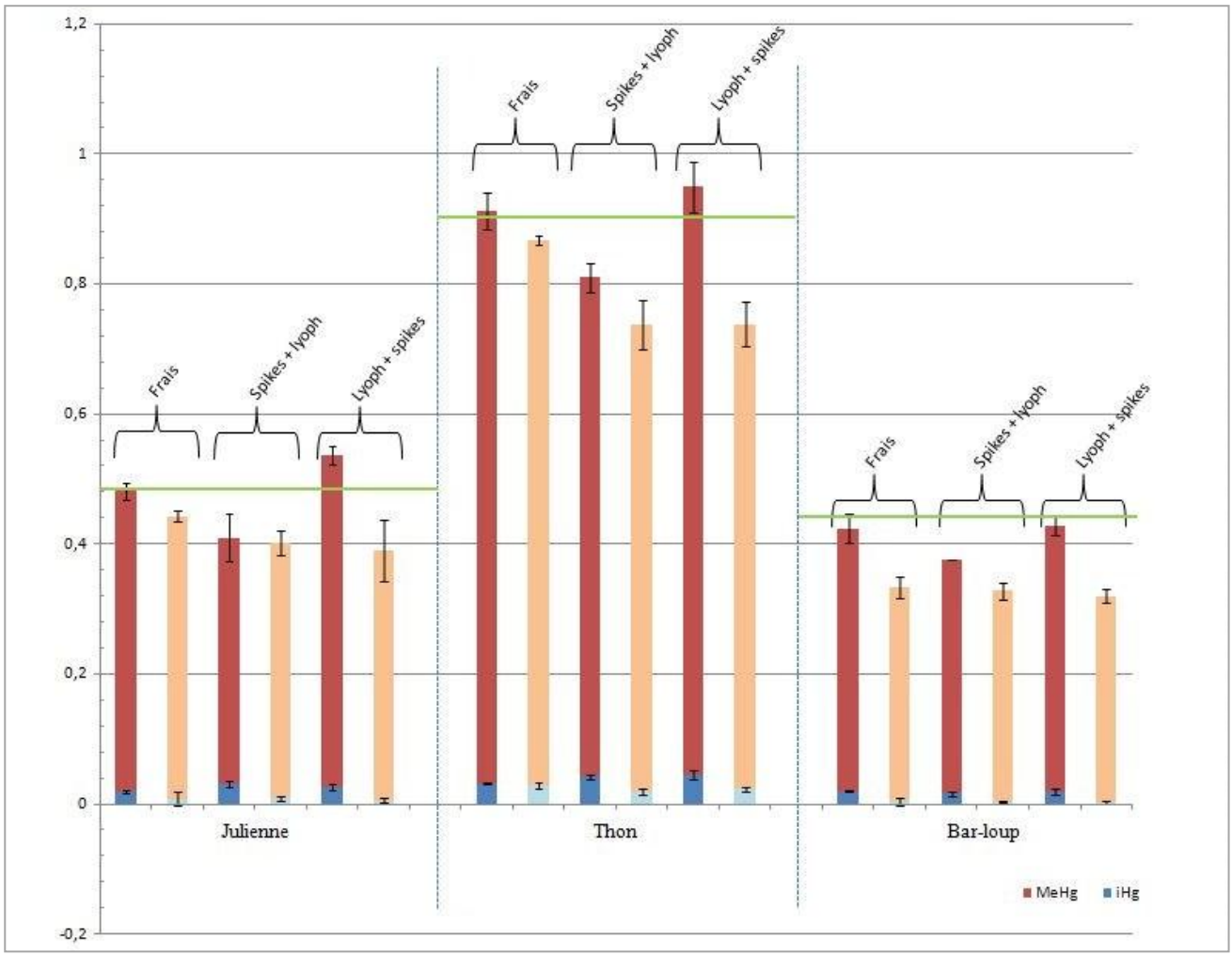


Figure 42 : Concentrations en iHg et MeHg (mg.kg^{-1}) dans les trois poissons analysés.

Concernant les résultats du laboratoire CIME, une diminution des teneurs en MeHg est observée sur les échantillons marqués isotopiquement puis lyophilisés (étape 2). Par contre, les teneurs en MeHg des échantillons frais (étape 1) et lyophilisés puis spikés (étape 3) sont similaires et la somme des espèces iHg et MeHg est proche de la valeur quantifiée en total. Si des pertes ou transformations inter-espèces étaient survenues au cours de l'étape de lyophilisation, une diminution des teneurs en espèces Hg aurait été observée au niveau de l'étape 3 où les spikes ont été ajoutés après lyophilisation et donc où les résultats finaux ne sont pas corrigés des éventuelles modifications ayant pu survenir au cours de ce traitement. Il ne semble donc pas y avoir d'influence de la lyophilisation sur les espèces Hg. Par contre, des diminutions des teneurs en espèces Hg sont constatées dans l'étape 2, où la lyophilisation est contrôlée par IDMS. Il est donc probable que la perte apparente observée en MeHg lors de l'étape 2 soit en fait due à une quantification faussée liée à un équilibre isotopique incomplet entre les spikes et les espèces endogènes. Il faut toutefois noter que cela ne remet pas en question la méthode analytique développée et validée lors de ces travaux

de thèse car dans le cas présent, l'équilibre isotopique doit se faire entre une matrice fraîche et des spikes en solution, dans un milieu où le solvant d'extraction est absent.

Pour le laboratoire LCABIE, une lègére décroissance des teneurs en MeHg est observée entre l'étape 1 et les étapes 2 et 3, uniquement significative sur le thon avec des valeurs similaires entres les étapes 2 et 3. Ces pertes en espèces Hg étant constatées pour l'étape 2 mais également pour l'étape 3, elles ne peuvent pas être imputables à la lyophilisation, qui ne semble pas modifier pas la distribution des espèces Hg. Ces pertes semblent plutôt liées à la nature de la matrice, les matrices lyophilisées réagissant différemment des matrices fraîches face à la méthode analytique utilisée par le laboratoire..

Pour les deux laboratoires, les teneurs en HgT des échantillons lyophilisés sont en accord avec les teneurs en HgT des échantillons frais. Cela renforce l'hypothèse stipulant qu'il ne semble pas y avoir de pertes d'espèces durant le processus de lyophilisation.

Les différences observées entre les 2 laboratoires s'expliquent probablement par la différence des méthodes de lyophilisation utilisées (masses et support de lyophilisation différents) (Cf. Annexe I). Ces résultats semblent confirmer ceux de Yu et Yan, (2003) qui concluent que les résultats observés sur des échantillons frais ou lyophilisés étaient équivalents sauf si les échantillons frais subissaient une congélation – décongélation trop répétée.

IV.2.3 Conclusion

Cette étude a été menée conjointement par les laboratoires LCABIE et CIME et les résultats obtenus laissent supposer qu'il ne semble donc pas y avoir de pertes ni de modification d'espèces durant le processus de lyophilisation. Néanmoins, afin de pouvoir confirmer cette hypothèse, cette étude nécessite la participation d'un plus grand nombre de laboratoires et la mise en place d'une procédure analytique unique. Idéalement, l'étude d'un plus grand nombre de matrices permettrait d'avoir une vision plus globale de l'éventuelle influence de la lyophylisation sur les produits de la pêche. A ce jour, nous avons décidé de poursuivre nos travaux en analysant les échantillons lyophilisés des produits de la pêche de l'EAT 2 plutôt que les échantillons frais (EAT 2, 2011).

IV.3 Etude des échantillons lyophilisés de l'EAT 2

IV.3.1 Contexte de l'étude

En 2000, Le ministère de l'agriculture et de la pêche ainsi que l'institut national de recherche agronomique (INRA) ont décidé d'implanter en France la méthode dite « d'étude de l'alimentation totale (EAT) », méthode standardisée et recommandée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et qui vise à rechercher diverses substances chimiques susceptibles d'être présentes dans les aliments « tels que consommés ». Les EAT sont des études nationales de surveillance des expositions alimentaires qui évaluent les risques liés à des substances chimiques d'intérêt en termes de santé publique. Elles sont construites, d'après des enquêtes de consommation, à partir de paniers représentatifs des consommations alimentaires des français.

Les EAT apportent des informations sur la composition et/ou la contamination des aliments, ainsi que sur leurs apports nutritionnels et permettent une évaluation des risques sanitaires des populations liée aux aliments étudiés. Une prise de décisions en matière de contrôle, de réglementation des produits chimiques et de sécurité des produits alimentaires, aussi bien au niveau national, qu'européen ou international est alors faite. Pour le gestionnaire du risque, ces études apportent les éléments scientifiques permettant de réviser ou d'établir une réglementation afin de réduire l'exposition du consommateur. Dans le cas d'une substance bénéfique, elles orientent les recommandations de consommation permettant d'optimiser les apports.

Une première EAT française (EAT 1) a été réalisée entre 2000 et 2004 par l'INRA, en collaboration avec l'AFSSA (Leblanc et al., 2005) et une seconde EAT (EAT 2) a été entreprise par l'AFSSA en 2006, incluant un nombre plus large de substances à rechercher et l'ensemble des régions administratives du territoire métropolitain (contre 3 grandes villes dans l'EAT 1). L'élaboration des paniers représentatifs des consommations alimentaires des français de l'EAT 2 s'appuie sur des données de l'enquête INCA 2 (seconde enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires) réalisée en 2006-2007.

Dans ces travaux, les échantillons lyophilisés et non dégraissés de produits de la pêche de l'EAT 2 ont été étudiés. 34 échantillons de mollusques et crustacés (10 moules, 4 huîtres, 16 crevettes et 4 coquilles Saint-Jacques) et 28 échantillons de poissons (6 thons, 16 saumons, 6 lieu-colins) ont été analysés par D-IDMS et D-SS-IDMS et par GC-ICP-MS. Les matériels et méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus sont discutés dans l'article II. Les matériels et méthodes utilisées sont discutés dans l'article II et des informations complémentaires relatives à la procédure de traitement d'échantillon ont été ajoutées en annexe (Annexe II). Il est à noter que les résultats de 3 échantillons de poissons panés non présentés dans cet article indiquent des concentrations très faibles de MeHg ($[MeHg_{moy}] = 24\ \mu g.kg^{-1}$ avec % MeHg ≈ 100%).

IV.3.2 Résultats expérimentaux

Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article II.

Anal Bioanal Chem (2011) 401:2699–2711
DOI 10.1007/s00216-011-5040-1

ORIGINAL PAPER

Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: method validation and occurrence data

Stéphanie Clémens · Mathilde Monperrus · Olivier F. X. Donard · David Amouroux · Thierry Guérin

Received: 2 March 2011 /Revised: 8 April 2011 / Accepted: 18 April 2011 / Published online: 1 May 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Methylmercury (MeHg) and total mercury (THg) in seafood were determined using species-specific isotope dilution analysis and gas chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry. Sample preparation methods (extraction and derivation step) were evaluated on certified reference materials using isotopically enriched Hg species. Solid–liquid extraction, derivation by propylation and automated agitation gave excellent accuracy and precision results. Satisfactory figures of merit for the selected method were obtained in terms of limit of quantification (1.2 μg Hg kg^{-1} for MeHg and 1.4 μg Hg kg^{-1} for THg), repeatability (1.3–1.7%), intermediate precision reproducibility (1.5% for MeHg and 2.2% for THg) and trueness (bias error less than 7%). By means of a recent strategy based on accuracy profiles (β-expectation tolerance intervals), the selected method was successfully validated in the range of approximately 0.15–5.1 mg kg^{-1} for MeHg and 0.27–5.2 mg kg^{-1} for THg. Probability β was set to 95% and the acceptability limits to ±15%. The method was then applied to 62 seafood samples representative of consumption in the French population. The MeHg concentrations were generally low (1.9–588 μg kg^{-1}), and the percentage of MeHg varied from 28% to 98% in shellfish and from 84% to 97% in fish. For all real samples tested, methylation and demethylation reactions were not significant, except in one oyster sample. The method presented here could be used for monitoring food contamination by MeHg and inorganic Hg in the future to more accurately assess human exposure.

Keywords Speciation · Methylmercury · Seafood · GC/ICP-MS · Species-specific isotope dilution analysis

Published in the special issue *Plasma Spectrochemistry* with Guest Editors Juan Castillo and Martín Resano.

S. Clémens · T. Guérin (✉)
Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Laboratoire de Sécurité des Aliments de Maisons-Alfort, Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, ANSES, 23, Avenue du Général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France
e-mail: thierry.guerin@anses.fr

M. Monperrus · O. F. X. Donard · D. Amouroux
Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux, IPREM UMR 5254 CNRS - Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc, 2, Avenue Pierre Angot, 64053 Pau Cedex, France

Introduction

Mercury (Hg) is a toxic compound that can contaminate humans through food, particularly via fish consumption. Seafood is the first source of human contamination by methylmercury (MeHg), the most toxic form of Hg. Over 90% of MeHg is absorbed through the gastrointestinal tract and rapidly transferred into the bloodstream due to its high lipophilicity [1]. MeHg is able to cross the blood–brain and placenta barriers, which make it neurotoxic and teratogenic [1]. The neurotoxicity of MeHg has been known since the poisoning of the population in Minamata, Japan, in the 1960s and since two other massive contamination episodes in Niigata, Japan, and Iraq [2].

As a safeguard for human health, guidelines and regulations stipulating maximum permissible levels of mercury in fish (0.50 or 1 mg kg^{-1} essentially for predatory fish) and seafood (0.50 mg kg^{-1}) have been set by Regulation (EC) No. 629/2008 [3] to limit dietary exposure of consumers. In 2003, the Joint FAO/WHO Expert

Committee on Food Additives (JECFA) established a provisional tolerable weekly intake (PTWI) of 1.6 μg MeHg/kg bw and of 5 μg total mercury (THg)/kg bw [4]. The PTWI for THg was withdrawn in 2010 by the JECFA and replaced by a PTWI for inorganic mercury (Hg(II)) of 4 μg (Hg)/kg bw/week [5]. The new PTWI for inorganic mercury is considered to be applicable for dietary exposure to THg from foods other than fish and shellfish. For dietary exposure to mercury from fish and shellfish, the previously established PTWI for MeHg should be applied.

The methods developed to perform Hg speciation analysis involve coupling a powerful separation technique (liquid or gas chromatography, capillary electrophoresis) with a selective and sensitive (elemental) detection method (fluorescence spectrometry, atomic emission spectrometry or mass spectrometry) [6, 7]. Gas chromatography combined with inductively coupled plasma-mass spectrometry (GC/ICP-MS) has rapidly dominated the field of trace and ultra-trace elemental analysis [8–10], despite the availability of cheaper, sufficiently powerful, but less versatile competing technologies (e.g. pyrolyzer-atomic fluorescence spectrometry, microwave-induced plasma-atomic emission spectrometry and electron ionisation mass spectrometry) [6, 7, 11]. The GC/ICP-MS technique has the high resolving power of capillary GC technology, which offers excellent separation of Hg species, and the sensitive multi-elemental detection capabilities of ICP-MS. Furthermore, this system of detection offers the possibility to perform speciated isotope dilution mass spectrometry [7, 12].

Most of developed sample preparation method involves a lyophilisation/homogenisation step, extraction and/or enrichment of the matrix, derivatisation and occasionally sample clean-up. Each step is critical to the viability and comparability of final results due to the possible occurrence of methylation (M) and demethylation (D) reactions during sample preparation [7, 10, 12]. The main extraction methods used are solid/liquid extraction (SLE), microwave-assisted extraction (MAE), extraction using sonication (US) and alternative methods such as solid-phase micro-extraction (SPME) [8, 9, 13]. However, few analytical methods have been optimised with supercritical fluid extraction (SFE), pressurised liquid extraction (PLE) or stir-bar sorptive extraction (SBSE) [9, 13]. In the last decade, MAE and US extraction techniques have been increasingly used because they are rapid, efficient and have an excellent recovery rate; furthermore, they require only small amounts of solvents.

Recently, the development of multiple isotope dilution procedures (M-IDA) has drastically improved the accuracy and quality of Hg speciation analysis [7, 8, 12]. The sample is spiked with two isotope tracers (^{199}Hg(II) and ^{201}MeHg) that react identically to the studied endogenous species, thereby controlling all losses or transformation reactions (i.e. M and D) that may occur during the analytical procedure. The quantification is based on measuring the altered isotopic ratio; quantitative extraction is therefore not necessary. Provided that the isotopically enriched exogenous species and the isotopically natural endogenous species are present in an equilibrated and equivalent state, spikes play the role of 'ideal' internal standards, reacting and transforming as species under investigation [12]. Consequently, because spikes are added in a known amount, artefacts can be observed, quantified and corrected. M-IDA is the only technique of quantification by which the analytical procedure can be monitored with high precision, thereby providing excellent accuracy.

The objectives of this work were first to optimise the analytical procedure among different sample preparation techniques (comparison of three techniques of extraction, two techniques of derivation and three techniques of agitation) and three methods for calculating isotope dilution for the determination of MeHg and Hg(II) in seafood samples. Second, the figures of merit of this optimised method were evaluated in terms of its limits of quantification (LOQ), accuracy, repeatability and intermediate precision reproducibility. Third, samples of the second French Total Diet Study (TDS) were analysed to assess MeHg levels and transformation rates according to tested matrices and to provide data on the occurrence of Hg in fish and shellfish.

Experimental

Instrumentation

GC/ICP-MS analysis was performed with an 6890N gas chromatographic system equipped with an on-column injector (Agilent, Massy, France), a MXT-1 guard column and a MXT-1 column (30 m, i.d. 0.53 mm; *df*, 1 μm; Restek, Lisses, France). The chromatographic system was coupled to an X-Series^{II} ICP-MS instrument via a commercial GC/ICP-MS interface (all Thermo Scientific, Courtaboeuf, France). This instrument configuration accepts dual sample introduction (gaseous samples and liquid standards). Torch position and ion lenses of the ICP-MS system were optimised daily by performing short-term stability tests with a 1-μg L^{-1} tuning solution (containing especially mercury (Hg) and indium (In)) to maximise Hg signal and stability. Mass bias was evaluated by measuring the ^{203}Tl/^{205}Tl ratio during each chromatographic run. Signals were monitored in the Time Resolved Analysis (TRA) mode of the ICP software. Further details of instrument settings are given in Table 1. Other equipment include the following: a closed-vessel microwave digestion system (Multiwave, Anton-Paar, Courtaboeuf, France) equipped with 80 mL quartz vessels (80 bar

Table 1 Instrument operating conditions for the GC/ICP-MS system

ICP-MS parameters	
Gas flow rate	
Plasma	15 L min^{-1}
Auxiliary	0.9 L min^{-1}
Nebulizer	0.5 L min^{-1}
Plasma power	1,450 W
Isotopes; dwell times	Hg (202, 201, 200, 199 and 198); 30 ms Tl (205 and 203); 5 ms
GC parameters	
Column	MXT Silcosteel 30 m: i.d. 0.53 mm; *df*, 1 µm
Injection port	On-column
Injection temperature	
Initial temperature	75 °C
Initial time	0 min
Ramp rate	120 °C min^{-1}
Final temperature	250 °C
Injection volume	1 µL
Carrier gas flow	He 25 ml min^{-1}
Make-up gas flow	Ar 300 ml min^{-1}
Oven temperature	
Initial temperature	60 °C
Initial time	1 min
Ramp rate	60 °C min^{-1}
Final temperature	280 °C
Transfer line temperature	280 °C

operating pressure), a *Digi*PREP digestion system (SCP Science, Courtaboeuf, France) equipped with 50 mL *Digi*tubes, a REAX 2 rotary shaker (Heidolph, Saint Herblain, France), a Seven easy pH meter, an AT460 Delta range balance (all Mettler Toledo, Viroflay, France) and a Universal 32R centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany).

