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

N°: 2012 AGPT 0030

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

Axelle LEUFROY

le 2 avril 2012

Spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche par couplage HPLC/ICP-MS. Estimation de sa bioaccessibilité en ligne et applications à d'autres éléments traces métalliques d'intérêt

Directeurs de thèse : Docteur **Thierry GUERIN et** Professeur **Diane BEAUCHEMIN**
Co-encadrement de la thèse : Docteur **Laurent NOËL**

Jury :

Pr. Valérie CAMEL,	Professeur, AgroParisTech, Paris, France	Président
Dr. Jean-Claude AMIARD,	Directeur de Recherche, CNRS, Université de Nantes, France	Rapporteur
Pr. José Luis TODOLI,	Professeur, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, University of Alicante, Spain	Rapporteur
Pr. Diane BEAUCHEMIN,	Professeur, Department of Chemistry, Queen's University, Kingston, ON, Canada	Examinateur
Dr. Thierry GUERIN,	Chargé de Recherche, ANSES, LSA - CIME, Maisons Alfort, France	Examinateur
Dr Laurent NOEL,	Ingénieur de Recherche, ANSES, LSA - CIME, Maisons Alfort, France	Invité

ANSES, Laboratoire de sécurité des Aliments, Unité CIME
23 avenue du Général Leclerc – 94706 Maisons-Alfort

N°: 2012 AGPT 0030

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

Axelle LEUFROY

le 2 avril 2012

Spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche par couplage HPLC/ICP-MS. Estimation de sa bioaccessibilité en ligne et applications à d'autres éléments traces métalliques d'intérêt

Directeurs de thèse : Docteur **Thierry GUERIN et** Professeur **Diane BEAUCHEMIN**

Co-encadrement de la thèse : Docteur **Laurent NOËL**

Jury :

Pr. Valérie CAMEL,	Professeur, AgroParisTech, Paris, France	Président
Dr. Jean-Claude AMIARD,	Directeur de Recherche, CNRS, Université de Nantes, France	Rapporteur
Pr. José Luis TODOLI,	Professeur, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Sciences, University of Alicante, Spain	Rapporteur
Pr. Diane BEAUCHEMIN,	Professeur, Department of Chemistry, Queen's University, Kingston, ON, Canada	Examinateur
Dr. Thierry GUERIN,	Chargé de Recherche, ANSES, LSA - CIME, Maisons Alfort, France	Examinateur
Dr Laurent NOEL,	Ingénieur de Recherche, ANSES, LSA - CIME, Maisons Alfort, France	Invité

ANSES, Laboratoire de sécurité des Aliments, Unité CIME
23 avenue du Général Leclerc – 94706 Maisons-Alfort

À mon père,

À ma mère.

Remerciements

L’ensemble de ces travaux a été réalisé dans l’unité des contaminants inorganiques et minéraux de l’environnement (CIME) au sein du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l’Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), à Maisons-Alfort. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Laurent Laloux pour m’avoir accueilli pendant ces trois années au sein de son laboratoire.

J’adresse mes plus sincères remerciements aux membres du jury : Valérie Camel qui a accepté de présider ce jury de thèse, ainsi que Jean-Claude Amiard et José Luis Todoli qui m’ont fait l’honneur d’évaluer ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance aux personnes qui m’ont encadrée tout au long de ce projet : mes co-directeurs de thèse Thierry Guérin et Diane Beauchemin pour votre confiance et votre investissement tout au long de ce parcours, et Laurent Noël pour ta disponibilité, tes conseils avisés ainsi que ton soutien et tes encouragements tout au long de ces trois années.

Je souhaite également remercier l’ensemble de mes collègues de l’unité CIME. Rachida Chekri pour ton aide et ta disponibilité, Christian Testu pour ta bonne humeur et ton humour, Claude Chafey pour ta gentillesse et nos nombreux échanges botaniques, Christelle Vastel pour ton dynamisme et ta sympathie, Stéphanie Clémens pour ta patience et nos discussions sur les lombrics et enfin, Sandrine Millour, mon amie, pour ta sympathie, ta complicité, et sans qui le projet « nono » n’aurait pu aboutir. Merci à tous pour tous les supers moments passés, j’ai eu énormément de plaisir à travailler avec vous.

Je n’oublie pas non plus mon prédécesseur, Vincent Dufailly, pour tes conseils, et qui a su se rendre disponible quand cela était nécessaire.

Merci également à mes autres collègues de l’ANSES, des équipes CAT, du LERPAZ, du PAFT et les informaticiens.

Du fond du cœur, je remercie les personnes qui m’ont aidée et soutenue durant ces trois années. Merci à mes amis, pour ces agréables moments passés à vos cotés à décompresser, que ce

soit lors des parties de « Guitar Hero », de « Cranium », ou bien encore lors des « soirées kiz », et un merci particulier à Naïke pour ton soutien et ton amitié, avec toute mon affection.

Enfin, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à ma maman, pour ton amour, ta confiance, et ton soutien car tout ceci n'aurait pas été possible sans toi. Merci de croire en moi.

Table des matières

REMERCIEMENTS **1**

TABLE DES MATIÈRES **3**

LISTE DES FIGURES **7**

LISTE DES TABLEAUX **8**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **10**

ARTICLES ET COMMUNICATIONS **14**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **17**

PREMIÈRE PARTIE. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE **19**

I. Généralités **20**

I.1. Propriétés 20

I.2. Les différentes formes d'arsenic 21

I.2.a. Les formes inorganiques 23

I.2.b. Les formes organiques 23

I.2.b.i. L'arsénobétaïne *23*

I.2.b.ii. Les espèces méthylées *23*

I.2.b.iii. L'arsénocholine *24*

I.2.b.iv. Les arsénosucres *24*

I.2.b.v. Les arsénolipides *24*

I.3. Le cycle de l'arsenic 24

I.3.a. Les sources d'émission de l'arsenic 25

I.3.a.i. Les sources naturelles (Mandal et Suzuki 2002) *25*

I.3.a.ii. Les sources anthropiques *26*

I.3.b. L'arsenic dans les différents compartiments de l'environnement 27

I.3.b.i. L'arsenic dans les sols *27*

I.3.b.ii. L'arsenic dans les compartiments aquatiques *28*

I.3.b.iii. L'arsenic dans l'air *28*

I.3.b.iv. L'arsenic dans les organismes vivants *29*

I.4. Toxicologie de l'arsenic 30

I.4.a. Devenir de l'arsenic dans l'organisme 30

I.4.a.i. Arsenic organique *31*

I.4.b. Arsenic inorganique 32
I.4.b.i. Toxicité aiguë *32*
I.4.b.ii. Toxicité chronique *32*
I.4.c. Valeurs toxicologiques de référence 35
I.5. Exposition humaine 38

II. Spéciation de l'arsenic : état de l'art 39
II.1. Extraction des composés arséniés 39
II.1.a. Extraction liquide solide (SLE) 42
II.1.b. Extraction assistée par micro-ondes 47
II.1.c. Extraction accélérée par solvant (ASE) 52
II.1.d. Extraction enzymatique 53
II.2. Méthodes de séparation des espèces arséniées 55
II.2.a. Séparation par chromatographie liquide (LC) 56
II.2.a.i. Chromatographie d'échange d'ions *56*
II.2.a.ii. Chromatographie en phase inverse *67*
II.2.b. Électrophorèse capillaire (CE) 69
II.3. Choix analytiques retenus 70

III. Bioaccessibilité de l'arsenic et d'autres éléments traces d'intérêt dans les aliments : état de l'art 71
III.1. Biodisponibilité et bioaccessibilité 71
III.2. Choix analytiques retenus 82

DEUXIÈME PARTIE. MÉTHODE DE SPÉCIATION DE L'ARSENIC DANS LES PRODUITS DE LA PÊCHE : EXTRACTION ASSISTÉE PAR MICRO-ONDES ET ANALYSE PAR COUPLAGE HPLC/ICP-MS 83

I. Introduction 84

II. Conditions expérimentales 85
II.1. Extraction assistée par micro-ondes (MAE) 85
II.1.a. Principe de la MAE 85
II.1.b. Préparation des échantillons 85
II.2. Couplage HPLC-ICP-MS 86
II.2.a. Séparation 86
II.2.a.i. Séparation des espèces par chromatographie d'échange d'anions *86*
II.2.b. Détection par ICP-MS 87
II.2.b.i. Principe général *87*
II.2.b.ii. Quantification de l'arsenic total *88*
II.2.b.iii. Couplage HPLC-ICP-MS *89*

III. Validation et applications de la méthode de spéciation 90
III.1. Résultats expérimentaux 90

III.2. Validation de la méthode 91
III.2.a. Plan A 91
III.2.a.i. Étalonnage *91*
III.2.a.ii. Limites de détection et de quantification *92*
III.2.b. Plan B 94
III.2.c. Plan C 96
III.2.c.i. Justesse *96*
III.2.c.ii. Fidélité en termes de répétabilité *97*
III.2.d. Plan D 98
III.2.e. Conclusion de la validation 99
III.2.f. Mise en place de contrôles qualité internes (CQI) 100
III.2.g. Comparaison des résultats avec la littérature 103
III.3. Applications de la méthode de spéciation 106
III.3.a. Contrôles qualité externes (CQE) 106
III.3.b. Certification d'un matériau de référence 109
III.3.c. Données d'occurrence issues de l'EAT 2 109

IV. Conclusions **122**

TROISIÈME PARTIE. DÉTERMINATION DE LA BIOACCESSIBILITÉ DE L'ARSENIC DANS LES PRODUITS DE LA PÊCHE : LIXIVIATION EN CONTINU ET SPÉCIATION PAR COUPLAGE HPLC/ICP-MS **123**