Chemicals

All solutions were prepared with analytical reagent-grade chemicals and ultra-pure water (18 MΩ cm) generated by purifying distilled water with the Milli-Q™ PLUS system combined with an Elix 5 pre-system (Millipore S.A., St. Quentin-en-Yvelines, France). Methanol (HPLC gradient grade, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), nitric acid (Suprapur, 67%, Merck), hydrochloric acid (Trace analysis grade, 37%, Fischer Scientific) and ammonia solution (Suprapur, 25%, Merck, Darmstadt, Germany) were used to stabilise species or to adjust pH. Standard solutions of the individual Hg species with an Hg concentration of 1,000 mg (Hg) L^{-1} were prepared by dissolving mercury (II) chloride (≥99.999%, Sigma-Aldrich) in 1% hydrochloric acid and MeHg chloride (Pestanal grade, Sigma-Aldrich) in methanol. Each stock solution was further diluted to 100 or 10 mg L^{-1}. Enriched standard solutions of the individual Hg species with an Hg concentration of 100 or 10 mg (Hg) L^{-1} were prepared by diluting Hg standard solutions enriched in ^{199}Hg (91.71%, ISC Science, Oviedo, Spain) or $^{201}MeHg$ enriched mercury (96.5%, ISC Science) in 1% hydrochloric acid. Stock solutions were stored in the dark at 4 °C to prevent decomposition or oxidation. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH, Purum, 25%, Sigma-Aldrich) was used as solvent extraction. Buffer solution of pH 4 was prepared by dissolving sodium acetate in Milli-Q water and adjusting to pH 4 with glacial acetic acid. One percent (*w*/*v*) solution of sodium tetrapropylborate ($NaBPr_4$) used for derivatisation was prepared every 6 h and kept in the dark. Isooctane (analytical reagent grade, Merck) was used for the analyte transfer phase. An internal standard solution was prepared with 1,000 mg L^{-1} standard stock solutions of indium (In), purchased from Analytika (Prague, Czech Republic) to check the sensitivity of the couple and the stability of the signal. Inorganic thallium was obtained from Spex Certiprep (Metuchen, NJ, USA) and used to correct for mass bias during the mercury isotope ratio measurements.

Reference materials

Certified reference materials (CRMs) DOLT-4 (Dogfish liver) and TORT-2 (Lobster hepatopancreas) from the National Research Council of Canada (CNRC) and BCR-464 (Tuna fish) from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) were purchased from Promochem (Molsheim, France). All samples were used as provided without further grinding.

Seafood samples

All the seafood composite samples from the second French TDS were analysed: fish (saithe, salmon, smoked salmon, tuna and canned tuna), mollusc (mussel, oyster and scallop) and crustacean (shrimp) products. Each of the samples was composed of up to 15 sub-samples of equal weight of the same food item and was prepared 'as normally consumed'. Only the edible part was used to prepare the sample (i.e. inedible parts fish, bones, fish skin, shells etc. were discarded). The core foods were then prepared as consumed (i.e. smoked salmon or steamed fresh salmon, oven-cooked fresh tuna or canned tuna in oil or brine, cooked saithe, raw oysters, boiled shrimp and mussels and steamed scallops). Therefore, in the TDS study, the impact of home-cooking was taken into account with regard to possible decomposition of less stable chemicals and the formation of new ones [14].

Total mercury determination

Aliquots of ~0.150–0.300 g sample were separately weighed in quartz vessels in duplicate, and 3 mL nitric acid and 3 mL ultra-pure water were added. The digestion program was performed as described previously [15]. After cooling, sample solutions were quantitatively transferred into calibrated 50-mL polyethylene flasks. Before final dilution with water to 50 mL, 1 mg L^{-1} internal standard solution (Re, Bi) was added to a final concentration of 2 μg L^{-1} to allow drift correction and to compensate for possible matrix effects. Total Hg concentration in extracted samples was determined by ICP-MS according to a validated and accredited "in-house" method [16]. Quantification was performed by external calibration using five aqueous Hg standard solutions from 0 to 20 μg L^{-1}.

Mercury speciation

In a recent study, the spiking procedure (before or after extraction) and the derivatisation reagent (ethylation or propylation) effect were evaluated. The results on CRMs indicated that concentration values were slightly more accurate to certified values when using tetrapropylborate and that the spike should be added before the extraction in order to correct for possible losses/transformations of the species during the extraction (Navarro et al., submitted). Therefore, propylation and spiking prior to extraction were used in this study to evaluate three different extractions and three different agitation methods.

For each extraction method tested, aliquots of approximately 0.250 g freeze-dried samples were separately weighed in appropriate vessels (*Digi*tubes, microwave digestion vessels or polyethylene flasks for the three extraction methods, see below), and appropriate weighed amounts of ^{199}Hg(II) and ^{201}MeHg were added so that the resulting isotope ratios of $^{199}Hg/^{202}Hg$ for Hg(II) and $^{201}Hg/^{202}Hg$ for MeHg were close to unity. Then, 5 mL of TMAH 25% (*w*/*v*) was added, and one of the three following extraction methods was used:

1. Solid–liquid extraction (SLE): *Digi*tubes were closed and placed into the digestion system. The samples were heated and maintained at 85 °C for 2 h.
2. Microwave-assisted extraction (MAE): The vessels were closed and placed into the microwave system. The samples were irradiated at 60 W for 3 min.
3. Extraction at room temperature (ERT): The tubes were closed and placed under the hood. The samples were left 24 h without agitation or heating.

After cooling, an aliquot of extracts produced from each of the three extraction methods was transferred into 22-mL glass tubes containing 5 mL of acetate buffer solution of pH 4, and the pH was adjusted to 4 by adding HCl. Species were simultaneously derivatised and extracted by adding 0.5 mL of 1% $NaBPr_4$ (*w*/*v*) and 1 mL of isooctane. The mixture was then manually shaken for 5 min, vortexed for 5 min or placed in a rotary shaker to be agitated for 7 min. The samples were centrifuged (2,500 rpm for 5 min), and the organic phase was transferred to an injection vial and, if necessary, stored at −18 °C until GC/ICPMS analysis. Each sample was extracted three times, and each extract was injected in triplicate.

The GC separation was performed at a He flow rate of 25 mL min^{-1}, using a gradient temperature of between 60 °C and 280 °C (Table 1). For quantification using peak area, the chromatographic software (PlasmaLab) of the ICP-MS instrument was used. Isotope ratios $^{199}Hg/^{202}Hg$ and $^{201}Hg/^{202}Hg$ were measured for both Hg species. Concentrations of unknown species and transformation factors (i.e. methylation and demethylation) were estimated using species-specific isotope dilution quantification as previously described [12].

Calculations and statistical methods

The concentrations of mercury species are expressed in milligrammes of Hg per kilogramme of dry mass for certified reference materials or in microgrammes of Hg per kilogramme of fresh mass for real samples. The calculated average moisture of the 62 seafood samples was 71%. All TDS samples were analysed in triplicate. When concentrations were below the limit of detection (LOD) or LOQ, the values were taken as being equal to the LOD or LOQ, respectively.

Results and discussion

Comparison of extraction procedures

As a compromise between extraction efficiency, duration and Hg species integrity, three common extraction procedures (MAE, SLE using a digestion system and ERT) were compared in terms of accuracy, precision and interspecies transformation. These procedures were selected because they greatly differ in their duration and their power. Indeed, MAE is very fast but aggressive, SLE requires more time, but is gentler and ERT is not aggressive but is time-consuming. Table 2 shows the concentrations of extracted MeHg and THg (∑MeHg+Hg(II)) in three CRMs (TORT-2, DOLT-4 and BCR-464). MeHg and THg concentrations obtained by the three extraction procedures were generally close to the certified values, with slightly lower standard deviations obtained by SLE, indicating better reproducibility

Table 2 MeHg and THg concentrations (milligrammes per kilogramme; ±SD) calculated by double species-specific isotope dilution analysis for each extraction condition in three certified reference materials

		MeHg	THg	*M* (%)	*D* (%)
TORT-2	Certified values	0.152±0.013	0.270±0.060	–	–
	SLE	0.160±0.017	0.285±0.032	3	3
	ERT	0.189±0.029	0.324±0.050	7	4
	MAE	0.152±0.036	0.328±0.052	4	9
DOLT-4	Certified values	1.33±0.12	2.58±0.22	–	–
	SLE	1.35±0.13	2.44±0.19	−1	2
	ERT	1.45±0.27	2.56±0.23	4	2
	MAE	1.53±0.25	2.60±0.30	−6	2
BCR-464	Certified values	5.12±0.17	5.24±0.10	–	–
	SLE	5.24±0.39	5.30±0.39	−191	0
	ERT	5.27±0.98	5.45±0.89	−248	4
	MAE	5.10±0.45	5.16±0.46	−27	1

M (percent) is the percentage of methylation (transformation of Hg(II) to MeHg), and *D* (percent) is the percentage of demethylation (transformation of MeHg to Hg(II)) ($n=5$)

and repeatability. More transformation reactions were observed when ERT was used, with a maximum of 7% of methylation in TORT-2. For the same CRM, 9% of demethylation after MAE was observed. Methylation rates for BCR-464 suggest that a high quantity of Hg(II) was methylated under the three extraction methods used, but these aberrant rate factors may be due to the low Hg(II) concentration (0.12 mg kg^{-1}) compared to MeHg (5.12 mg kg^{-1}), as previously explained [17]. After SLE, transformation reactions were generally negligible (<2%) except for TORT-2 where 3% of methylation and demethylation were observed, although their rates were very low. Therefore, SLE was chosen as the best compromise between duration, precision and induced transformation for the remainder of this work.

Comparison of the modes of agitation

To make the derivatisation step easier and more repeatable, the conventional technique of agitation (i.e. rigorous manual agitation (RMA) for 5 min) was compared with two other techniques: vortex agitation (VA) for 5 min and rotary agitation (RA) for 7 min. The time used for rotary agitation was first optimised by analysing DOLT-4 (between 7 and 15 min, data not shown). Since the results obtained using the three modes of agitation on the three CRMs ($n=6$ on different days) indicated no significant differences (Table 3) and no significant transformation reactions, rotary agitation was chosen for the remainder of this work.

Comparison of quantification methods

Three types of quantification methods, i.e. double isotope dilution analysis (D-IDA) [18], double species-specific isotope dilution analysis (D-SS-IDA) [17] and isotope pattern deconvolution (IPD) [11], were assessed on TORT-2, DOLT-4 and BCR-464. D-IDA determines Hg (II) and MeHg concentrations separately and therefore corrects for lack of recovery and analyte losses, but not for any potential transformation reactions [12]. D-SS-IDA and IPD methodologies provide both Hg(II) and MeHg concentrations simultaneously, and are generally used to control M and D reactions during the analytical procedure [11, 17]. Table 4 shows the concentrations of extracted MeHg and THg (∑MeHg+Hg(II)) in the three CRMs. MeHg and THg concentrations obtained by the three quantification methods matched certified values. Potential transformation reactions quantified by D-SS-IDA and IPD were not significantly different and, for all CRMs, M and D reactions were negligible or very low (<4%). Consequently, D-SS-IDA or IPD mathematical models can be used when information on M and D reactions is needed.

Table 3 MeHg and THg concentrations (milligrammes per kilogramme; ±SD) for each agitation conditions in three certified reference materials ($n=6$)

		MeHg	THg
TORT-2	Certified value	0.152±0.013	0.270±0.060
	RMA	0.165±0.007	0.279±0.010
	VA	0.166±0.009	0.284±0.009
	RA	0.163±0.005	0.275±0.008
DOLT-4	Certified value	1.33±0.12	2.58±0.22
	RMA	1.41±0.04	2.60±0.04
	VA	1.37±0.05	2.61±0.07
	RA	1.35±0.04	2.53±016
BCR-464	Certified value	5.12±0.17	5.24±0.10
	RMV	5.24±0.09	5.35±0.09
	VA	5.12±0.08	5.24±0.08
	RA	5.17±0.08	5.27±0.08

Table 4 MeHg and THg concentrations (milligrammes per kilogramme; ±SD) obtained on certified reference materials

		MeHg	THg	*M* (%)	*D* (%)
TORT-2	Certified values	0.152±0.13	0.270±0.060	–	–
	D-IDA	0.165±0.007	0.292±0.013	–	–
	IPD	0.160±0.002	0.272±0.004	4	3
	D-SS-IDA	0.164±0.017	0.288±0.023	0	2
DOLT-4	Certified value	1.33±0.12	2.58±0.22	–	–
	D-IDA	1.29±0.09	2.51±0.05	–	–
	IPD	1.28±0.12	2.39±0.10	3	4
	D-SS-IDA	1.29±0.15	2.47±0.29	−1	3
BCR-464	Certified values	5.12±0.17	5.24±0.10	–	–
	D-IDA	5.10±0.30	5.24±0.35	–	–
	IPD	5.18±0.35	5.28±0.35	−196	3
	D-SS-IDA	5.27±0.33	5.33±0.33	−65	1

M (percent) is the percentage of methylation (transformation of Hg(II) to MeHg), and *D* (percent) is the percentage of demethylation (transformation of MeHg to Hg(II)) (n=3)

Validation parameters

The optimised conditions for the analysis of mercury speciation in seafood samples by GC/ICP-MS were used to validate the quantification method by D-IDA. The criteria performance of the speciation method, including LOQs, repeatability and intermediate precision reproducibility were defined. Accuracy profiles estimated according to two standards are presented in Fig. 1 [19].

Limits of quantification

The LODs and LOQs (in microgrammes (Hg) per kilogramme) were defined, respectively, as three and six times the standard deviation of the average from the spiked blank samples (n=21) quantified on different days over several months, following quantification of isotope dilution. So, the LOQs estimated in this study (MeHg, 1.2 μg Hg kg^{-1}; THg, 1.4 μg Hg kg^{-1}) were obtained under robust conditions. These LOQs were sometimes in good agreement or better than those previously reported for marine samples [11, 20, 21] and sometimes higher than those previously obtained under short-term conditions [17, 22, 23]. The large variability among reported LOQs can be attributed to differences in methods of evaluation, such as the number of blanks analysed and LOQs estimated under short- or long-term conditions.

Precision under repeatability and intermediate precision reproducibility conditions

Repeatability ($_r$) and intermediate precision reproducibility ($_R$) were evaluated on TORT-2, DOLT-4 and BCR-464 spiked with ^{199}Hg(II) and ^{201}MeHg. Repeatability was estimated by using the same method on identical test items in the same laboratory by the same operator using the same equipment within short intervals of time. Repeatability variance (s_r^2) represents intra-series variation and is calculated following Eq. 1:

$$s_r^2 = \frac{\mathrm{SCE_r}}{I(J-1)} \quad (1)$$

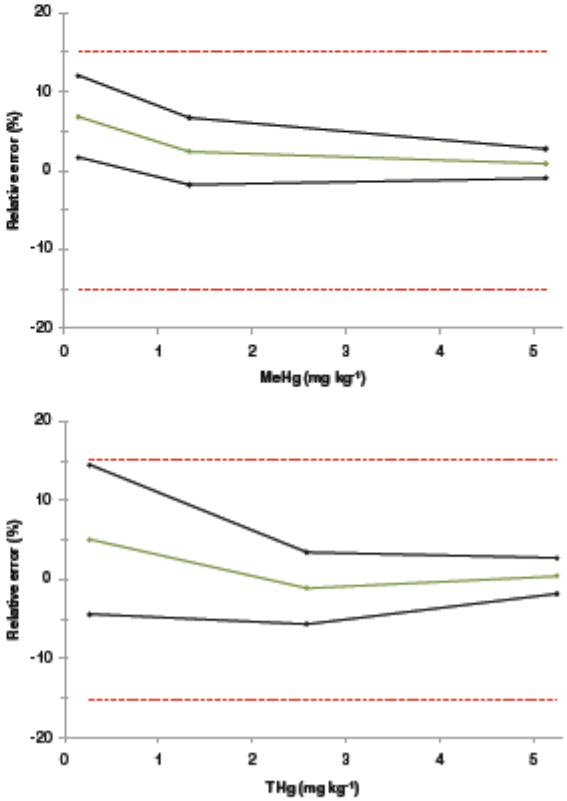


Fig. 1 Accuracy profile for MeHg and THg; β=95%, λ (acceptance limits)=±15%

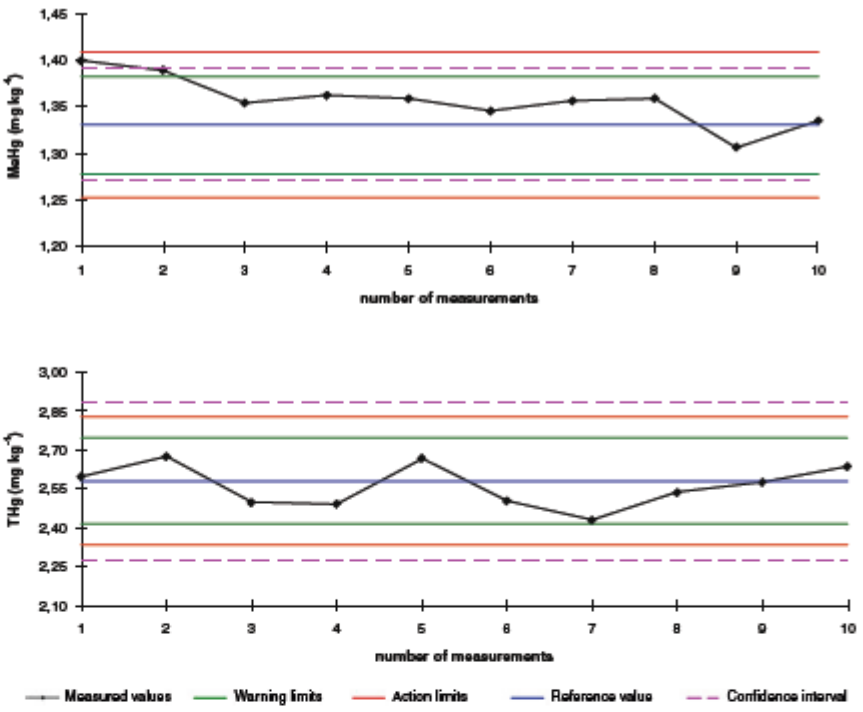


Fig. 2 Control charts for MeHg and THg in DOLT-4 (n=10). Warning limits were calculated as M±2 s, action limits as M± 3 s, confidence interval as M± (k×CV_R×M) where M is the certified value, s the standard deviation, k=3 (P=99%) and CV_R the intermediate precision coefficient of variation set to 1.5% for MeHg and 2.2% for THg

with SCE_r=sum of intra-series squared deviations from the mean, I=number of series analyzed and J=number of repetition.