I. Introduction **124**

II. Lixiviation en continu et spéciation de l'arsenic par couplage HPLC/ICP-MS **124**
II.1. Conditions expérimentales 124
II.1.a. Instrumentation 124
II.1.b. Méthodologie 124
II.1.c. Lixiviation en ligne 126
II.1.d. Quantification des espèces arséniées dans les lixiviats 126
II.1.e. Vérification du bilan en masse 127
II.1.f. Optimisation du débit de nébulisation de l'ICP 127
II.2. Résultats expérimentaux et discussion (Article II) 129

III. Application de la lixiviation en continu à d'autres éléments d'intérêt **141**
III.1. Introduction 141
III.2. Résultats expérimentaux (Article III) 142

IV. Conclusions **154**

QUATRIÈME PARTIE : QUALITÉ EN RECHERCHE **157**

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES **162**

BIBLIOGRAPHIE **165**

Liste des figures

Figure 1. Cycle de l'arsenic (source : Mukhopadhyay *et al.,* (2002)) 25
Figure 2. L'orpiment (source : http://www.mediatheque.grand-troyes.fr/webmat2/archives/_/nv/enluminure/enlu12.htm) 25
Figure 3. Schéma du métabolisme de l'arsenic inorganique (source INERIS (2010)) 31
Figure 4. La « maladie des pieds noirs » (Source : http://www.betterlifelabs.org/overview05.html) 34
Figure 5. pKa et formes chimiques prédominantes des différentes espèces d'arsenic selon le pH (d'après Suner *et al.,* (2001)) 87
Figure 6. Représentation schématique d' ICP-MS (source : http://iramis.cea.fr/Images/astImg/348_2.gif) 87
Figure 7. Chromatogramme d'une solution étalon de 7 espèces d'As (2 µg/L en As(III), MA, DMA, As(V), TMAO et AsC et 6 µg/L en AsB) obtenu dans les conditions chromatographiques données 90
Figure 8. Étude de la spécificité 95
Figure 9. Justesse estimée sur chacune des espèces arséniées 97
Figure 10. Cartes de contrôle du BCR 627 certifié en DMA (0,150 mg/kg) et en AsB (3,9 mg/kg) 102
Figure 11. Résultats obtenus lors de nos participations à différents essais interlaboratoires 107
Figure 12. Schéma du dispositif de lixiviation en ligne 125
Figure 13. Comparaison des résultats obtenus en fonction du débit de nébulisation pour un échantillon de crevette et un échantillon de moule. 128

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques de l'arsenic (Carmalt et Norman 1998) 20
Tableau 2. Noms, abréviations, et structures chimiques des principales espèces d'arsenic (D'après Francesconi et Kuehnelt (2004)) 22
Tableau 3. Sous-secteurs prépondérant des émissions atmosphériques d'arsenic en 2009 (d'après (CITEPA 2011)) 29
Tableau 4. Doses létales des différents composés arséniés chez la souris (d'après Hughes (2002)) 30
Tableau 5. Valeurs toxicologiques de référence 37
Tableau 6. Matériaux de référence certifiés en arsenic total et en espèces d'arsenic dans les produits de la pêche (mg/kg) 41
Tableau 7. Récapitulatif des méthodes d'extraction liquide-solide par agitation mécanique 43
Tableau 8. Récapitulatif des méthodes d'extraction liquide-solide par ultrasons 45
Tableau 9. Récapitulatif des méthodes d'extraction par soxhlet 46
Tableau 10. Récapitulatif des méthodes d'extraction assistée par micro-ondes 49
Tableau 11. Récapitulatif des méthodes d'extraction par ASE 52
Tableau 12. Récapitulatif des méthodes d'extraction enzymatiques 54
Tableau 13. Récapitulatif des séparations par échange de cations 58
Tableau 14. Récapitulatif des séparations par échange d'anions 61
Tableau 15. Récapitulatif des séparations en phase inverse 68
Tableau 16. Récapitulatif des séparations par électrophorèse capillaire 69
Tableau 17. Études de bioaccessibilité de l'arsenic dans les poissons et autres produits de la pêche 74
Tableau 18. Études de bioaccessibilité des autres éléments dans les poissons et autres produits de la pêche 78
Tableau 19. Programme MAE 86
Tableau 20. Paramètres chromatographiques et d'ICP-MS 89
Tableau 21. Étalonnage et test de linéarité 92
Tableau 22. Évaluation des LD et LQ (n = 21) 93
Tableau 23. Vérification des LQ (n = 10) 94
Tableau 24. Vérification de la spécificité 96
Tableau 25. Répétabilité et stabilité de la fidélité 98
Tableau 26. Estimation de la reproductibilité 99