Intermediate reproducibility variance (s_R^2) was estimated from results obtained with the same method in the same laboratory within long intervals of time. Intermediate reproducibility variance was calculated as $s_R^2=s_L^2+s_r^2$. s_L^2 is the variance that measures sample variations and is calculated following Eq. 2:

$$s_L^2 = \frac{\frac{SCE_L}{I-1} - s_r^2}{J} \quad (2)$$

with SCE_L=sum of inter-series squared deviations from the mean.

Repeatability was estimated by analysing the CRMs in duplicate on the same day by the same operator (n=6). The mean estimated CV_r were 1.3% and 1.7% for MeHg and THg, respectively. The intermediate precision reproducibility was investigated on the same CRMs analysed six times in duplicate on different weeks, over a period of 6 months. The average CV_R values were 1.5% and 2.2% for MeHg and THg, respectively. Compared to the literature, CV_r and CV_R were in good agreement or better than those previously reported in marine samples [20, 21, 23].

Accuracy profile

A recent validation strategy based on the accuracy profiles was applied to demonstrate the ability of the tested method to quantify MeHg, Hg(II) and THg [19, 24]. The probability β was set to 95%, which means that, on average, 95% of the future results will fall in the computed tolerance intervals. The acceptance limits were set to ±15%,

Table 5 Results from proficiency test schemes

		MeHg	Z-score	THg	Z-score
FAPAS 07136	Assigned value	0.677±0.115		0.774±0.129	
Canned Fish	Result	0.767	0.8	0.841	0.6
IMEP-109	Assigned value	1.33±0.20		2.58±0.39	
Fish	Result	1.21	−0.6	2.74	0.3

Table 6 Concentrations of Hg in shellfish (micrograms per kilogramme wet mass) as determined by GC/ICP-MS and ICP-MS

	GC/ICP-MS			ICP-MS		
	Hg(II)	MeHg	∑Hg species	%MeHg	THg	Recovery (%)
Mussels	8.3	5.0	13	37	15	87
	3.3	8.6	12	73	12	99
	8.0	9.8	18	55	15	116
	13	5.8	19	30	23	84
	6.0	8.3	14	58	15	96
	15	7.5	22	34	24	93
	7.9	7.7	16	49	16	98
	3.5	3.7	7.2	51	<8[a]	–
	5.2	26	32	84	32	97
	18	6.9	25	28	31	81
Mean (n=10)	8.8±5.0	8.9±6.3	18±7	50±19	19±8	95±10
Oysters	<0.70[a]	8.9	10	86	9.8	105
	3.9	7.2	11	65	15	73
	2.1	11	13	85	14	92
	<1.4[a]	9.0	10	90	13	78
Mean (n=4)	2.0±1.4	9.0±1.6	11±1	82±11	13±2	87±14
Great scallops	2.5	5.0	7.5	67	10	75
	4.2	9.5	14	69	14	98
	<1.4[a]	2.9	4.3	67	<8[a]	–
	2.0	1.9	3.9	49	<8[a]	–
Mean (n=4)	2.5±1.2	4.8±3.4	7.4±4.7	63±9	10±3	87±16
Shrimp	2.2	20	22	90	26	85
	1.8	30	32	94	34	95
	<1.4[a]	23	24	96	28	85
	2.2	20	22	90	27	81
	1.6	28	29	94	34	85
	<0.70[a]	27	28	98	28	99
	<1.4[a]	29	30	97	27	111
	3.5	27	30	89	32	95
	2.3	21	24	90	23	103
	<0.70[a]	33	34	98	38	89
	1.6	28	30	95	37	81
	<1.4[a]	33	34	97	29	116
	1.8	4.2	5.9	70	<8[a]	–
	1.5	31	32	95	27	119
	1.4	26	28	95	28	98
	<1.4[a]	25	26	96	25	103
Mean (n=16)	1.7±0.7	25±7	28±4	93±7	28±7	96±12
Total mean (n=34)	3.9	16	20	75	22	94
Median	2.2	10	22	86	24	95
P90	8.2	30	32	97	33	112
Minimum	<0.70	1.9	3.9	28	<8[a]	73
Maximum	18	33	34	98	38	119
n<LOQ	9	0	0	–	0	–

[a] Values below the LOD or LOQ

Table 7 Concentrations of Hg in fish (microgrammes per kilogramme wet mass) as determined by GC/ICP-MS and ICP-MS

	GC/ICP-MS			ICP-MS		
	Hg(II)	MeHg	∑Hg species	%MeHg	THg	Recovery (%)
Saithe	3.0	35	38	92	35	108
	4.4	74	78	94	72	109
	2.0	57	59	97	66	89
	2.0	47	49	96	58	85
	2.7	83	86	97	74	116
	7.7	73	81	91	82	98
Mean (n=6)	3.6±2.2	62±18	65±19	95±3	65±17	101±12
Tuna	54	588	642	92	727	88
	30	230	260	88	263	99
	33[a]	170	203	84	226	90
	14[a]	145	159	91	191	83
	16[a,b]	219	235	93	207	114
	10[a]	154	164	94	164	100
Mean (n=6)	26±16	251±169	277±183	90±4	296±214	96±11
Salmon	3.6	33	36	90	33	111
	2.0	29	31	93	27	117
	2.2	46	48	95	42	114
	2.1	28	30	93	25	120
	2.8	32	35	92	31	113
	3.9	39	43	91	42	102
	4.0	41	45	91	41	111
	2.0	48	50	96	42	119
	3.0	34	37	92	26	140
	1.8	39	41	96	39	106
	1.9	42	44	96	45	97
	3.2	37	40	92	42	95
	2.7	47	49	95	37	132
	1.4[b]	45	46	97	38	121
	3.2	48	51	94	42	121
	2.3	46	48	95	42	114
Mean (n=16)	2.6±0.8	40±7	42±7	94±2	37±7	115±12
Total mean (n=28)	7.9	90	97	93	99	108
Median	3.0	47	49	93	42	110
P90	20	185	213	96	213	121
Minimum	1.4	28	30	84	25	83
Maximum	54	588	642	97	727	140
n<LOQ	0	0	0	–	0	–

[a] Canned
[b] Smoked

which is lower than the regulatory requirements for food analysis. Figure 1 shows that tolerance intervals and trueness bias increased with decreasing concentrations for the three CRMs studied (TORT-2, DOLT-4 and BCR-464). The trueness bias ranged from 0.5% (BCR 464) to 5% (TORT-2) for THg and from 1% (BCR 464) to 7% (TORT-2) for MeHg. All the β-expectation tolerance intervals were comprised within the acceptability limits. Therefore, the analytical method can be declared as valid in the range of approximately 0.15–5.1 mg kg^{-1} for MeHg and 0.27–5.2 mg kg^{-1} for THg.

Uncertainty of measurement

Based on these CV_R values, uncertainties can be defined as twice the CV_R (percent; k=2, P=0.95). Therefore, uncertainties of the method were estimated on average at 3% and 4.4% for MeHg and THg, respectively.

Table 8 Comparison of the range (mean) and percentage levels of MeHg quantified in fish and shellfish (microgrammes Hg per kilogramme wet mass)

Group	Origin	Number species	Number samples	MeHg	∑Hg species	%MeHg	References
Fish	France	3	28	28–588 (90)	30–642 (97)	84–97 (93)	This work
	France	41	108	10–944 (169)	–	70–100	[29]
	Germany	32	536	6–567 (38)	–	14–100 (70)	[30]
	Slovenia	27	52	2–1,120 (127)	3–1,110 (150)	40–110 (80)	[31]
	Spain	14	25	54–596	–	–	[32]
	Italy	15	2,880	0–1,740 (314)	0–1,870 (356)	52–100 (88)	[33]
	Ghana	24	–	9–107	–	–	[34]
	Malaysia	2	69	(378)	(459)	70–82 (77)	[35]
	Hong Kong	89	280	3–1,010 (72)	3–1,370 (91)	–	[36]
	China	13	148	40–590 (260)	10–660 (180)	59–84 (74)	[37]
	India	7	–	8.0–16 (13)	8.7–17 (15)	71–95	[38]
	USA	9	–	(13–278)	(16–292)	93–98 (96)	[39]
	Canada	9	112	9–2,346 (342)	20–2,729 (542)	30–94 (64)	[40]
Shellfish	France	4	34	1.9–33 (16)	3.9–34 (20)	28–98 (75)	This work
	France	18	47	3–219 (54)	–	–	[29]
	Italy	1	–	15–51	35–115	33–91	[41]
	Brazil	4	14	3.8–37 (15)	3.8–40 (16)	–	[42]
	India	3	–	(34)	(48)	–	[38]
	China	3	–	17–24	–	–	[43]
	China	7	7	(56–84)	–	–	[44]

Application

Quality assurance

Following the proposed GC/ICP-MS procedure, sample solutions were analysed in batches including internal quality controls (IQC), e.g. a reagent blank, to monitor possible cross-contamination or memory effects [25], CRMs to check trueness, $^{203}Tl/^{205}Tl$ measurements to check mass bias or to evaluate detector dead time [12]. Concentrations and isotopic abundances of the spike solutions of $^{199}Hg(II)$ and $^{201}MeHg$ were checked for each set of analyses by reverse isotope dilution analysis [17]. The mean values obtained on DOLT-4 for MeHg and THg were 1.36 and 2.56 mg kg^{-1} with a relative standard deviation of 1.9% and 3.2%, respectively (n=10). Control charts indicate that the concentrations found were usually well within the confidence interval (CI; Fig. 2). Although the two first values of MeHg were in the warning limits (M±2 s), the action limits (M±3 s) were lower than the tolerance interval of the DOLT-4 certified value (1.33±0.12), demonstrating the accuracy and precision of this method.

External quality controls

To ensure and confirm the analytical trueness of the THg and Hg speciation methods, the laboratory regularly participated in proficiency test schemes (PTs) such as the Central Science Laboratory-Food Analysis Performance Assessment Scheme (CSL-FAPAS), the Community Reference Laboratory for Heavy Metals (Instituto Superiore di Sanità) or the Institute for Reference Materials and Measurements. The results for THg in fish and shellfish obtained by ICPMS were considered satisfactory with a Z-score in the range −2 and +2 [26]. The results for speciation analysis in two fish samples were also considered satisfactory (Table 5). No PTs on shellfish were available during this study.

Occurrence data

A selection of seven different seafood samples from the second French TDS (n=62) was analysed for their MeHg and THg content. The samples selected correspond to the most consumed species in the general French population and were prepared as consumed [14]. The average fat content for fish was 12.4% for smoked salmon, 11.8% for steamed salmon, 8% for canned tuna, 5% for oven-cooked tuna, 1.0% for saithe and for shellfish, 3.0% for boiled mussels, 1.4% for steamed scallops, 1.1% for boiled shrimp and 0.53% for raw oysters [27]. Each set of data were treated using D-IDA and D-SS-IDA because transformation reactions are matrix dependent [11, 12]. The individual results are presented in Table 6 for shellfish and Table 7 for fish (THg levels by ICP-MS). No significant M and D

factors were determined, except for one out of four oyster samples that presented a demethylation rate of 18% (data not shown). Furthermore, MeHg and THg concentrations obtained using the two modes of calculations were similar.

MeHg was quantified in all samples, but mainly at low concentrations. The average percentage of MeHg varied between 50% in mussel and 95% in saithe samples. Except in shrimp, the percentage of MeHg was generally more variable in the four shellfish species (range, 28–98%), notably in mussel samples (range, 28–84%), than in the three fish species analysed (range, 84–97%). Shellfish contained less MeHg than fish. A mean level of 16 μg MeHg kg^{-1} wet mass (wm) was found in shellfish, compared to 90 μg kg^{-1} in fish. The highest levels of MeHg in fish and shellfish were found in tuna (581 μg kg^{-1}) and in shrimp (33 μg kg^{-1}) samples, respectively. All concentrations fell much below the maximum levels set by Regulation (EC) No. 629/2008 [3], which is reassuring considering that these results were obtained from composite samples. In shellfish, shrimp was on average the most contaminated by MeHg (25 μg kg^{-1}), followed by oysters, mussels (9 μg kg^{-1}) and great scallops (5 μg kg^{-1}), while for the fish, tuna samples were on average the most contaminated by MeHg (249 μg kg^{-1}), followed by saithe (62 μg kg^{-1}) and salmon (40 μg kg^{-1}) samples. The recovery rates observed among THg levels quantified by a previously validated and accredited ICP-MS method for THg [16] and the sum of both MeHg and Hg(II) obtained by this speciation method indicated, on average, a good correlation between the two methods. Nevertheless, seven of 62 recovery rates were not found in the 80–120% range (corresponding to the confidence interval of the least precise ICP-MS method calculated with the CV_R of 10% at P=0.95). Ratios below 80% were observed for low-fat matrices and low concentrations in two oyster samples and one great scallop sample. Ratios above 120% were observed for fatty matrices on four salmon samples, with two values at 121%. However, only two ratio values on salmon (140% and 132%) exceeded the confidence interval of 70–130% calculated at P=0.99 (k=3). These concentrations were generally in good agreement with those found previously (on THg) in the first and the second French TDS [28].

Compared with recent previous studies dealing with occurrence data in food, the percentages of MeHg were generally greater in fish than in shellfish, and the highest levels of MeHg were found in predatory fish (Table 8) [29–44]. The levels observed in this study were similar [30, 36, 37, 39, 41–43] or lower [29, 31, 33, 35, 40, 44] than those found previously. The differences between studies are generally due to the number of predatory fish analysed and are also linked to the complex Hg biogeochemistry in the marine environment, e.g. due to the marine trophic chain in which the organism has been collected, the age and exposure time of each individual organism and also the amount of direct anthropogenic pollution prevailing in the seafood organism's ecosystem (mainly in the form of inorganic Hg) [45]. In fish, the mean MeHg percentages ranged from 64% to 96% (Table 8), with minimum percentages higher than 55%, except in some studies [30, 31, 33, 40]. According to Kuballa et al. [30] and Forsyth et al. [40], MeHg proportion varies widely and also could be dependent on the fish species. This is in contradiction with previous opinions who stated that virtually all (>95%) of the mercury present is in the form of MeHg, and this emphasizes that the use of a fixed conversion factor to estimate MeHg levels from total Hg determinations may not provide accurate exposure estimates. This reinforces the need to quantify directly Hg species by accurate and precise speciation methods to improve health risk assessments.

Conclusions

In this work, a recently developed strategy based on accuracy profiles was applied to demonstrate the ability of the GC/ICP-MS method to quantify MeHg and THg concentrations in the range of 0.15–5.12 mg kg^{-1} for MeHg and 0.27–5.24 mg kg^{-1} for THg (∑MeHg+Hg(II)). Figures of merit (LOQ, repeatability, intermediate precision reproducibility and trueness) of the proposed GC/ICP-MS procedure were satisfactory for the determination of MeHg, Hg(II) and THg in fish and shellfish. Data treatment using D-SS-IDA provided accurate results and effectively corrected for transformation reactions. The procedure was successfully applied to various real samples, e.g. mussels, oysters, shrimps and different types of more or less fatty fish.

In the future, this analytical method should be extended and used to estimate inorganic mercury in food matrices other than fish products to estimate dietary exposure to this Hg species with the new, recently established PTWI for inorganic mercury (Hg(II)) of 4 μg (Hg)/kg bw/week [5].

Acknowledgments The authors would like to thank the National Research Agency (ANR, 'Contaminants, Environnement et Santé' programme) for financial support in the framework of the IDEA project and J-C. Leblanc (ANSES DER), coordinator of the Second French TDS for his help.

References

1. Ceccatelli S, Daré E, Moors M (2010) Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. Chem Biol Interact 188(2):301–308
2. Eto K, Marumoto M, Takeya M (2010) The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease): the 50th anniver-

sary of Japanese Society of Neuropathology. Neuropathol 30 (5):471–479
3. EC (2008) Amending Regulation (EC) No. 1881/2006 laying down maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Commission Regulation No. 629/2008, Oj No. 364, 20.12.2006
4. JECFA (2006) Summary and conclusions of the sixty-seventh meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee and Food Additives (JECFA), JECFA 67/SC, ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/jecfa67_final.pdf Accessed 01 March 2011
5. JECFA (2011) Evaluation of certain contaminants in food (seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 959, http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_959_eng.pdf Accessed 01 March 2011
6. Stoichev T, Amouroux D, Rodriguez Martin-Doimeadios RC, Monperrus M, Donard OFX, Tsalev DL (2006) Speciation analysis of mercury in aquatic environment. Appl Spectrosc Rev 41(6):591–619
7. Björn E, Larsson T, Lambertsson L, Skyllberg U, Frech W (2007) Recent advances in mercury speciation analysis with focus on spectrometric methods and enriched stable isotope applications. Ambio 36(6):443–451
8. Bouyssiere B, Szpunar J, Lobinski R (2002) Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis. Spectrochim Acta B 57(5):805–828
9. Wuilloud JCA, Wuilloud RG, Vonderheide AP, Caruso JA (2004) Gas chromatography/plasma spectrometry—an important analytical tool for elemental speciation studies. Spectrochim Acta B 59(6):755–792
10. Popp M, Hann S, Koellensperger G (2010) Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry—a review. Anal Chim Acta 668(2):114–129
11. Castillo Ã, Rodríguez-González P, Centineo G, Roig-Navarro AF, García Alonso JI (2010) Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues. Anal Chem 82(7):2773–2783
12. Rodríguez-González P, Marchante-Gayón JM, García Alonso JI, Sanz-Medel A (2005) Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. Spectrochim Acta B 60(2):151–207
13. Leermakers M, Baeyens W, Quevauviller P, Horvat M (2005) Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation. Trends Anal Chem 24(5):383–393
14. Sirot V, Volatier JL, Calamassi-Tran G, Dubuisson C, Menard C, Dufour A, Leblanc JC (2009) Core food of the French food supply: second total diet study. Food Addit Contam 26(5):623–639
15. Noël L, Guérin T, Frémy JM, Huet H, Kolf-Clauw M (2003) Optimized simultaneous determination of several elements in human intestinal Caco-2 TC7 cells by inductively coupled plasma-mass spectrometry after closed vessel microwave digestion. J AOAC Int 86(6):1225–1231
16. Millour S, Noël L, Kadar A, Chekri R, Vastel C, Guérin T (2011a) Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: method validation. J Food Compos Anal 24(1):111–120. 10.1016/j.jfca.2010.04.002
17. Monperrus M, Rodríguez González P, Amouroux D, García Alonso JI, Donard OFX (2008) Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices. Anal Bioanal Chem 390 (2):655–666
18. Rodríguez Martín-Doimeadios RC, Krupp E, Amouroux D, Donard OFX (2002) Application of isotopically labeled methyl-mercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICPMS. Anal Chem 74(11):2505–2512
19. AFNOR (NF V 03–110: May 2010) Analyse des produits agricoles et alimentaires, protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude. Association Française de Normalisation, Saint Denis, France
20. Tu Q, Qian J, Frech W (2000) Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC-MIP-AES or GC-ICP-MS following simultaneous ultrasonic assisted in situ ethylation and solvent extraction. J Anal At Spectrom 15(12):1583–1588
21. Hintelmann H, Nguyen HT (2005) Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching. Anal Bioanal Chem 381(2):360–365
22. Point D, Ignacio García Alonso J, Clay Davis W, Christopher SJ, Guichard A, Donard OFX, Becker PR, Turk GC, Wise SA (2008) Consideration and influence of complexed forms of mercury species on the reactivity patterns determined by speciated isotope dilution model approaches: a case for natural biological reference materials. J Anal At Spectrom 23(3):385–396
23. Taylor VF, Jackson BP, Chen CY (2008) Mercury speciation and total trace element determination of low-biomass biological samples. Anal Bioanal Chem 392(7–8):1283–1290
24. Hambye S, Stanicki D, Colet JM, Alioust EM, Vanden Eynde JJ, Blankert B (2011) Three optimized and validated (using accuracy profiles) LC methods for the determination of pentamidine and new analogs in rat plasma. Talanta 83(3):832–839
25. Yang L, Sturgeon RE (2005) Blank correction considerations for isotope dilution and reverse isotope dilution calibration: determination of methylmercury in fish tissue. J Anal At Spectrom 20 (8):724–729
26. Millour S, Noël L, Chekri R, Vastel C, Kadar A, Guérin T (2010) Internal quality controls applied in inductively coupled plasma mass spectrometry multi-elemental analysis in the second French Total Diet Study. Accredit Qual Assur 15(9):503–513
27. CIQUAL, ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail). French Food Composition Table—TABLE CIQUAL 2008. http://www.afssa.fr/TableCIQUAL. Accessed 01 March 2011
28. Millour S, Noël L, Kadar A, Chekri R, Vastel C, Sirot V, Leblanc JC, Guérin T (2011) Pb, Hg, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French Total Diet Study. Food Chem 126 (4):1787–1799
29. Sirot V, Guérin T, Mauras Y, Garraud H, Volatier JL, Leblanc JC (2008) Methylmercury exposure assessment using dietary and biomarker data among frequent seafood consumers in France. CALIPSO study. Environ Res 107(1):30–38
30. Kuballa T, Moellers M, Schoeberl K, Lachenmeier DW (2011) Survey of methylmercury in fish and seafood from the south-western German market. Eur Food Res Technol 232:737–742
31. Miklavcic A, Stibilj V, Heath E, Polak T, Tratnik JS, Klavz J, Mazej D, Horvat M (2011) Mercury, selenium, PCBs and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. Food Chem 124(3):711–720
32. Sahuquillo I, Lagarda MJ, Silvestre MD, Farré R (2007) Methylmercury determination in fish and seafood products and estimated daily intake for the Spanish population. Food Addit Contam 24(8):869–876
33. Storelli MM, Giacominelli-Stuffler R, Storelli A, D'Addabbo R, Palermo C, Marcotrigiano GO (2003) Survey of total mercury and methylmercury levels in edible fish from the Adriatic Sea. Food Addit Contam 20(12):1114–1119
34. Voegborlo RB, Matsuyama A, Adimado AA, Akagi H (2011) Determination of methylmercury in marine and freshwater fish in Ghana using a combined technique of dithizone extraction and

gas-liquid chromatography with electron capture detection. Food Chem 124(3):1244–1248
35. Hajeb P, Jinap S, Ahmad I (2010) Biomagnifications of mercury and methylmercury in tuna and mackerel. Environ Monit Assess 171(1–4):205–217
36. Tang ASP, Kwong KP, Chung SWC, Ho YY, Xiao Y (2009) Dietary exposure of Hong Kong secondary school students to total mercury and methylmercury from fish intake. Food Addit Contam B 2(1):8–14
37. Cheng J, Gao L, Zhao W, Liu X, Sakamoto M, Wang W (2009) Mercury levels in fisherman and their household members in Zhoushan, China: impact of public health. Sci Total Environ 407 (8):2625–2630
38. Mishra S, Bhalke S, Saradhi IV, Suseela B, Tripathi RM, Pandit GG, Puranik VD (2007) Trace metals and organometals in selected marine species and preliminary risk assessment to human beings in Thane Creek area, Mumbai. Chemosphere 69(6):972–978
39. Hight SC, Cheng J (2006) Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): method development and validation. Anal Chim Acta 567(2):160–172
40. Forsyth DS, Casey V, Dabeka RW, McKenzie A (2004) Methylmercury levels in predatory fish species marketed in Canada. Food Addit Contam 21(9):849–856
41. Ipolyi I, Massanisso P, Sposato S, Fodor P, Morabito R (2004) Concentration levels of total and methylmercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island (Italy). Anal Chim Acta 505(1):145–151
42. Batista BL, Rodrigues JL, De Souza SS, Oliveira Souza VC, Barbosa F Jr (2011) Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. Food Chem 126(4):2000–2004
43. Xiong C, Hu B (2007) Online YPA4 resin microcolumn separation/preconcentration coupled with inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) for the speciation analysis of mercury in seafood. J Agric Food Chem 55(25):10129–10134
44. Lin Y, Hu B (2007) Sequential cloud point extraction for the speciation of mercury in seafood by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Spectrochim Acta B 62:1153–1160
45. Fitzgerald WF, Lamborg CH, Hammerschmidt CR (2007) Marine biogeochemical cycling of mercury. Chem Rev 107(2):641–662

IV.3.3 Résultats complémentaires et discussion

Les données obtenues par analyse des échantillons de produits de la pêche de l'EAT 2 ont été traitées par D-IDMS et D-SS-IDMS afin d'évaluer l'impact de ces nouvelles matrices sur les réactions de méthylation (M) et déméthylation (D). La D-SS-IDMS a été choisie plutôt que l'IPD pour alléger le traitement des données en raison du nombre conséquent d'échantillons analysés. Les résultats sont présentés dans le tableau 25 (les données individuelles sont présentées dans les tableaux 6 et 7 de l'article II).

Tableau 25 : Concentrations en Hg (µg kg^{-1}) des échantillons de produits de la pêche EAT 2

Espèces	n	Mode de calcul	MeHg	∑espèces Hg	% MeHg	M (%)	D (%)
Moule	10	D-IDMS	11 ± 5,4	18 ± 7,4	59 ± 15	-	-
		D-SS-IDMS	8,9 ± 6,3	18 ± 7,0	50 ± 19	4 ± 26	-18 ± 41
Huître	4	D-IDMS	6,5 ± 2,4	11 ± 2,6	84 ± 13	-	-
		D-SS-IDMS	9,0 ± 1,6	11 ± 1	82 ± 11	-151 ± 85	18 ± 59
Coquille Saint-Jacques	4	D-IDMS	5,1 ± 3,2	7,5 ± 4,6	68 ± 5	-	-
		D-SS-IDMS	4,8 ± 3,4	7,4 ± 4,7	63 ± 9	18 ± 32	-1 ± 27
Crevette	16	D-IDMS	25 ± 7,2	28 ± 7,4	90 ± 6	-	-
		D-SS-IDMS	25 ± 6,9	28 ± 4	93 ± 7	4 ± 93	4 ± 3
Lieu-colin	6	D-IDMS	66 ± 17	72 ± 17	91 ± 3	-	-
		D-SS-IDMS	62 ± 18	65 ± 19	95 ± 3	-27 ± 110	-0,3 ± 1,1
Thon	6	D-IDMS	254 ± 163	281 ± 179	90 ± 4	-	-
		D-SS-IDMS	251 ± 169	277 ± 183	90 ± 4	17 ± 38	0,5 ± 1,9
Saumon	16	D-IDMS	40 ± 7,7	43 ± 7,6	93 ± 2	-	-
		D-SS-IDMS	40 ± 6,8	42 ± 6,7	94 ± 2	-45 ± 88	0,4 ± 1,8

D'importantes fluctuations des taux moyens de M et de D sont observées. Ces fluctuations sont également significatives au niveau du triplicata d'injection d'un même échantillon, comme constaté précédemment sur les MRCs (partie II, paragraphe VI.4.). Néanmoins, à l'exception d'un échantillon d'huître qui présente un taux de D de 18% (résultats par échantillon non montrés), ces taux restent négligeables pour l'ensemble des échantillons. Les teneurs en iHg et MeHg déterminées par D-IDMS sont généralement similaires aux concentrations calculées par D-SS-IDMS, ce qui confirme une faible influence des réactions de transformation sur les résultats finaux.

Les pourcentages moyens de MeHg déterminés par D-IDMS sont similaires à ceux déterminés à partir des données D-SS-IDMS, à l'exception des moules où un pourcentage moyen de MeHg plus élevé (59% contre 50%) est calculé. Les taux de M et D pour cette matrice sont négligeables, ils n'expliquent donc pas cette différence. Par contre, les variations de pourcentage

entre les deux méthodes de calculs sont observées sur les échantillons les moins concentrés. Il est donc probable que ces différences soient liées aux incertitudes de mesure.

Le pourcentage moyen de MeHg dans les mollusques et crustacés est de 75% avec d'importantes variations inter-espèces mais également intra-espèces. Le pourcentage minimum de MeHg a été mesuré dans un échantillon de moule (28%) et le maximum dans un échantillon de crevette (98%). Les teneurs moyennes de MeHg sont comprises entre 1,9 µg kg^{-1} et 33 µg kg^{-1}, avec une teneur moyenne de 16 µg kg^{-1}. Les concentrations les plus elevées sont mesurées dans les crevettes.

Le pourcentage moyen de MeHg dans les poissons (93%) est plus élevé que dans les mollusques et crustacés. Les variations inter-espèces et intra-espèces sont plus faibles avec un pourcentage en MeHg minimal de 84% dans un échantillon de thon et un pourcentage maximal de 97% dans un échantillon de saumon et un de lieu-colin. Les teneurs moyennes de MeHg sont comprises entre 28 µg kg^{-1} et 588 µg kg^{-1}, avec une teneur moyenne de 90 µg kg^{-1}. Les concentrations les plus fortes sont mesurées dans le thon.

La fiabilité des résultats a été évaluée en comparant les teneurs en HgT obtenues en sommant les teneurs des espèces Hg déterminées par spéciation, avec les teneurs en HgT déterminées par la méthode ICP-MS accréditée (Noël et al., 2005). Les résultats de cette comparaison sont présentés dans les tableaux 6 et7 de l'article II. En moyenne, les teneurs en HgT déterminées par spéciation sont en accord avec les teneurs déterminées en total.

Les teneurs et pourcentages en MeHg des échantillons ont également été comparées aux données de la littérature (cf. tableau 8 de l'article II). Cette comparaison comprend peu d'études en raison de deux difficultés rencontrées. La première concerne la nature des données de MeHg. En effet, plusieurs études déterminent la teneur en HgT dans l'échantillon et utilise une hypothèse de pourcentage de MeHg présent dans le HgT (Cf. partie I, paragraphe III.8.) (AFSSA 2002, Usydus et al., 2009, Ström et al., 2010). La seconde réside dans l'origine et le domaine d'application de l'étude. Plus particulièrement pour les mollusques et crustacés que pour les poissons, ces produits de la pêche sont régulièrement utilisés comme indicateur de pollutions environnementales. Par conséquent, ils sont le plus souvent prélevés dans des milieux contaminés et sont peu susceptibles d'être consommés. Ils n'ont donc pas d'intérêt alimentaire. Les articles entrant dans ces deux catégories n'ont pas été pris en considération.

En général, les pourcentages en MeHg déterminés dans cette étude sont similaires ou supérieures aux valeurs de la littérature alors que les teneurs en MeHg sont soit similaires, soit inférieures (cf. tableau 8 de l'article II). Comme expliqué dans l'article II, les différences entre les études sont principalement liées au nombre de poissons prédateurs analysés et à la biogéochimie

complexe du Hg dans le milieu marin (par exemple, chaîne trophique marine dans lequel l'organisme a été recueilli, son âge, le temps de l'exposition et le niveau de contamination anthropique).

IV.3.4 Conclusion

Les résultats obtenus par le couplage ID-GC-ICP-MS sur des échantillons de produits de la pêche lyophilisés et non dégraissés de l'EAT 2 sont à la fois en bonne corrélation avec les valeurs en HgT quantifié par une méthode ICP-MS accréditée et en bon accord avec les données de la littérature.

V. Conclusions et perspectives de la partie III

Pour une utilisation en « routine » de la méthode validée sur des échantillons réels, des contrôles qualités internes ont été mis en place et la justesse de la méthode a été évaluée par le biais de 2 contrôles qualités externes avec des résultats satisfaisants sur des matrices de poisson.

Par la suite, l'applicabilité de la méthode a été évaluée sur des échantillons réels. Dans un premier temps, des essais ont été réalisés avec satisfaction sur des échantillons lyophilisés non dégraissés, d'anguilles et de civelles, au sein du laboratoire LCABIE. Les résultats sont présentés dans l'article I. Parmis les observations faites, cette étude a clairement montré l'avantage d'utiliser la déconvolution isotopique par rapport à la dilution isotopique classique car elle a permis d'obtenir des résultats finaux plus justes et précis, car corrigés des transformations inter-espèces engendrées par l'étape d'extraction.

Dans un second temps, une étude sur l'influence de la lyophilisation sur les espèces Hg dans les produits de la pêche a été menée aux laboratoires CIME et LCABIE dans le but de déterminer l'impact de la lyophilisation sur la distribution naturelle des espèces Hg. Des résultats différents ont été obtenus par les deux laboratoires, probablement en raison des méthodes de lyophilisation utilisées (masses et support de lyophilisation différents). Néanmois, cette évaluation a permis de constater qu'il ne semble pas y avoir de pertes ni de modification d'espèces durant le processus de lyophilisation. Toutefois, de nouvelles expérimentations pourraient être envisagées afin de renforcer les premières constatations faites, en augmentant le nombre de laboratoires participants, en définissant une procédure unique de lyophilisation et sur un plus grand nombre de matrices.

Enfin, la méthode validée a été utilisée avec succès sur les échantillons lyophilisés et non dégraissés des produits de la pêche de l'EAT 2, au sein du laboratoire CIME. Les conclusions de cette étude sont présentées dans l'article II. Les résultats obtenus ont montré que, pour les sept

matrices différentes analysées, la dilution isotopiques classique a permis une quantification juste, au regard des résultats retrouvés dans la littérature et des résultats déterminés par analyse de l'élement mercure sans spéciation et donc nous conforte dans la constatation que la méthode analytique développée et présentée dans ces travaux ne semble pas engendrer de transformations inter-espèces. En perspective, ces données d'occurrence pourraient être utilisées pour une évaluation plus juste de l'exposition humaine au MeHg via la consommation de produits de la pêche, lors du traitement de l'ensemble des données de l'étude EAT 2 dont le rapport final est en cours de rédaction. Enfin, il serait intéressant d'analyser également les échantillons frais des produits de la pêche de l'EAT 2 afin de comparer les résultats avec les échantillons lyophilisés et de conforter ou non les résultats sur l'influence de la lyophilisation sur les espèces Hg.

Partie IV : Qualité en recherche

Selon un extrait de la charte des thèses de l'Anses intitulé : « *Thèse et système de management de la qualité : Les travaux de thèse doivent s'intégrer dans le système de management de la qualité en recherche en place au sein de l'entité. Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche.*

A ce titre, le doctorant accepte d'effectuer ses expériences et manipulations conformément aux méthodes contenues dans le manuel qualité du laboratoire dont il a pris connaissance. Le doctorant accepte qu'un audit qualité ait lieu au cours de son travail ainsi qu'il y ait éventuellement un audit qualité à la fin de son travail, préliminaire à la rédaction du bilan qualité de la thèse par le responsable qualité de l'entité et qui devra accompagner son mémoire de thèse. D'autre part, le doctorant accepte qu'une fois par an ait lieu un bilan qualité de son travail dont les conclusions pourront comporter des suggestions d'amélioration.
L'entité d'accueil du doctorant s'engage à prendre en charge et assurer la formation qualité de l'étudiant et à mettre à sa disposition toute la documentation qualité dont il a besoin. »

Deux audits ont été réalisés au cours de cette thèse, dont les principales conclusions ont été synthétisées dans le rapport présenté ci-dessous :

anses

RAPPORT QUALITE POUR LE MEMOIRE DE THESE DE S. CLEMENS-DAFONSECA

« PROJET SPEHG »

Depuis 1990, le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses a mis en place une démarche qualité. Il est accrédité par le COFRAC selon le référentiel NF EN ISO 17025 (portée disponible sur www.cofrac.fr) pour un ensemble de programmes « Essais » correspondant à ses activités d'analyse de contaminants biologiques et physico-chimiques dans les aliments. Depuis 2001, le laboratoire a entrepris une démarche de qualité en recherche et a suivi pour cela les recommandations de la commission AFNOR sur l'assurance qualité en recherche. Un système de management de la qualité en recherche a été mis en place au sein du laboratoire qui s'applique aux travaux de thèse. Un manuel qualité en recherche auquel les unités accueillant des doctorants doivent se référer est en vigueur. Des audits internes sont réalisés régulièrement auprès des unités par le service de management de la qualité du laboratoire. C'est dans ce contexte que le présent rapport qualité pour les travaux de thèse faisant l'objet de ce mémoire a été rédigé. Les audits et le rapport ci-dessous ne concernent que les travaux effectués à l'Anses, au laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort.

Rédacteurs	Service de management de la Qualité : H. Lelièvre (responsable qualité des laboratoires), C. Cecconi et M.Poumeyrol (adjointes) Sous-direction en charge de la recherche au laboratoire : S. Dragacci
Audit Qualité	18 novembre 2010 ; auditeurs : C. Cecconi et S. Dragacci
Audit de traçabilité	13 décembre 2010 ; auditeur : M. Poumeyrol
Unité d'accueil	Unité CIME-Contaminants inorganiques et minéraux de l'environnement, ANSES-Laboratoire de sécurité des aliments Chef d'Unité Dr T. Guérin, titulaire de l'HDR
Date début de thèse	avril 2008
Acronyme Thèse	SpéHg
Titre Thèse	Spéciation du mercure dans les produits de la pêche par couplage GC-ICP-MS et double dilution isotopique
Direction de thèse	Pr O.F.X. Donard et D. Amouroux (UMR CNRS 5254, Université de Pau)
Chef de projet à l'Anses	T. Guérin, Chef de l'Unité CIME
Ecole doctorale	ABIES-Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé (ED n° 0435, AgroParisTech)
Comité de pilotage	Pr O.F.X. Donard, M. Monperrus et D. Amouroux (UMR CNRS Univers. PAU), T. Guérin (Anses)
Correspondant qualité de l'Unité	R. Chekri
Statut qualité de l'Unité d'accueil	L'Unité est accréditée par le COFRAC, référentiel « Essai », programme 99-3 ; numéro d'accréditation : 1-2246 (annexe technique disponible sur le site du COFRAC, www.cofrac.fr)

Extrait de la charte des thèses de l'Anses : « *Thèse et système de management de la qualité : Les travaux de thèse doivent s'intégrer dans le système de management de la qualité en recherche en place au sein de l'entité. Le management de la qualité en recherche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche.*
A ce titre, le doctorant accepte d'effectuer ses expériences et manipulations conformément aux méthodes contenues dans le manuel qualité du laboratoire dont il a pris connaissance. Le doctorant accepte qu'un audit qualité ait lieu au cours de son travail ainsi qu'il y ait éventuellement un audit qualité à la fin de son travail, préliminaire à la rédaction du bilan qualité de la thèse par le responsable qualité de l'entité et qui devra accompagner son mémoire de thèse. D'autre part, le doctorant accepte qu'une fois par an ait lieu un bilan qualité de son travail dont les conclusions pourront comporter des suggestions d'amélioration.
L'entité d'accueil du doctorant s'engage à prendre en charge et assurer la formation qualité de l'étudiant et à mettre à sa disposition toute la documentation qualité dont il a besoin. »

Initiation du doctorant à l'assurance qualité

La doctorante a été formée à l'assurance qualité par la correspondante qualité de l'Unité d'accueil relayée par le chef de projet de thèse. La doctorante s'est approprié le manuel qualité en recherche (MQ R) du laboratoire et la procédure de gestion de projet associée. Elle a utilisé tous les documents qualité adéquats des manuels qualité « Essais et analyses » et « Recherche ».