Tableau 27. Teneurs observées dans la littérature dans les principaux MRC de produits de la pêche (mg/kg) 104
Tableau 28. Teneurs observées dans la littérature dans un MRC de riz 106
Tableau 29. Résumé des différents essais interlaboratoires 108
Tableau 30. Teneurs en Asi et DMA mesurées dans l'ERM BC211 (µg/g) 109

Liste des abréviations

$(NH_4)_2CO_3$: Carbonate d'ammonium

3-AHPA : Acide 3-amino 4-hydroxyphenyl arsenic

3-AHPAA : Acide 3-Amino-4-hydroxyphenylarsonique

4-HPAA : Acide 4-hydroxyphenylarsonique

AAS : Atomic Absorption Spectrometry (Spectrométrie d'absorption atomique)

ACN : Acétonitrile

AFNOR : Agence Française de NORmalisation

AFS : Atomic Fluorescence Spectrometry (Spectrométrie de fluorescence atomique)

ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

As(III) : Arsénite

As(V) : Arséniate

AsB : Arsénobétaïne

AsC : Arsénocholine

ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BCR : Bureau Communautaire de Référence

BDSA : Acide benzène 1,2 disulfonique

BMDL : Benchmark Dose Limit

$C_4H_6O_6$: Acide 2,3-dihydroxybutanedioïque (Acide tartrique)

C_5H_5N : Pyridine

CALIPSO : Étude des Consommations ALimentaires de produits de la mer et Imprégnations aux éléments traces, PolluantS et Oméga 3

$CHCl_3$: Chloroforme

$CH_2(COOH)_2$: Acide maloniqueAcide 1, 3 propanedioïque (Acide malonique)

CH_3COOH/CH_3COO^- : Acide éthanoïque (Acide acétique/ion acétate)

CIME : Unité **«** Contaminants Inorganiques et minéraux de l'Environnement »

CQI : Contrôle Qualité Interne

DHTP : Dose Hebdomadaire Tolérable Provisoire

DMA : Acide diméthylarsinique

EAT 2 : Deuxième Étude de l'Alimentation Totale

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

EFSA : European Food Safety Agency (Agence européenne de sécurité alimentaire)

ESI-MS-MS : Electrospray Ionization Mass Spectrometry

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

H_2O : Eau

HCOOH : Acide formique

HNO_3 : Acide nitrique

H_3PO_4 : Acide phosphorique

IARC : International Agency for Research on Cancer (Agence internationale de recherche sur le cancer)

ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif)

IEC : Ion Exchange Chromatography (chromatographie d'échange d'ions)

INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des RISques

INVS : Institut National deVeille Sanitaire

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

JECFA : Joint FAO/WHO Expert Comittee on Food Additives

K_2SO_4 : Sulfate de potassium

KH_2PO_4 : Dihydrogénophosphate de potassium

LOAEL : Lowest Observed Adverse Effect Level

LSA : Laboratoire de Sécurité des Aliments (de Maisons-Alfort)

MA : Acide monométhylarsonique

MAE : Microwave Assisted Extraction (Extraction assistée par micro-ondes)

MeOH : Méthanol

MRC : Matériau de Référence Certifié

MRL : Minimal Risk Level

NaOH : Hydroxyde de sodium

Na_2SO_4 : Sulfate de sodium

$NaC_4H_9SO_3$: 1-Butanesulfonate de sodium

$NaC_6H_{13}SO_3$: 1-Hexanesulfonate de sodium

$NH_4H_2PO_4$: Dihydrogénophosphate d'ammonium

NH_4HCO_3 : Bicarbonate d'ammonium

NH_4NO_3 : Nitrate d'ammonium

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

o-ASA : Acide o-Arsanilique

p-ASA : Acide p-arsanilique

SLE : Solid Liquid Extraction (Extraction liquide / solide)

RfD : Reference Dose (Dose de référence)

ROX : Roxarsone

rpm : Rotations par minute

TBA : Hydroxyde de tétrabutylammonium

TDI : Tolerable Daily Intake

TEAH : Hydroxyde de tétraéthylammonium

TMAH : Hydroxyde de tétraméthylammonium

TMAO : Oxyde de triméthylarsine

TFA : Trifluoroacetic acid (acide trifluoroacétique)

TETRA : Ion tétraméthylarsonium

US EPA : United States Environmental Protection Agency (Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis)

VTR : Valeur Toxicologique de Référence

WHO : World Health Organisation

Articles et communications

Articles

Article I. Leufroy A. Noël L., Beauchemin D., Guérin T., (2011). "Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled with inductively plasma mass spectrometry following microwave assisted extraction."Talanta, 83, 770-779. 111

Article II. Leufroy A. Noël L., Beauchemin D., Guérin T. (2012). "Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method" Analytical & Bioanalytical Chemistry, 402, 2849-2859. 129

Article III. Leufroy A., Noël L., Dufailly V., Beauchemin D., Guérin T. "Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood", Food Chemistry, 135, 623-633. 142

Communications orales

Leufroy A., Noël L., Beauchemin D., Guérin T. " Bio-accessibility of trace elements in seafood as determined by a simple continuous on-line leaching method combined to inductively coupled plasma mass spectrometry ". 57th ICASS International Conference on Analytical Sciences and Spectroscopy, August 28-31, 2011. Toronto - Canada. **(Invited presentation)**

Leufroy A., Noël L., Beauchemin D., Guérin T. " Bio-accessibility of arsenic species and of toxic and non-toxic elements in seafood by combination of a simple continuous on-line leaching method and inductively coupled plasma mass spectrometry". 13th Workshop on Progress in Speciation for Environmental Analytical Chemistry - TraceSpec 2011, May 18-20, 2011. Pau - France.

Leufroy A., Noël L., Beauchemin D., Guérin T. "Development of a simple digestion method for assessing the bio-accessibility of arsenic in seafood using on-line leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry". 2011 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, January 30 - February 4, 2011. Zaragoza - Spain.

Beauchemin D., **Leufroy A.**, Dufailly V., Noël L. and Guérin T., "Towards a robust yet simple method for risk assessment of arsenic in seafood", 56th International Conference on Analytical Sciences and Spectroscopy, August 16-18, 2010, Edmonton, Alberta, Canada. **(Invited presentation)**

Leufroy A., Noël L.,Sirot V., Leblanc J-C., Beauchemin D. and Guérin T., "Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma – mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and dietary exposure", EnviroAnalysis 2010, May 9-12, 2010, Toronto, Ontario, Canada.

Communications affichées

Leufroy A., Noël L., Beauchemin D., Guérin T., “Improved continuous leaching method for assessing the bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry”. 2012 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, January 9 - 14, 2012. Tucson – Arizona, USA. **(JAAS Poster Prize)**.

Leufroy A., Noël L., Leblanc J-C., Beauchemin D., Guérin T., "Bio-accessibility of toxic and non toxic elements in seafood by combination of a simple continuous on-line leaching method and inductively coupled plasma mass spectrometry ". 7th International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications - IMA 2011, September 18-22, 2011, Chania, Crete, Greece.

Leufroy A., Noël L., Leblanc J-C., Beauchemin D., Guérin T., "Speciation of arsenic in fish and other seafood by IEC/ICP-MS following microwave-assisted extraction: method validation and occurrence data". 2010 Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, January 4-9, 2010, Fort Myers, Florida, USA.

Leufroy A., Sirot V., Leblanc J-C., Noël L., Beauchemin D., Guérin T., "Speciation of arsenic in seafood by IEC/ICP-MS following microwave assisted extraction: method validation". 4th International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, November 4-6, 2009, Prague, Czech Republic.

Introduction générale

« Rien n'est poison, tout est poison : seule la dose fait le poison », Theophrastus Bombastus von Hohenheim, dit Paracelse. Ce vieil adage illustre bien le caractère ambigu de l'arsenic : en effet, souvent employé comme poison comme en témoignent de nombreuses références historiques (la théorie de l'empoisonnement de Napoléon Bonaparte, l'affaire Marie Besnard, François Ier de Medicis), littéraires (Madame Bovary) ou cinématographiques (Arsenic et vieilles dentelles), il possède également certains effets bénéfiques déjà bien connus (traitement de certains cancers).

L'arsenic est naturellement présent dans tous les compartiments de l'environnement sous forme de composés organiques et inorganiques très divers. En particulier, les produits de la pêche sont connus pour en contenir de fortes quantités, ce qui peut représenter un risque potentiel pour la consommation humaine. La caractérisation du risque pour la santé constitue une des étapes dans la démarche d'évaluation des risques sanitaires. Cela nécessite une connaissance approfondie des effets du contaminant sur le fonctionnement de l'organisme et des doses à partir desquelles il représente un danger, ainsi qu'une exposition quantifiée de l'exposition. Cependant, alors que la toxicité de l'arsenic dépend principalement de sa forme chimique, les agences gouvernementales évaluent généralement les risques liés à la présence d'arsenic dans les aliments en analysant uniquement l'arsenic élémentaire, sans prendre en compte les différentes formes présentes, et donc la réelle toxicité de l'aliment. Afin de bénéficier d'une meilleure évaluation des risques, il est important non seulement de disposer d'une méthode qui permet de mesurer la teneur des différentes espèces d'arsenic en plus de l'arsenic total dans les produits de la pêche, mais également de pouvoir estimer sa bioaccessibilité, c'est-à-dire dans quelle mesure il va être libéré dans l'organisme lors de la digestion.

L'objectif principal de ces travaux a donc été, dans un premier temps, de valider une méthode d'analyse de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche et de l'utiliser pour collecter des données d'occurrence sur différents échantillons représentatifs, puis d'estimer la bioaccessibilité de l'arsenic élémentaire et de ses espèces sur ces produits de la pêche.