Présentation par la doctorante de son projet de recherche (objectifs, hypothèses de travail, partenariats)

La doctorante a présenté l'état d'avancement de ses travaux de thèse au regard du programme initial de travail, et les résultats des expérimentations. Les hypothèses sous-tendant le projet de recherche ont été formulées dans des documents écrits (fiche de définition du projet ; comptes-rendus des réunions de travail et de pilotage des thèses). La doctorante a pu apprécier les avantages d'un système de management de la qualité pour le suivi de son projet de thèse.

Organisation de la documentation qualité

Il existe un dossier qualité de la thèse regroupant l'ensemble des documents relatifs au projet (définition, mise en place, programme de travail, expérimentations, résultats et traitements des résultats, rapports divers notamment comptes-rendus des réunions de comité de pilotage, valorisation). La documentation qualité et les fiches associées au MQ R sont utilisées de façon appropriée. Il existe une version dossier « papier » et une version dossier « numérique ». Les résultats bruts des expérimentations sont également conservés au niveau du logiciel d'acquisition des données des appareillages et d'un CD.

Pilotage du projet

Le sujet de thèse est bien conduit en mode projet et les fiches de suivi du déroulement du projet sont abondées. Un diagramme de Gantt a été établi pour le suivi de la bonne marche du projet. La conduite du projet (réunions, observation des écarts éventuels, bilans, rapports, suivi qualité, valorisation) est globalement satisfaisante. Des comptes-rendus des réunions de travail et de pilotage sont effectués.

L'évolution des hypothèses de travail au regard de l'acquisition des résultats est décrite. L'affectation d'incertitudes aux résultats-produits de la recherche a été réfléchie et un exemple est donné sur une étape critique de lyophilisation.

La valorisation du projet de recherche est effective : affiches et communications orales pour congrès nationaux et internationaux, projets de publications, réalisation de dossiers de validation de méthodes, rédaction de protocoles d'analyse, création de notices d'utilisation d'instrumentation ; pour ces trois derniers points, les documents écrits ont été mis sous une forme directement utilisable pour l'application de la méthode par le personnel de l'unité et pour permettre au laboratoire de se présenter éventuellement à une extension d'accréditation.

Le projet de thèse a bénéficié d'un suivi rapproché par la correspondante qualité de l'Unité pour l'amélioration continue de la qualité (contrôles interne et externe, dérogations, anomalies).

Expérimentation et traçabilité

Aucune rupture de traçabilité sur la partie expérimentale auditée n'a été observée. L'essai de traçabilité a permis de retrouver tous les éléments pertinents pour l'apprentissage par le doctorant des méthodes nécessaires au travail de thèse. La métrologie des appareils utilisés au cours de la thèse a été correctement effectuée.

Habilitation technique et validation de méthodes d'analyse : la doctorante a été habilitée par les responsables de l'unité d'accueil pour la méthode ICP-MS. La doctorante a suivi ensuite une formation à l'Université de Pau pour la partie complémentaire (couplage ICP-MS-GC). La doctorante a utilisé des protocoles de validation de méthode décrits dans la norme AFNOR NF V03-110 et dans les procédures du laboratoire.

En conclusion, l'équipe de management de la qualité du Laboratoire de sécurité des aliments atteste que les travaux de thèse menés par S. Clemens-Da Fonseca se sont déroulés en appliquant les éléments du système qualité général, ainsi que les procédures spécifiques de l'unité d'accueil. Ceci permet d'avoir confiance dans la conduite du projet de thèse et dans la fiabilité des résultats obtenus au cours des expérimentations.

Fait à Maisons-Alfort, le 3 juin 2011

H. Lelièvre

Responsable du service de management de la Qualité
Anses-Laboratoire de sécurité des aliments
Laboratoire de santé animale



Conclusions générales et perspectives

Le principal objectif de cette étude a été d'optimiser et de valider une méthode de spéciation du mercure par couplage ID-GC-ICP-MS permettant de quantifier avec une grande exactitude le MeHg et le iHg dans les produits de la pêche. Cette méthode permettra 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.

Après une présentation générale de la problèmatique du mercure dans la première partie de ce manuscrit, une revue bibliographique exhaustive présentée dans la deuxième partie a permis de faire des choix préliminaires parmi les différentes méthodes de préparation d'échantillon, de séparation et de détection couramment utilisées afin de tester voire d'optimiser celles qui nous paraissaient les plus intéressantes à l'aide de matériaux de référence certifiés (MRC) pertinents (Revue I).

La première optimisation a permis de conclure qu'il était préférable d'ajouter les traceurs isotopiques avant l'étape d'extraction afin qu'ils suivent l'ensemble du processus de préparation de l'échantillon. La deuxième optimisation a permis de retenir une extraction SLE par *digi*PREP plutôt qu'une extraction assistée par micro-ondes (MAE) ou une extraction à température ambiante. Cette technique, relativement lente mais peu agressive par rapport à la MAE, permet d'extraire efficacement et simultanément jusqu'à 46 échantillons en préservant la distribution naturelle des

espèces car aucune transformation inter-espèces (méthylation de iHg ou déméthylation de MeHg) n'a été mise en évidence. La troisième et dernière optimisation a montré que la dérivation des espèces mercurielles par le tétrapropylborate de sodium ($NaBPr_4$) ou le tétraéthylborate de sodium ($NaBEt_4$) était satisfaisante. Néanmoins, le $NaBEt_4$ n'a pas été retenu en raison d'articles scientifiques ayant remis en question la pureté de certains lots de ce réactif. L'étape de dérivation des espèces mercurielles a également été améliorée d'un point de vue pratique en remplacant l'agitation manuelle couramment utilisée par une agitation mécanique rotative pendant 7 min, qui permet d'automatiser cette étape et d'agiter plus de tubes en même temps.

Les différentes techniques de traitement des données par ID (simple (S-IDMS), multiple SS-IDMS) ou par déconvolution isotopiques (IPD)) ont été comparées à l'aide de MRCs. Une quantification juste des concentrations par la D-IDMS est systématique tandis que des problèmes de répétabilité de mesure sont rencontrés avec les deux autres techniques, liés à la mesure des fractions molaires. Néanmoins, des possibilités d'action correctives ont été mises en évidence mais non appliquées à l'heure actuelle.

Par la suite, la validation de la méthode de spéciation a permis d'estimer ses principaux critères de performance (limites de détection et de quantification, justesse, répétabilité, fidélité intermédiaire de reproductibilité, incertitudes et profils d'exactitude) selon 2 normes française (AFNOR 1998, 2010). Les LQs (1,2 µg kg^{-1} pour le MeHg et 1,4 mg kg^{-1} pour le HgT) et la justesse de la méthode estimée à partir de MRCs ont été considérées acceptables pour les deux espèces Hg, et les CV_R moyens sont de 1,5% pour le MeHg et 2,2% pour le HgT. Les limites d'acceptabilité des profils d'exactitude ont été fixées à 15% avec une probabilité de 95% et les profils d'exactitude indiquent que la méthode est applicable dans un domaine de validité qui s'étend approximativement de 0,15 mg kg^{-1} à 5,12 mg kg^{-1} pour MeHg. La méthode est donc validée pour la spéciation du mercure dans les produits de la pêche et sera être soumise prochainement à accréditation COFRAC. L'ensemble des résultats de cette deuxième partie a fait l'objet d'un article publié dans le journal « Analytical and Bioanalytical Chemistry » (Article II).

La troisième partie de ce mémoire présente les différentes applications menées au cours de ces travaux. Une première application a porté sur la détermination des teneurs en MeHg et iHg par SID-GC-ICP-MS et par IPD-GC-ICP-MS dans des échantillons d'anguilles et de civelles et les principales conclusions indiquent une excellente applicabilité de la méthode analytique à des échantillons réels, même de faibles masses et une quantification plus juste et plus précise par IPD et montrent le caractère de bioaccumulation et de bioamplification du MeHg dans les anguilles. L'ensemble des résultats a fait l'objet d'un article soumis en avril 2011 au journal « International Journal of Environmental Analytical Chemistry » (Article I). Une étude comparative de la

spéciation du mercure dans des échantillons frais et lyophilisés a montré qu'il ne semble pas y avoir de pertes ni de modification d'espèces durant le processus de lyophilisation. En conséquence, la spéciation du mercure a été menée dans les échantillons lyophilisés de l'étude EAT 2. Les résultats obtenus ont montré une bonne corrélation à la fois avec les valeurs en HgT quantifiées par une méthode ICP-MS accréditée et avec les données de la littérature.

Enfin, la quatrième et dernière partie de ce mémoire démontre que l'ensemble des travaux de cette thèse a été mené sous assurance qualité en recherche.

Ces différents travaux ont permis de mettre en avant de multiples perspectives :

- La méthode validée d'analyse de spéciation du Hg dans les produits de la pêche pourrait être prochainement soumise à accréditation COFRAC.

- Deux possibilités d'action peuvent être appliquées pour tenter d'améliorer les problèmes rencontrés lors d'une quantification par IDMS utilisant l'IPD, soit en ajoutant les espèces enrichies en un isotope en concentrations égales aux espèces naturelles, ce qui ménerait à des rapports isotopiques altérés de l'ordre de 0,3 plutôt que de 1, soit en procédant à une séparation par GC utilisant un nouvel appareil de chromatographie en phase gazeuse.

- Afin de conforter les observations faites lors de l'étude de l'impact de la lyophilisation sur les espèces Hg, il serait intéressant de poursuivre ces recherches en augmentant le nombre de participant et en appliquant une procédure analytique unique. De plus, les échantillons frais de produits de la pêche de l'EAT 2 pourraient être analysés afin de comparer les résultats avec les échantillons lyophilisés. Les données d'occurrence obtenues sur les échantillons lyophilisés de cette étude pourraient ensuite être utilisées pour une évaluation plus juste de l'exposition humaine au MeHg via la consommation de produits de la pêche.

- D'autres produits de la pêche que les plus consommés par la population française pourraient être analysés ainsi que des matrices de faibles masses telles que les civelles. De même, la méthode de spéciation validée pourrait être étendue à de nouvelles matrices d'intérêt, en mettant d'avantage l'accent sur la détermination du iHg suite à l'établissement par le JECFA d'une valeur toxicologique de référence pour cette espèce pour les denrées autres que les produits de la pêche (JECFA 2010).

Bibliographie

Abranko L, Jokai Z, Fodor P (2005) Investigation of the species-specific degradation behaviour of methylmercury and ethylmercury under microwave irradiation. Anal. Bioanal. Chem. 383 (3): 448-453

Abuin M, Carro AM, Lorenzo RA (2000) Experimental design of a microwave-assisted extraction-derivatization method for the analysis of methylmercury. J. Chrom. A 889 (1-2): 185-193

AFNOR(1995) Application de la statistique – Cartes de contrôle. NF X 06-031-0. Association Française de Normalisation, Saint Denis, France

AFNOR (1996) Analyse des produits agricoles et alimentaires. Guide pour l'utilisation des matériaux de références. FD V03-115. Association Française de Normalisation, Saint Denis, France

AFNOR (1998) Analyse des produits agricoles et alimentaires, procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence. NF V03-110. Association Française de Normalisation, Saint Denis, France

AFNOR (2002) Produits alimentaires – Dosage des elements traces – Critères de performance, généralité et préparation d'échantillons. AFNOR NF EN 13804. Association Française de Normalisation, Saint-Denis, France

AFNOR (2010) Analyse des produits agricoles et alimentaires, protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude. NF V03-110. Association Française de Normalisation, Saint Denis, France

AFSSA (2002) Saisine n° 2002-SA-0014 relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition au mercure des femmes enceintes et allaitantes et des jeunes enfants.

AFSSA (2003) Saisine n° 2003-SA-0380 relatif à la réévaluation des risques sanitaires du méthylmercure liés à la consommation des produits de la pêche au regard de la nouvelle dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP).

AFSSA (2004) Méthylmercure et consommation de poissons, effets-VTRs-impact. Rapport établi à la demande de l'AFSSA, groupement d'études en toxicologie, Grenoble, France

AFSSA (2006) Saisine n° 2006-SA-0006 relatif à la consommation des poissons prédateurs pélagiques, en particulier l'espadon, à la Réunion vis-à-vis du risque sanitaire lié au méthylmercure à l'évaluation des risques sanitaires.

AESA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. Demande n° EFSA-Q-2003-030. http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/34.pdf Accés le 13 juin 2011

Alasoni E, Navarro P, Ebrard G, Allard A, Labarraque G, Monperrus M, Amouroux D, Fisicaro P (2011) Evaluation of the measurement uncertainties for multiple-spiking isotope dilution procedures. European Winter conference on Plasma Spectrochemistry, 30 Janvier au 4 février 2011, Zaragoza, Spain.

Amin-Zaki L, Elhassani S, Majeed MA, Clarkson TW, Doherty RA, Greenwood M (1974) Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. Pediatr. 54 (5):587-595

Amyot M, Mierle G, Lean D, McQueen DJ (1997) Effect of solar radiation on the formation of dissolved gaseous mercury in temperate lakes. Geochim. Cosmochim. Acta 61 (5):975-987

Amyot M, Southworth G, Lindberg SE, Hintelmann H, Lalonde JD, Ogrinc N, Poulain AJ, Sandilands KA (2004) Formation and evasion of dissolved gaseous mercury in large enclosures amended with $^{200}HgCl_2$. Atmos. Environ. 38 (26):4279-4289

Arleny I, Tabouret H, Rodriguez-Gonzalez P, Bareille G, Donard OFX, Amouroux D (2007) Methylmercury bioconcentration in muscle tissue of the European eel (Anguilla anguilla) from the Adour estuary (Bay of Biscay, France). Mar. Pollut. Bull. 54 (7):1031-1036

Bacon JR, Linge KL, Parrish RR, Van Vaeck L (2008) Atomic spectrometry update. Atomic mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. 23 (8):1130-1162

Baeyens W, Leermakers M, Molina R, Holsbeek L, Joiris CR (1999) Investigation of headspace and solvent extraction methods for the determination of dimethyl- and monomethylmercury in environmental matrices. Chemosphere 39 (7):1107-1117

Bagnato E, Aiuppa A, Parello F, Calabrese S, D'Alessandro W, Mather TA, McGonigle AJS, Pyle DM, Wangberg I (2007) Degassing of gaseous (elemental and reactive) and particulate mercury from Mount Etna volcano (Southern Italy). Atmos. Environ. 41 (35):7377-7388

Baldi F, Parati F, Filippelli M (1995) Dimethylmercury and dimethylmercury-sulfide of microbial origin in the biogeochemical cycle of Hg. Water Air Soil Poll. 80 (1-4):805-815

Baltussen E, Cramers C, Sandra P (2002) Sorptive sample preparation - a review. Anal. Bioanal. Chem. 373 (1):3-22

Barkay T, Miller SM, Summers AO (2003) Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. FEMS Microbiol. Rev. 27 (2-3):355-384

Batista BL, Rodrigues JL, De Souza SS, Oliveira Souza VC, Barbosa JF (2011) Mercury speciation in seafood samples by LC-ICP-MS with a rapid ultrasound-assisted extraction procedure: Application to the determination of mercury in Brazilian seafood samples. Food Chem. 126 (4):2000-2004

Beauchemin D (2010) Inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal. Chem. 82 (12):4786-4810

Bélanger J, Paré J (2006) Applications of microwave-assisted processes (MAP™) to environmental analysis. Anal. Bioanal. Chem. 386 (4):1049-1058

Bengtsson G, Picado F (2008) Mercury sorption to sediments: Dependence on grain size, dissolved organic carbon, and suspended bacteria. Chemosphere 73 (4):526-531

Bensefa-Colas L, Andujar P, Descatha A (2010) Mercury poisoning. Intoxication par le mercure. Rev. Med. Interne, doi:10.1016/j.revmed.2009.08.024

Berzas Nevado JJ, Martin-Doimeadios RCR, Guzman Bernardo FJ, Jimenez Moreno M (2005) Determination of mercury species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel microwave-assisted extraction. J. Chrom. A 1093 (1-2): 21-28

Bjorn E, Larsson T, Lambertsson L, Skyllberg U, Frech W (2007) Recent Advances in Mercury Speciation Analysis with Focus on Spectrometric Methods and Enriched Stable Isotope Applications. Ambio 36 (6):443-451.

Boszke L (2005) High-performance liquid chromatography as a valuable tool for determination of mercury species in environmental samples. A review. Chem. Anal. 50 (3):489-505

Bouyssiere B, Szpunar J, Lobinski R (2002) Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis. Spectrochim. Acta Part B 57 (5):805-828

Bowling AM, Hammerschmidt CR, Oris JT (2011) Necrophagy by a benthic omnivore on biomagnification of methylmercury in fish. Aquat. Toxicol. 102 (3-4):134-141

Bramanti E, Lomonte C, Onor M, Zamboni R, D'Ulivo A, Raspi G (2005) Mercury speciation by liquid chromatography coupled with on-line chemical vapour generation and atomic fluorescence spectrometric detection (LC-CVGAFS). Talanta 66 (3):762-768

Budtz-Jorgensen E, Grandjean P, Jorgensen PJ, Weihe P, Keiding N (2004) Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. Environ. Res. 95 (3):385-393

Cabanero Ortiz AI, Albarran YM, Rica CC (2002) Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples. J. Anal. At. Spectrom. 17 (12): 1595-1601

Cai Y, Bayona JM (1995) Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chrom. A 696 (1):113-122

Calvert JG, Lindberg SE (2005) Mechanisms of mercury removal by O3 and OH in the atmosphere. Atmos. Environ. 39 (18):3355-3367

Cano-Pavon JM, Garcia De Torres A, Sanchez-Rojas F, Canada-Rudner P (1999) Analytical Methods for Mercury Speciation in Environmental and Biological Samples - An Overview. Int. J. Environ. Anal. Chem. 75 (1):93 – 106

Capelo-Martinez JL, Ximenez-Embun P, Madrid Y, Camara C (2004) Advanced oxidation processes for sample treatment in atomic spectrometry. Trends Anal. Chem. 23 (4):331-340

Carrasco L, Diez S, Bayona JM (2007) Methylmercury determination in biota by solid-phase microextraction. Matrix effect evaluation. J. Chrom. A 1174 (1-2):2-6

Carrasco L, Díez S, Soto DX, Catalan J, Bayona JM (2008) Assessment of mercury and methylmercury pollution with zebra mussel (Dreissena polymorpha) in the Ebro River (NE Spain) impacted by industrial hazardous dumps. Sci. Total Environ. 407 (1):178-184

Carrasco L, Diez S, Bayona JM (2009) Simultaneous determination of methyl- and ethyl-mercury by solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection. J. Chrom. A 1216 (51):8828-8834

Carro AM, Mejuto MC (2000) Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compounds in food analysis. J. Chrom. A 882 (1-2):283-307

Caruso JA, Klaue B, Michalke B, Rocke DM (2003) Group assessment: Elemental speciation. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56 (1):32-44

Castillo Ã, Rodriguez-Gonzalez P, Centineo G, Roig-Navarro AF, Garcia Alonso JI (2010) Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues. Anal. Chem. 82 (7):2773-2783

CE (2006), Règlement (CE) N° 1881/2006 du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.