La première partie de ce mémoire présente des informations générales sur les propriétés de l'arsenic, son occurrence dans les différents compartiments de l'environnement et sa toxicité, et une étude bibliographique sur les techniques de spéciation de l'arsenic dans les matrices alimentaires et sur les différentes approches existantes pour l'étude de la bioaccessibilité de l'arsenic et de ses espèces ainsi que des autres éléments traces métalliques d'intérêt.

La deuxième partie est consacrée à la méthode d'analyse de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche mise en place par extraction assistée par micro-ondes (MAE), séparation par chromatographie d'échange d'ions (IEC) et détection par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS). L'évaluation des performances analytiques de la méthode est présentée, ainsi que les contrôles qualité internes et externes mis en place et les différentes applications, notamment les données de spéciation collectées par l'analyse des produits de la pêche les plus consommés par la population française (Article I).

La troisième partie porte sur l'évaluation de la bioaccessibilité de l'arsenic total et de ses différentes formes dans les produits de la pêche à l'aide d'une méthode de lixiviation en ligne. Cette évaluation a été réalisée par la mise en place d'une méthode *in vitro* de lixiviation en ligne couplée à la méthode de spéciation de l'arsenic présentée dans la partie précédente (Article II). Cette méthode de lixiviation en ligne a également été utilisée sur ces mêmes produits de la pêche pour estimer la bioaccessibilité d'autres éléments d'intérêt (Article III).

L'ensemble de ces travaux a été réalisé dans l'unité des contaminants inorganiques et minéraux de l'environnement (CIME) au Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA) de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire - alimentation, environnement, travail (ANSES). Ils s'intègrent dans le système de gestion de la qualité en recherche en place au sein de l'agence. Cette démarche permet de garantir la bonne conduite de la recherche et ainsi de donner confiance dans les résultats de la recherche. Le rapport qualité évaluant ces travaux de thèse constitue la quatrième et dernière partie de ce mémoire.

Première partie. Étude bibliographique

I. Généralités

I.1. Propriétés

L'arsenic est un élément naturellement présent dans l'environnement puisque qu'il occupe le 20ème rang dans l'ordre d'abondance des éléments de la croûte terrestre. On pense devoir sa découverte à Albert Le Grand, au XIIIème siècle, qui chauffa du savon avec de l'orpiment, minéral jaune (pigment) composé de trisulfure d'arsenic. Le nom arsenic dérive du terme grec *arsenikon*, qui signifie « qui dompte le mâle » en lien avec sa forte toxicité.

L'arsenic est considéré comme un métalloïde en raison de ses propriétés à la fois de métal et de non métal. Il appartient au groupe VA de la classification périodique de Mendeleïev, comme l'azote et le phosphore, et possède par conséquent des propriétés chimiques similaires à ces deux éléments essentiels. Il ne possède qu'un seul isotope stable. À l'état pur, il existe sous deux formes allotropiques, une poudre jaune et un métal gris. Sa chimie est basée sur les propriétés de ses oxydes et leur capacité à former des sels avec de nombreux cations. Par ailleurs, les possibilités de former des liaisons covalentes stables avec l'hydrogène et le carbone sont à l'origine d'une grande variété de composés organiques (Cullen et Reimer 1989; Francesconi et Kuehnelt 2004). Néanmoins, dans l'environnement, il est fréquemment combiné à d'autres éléments comme l'oxygène, le chlore, le soufre, et forme dans ce cas des composés inorganiques. Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'arsenic sont regroupées dans le Tableau 1.

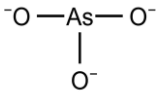
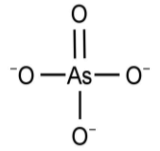
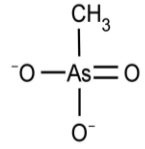
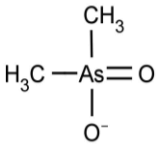
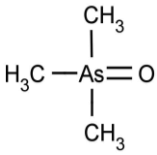
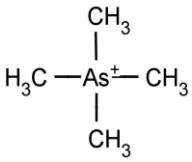
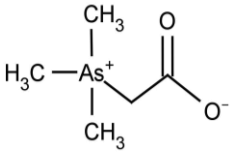
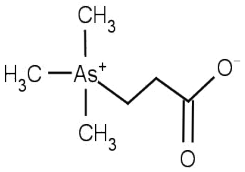
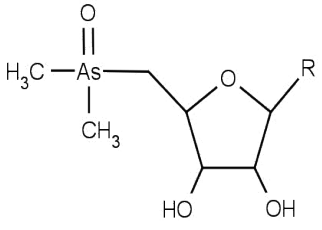
Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques de l'arsenic (Carmalt et Norman 1998)