CE (2008), Règlement (CE) N° 629/2008 du 02 juillet 2008 modifiant le règlement (CE) N° 1881/2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.

Celo V, Lean DRS, Scott SL (2006) Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. Sci. Total Environ. 368 (1):126-137

Centineo G, Gonzalez EB, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A (2006) Isotope dilution SPME GC/MS for the determination of methylmercury in tuna fish samples. J. Mass Spectrom. 41 (1):77-83

Cernichiari E, Myers GJ, Ballatori N, Zareba G, Vyas J, Clarkson T (2007) The biological monitoring of prenatal exposure to methylmercury. NeuroToxicol. 28 (5 SPEC. ISS.):1015-1022

Chang LF, Jiang SJ, Sahayam AC (2007) Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Chrom. A 1176 (1-2):143-148

Chen B, Wang T, Yin Y, He B, Jiang G (2007) Methylation of inorganic mercury by methylcobalamin in aquatic systems. Appl. Organomet. Chem. 21 (6):462-467

Chen J, Chen H, Jin X, Chen H (2009) Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl- and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction preconcentration. Talanta 77 (4):1381-1387

Chiou C-S, Jiang S-J, Kumar Danadurai KS (2001) Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. Spectrochim. Acta Part B 56 (7):1133-1142

Choi SC, Chase Jr T, Bartha R (1994) Metabolic pathways leading to mercury methylation in Desulfovibrio desulfuricans LS. Appl. Environ. Microbiol. 60 (11):4072-4077

Chung SWC, Chan BTP (2010) A reliable method to determine methylmercury and ethylmercury simultaneously in foods by gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after enzymatic and acid digestion. J. Chrom. A 1218 (9):1260-1265

Clarkson TW, Vyas JB, Ballatori N (2007) Mechanisms of mercury disposition in the body. Am. J. Ind. Med. 50 (10):757-764

Clough R, Belt ST, Evans EH, Fairman B, Catterick T (2003) Investigation of equilibration and uncertainty contributions for the determination of inorganic mercury and methylmercury by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 500 (1-2):155-170

Clough R, Belt ST, Fairman B, Catterick T, Evans EH (2005) Uncertainty contributions to single and double isotope dilution mass spectrometry with HPLC-CV-MC-ICP-MS for the determination of methylmercury in fish tissue. J. Anal. At. Spectrom. 20 (10):1072-1075

Coelho-Souza SA, Guimaraes JRD, Mauro JBN, Miranda MR, Azevedo SMFO (2006) Mercury methylation and bacterial activity associated to tropical phytoplankton. Sci. Total Environ. 364 (1-3):188-199

Commission de Codex Alimentarius, Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires, comité du codex sur les additives alimentaires et les contaminants, 37° session, avril 2005.

Cornelis R, Caruso J, Crews H, Heumann K (2003) Handbook of elemental speciation I: Techniques and methodology. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.

Cornelis R, Caruso J, Crews H, Heumann K (2005) Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine and occupational health. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England.

Covelli S, Faganeli J, Horvat M, Brambati A (1999) Porewater distribution and benthic flux measurements of mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). Estuar. Coast. Shelf Sci. 48 (4):415-428

Crespo-Lopez ME, Macedo GL, Pereira SID, Arrifano GPF, Picanco-Diniz DLW, Nascimento JLMd, Herculano AM (2009) Mercury and human genotoxicity: Critical considerations and possible molecular mechanisms. Pharmacol. Res. 60 (4):212-220

Dabeka R, McKenzie AD, Forsyth DS, Conacher HBS (2004) Survey of total mercury in some edible fish and shellfish species collected in Canada in 2002. Food Addit. Contam. 21: 434-440

Daverat F, Martin J, Fablet R, Pécheyran C (2011) Colonisation tactics of three temperate catadromous species, eel Anguilla anguilla, mullet Liza ramada and flounder Plathychtys flesus, revealed by Bayesian multielemental otolith microchemistry approach. Ecol. Freshw. Fish 20 (1):42-51

Davis WC, Vander Pol SS, Schantz MM, Long SE, Day RD, Christopher SJ (2004) An accurate and sensitive method for the determination of methylmercury in biological specimens using GC-ICP-MS with solid phase microextraction. J. Anal. At. Spectrom. 19 (12):1546-1551

Davis W, Christopher S, Pugh R, Donard O, Krupp E, Point D, Horvat M, Gibičar D, Kljakovic-Gaspic Z, Porter B, Schantz M (2007) Certification of methylmercury content in two fresh-frozen

reference materials: SRM 1947 Lake Michigan fish tissue and SRM 1974b organics in mussel tissue (Mytilus edulis). Anal. Bioanal. Chem. 387 (7):2335-2341

Dekker W (2000) A Procrustean assessment of the European eel stock. ICES J. Mar. Sci. 57 (4):938-947

Diez S, Bayona JM (2008) Determination of Hg and organomercury species following SPME: A review. Talanta 77 (1):21-27

Dill C, Kuiken T, Zhang H, Ensor M (2006) Diurnal variation of dissolved gaseous mercury (DGM) levels in a southern reservoir lake (Tennessee, USA) in relation to solar radiation. Sci. Total Environ. 357 (1-3):176-193

Duran R, Ranchou-Peyruse M, Menuet V, Monperrus M, Bareille G, Goni MS, Salvado JC, Amouroux D, Guyoneaud R, Donard OFX, Caumette P (2008) Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour Estuary (Bay of Biscay, France). Environ. Pollut. 156 (3):951-958

EAT 2 (2011) Etude de l'alimentation totale française 2 (EAT 2). Tome 1 : Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistant, mycotoxines et phytoestrogènes. Avis de l'ANSES ; Rapport d'expertise. Juin 2011.
http://www.anses.fr/Documents/PASER2006sa0361Ra1.pdf ; Accès le 03 novembre 2011

Ebdon L, Foulkes ME, Le Roux S, Munoz-Olivas R (2002) Cold vapour atomic fluorescence spectrometry and gas chromatography-pyrolysis-atomic fluorescence spectrometry for routine determination of total and organometallic mercury in food samples. Analyst 127 (8):1108-1114

Emteborg H, Snell J, Qian J, Frech W (1999) Sources of systematic errors in mercury speciation using Grignard reagents and capillary gas chromatography coupled to atomic spectrometry. Chemosphere 39 (7):1137-1152

EPA 6800: EPA Method 6800: elemental and speciated isotope dilution mass spectrometry http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-6800.pdf Accès le 13 juin 2011

Eto K, Marumoto M, Takeya M (2010) The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease): The 50th Anniversary of Japanese Society of Neuropathology. Neuropathol. 30 (5):471-479

Eurachem (2000), Guide EURACHEM / CITAC, quantifier l'incertitude dans les mesures analytiques.
http://www.lne.fr/publications/eurachem_guide_incertitude_fr.pdf Accès le 13 juin 2011

Falter R (1999) Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis: Part 1: Localisation of the compounds effecting the abiotic mercury methylation. Chemosphere 39 (7):1051-1073

FAPAS (2010) FAPAS proficiency test 07136 metallic contaminants in canned fish. March – May 2010 report.

Feinberg M (2009) Labo-Stat, Guide De Validation Des Méthodes D'analyse. Tec & Doc Lavoisier, Paris, France : 361 pp

Feunteun E (2002) Management and restoration of European eel population (Anguilla anguilla): An impossible bargain. Ecol. Eng. 18 (5):575-591

Fitzgerald WF, Lamborg CH, Hammerschmidt CR (2007) Marine biogeochemical cycling of mercury. Chem. Rev. 107 (2):641-662

Fleming EJ, Mack EE, Green PG, Nelson DC (2006) Mercury methylation from unexpected sources: Molybdate-inhibited freshwater sediments and an iron-reducing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 72 (1):457-464

Forsyth D, Casey V, Dabeka RW, McKenzie A (2004) Methylmercury levels in predatory fish species marketed in Canada. Food Add. Contam. 21:849-856

Fragueiro S, Lavilla I, Bendicho C (2004) Direct coupling of solid phase microextraction and quartz tube-atomic absorption spectrometry for selective and sensitive determination of methylmercury in seafood: An assessment of chloride and hydride generation. J. Anal. At. Spectrom. 19 (2):250-254

Gabriel MC, Williamson DG (2004) Principal biogeochemical factors affecting the speciation and transport of mercury through the terrestrial environment. Environ. Geochem. Health 26 (3-4):421-434

Garcia Fernandez R., Montes Bayon M., Garcia Alonso J. I., Sanz-Medel A. (2000) Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Mass Spectrom. 35 (5):639-646

Gardfeldt K, Munthe J, Stromberg D, Lindqvist O (2003) A kinetic study on the abiotic methylation of divalent mercury in the aqueous phase. Sci. Total Environ. 304 (1-3):127-136

Gardner RM, Nyland JF, Silbergeld EK (2010) Differential immunotoxic effects of inorganic and organic mercury species in vitro. Toxicol. Lett. 198 (2):182-190

Garraud H, Vacchina V, Seby F, Dumont J, Sirot V, Guerin T, Leblanc J-C (2007) Méthodologies analytiques pour la spéciation des métaux dans les produits de la mer dans le cadre d'une approche bénéfice/risque (étude CALIPSO). Ann. Toxicol. Anal. 19 (1):71-80

Gerbersmann C, Heisterkamp M, Adams FC, Broekaert JC (1997) Two methods for the speciation analysis of mercury in fish involving microwave-assisted digestion and gas chromatography-atomic emission spectrometry. Anal. Chim. Acta 350 (3):273-285

Gil S, Fragueiro S, Lavilla I, Bendicho C (2005) Determination of methylmercury by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace single-drop microextraction with in situ hydride generation. Spectrochim. Acta Part B 60 (1):145-150

Gill U, Bigras L, Schwartz H (2004) Routine, automated determination of inorganic and total mercury in multimedia using cold vapour atomic absorption spectrometry. Chemosphere 56 (11):1097-1103

Gomez-Ariza JL, Morales E, Giraldez I, Sanchez-Rodas D, Velasco A (2001) Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants. J. Chrom. A 938 (1-2):211-224

Gomez-Ariza JL, Lorenzo F, Garcia-Barrera T (2005) Sample treatment selection for routine mercury speciation in seafood by gas chromatography- Atomic fluorescence spectroscopy. Appl. Organomet. Chem. 19 (5):600-604

Grandjean P, Perez M (2008) Development neurotoxicity: Implications of methylmercury research. Int. J. Environ. Health 2 (3-4):417-428

Gray JS (2002) Biomagnification in marine systems: The perspective of an ecologist. Mar. Pollut. Bull. 45 (1-12):46-52

Grinberg P, Campos RC, Mester Z, Sturgeon RE (2003) A comparison of alkyl derivatization methods for speciation of mercury based on solid phase microextraction gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometry detection. J. Anal. At. Spectrom. 18 (8):902-909

Gustin MS, Lindberg SE, Austin K, Coolbaugh M, Vette A, Zhang H (2000) Assessing the contribution of natural sources to regional atmospheric mercury budgets. Sci. Total Environ. 259 (1-3):61-71

Gustin MS, Lindberg SE, Weisberg PJ (2008) An update on the natural sources and sinks of atmospheric mercury. Appl. Geochem. 23 (3):482-493

Hammerschmidt CR, Fitzgerald WF, Lamborg CH, Balcom PH, Visscher PT (2004) Biogeochemistry of methylmercury in sediments of Long Island Sound. Mar. Chem. 90 (1-4 SPEC. ISS.):31-52

Hans Wedepohl K (1995) The composition of the continental crust. Geochim. Cosmochim. Acta 59 (7):1217-1232

Harrington CF (2000) The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography. Trends Anal. Chem. 19 (2-3):167-179

Herrera LK, Duran A, Franquelo ML, Justo A, Perez-Rodriguez JL (2009) Hg/Sn amalgam degradation of ancient glass mirrors. J. Non-Cryst. Solids 355 (37-42):1980-1983

Heumann KG, Gallus SM, Radlinger G, Vogl J (1998) Precision and accuracy in isotope ratio measurementsby plasma source mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. 13: 1001-1008

Hight SC, Cheng J (2006) Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation. Anal. Chim. Acta 567 (2):160-172

Hill SJ, Pitts LJ, Fisher AS (2000) High performance liquid chromatography-isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation studies: an overview. Trends Anal. Chem. 19:120-126

Hines NA, Brezonik PL (2004) Mercury dynamics in a small Northern Minnesota lake: Water to air exchange and photoreactions of mercury. Mar. Chem. 90 (1-4 SPEC. ISS.):137-149

Hintelmann H, Nguyen HT (2005) Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching. Anal. Bioanal. Chem. 381 (2):360-365

Horvat M, Covelli S, Faganeli J, Logar M , Mandic V, Rajar R, Sirca A, Zagar D (1999) Mercury in contaminated coastal environments; a case study: The Gulf of Trieste. Sci. Total Environ. 237-238:43-56

Horvat M, Nolde N, Fajon V, Jereb V, Logar M, Lojen S, Jacimovic R, Falnoga I, Liya Q, Faganeli J, Drobne D (2003) Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China. Sci. Total Environ. 304 (1-3):231-256

Huang CW, Jiang SJ (1993) Speciation of mercury by reversed-phase liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. J. Anal. At. Spectrom. 8 (5):681-686

Huang J-H (2005) Artifact formation of methyl- and ethyl-mercury compounds from inorganic mercury during derivatization using sodium tetra(n-propyl)borate. Anal. Chim. Acta 532 (2): 113-120

Inagaki K, Kuroiwa T, Narukawa T, Yarita T, Takatsu A, Okamoto K, Chiba K (2008) Certification of methylmercury in cod fish tissue certified reference material by species-specific isotope dilution mass spectrometric analysis. Anal. Bioanal. Chem. 391 (6):2047-2054

INERIS (2006) Mercure et ses dérives. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances dangereuses n° DRC-00-25590-99DF389, version n°3
http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/2802 Accès le 13 juin 2011

Ipolyi I, Massanisso P, Sposato S, Fodor P, Morabito R (2004) Concentration levels of total and methylmercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island (Italy). Anal. Chim. Acta 505 (1):145-151

IRMM (2010) Report of the ninth interlaboratory comparison organised by the European union reference laboratory for heavy metals in feed and food. IMEP-109: total cadmium, lead, arsenic and mercury as well as methylmercury and inorganic arsenic in seafood. September 2010

ISO (2005) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais. NF EN ISO/CEI 17025. Association Française de Normalisation, Saint Denis, France

Issaro N, Abi-Ghanem C, Bermond A (2009) Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction. Anal. Chim. Acta 631 (1): 1-12

Jay JA, Murray KJ, Gilmour CC, Mason RP, Morel FMM, Roberts AL, Hemond HF (2002) Mercury methylation by Desulfovibrio desulfuricans ND132 in the presence of polysulfides. Appl. Environ. Microbiol. 68 (11):5741-5745

JECFA (2006) Summary and conclusions of the sixty-seventh meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee and Food Additives (JECFA), JECFA 67/SC
ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/jecfa67_final.pdf Accessed 15 Feb 2011 Accès le 13 juin 2011

JECFA (2010) Evaluation of certain contaminants in food (Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Technical Report Series, No. 959
http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_959_eng.pdf Accessed 15 Feb 2011 Accès le 13 juin 2011

Jitaru P, Infante HG, Adams FC (2004) Simultaneous multi-elemental speciation analysis of organometallic compounds by solid-phase microextraction and multicapillary gas chromatography

hyphenated to inductively coupled plasma-time-of-flight-mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. 19 (7):867-875

Jokai Z, Abranko L, Fodor P (2005) SPME-GC-pyrolysis-AFS determination of methylmercury in marine fish products by alkaline sample preparation and aqueous phase phenylation derivatization. J. Agric. Food Chem. 53 (14):5499-5505

Jonasson IR, Boyle RW (1972) Geochemistry of mercury and origins of natural contamination of the environment. Can. Min. Metall. Bull. 65:32-39.