Symbole	As
Numéro atomique	33
Configuration électronique	[Ar] $3d^{10}$ $4s^2$ $4p^3$
Groupe, période, bloc	VA, 4, p
Masse atomique	74,9216
Rayon atomique	115 pm
États d'oxydation	-III, 0, +III, +V
Électronégativité (Pauling)	2,18
Température de fusion	817°C
Point d'ébullition	613°C
Densité	5,73 g/cm^3 (gris), 1,97 g/cm^3 (jaune)

I.2. Les différentes formes d'arsenic

Plus de trente espèces d'arsenic ont déjà été identifiées dans l'environnement, leur présence et leur répartition dépendant des conditions du milieu (conditions d'oxydoréduction, pH, cinétiques de réactions). Les noms, abréviations et structures chimiques des principales espèces organiques et inorganiques retrouvées dans les produits de la pêche sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Noms, abréviations, et structures chimiques des principales espèces d'arsenic (D'après Francesconi et Kuehnelt (2004))

Nom	Abréviation	Structure chimique
Arsénite	As(III)	
Arséniate	As(V)	
Acide monométhylarsonique	MA	
Acide diméthylarsinique	DMA	
Oxyde de triméthylarsine	TMAO	
Ion tétraméthylarsonium	TETRA	
Arsénobétaïne	AsB	
Triméthylarsiniopropionate	TMAP	
Arsénosucres		

I.2.a. Les formes inorganiques

Les espèces d'arsenic inorganique retrouvées dans l'environnement présentent des degrés d'oxydation de +III ou +V, et existent sous forme thio-complexées, ou sous forme anioniques arsénite (As(III)) et arséniate (As(V)). Les deux formes inorganiques As(III) et As(V) sont facilement inter-convertibles par réaction d'oxydoréduction, et sont donc souvent retrouvées ensemble, l'As(V) étant thermodynamiquement favorisé dans les conditions normales oxydantes (Cullen et Reimer 1989). Dans les organismes marins, leur quantité est souvent faible, inférieure à 10 % de l'arsenic total (Edmonds et Francesconi 1993; Schoof et Yager 2007).

I.2.b. Les formes organiques

I.2.b.i. L'arsénobétaïne

L'arsénobétaïne (AsB) est la forme majoritaire d'arsenic retrouvée dans les poissons et les crustacés, en représentant plus de 80 % de l'arsenic total présent. Cette espèce a également été récemment retrouvée dans des algues marines (Nischwitz et Pergantis 2005), même si elle reste difficile à mesurer en présence des arsénosucres (espèces dominante dans les algues) en raison de sa faible concentration.

I.2.b.ii. Les espèces méthylées

L'acide monométhylarsonique (MA), l'acide diméthylarsinique (DMA), l'oxyde de triméthylarsine (TMAO), et l'ion tétraméthylarsonium (TETRA) appartiennent au groupe des formes méthylées. Parmi ces espèces, les formes MA et DMA sont couramment retrouvées dans l'environnement, et sont toutes les deux des métabolites du schéma de biométhylation de l'arsenic présenté dans la Figure 1.

I.2.b.iii. L'arsénocholine

L'arsénocholine (AsC) est généralement présente chez les organismes marins, mais à l'état de trace. Elle est rapidement bio-transformée en AsB et a été présentée comme étant un précurseur de ce composé (Francesconi *et al.*, 1989).

I.2.b.iv. Les arsénosucres

Les arsénosucres sont les constituants arséniés majeurs des algues marines (2 - 50 mg/kg). Ces espèces ont également été retrouvées dans d'autres organismes marins qui se nourrissent d'algues, comme les moules, les palourdes et les huîtres (0,5 - 5 mg/kg) (Le *et al.*, 2004). Plus de vingt arsénosucres naturels ont été identifiés, formés pour la plupart par un dérivé diméthylarsinoyl et triméthylarsonium lié à un radical hydroxyl, sulfate, sulphonate, amino, ou glycérophosphoryl.

I.2.b.v.Les arsénolipides

Les arséno-lipides on fait l'objet d'un nombre limité d'études dans les organismes marins, à cause de leur faible teneur, leur difficulté à être isolés, et le manque de méthodes analytiques les concernant. La structure chimique des arséno-lipides a été déduite de la spéciation des fragments hydrosolubles de ces composés hydrolysés.

I.3. Le cycle de l'arsenic

L'arsenic est un élément ubiquiste présent dans tous les compartiments de l'environnement (Figure 1).