Kehrig HA, Seixas TG, Baeta AP, Malm O, Moreira I (2010) Inorganic and methylmercury: Do they transfer along a tropical coastal food web? Mar. Pollut. Bull. 60 (12):2350-2356

Kerper LE, Mokrzan EM, Clarkson TW, Ballatori N (1996) Methylmercury efflux from brain capillary endothelial cells is modulated by intracellular glutathione but not ATP. Toxicol. Appl. Pharmacol. 141 (2):526-531

King JK, Kostka JE, Frischer ME, Saunders FM (2000) Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 66 (6):2430-2437

Kotnik J, Horvat M, Tessier E, Ogrinc N, Monperrus M, Amouroux D, Fajon V, Gibicar D, Zizek S, Sprovieri F, Pirrone N (2007) Mercury speciation in surface and deep waters of the Mediterranean Sea. Mar. Chem. 107 (1):13-30

Kot A (2000) Namiesnik J The role of speciation in analytical chemistry. Trends Anal. Chem. 19 (2-3):69-79

Krystek P, Ritsema R (2004) Determination of methylmercury and inorganic mercury in shark fillets. Appl. Organomet. Chem. 18 (12):640-645

Kuballa T, Leonhardt E, Schoeberl K, Lachenmeier DW (2009) Determination of methylmercury in fish and seafood using optimized digestion and derivatization followed by gas chromatography with atomic emission detection. Eur. Food Res. Technol. 228 (3):425-431

Kuballa T, Moellers M, Schoeberl K, Lachenmeier DW (2010) Survey of methylmercury in fish and seafood from the southwestern German market. Eur. Food Res. Technol. 232:737-742

Landaluze JS, De Diego A, Raposo JC, Madariaga JM (2004) Methylmercury determination in sediments and fish tissues from the Nerbioi-Ibaizabal estuary (Basque Country, Spain). Anal. Chim. Acta 508 (1):107-117

Leblanc JC, Guérin T, Noël L, Calamassi-tran G, Volatier JL, Verger P (2005) Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study. Food Add. Contam. 22 (7):624-641

Lee SH, Suh JK (2005) Determination of mercury in tuna fish tissue using isotope dilution-inductively coupled plasma mass spectrometry. Microchem. J. 80 (2):233-236

Leenaers J, Van Mol W, Infante HG, Adams FC (2002) Gas chromatography-inductively coupled plasma-time-of-flight mass spectrometry as a tool for speciation analysis of organomercury compounds in environmental and biological samples. J. Anal. At. Spectrom. 17 (11):1492-1497

Leermakers M, Baeyens W, Quevauviller P, Horvat M (2005) Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. Trends Anal. Chem. 24 (5):383-393

Li Y, Yan XP, Dong LM, Wang SW, Jiang Y, Jiang DQ (2005) Development of an ambient temperature post-column oxidation system for high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold vapor atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation in seafood. J. Anal. At. Spectrom. 20 (5):467-472

Li Y, Liu SJ, Jiang DQ, Jiang Y, Yan XP (2008) Gas Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry for Mercury Speciation in Seafood. Chin. J. Anal. Chem. 36 (6):793-798

Liang L, Horvat M, Cernichiari E, Gelein B, Balogh S (1996) Simple solvent extraction technique for elimination of matrix interferences in the determination of methylmercury in environmental and biological samples by ethylation-gas chromatography-cold vapor atomic fluorescence spectrometry. Talanta 43 (11):1883-1888

Liang LN, Jiang GB, Liu JF, Hu JT (2003) Speciation analysis of mercury in seafood by using high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic fluorescence spectrometry via a post column microwave digestion. Anal. Chim. Acta 477 (1):131-137

Lindberg SE, Brooks S, Lin CJ, Scott KJ, Landis MS, Stevens RK, Goodsite M, Richter A (2002) Dynamic oxidation of gaseous mercury in the arctic troposphere at polar sunrise. Environ. Sci. Technol. 36 (6):1245-1256

Lobinski R, Adams FC (1997) Speciation analysis by gas chromatography with plasma source spectrometric detection. Spectrochim. Acta Part B 52 (13):1865-1903

Lobinski R, Pereiro IR, Chassaigne H, Wasik A, Szpunar J (1998) Elemental speciation and coupled techniques-towards faster and reliable analyses: Plenary lecture. J. Anal. At. Spectrom. 13 (9):859-867

Lobinski R, Schaumloffel D, Szpunar J (2006) Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry. Mass Spectrom. Rev. 25 (2):255-289

Lopez I, Cuello S, Camara C (2010) Madrid Y Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS. Talanta 82 (2):594-599

LRC 2011,
http://sites.google.com/site/chimiedu45600lrc/le-journal-des-sciences/le-mercure---cycle-et-toxicite
Accès le 13 juin 2011

Luque-Garcia JL, Luque De Castro MD (2003) Ultrasound: A powerful tool for leaching. Trends Anal. Chem. 22 (1):41-47

Margetinova J, Houserova-Pelcova P, Kuban V (2008) Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction. Anal. Chim. Acta 615 (2):115-123

Martin-Doimeadios RCR, Krupp E, Amouroux D, Donard OFX (2002) Application of isotopically labeled methylmercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICPMS. Anal. Chem. 74 (11):2505-2512

Martin-Doimeadios RCR, Tessier E, Amouroux D, Guyoneaud R, Duran R, Caumette P, Donard OFX (2004) Mercury methylation/demethylation and volatilization pathways in estuarine sediment slurries using species-specific enriched stable isotopes. Mar. Chem. 90 (1-4 SPEC. ISS.):107-123

Martin RS, Witt MLI, Pyle DM, Mather TA, Watt SFL, Bagnato E, Calabrese S (2011) Rapid oxidation of mercury (Hg) at volcanic vents: Insights from high temperature thermodynamic models of Mt Etna's emissions. Chem. Geol. doi:10.1016/j.chemgeo.2011.01.027

Marvin-Dipasquale M, Agee J, McGowan C, Oremland RS, Thomas M, Krabbenhoft D, Gilmour CC (2000) Methyl-mercury degradation pathways: A comparison among three mercury impacted ecosystems. Environ. Sci. Technol. 34 (23):4908-4916

Mauro JBN, Guimaraes JRD, Hintelmann H, Watras CJ, Haack EA, Coelho-Souza SA (2002) Mercury methylation in macrophytes, periphyton, and water - Comparative studies with stable and radio-mercury additions. Anal. Bioanal. Chem. 374 (6):983-989

Meija J, Mester Z (2008) Paradigms in isotope dilution mass spectrometry for elemental speciation analysis. Anal. Chim. Acta 607 (2):115-125

Mester Z, Lam J, Sturgeon R, Pawliszyn J (2000) Determination of methylmercury by solid-phase microextraction inductively coupled plasma mass spectrometry: A new sample introduction method for volatile metal species. J. Anal. At. Spectrom. 15 (7):837-842

Mester Z, Sturgeon R (2005) Trace element speciation using solid phase microextraction. Spectrochim. Acta Part B 60 (9-10):1243-1269

Michalke B (2003) Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56 (1):122-139

Millour S, Noël L, Kadar A, Chekri R, Vastel C, Sirot V, Leblanc JC, Guérin T (2011) Pb, Hg, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French total diet study. Food Chem. 126(4):1787-1799

Ministère japonaise de la santé (2003),
http://www.mhlw.go.jp/english/wp/other/councils/mercury/index.html Accès le 13 juin 2011

Miquel G (2001) Les effets des métaux lours sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, rapport d'information n° 261, session ordinaire de 2000-2001, assemblée nationale n° 2979
http://www.senat.fr/rap/l00-261/l00-2611.pdf Accès en juin 2011

Mishra S, Bhalke S, Saradhi IV, Suseela B, Tripathi RM, Pandit GG, Puranik VD (2007) Trace metals and organometals in selected marine species and preliminary risk assessment to human beings in Thane Creek area, Mumbai. Chemosphere 69 (6):972-978

Moldovan M, Krupp EM, Holliday AE, Donard OFX (2004) High resolution sector field ICP-MS and multicollector ICP-MS as tools for trace metal speciation in environmental studies: A review. J. Anal. At. Spectrom. 19 (7):815-822

Monperrus M, Martin-Doimeadios RCR, Scancar J, Amouroux D, Donard OFX (2003) Simultaneous sample preparation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis of monomethylmercury and tributyltin in a certified oyster tissue. Anal. Chem. 75 (16):4095-4102

Monperrus M, Krupp E, Amouroux D, Donard OFX, Rodriguez Martin-Doimeadios RC (2004) Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. Trends Anal. Chem. 23 (3):261-272

Monperrus M, Tessier E, Amouroux D, Leynaert A, Huonnic P, Donard OFX (2007a) Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea. Mar. Chem. 107 (1):49-63

Monperrus M, Tessier E, Point D, Vidimova K, Amouroux D, Guyoneaud R, Leynaert A, Grall J, Chauvaud L, Thouzeau G, Donard OFX (2007b) The biogeochemistry of mercury at the sediment-water interface in the Thau Lagoon. 2. Evaluation of mercury methylation potential in both surface sediment and the water column. Estuar. Coast. Shelf Sci. 72 (3):485-496

Monperrus M, Rodriguez Gonzalez P, Amouroux D, Garcia Alonso JI, Donard OFX (2008) Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices. Anal. .Bioanal. Chem. 390 (2):655-666

Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M (1998) The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. Annu. Rev. Ecol. System. 29:543-566

Moreno Jimenez S, Sturgeon RE (1997) Speciation of methyl- and inorganic mercury in biological tissues using ethylation and gas chromatography with furnace atomization plasma emission spectrometric detection. J.. Anal. At. Spectrom. 12 (5):597-601

Mozaffarian D (2009) Fish, mercury, selenium and cardiovascular risk: Current evidence and unanswered questions. Int. J.. Environ. Res. .Public Health 6 (6):1894-1916

Muresan B, Cossa D, Richard S, Dominique Y (2008) Monomethylmercury sources in a tropical artificial reservoir. Appl. Geochem. 23 (5):1101-1126

Noël L, Guérin T, Fremy JM, Huet H, Kolf-Clauw M (2003) Optimized simultaneous determination of several elements in human intestinal Caco-2 TC7 cells by inductively coupled plasma-mass spectrometry after closed vessel microwave digestion. J. AOAC International 86 (6):1225-1231

Noël L, Dufailly V, Lemahieu N, Vastel C, Guérin T (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

NRC (2000) Toxicological effects of methylmercury. National Research Council, National academy press, Washington, DC

Nriagu J, Becker C (2003) Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: Global and regional inventories. Sci. . Total Environ. 304 (1-3):3-12

Ogrinc N, Monperrus M, Kotnik J, Fajon V, Vidimova K, Amouroux D, Kocman D, Tessier E, Zizek S, Horvat M (2007) Distribution of mercury and methylmercury in deep-sea surficial sediments of the Mediterranean Sea. Mar. Chem. 107 (1):31-48

Oken E, Radesky JS, Wright RO, Bellinger DC, Amarasiriwardena CJ, Kleinman KP, Hu H, Gillman MW (2008) Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. Obstet. Gynecol. Surv. 63 (9):557-558

OMS (1990) Methylmercury. Critère d'hygiène de l'environnement 101. Programme international sur la sécurité des substances chimiques. Organisation mondiale de la santé, Genève.

Orellana Velado NG, Pereiro R, Sanz-Medel A (1998) Glow discharge atomic emission spectrometry as a detector in gas chromatography for mercury speciation. J. Anal. At. Spectrom. 13 (9):905-909

Orellana Velado NG, Pereiro R, Sanz-Medel A (2000) Mercury speciation by capillary gas chromatography with radiofrequency hollow cathode glow discharge atomic emission detection. J. Anal. At. Spectrom. 15 (1):49-53

Oyanagi K, Ikuta F (1993) The aging of central nervous system in methylmercury intoxication in Niigata, Japan - Quantitative investigation of neurofibrillary tangles and senile plaques. Brain Nerve 45 (3):241-244

Pacheco-Arjona J, Rodriguez-Gonzalez P, Valiente M, Barclay D, Donard OFX (2008) Application of a new focused microwave technology with species-specific isotope dilution analysis for the quantitative extraction of organometallic contaminants in solid environmental matrices. Int. J. Environ. Anal. Chem. 88 (13):923-932

Pacyna EG, Pacyna JM, Steenhuisen F, Wilson S (2006) Global anthropogenic mercury emission inventory for 2000. Atmos. Environ. 40 (22):4048-4063

Paré JRJ, Bélanger JMR, Stafford SS (1994) Microwave-assisted process (MAP®): A new tool for the analytical laboratory. Trends Anal. Chem. 13 (4):176-184

Percy AJ, Korbas M, George GN, Gailer J (2007) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of inorganic mercury and methylmercury driven by their different coordination chemistry towards thiols. J. .Chrom. A 1156 (1-2 SPEC. ISS.):331-339

Pereiro RI, Diaz CA (2002) Speciation of mercury, tin, and lead compounds by gas chromatography with microwave-induced plasma and atomic-emission detection (GC-MIP-AED). Anal. .Bioanal. Chem. 372 (1):74-90

Perna L, LaCroix-Fralish A, Sturup S (2005) Determination of inorganic mercury and methylmercury in Zooplankton and fish samples by speciated isotopic dilution GC-ICP-MS after alkaline digestion. J. Anal. At. Spectrom. 20 (3):236-238

PNUE (2005) Evaluation mondiale du mercure. Programme des Nations Unies pour l'Environnement, section substances chimiques, version française, Genève, Suisse
http://www.chem.unep.ch/mercury/gma%20in%20F%20and%20S/final-assessment-report-F-revised.pdf
Accès le 13 juin 2011

Point D, Davis WC, Garcia Alonso JI, Monperrus M, Christopher SJ, Donard OFX, Becker PR, Wise SA (2007) Simultaneous determination of inorganic mercury, methylmercury, and total mercury concentrations in cryogenic fresh-frozen and freeze-dried biological reference materials. Anal. Bioanal. Chem. 389 (3):787-798

Point D, Ignacio Garcia Alonso J, Clay Davis W, Christopher SJ, Guichard A, Donard OFX, Becker PR, Turk GC, Wise SA (2008) Consideration and influence of complexed forms of mercury species on the reactivity patterns determined by speciated isotope dilution model approaches: A case for natural biological reference materials. J. Anal. At. Spectrom. 23 (3):385-396

Ponce De Leon CA, Montes-Bayon M, Caruso JA (2002) Elemental speciation by chromatographic separation with inductively coupled plasma mass spectrometry detection. J. Chrom. A 974 (1-2):1-21

Poperechna N, Heumann KG (2005) Simultaneous multi-species determination of trimethyllead, monomethylmercury and three butyltin compounds by species-specific isotope dilution GC-ICP-MS in biological samples. Anal. Bioanal. Chem. 383 (2):153-159

Popp M, Hann S, Koellensperger G (2010) Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry-A review. Anal. Chim. Acta 668 (2):114-129

Pourreza N, Ghanemi K (2009) Determination of mercury in water and fish samples by cold vapor atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on agar modified with 2-mercaptobenzimidazole. J. Hazard. Mater. 161 (2-3):982-987

Quevauviller P (1996) Improvement of quality control of speciation analysis using hyphenated techniques. A decade of progress within the European Community. J. Chrom. A 750 (1-2):25-33

Qvarnstrom J, Frech W (2002) Mercury species transformations during sample pre-treatment of biological tissues studied by HPLC-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 17 (11):1486-1491

Rai R, Maher W, Kirkowa F (2002) Measurement of inorganic and methylmercury in fish tissues by enzymatic hydrolysis and HPLC-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 17 (11):1560-1563

Ramalhosa E, Segade RS, Pereira E, Vale C, Duarte A (2001) Microwave treatment of biological samples for methylmercury determination by high performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. Analyst 126 (9):1583-1587

Ray SJ, Andrade F, Gamez G, McClenathan D, Rogers D, Schilling G, Wetzel W, Hieftje GM (2004) Plasma-source mass spectrometry for speciation analysis: State-of-the-art. J. Chrom. A 1050 (1):3-34

Reyes LH, Rahman GMM, Kingston HMS (2009) Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. Anal. Chim. Acta 631 (2):121-128

Rodil R, Carro AM, Lorenzo RA, Abuin M, Cela R (2002) Methylmercury determination in biological samples by derivatization, solid-phase microextraction and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. J. Chrom. A 963 (1-2):313-323

Rodriguez-Gonzalez P, Marchante-Gayon JM, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A (2005) Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. Spectrochim. Acta Part B 60 (2):151-207

Ruiz Encinar J, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A (2000) Synthesis and application of isotopically labelled dibutyltin for isotope dilution analysis using gas chromatography-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 15 (9):1233-1240

Ruiz Encinar J, Rodríguez-González P, García Alonso JI, Sanz-Medel A (2003) Isotopically-labelled compounds for validating organometallics speciation analysis. Trends Anal. Chem. 22 (2):108-114

Schaumloffel D, Lobinski R (2005) Isotope dilution technique for quantitative analysis of endogenous trace element species in biological systems. Int. J. Mass Spectrom. 242 (2-3):217-223

SCOOP (2004) European/Commission, Report of experts participating in Task 3.2.11, Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead, and mercury of the population of the EU Member States, European commission
http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf
Accès le 13 juin 2011

Serafimovski I, Karadjova I, Stafilov T, Cvetkovic J (2008) Determination of inorganic and methylmercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Microchem. J. 89 (1):42-47

Siepak J, Boszke L (2004) Analytical methods in determination of mercury species in environmental samples. An overview. Acta Toxicol. 12 (2):87-100

Silva da Rocha M, Soldado AB, Blanco E, Sanz-Medel A (2001) Speciation of mercury using capillary electrophoresis coupled to volatile species generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. 16 (9):951-956

Sirot V, Guérin T, Mauras Y, Garraud H, Volatier JL, Leblanc JC (2008) Methylmercury exposure assessment using dietary and biomarker data among frequent seafood consumers in France. CALIPSO study. Environ. Res. 107 (1):30-38

Skip Kingston HM, Reyes LH, Mizanur Rahman GM, Fahrenholz T (2008) Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish. Anal. Bioanal. Chem. 390 (8):2123-2132

Slaets S, Adams F, Rodriguez Pereiro I, Lobinski R (1999) Optimization of the coupling of multicapillary GC with ICP-MS for mercury speciation analysis in biological materials. J. Anal. At. Spectrom. 14 (5):851-857

Snell JP, Quétel CR (2005) SI-traceable certification of methylmercury amount content in a tuna material. J. Anal. At. Spectrom. 20 (5):447-454

Smith T, Pitts K, McGarvey JA, Summers AO (1998) Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg(0). Appl. Environ. Microbiol. 64 (4):1328-1332

Sommar J, Andersson ME, Jacobi HW (2010) Circumpolar measurements of speciated mercury, ozone and carbon monoxide in the boundary layer of the Arctic Ocean. Atmos. Chem. Phys. 10 (11):5031-5045

Sparr Eskilsson C, Bjorklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. J. Chrom. A 902 (1):227-250

Stein ED, Cohen Y, Winer AM (1996) Environmental distribution and transformation of mercury compounds. Cri. Rev. Environ. Sci. Technol. 26 (1):1-43

Stoichev T, Amouroux D, Rodriguez Martin-Doimeadios RC, Monperrus M, Donard OFX, Tsalev DL (2006) Speciation analysis of mercury in aquatic environment. Appl. Spectrosc. Rev. 41 (6):591-619

Ström S, Helmfrid I, Glynn A, Berglund M (2010) Nutritional and toxicological aspects of seafood consumption-An integrated exposure and risk assessment of methylmercury and polyunsaturated fatty acids. Environ. Res. 111 (2):274-280

Sturup S, Hansen HR, Gammelgaard B (2008) Application of enriched stable isotopes as tracers in biological systems: A critical review. Anal. Bioanal. Chem. 390 (2):541-554

Szpunar J, Schmitt VO, Donard OFX, Lobinski R (1996) Low-power focused microwave technology as a new tool for rapid preparation of solid samples for speciation analysis. Trends Anal. Chem. 15 (4):181-187

Szpunar J, McSheehy S, Polec K, Vacchina V, Mounicou S, Rodriguez I, Lobinski R (2000) Gas and liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry detection for environmental speciation analysis - advances and limitations. Spectrochim. acta Part B 55 (7):779-793

Tabouret H, Bareille G, Claverie F, Pécheyran C, Prouzet P, Donard OFX (2010) Simultaneous use of strontium:calcium and barium:calcium ratios in otoliths as markers of habitat: Application to the European eel (Anguilla anguilla) in the Adour basin, South West France. Mar. Environ. Res. 70 (1):35-45

Taylor VF, Jackson BP, Chen CY (2008) Mercury speciation and total trace element determination of low-biomass biological samples. Anal. Bio. Chem. 392 (7-8):1283-1290

Taylor A, Branch S, Day MP, Patriarca M, White M (2010) Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages. J. Anal. At. Spectrom. 25 (4):453-492

Templeton DM, Ariese F, Cornelis R, Danielsson LG, Muntau H, Van Leeuwen HP, Lobinski R (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.

Tseng CM, De Diego A, Martin FM, Amouroux D, Donard OFX (1997) Rapid determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion. J. Anal. At. Spectrom. 12 (7):743-750

Tseng CM, De Diego A, Pinaly H, Amouroux D, Donard OFX (1998) Cryofocusing coupled to atomic absorption spectrometry for rapid and simple mercury speciation in environmental matrices. J. Anal. At. Spectrom. 13 (8):755-764

Tu Q, Qian J, Frech W (2000) Rapid determination of methylmercury in biological materials by GC-MIP-AES or GC-ICP-MS following simultaneous ultrasonicassisted in situ ethylation and solvent extraction. J. Anal. At. Spectrom. 15 (12):1583-1588

Tuzen M, Karaman I, Citak D, Soylak M (2009) Mercury(II) and methyl mercury determinations in water and fish samples by using solid phase extraction and cold vapour atomic absorption spectrometry combination. Food Chem. Toxicol. 47 (7):1648-1652

Usydus Z, Szlinder-Richert J, Polak-Juszczak L, Komar K, Adamczyk M, Malesa-Ciecwierz M, Ruczynska W (2009) Fish products available in Polish market - Assessment of the nutritive value and human exposure to dioxins and other contaminants. Chemosphere 74 (11):1420-1428

Van Loon JC, Alcock LR, Pinchin WH, French JB (1986) Inductively coupled plasma-source mass spectrometry: new element isotope-specific mass spectrometry detector for chromatography. Spectrosc. Lett. 19 1125–1135.

Varekamp JC, Buseck PR (1986) Global mercury flux from volcanic and geothermal sources. Appl. Geochem. 1 (1):65-73

Vazquez MJ, Abuin M, Carro AM, Lorenzo RA, Cela R (1999) Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy. Chemosphere 39 (7):1211-1224

Veiga M, Baker R (2004) Protocols for environmental and health assessment of mercury released by artisanal and small-scale gold miners. Global Mercury Project: GEF/UNDP/UNIDO, Vienne, Austria.
http://www.globalmercuryproject.org/documents/non_country%20specific/Protocols_for_Environmental%20_Assessment.pdf
Accès le 13 juin 2011

Vereda Alonso E, Siles Cordero MT, Garcia de Torres A, Canada Rudner P, Cano Pavon JM (2008) Mercury speciation in sea food by flow injection cold vapor atomic absorption spectrometry using selective solid phase extraction. Talanta 77 (1):53-59

Vidler DS, Jenkins RO, Hall JF, Harrington CF (2007) The determination of methylmercury in biological samples by HPLC coupled to ICP-MS detection. Appl. Organomet. Chem. 21 (5):303-310

Vogl J (2007) Characterisation of reference materials by isotope dilution mass spectrometry. J. Anal. At. Spectrom. 22 (5):475-492

Waddell R, Lewis C, Hang W, Hassell C, Majidi V (2005) Inductively coupled plasma mass spectrometry for elemental speciation: Applications in the new millennium. Appl. Spectrosc. Rev. 40 (1):33-69

Wang M, Feng W, Zhang F, Wang B, Shi J, Li B, Chai Z, Zhao Y (2005) Determination of inorganic and methyl mercury in biological samples by high performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. Fenxi Huaxue 33 (12):1671-1675

Wang M, Feng W, Shi J, Zhang F, Wang B, Zhu M, Li B, Zhao Y, Chai Z (2007) Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS. Talanta 71 (5):2034-2039

Wasik A, Pereiro IR, Dietz C, Szpunar J, Lobinski R (1998) Speciation of mercury by ICP-MS after on-line capillary cryofocussing and ambient temperature multicapillary gas chromatography. Anal. Commun. 35 (10):331-335

Watras CJ, Back RC, Halvorsen S, Hudson RJM, Morrison KA, Wente SP (1998) Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. Sci. Total Environ. 219 (2-3):183-208

Westöö G (1968) Determination of methylmercury salts in various kinds of biological material. Acta chem. Scand. 22 (7):2277-2280

Whalin L, Kim EH, Mason R (2007) Factors influencing the oxidation, reduction, methylation and demethylation of mercury species in coastal waters. Mar. Chem. 107 (3):278-294

WHO/FNU/FOS (1995) Application de l'analyse des risques dans le domaine des normes alimentaires. World Health Organization, Genève, Suisse.

Wilken RD, Falter R (1998) Determination of Methylmercury by the Species-specific Isotope Addition Method Using a Newly Developed HPLC-ICP MS Coupling Technique with Ultrasonic Nebulization. Appl. Organomet. Chem. 12 (8-9):551-557

Wilson RT, Wang J, Chinchilli V, Richie JP, Virtamo J, Moore LE, Albanes D (2009) Vitamin D, and Flavonoids in Relation to Renal Cell Cancer Among Smokers. Am. J. Epidemiol. 170 (6):717-729

Wuilloud JCA, Wuilloud RG, Vonderheide AP, Caruso JA (2004) Gas chromatography/plasma spectrometry - An important analytical tool for elemental speciation studies. Spectrochim. Acta Part B 59 (6):755-792

Yang L, Colombini V, Maxwell P, Mester Z, Sturgeon RE (2003a) Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. J. Chrom. A 1011 (1-2):135-142

Yang L, Mester Z, Sturgeon RE (2003b) Determination of methylmercury in fish tissues by isotope dilution SPME-GC-ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 18 (5):431-436

Yang L, Sturgeon RE (2005) Blank correction considerations for isotope dilution and reverse isotope dilution calibration: Determination of methylmercury in fish tissue. J. Anal. At. Spectrom. 20 (8):724-729

Yin Y, Liu J, He B, Shi J, Jiang G (2008) Simple interface of high-performance liquid chromatography-atomic fluorescence spectrometry hyphenated system for speciation of mercury based on photo-induced chemical vapour generation with formic acid in mobile phase as reaction reagent. J. Chrom. A 1181 (1-2):77-82

Yudovich YE, Ketris MP (2005) Mercury in coal: A review Part 2. Coal use and environmental problems. Int. J. Coal Geol. 62 (3):135-165

Annexe 1

Trois échantillons frais de poisson déjà analysés en mercure total par une méthode accréditée (Noël et al., 2005) ont été utilisés :

- Un échantillon de thon, [HgT] = 0,902 ± 0,127 mg kg^{-1}
- Un échantillon de julienne, [HgT] = 0,473 ± 0,067 mg kg^{-1}
- Un échantillon de bar-loup, [HgT] = 0,422 ± 0,060 mg kg^{-1}

Chaque laboratoire a analysé les 3 échantillons en spéciation selon les 3 protocoles suivants :

(1) Une analyse sur l'échantillon frais, avec marquage isotopique par le ^{201}MeHg et le ^{199}iHg avant extraction.

(2) Une analyse sur l'échantillon lyophilisé, avec marquage isotopique avant lyophilisation selon la procédure décrite dans la partie II, paragraphe V.3.2.

(3) Une analyse sur l'échantillon lyophilisé, avec marquage isotopique après lyophilisation et avant extraction selon la procédure décrite dans la partie II, paragraphe V.3.2.

Le protocole 1 sur le produit frais peut être considéré comme l'analyse « témoin ». Il fournit une information sur les teneurs et la distribution réelle des espèces Hg dans les échantillons non modifiés. Les deux autres protocoles permettent d'évaluer l'impact de la lyophilisation sur les espèces Hg afin de mettre en évidence les potentielles pertes ou transformations inter-espèces pouvant survenir lors de la lyophilisation. En effet, le protocole 2 permet de contrôler l'ensemble de la méthode analytique incluant la lyophilisation alors que l'ajout des marqueurs après lyophilisation (protocole 3) ne le permet pas.

Le laboratoire CIME s'est également chargé de réanalyser le HgT sur les échantillons ayant suivis les protocoles (1) et (3) (Noël et al., 2005) à l'aide d'un micro-onde en système fermé Multiwave 3000 (Anton Paar,Courtaboeuf, France) et d'un ICP-MS X SERIES 2 (Thermo Scientific). Pour chacun de ces 3 protocoles, la préparation des échantillons par chacun des 2 laboratoires a été réalisée de la manière suivante :

Etape (1) :

LCABIE et CIME : Cf.les procédures analytiques décrites dans la partie II, paragraphe V.3.2.

Etapes (2) et (3) :

LCABIE : Le système de lyophilisation utilisé dans cette étude est un LP3 fabriqué et commercialisé par JOUAN (France). Un tube d'extraction en verre de 22 ml contenant 1 g d'échantillon frais est recouvert d'un parafilm percé à plusieurs endroits par une aiguille et placé dans le lyophilisateur pour une durée de 48 h à -80 °C. Après lyophilisation, les échantillons sont broyés manuellement à l'aide d'une spatule en inox et conservés dans des flacons en plastique. Lors de l'étape 2, les spikes sont ajoutés, en volumes et concentrations suffisants, à l'échantillon frais. Après un temps de mise en contact entre les spikes et les espèces endogènes de 6 minutes, les échantillons sont lyophilisés. Pour l'étape 3, les spikes sont ajoutés à l'échantillon lyophilisé. Les échantillons lyophilisés sont ensuite préparés selon la procédure décrite dans la partie II, paragraphe V.3.2.

CIME : Le système de lyophilisation utilisé dans cette étude est un Beta 1-8 LD fabriqué et commercialisé par Christ (Osterode am Harz, Allemagne). Un plateau en inox de 20 cm de diamètre contenant 10 g d'échantillon frais est recouvert d'un parafilm percé à plusieurs endroits par une aiguille et est placé dans le lyophilisateur pour une durée de 48 h à -80 °C. Après lyophilisation, les échantillons sont finement broyés dans un mortier et conservés dans des flacons en plastique. Le marquage isotopique des échantillons selon l'étape 2 ou 3 est identique à la procédure décrite pour le LCABIE. Pour l'étape 2, un temps de mise en contact entre les spikes et les espèces endogènes de 1 h 30 min a été utilisé en raison de la quantité importante d'échantillon. Les échantillons lyophilisés sont ensuite préparés selon la procédure décrite dans la partie II, paragraphe V.3.2.

Annexe 2

Chaque échantillon est marqué de sorte que les rapports isotopiques modifiés $R^{202/199}$ et $R^{202/201}$ soient proches de 1. Pour calculer les volumes et concentrations de spikes à ajouter, il faut idéalement connaître la teneur en HgT et le pourcentage de MeHg dans l'échantillon. Les échantillons étudiés étant issus de l'EAT 2, les teneurs en HgT étaient connues et confirmées au cours de cette étude. Une pré-étude par calibration externe a donc été menée sur chaque type de matrice et les pourcentages de MeHg estimés sont les suivants :

- 80% pour le thon,
- 83% pour le saumon,
- 81% pour la crevette,
- 89% pour le lieu-colin,
- 28% pour la moule,
- 40% pour la coquille Saint-Jacques,
- 48% pour l'huître.

Par ailleurs, plusieurs ajustements ont du être faits, selon la matrice étudiée, au niveau de la préparation d'échantillon :

Compromis entre la teneur en HgT dans le vial d'injection du GC et le volume d'isooctane :

La teneur maximale en HgT dans le vial d'injection du GC a été fixée à 4 µg l^{-1} pour l'ensemble de l'étude, afin d'obtenir des intensités de pics satisfaisantes, sans saturer le détecteur. Cette teneur est directement dépendante du volume d'extrait à prélever et du volume d'isooctane à ajouter, comme le montre l'équation 12 suivante :

$$[HgT]_{vial\ extrait}\ (ml) = \frac{V_{extrait}\ (ml) \times [HgT]_{extrait}}{V_{isooctane}\ (ml)} \qquad (12)$$

avec $[HgT]_{extrait}$, $V_{extrait}$ et $V_{isooctane} = f([HgT]_{échantillon})$

Le volume d'isooctane à ajouter doit être au minimum de 0,5 ml sinon il devient difficile de prélever la phase organique. De plus, un volume minimum dans le vial d'injection est nécessaire pour que la seringue soit immergée.

Pour les échantillons faiblement contaminés en Hg comme les moules, les coquilles Saint-Jacques et les huîtres, la teneur en HgT dans le vial a due être abaissée à 3 µg l^{-1} pour obtenir un compromis satisfaisant entre le volume d'extrait à prélever et le volume d'isooctane à ajouter. Par exemple, pour un échantillon de coquille Saint-Jacques :

$[HgT]_{échantillon}$ = 7 µg kg^{-1} et % $MeHg_{hyp}$ = 28%
alors $[MeHg]_{théorique\ échantillon}$ = 1,96 µg kg^{-1} et $[iHg]_{théorique\ échantillon}$ = 5,04 µg kg^{-1}

Prise d'essai = 0,25 g et V_{TMAH} = 5 ml
V_{199iHg} = 178 µl avec $[^{199}iHg]$ = 1 µg l^{-1}
$V_{201MeHg}$ = 85 µl avec $[^{201}MeHg]$ = 1 µg l^{-1}
Donc, le volume total de l'extrait est approximativement de 5 ml.

Si $[HgT]_{vial}$ = 4 µg l^{-1}
alors, $V_{extrait\ à\ prélever}$ = 5,714 ml et $V_{isooctane}$ = 0,5 ml,
le volume total d'extrait n'est pas suffisamment grand (≈ 5 ml) pour pouvoir prélever 5,714 ml.
ou, $V_{extrait\ à\ prélever}$ = 2,857 ml et $V_{isooctane}$ = 0,25 ml,
le volume d'isooctane est trop faible

Si [HgT] vial = 3 µg l^{-1}
Alors, $V_{extrait\ à\ prélever}$ = 4,286 ml et $V_{isooctane}$ = 0,5 ml,
Cette configuration est acceptable.

Mise en contact entre les analytes et les spikes :

Comme vu précédemment dans la partie II, paragraphe VI.2., une mise en contact de 6 minutes entre les spikes en solution et les analytes dans une matrice solide et dans un solvant d'extraction, est suffisante pour atteindre un équilibre isotopique complet (Rodriguez-Gonzalez et al., 2005). Par conséquent, dans les conditions normales de préparation d'échantillon, l'échantillon, les spikes et le solvant d'extraction sont directement introduits dans le *digi*tube et l'extraction est démarrée après 6 minutes de repos.

Par rapport aux MRC, les échantillons EAT 2 sont lyophilisés mais non dégraissés. De plus, ils sont broyés moins finement ce qui diminue la surface de contact. Par conséquent, les conditions normales de mise en contrat entre les analytes et les spikes ont du être modifiées, selon la matrice étudiée. Les conditions de mise en contact appliquées sont les suivantes :

- Thon, lieu-colin : conditions normales.
- Crevette, moule, huître, coquilles Saint-Jacques : repos de 6 minutes dans un minimum de solvant (2 ml de TMAH) puis ajout du volume de solvant restant (3 ml) et extraction.
- Saumon : en raison de sa teneur en matière grasse, un repos de 60 min dans un minimum de solvant (2 ml de TMAH) est nécessaire, puis ajout des 3 ml restant et extraction.

Mercury speciation in seafood by double isotope dilution and gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry (GC-ICP-MS)

Mercury is a contaminant which is found in all compartments of the environment and to which human beings are directly exposed when eating food. Government agencies assess the safety of food products by using total mercury concentrations. However, its toxicity depends on the species absorbed (among which methylmercury is its most toxic form). Therefore, the analysis of speciation, i.e. detection and quantification of different chemical forms of this element, is of high interest. The main objective of this project was to develop and validate, under quality assurance, a sensitive and highly accurate method, based on the use of isotope dilution. This method will then be applied as a reference method by the agency for speciation analysis of mercury in seafood, in order to better assess risks to the consumer.

The first part of this work focused on the biogeochemical cycle of mercury and the state of art of the various methods of sample preparation, separation and quantification of Hg in biological matrices in order to make analytical choices. Thus, mercury compounds (methyl mercury and inorganic mercury) were determined by gas chromatography (GC) coupled with an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS) and quantified by isotope dilution.

The second part of the work was dedicated to the optimization of the method of sample preparation and the quantification technique. The work was made on different certified reference materials and showed that changes of the natural distribution of the sample could occur during the extraction step. Therefore, isotopic tracers had been added to the sample before this step. Mercury species were extracted by a solid-liquid extraction by using a digiPREP and derivated by propylation using tétrapropylborate the sodium and a rotary agitation. Data were treated by simple and multiple isotope dilution. Achieved concentrations were similar for all analyzed matrices. Results showed that inter-species transformation hardly occurred during the analytical procedure. This was the reason why the use of two isotopic tracers for quantification by simple isotope dilution was kept. To end, the method was validated for the speciation of mercury in seafood, in respect with the French norms AFNOR NF V03-110 of 1998 and 2010.

Finally, the work ended with the applicability of the validated method for mercury speciation analysis in real biological samples and our participation in several inter-laboratory proficiency tests organized by the CSL-FAPAS on a sample of tuna and by the IRMM on the material IMEP-109 (lobster).

Keywords: methylmercury; speciation; seafood; GC-ICP-MS; isotope dilution; validation

Spéciation du mercure dans les produits de la pêche par double dilution isotopique et chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à plasma induit (GC-ICP-MS)

Le mercure est un contaminant présent dans l'ensemble des compartiments de l'environnement et l'homme y est directement exposé via l'alimentation. Actuellement, les organismes gouvernementaux évaluent la sécurité des produits alimentaires en se basant essentiellement sur la concentration totale de cet élément. Cependant, la toxicité du mercure dépend, entre autre, de l'espèce absorbée (dont le méthylmercure, sa forme la plus toxique). Par conséquent, l'analyse de spéciation, c'est à dire la détection et quantification des différentes formes chimiques de cet élément, présente un intérêt croissant. Le principal objectif de ce projet a donc été de développer et de valider, sous assurance qualité, une méthode sensible et d'une grande exactitude, basée sur l'utilisation de la dilution isotopique. Elle sera par la suite appliquée comme méthode de référence par l'agence pour l'analyse en spéciation du mercure dans les produits de la pêche afin de permettre une meilleure évaluation des risques encourus par le consommateur.

La première partie de ce travail a porté sur l'étude du cycle biogéochimique du mercure et de l'état de l'art des diverses méthodes de préparation de l'échantillon, de séparation et de quantification du Hg dans les matrices biologiques, afin d'émettre des choix analytiques. Ainsi, les principaux composés mercuriels susceptibles d'être retrouvés dans les produits de la pêche (le méthylmercure et le mercure inorganique) ont été déterminés par couplage GC-ICP-MS et une quantification par dilution isotopique.

La seconde partie des travaux a été consacrée à l'optimisation de la méthode de préparation des échantillons et de la technique de quantification. Ces travaux sur différents matériaux de référence certifiés ont montré que des modifications de la distribution naturelle de l'échantillon pouvaient survenir dès l'étape d'extraction, préconisant un marquage isotopique avant extraction solide-liquide par digiPREP des espèces mercurielles et dérivation par propylation par le tétrapropylborate de sodium et agitation rotative. Les résultats expérimentaux ont été traités par dilution isotopique simple et multiple. Les teneurs obtenues ont été similaires, pour l'ensemble des matrices analysées, montrant que peu ou pas de transformation inter-espèces surviennent au cours de la procédure analytique. Une quantification par double marquage isotopique et dilution isotopique simple a donc été conservée. L'évaluation des critères analytique a démontré que la méthode est validée pour la spéciation du mercure dans les produits de la pêche, selon les normes françaises AFNOR NF V03-110 de 1998 et de 2010.

La dernière partie des travaux a porté sur l'application de la méthode validée à la spéciation du mercure dans des échantillons biologiques réels, ainsi qu'à la participation à plusieurs essais interlaboratoires d'aptitudes organisés par le CSL-FAPAS sur un échantillon de thon en conserve et par l'IRMM sur le matériau IMEP-109 de homard.

Mots clés : méthylmercure ; spéciation ; produits de la pêche ; GC-ICP-MS ; dilution isotopique ; validation