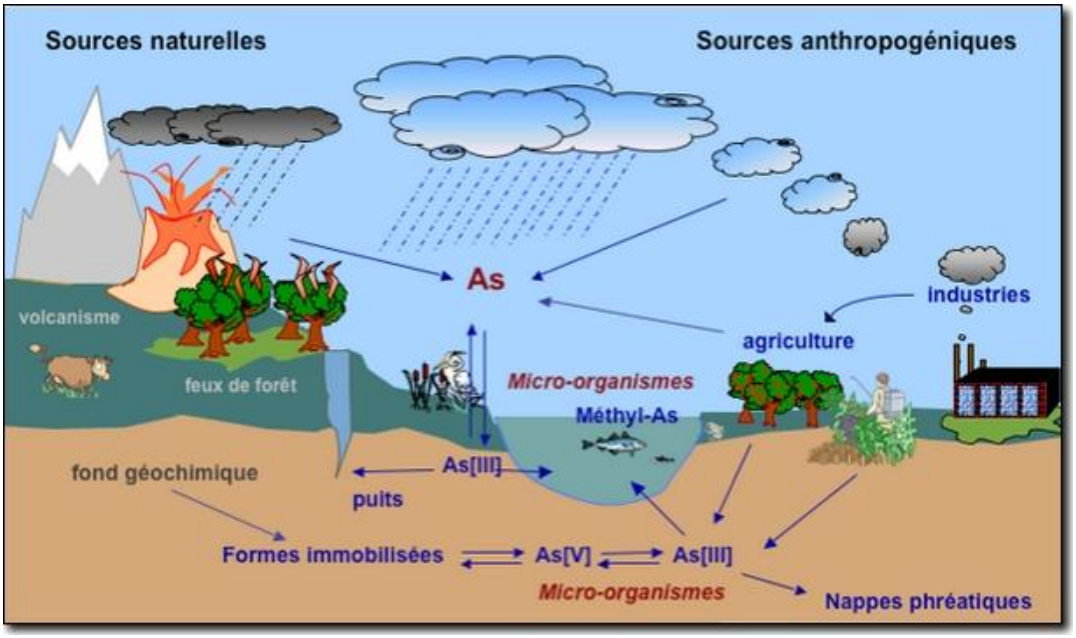


Figure 1. Cycle de l'arsenic (source : Mukhopadhyay *et al.*, (2002))

I.3.a. Les sources d'émission de l'arsenic

I.3.a.i. *Les sources naturelles (Mandal et Suzuki 2002)*

L'arsenic est un composant naturel de l'écorce terrestre avec une concentration dans la partie superficielle évaluée à 2 mg/kg, et pouvant atteindre localement 100 mg/kg voire 200 mg/kg dans les dépôts calcaires ou phosphatés et dans les schistes. On le trouve en proportions plus considérables dans les roches, où plus de 99 % de l'arsenic présent se trouve sous forme de minerais de cuivre, de zinc et de plomb, les plus importants étant l'arsénopyrite (FeAsS), le réalgar (As_4S_4), et l'orpiment (As_2S_3) (Figure 2).



Figure 2. L'orpiment (source : http://www.mediatheque.grand-troyes.fr/webmat2/archives/_/nv/enluminure/enlu12.htm)

L'érosion, les précipitations et le lessivage des sols entrainent une redistribution de l'arsenic vers les compartiments aquatiques sous forme dissoute ou particulaire. Certaines eaux issues de sols volcaniques peuvent contenir des teneurs atteignant 300 µg/L, mais plus généralement, l'arsenic dissous dans les eaux superficielles se trouve à des concentrations comprises entre 0,1 et 10 µg/L. Dans l'atmosphère, le flux d'arsenic est principalement causé par l'érosion éolienne et l'activité volcanique.

I.3.a.ii. Les sources anthropiques

La production mondiale d'arsenic en 2008 était estimée à 53 500 tonnes, dont 97 % sous forme de trioxyde d'arsenic (As_2O_3 = As(III)) (EFSA 2009). L'élément arsenic est produit par pyrolyse de l'arsénopyrite ou par grillage de sulfure puis réduction de l'oxyde formé avec du carbone. Le trioxyde d'arsenic est formé lors de la fusion du plomb ou du cuivre, par évaporation et oxydation dans l'air de l'arsenic combiné avec ces métaux (ATDSR 2007).

L'arsenic et ses composés sont utilisés dans de nombreux domaines :

- En agriculture, il entre dans la composition de nombreux pesticides, même si son utilisation a fortement diminué depuis l'essor des pesticides organochlorés et organophosphatés ;
- Dans l'industrie du bois pour la protection contre les insectes sous forme de complexe cuivre/chrome/arsenic (CCA) ;
- Dans l'industrie du verre pour favoriser la sortie des bulles d'air et comme agent décolorant ;
- Dans l'industrie des semi-conducteurs, pour la fabrication de piles photovoltaïques, de diodes électroluminescentes, de circuits intégrés ;
- Dans l'industrie pharmaceutique et vétérinaire, pour le traitement d'un type particulier de leucémie (ATDSR 2007), et il est également utilisé dans la fabrication d'antibiotiques pour l'élevage des volailles dans certains pays (Roxarsone (ROX), Nitrarsone (NIT), acide p-arsanilique (p-ASA) (Sánchez-Rodas *et al.*, 2006) ;
- Dans les industries métallurgiques, pour durcir le cuivre et le plomb antimoiné, pour la fabrication des munitions ;

- Dans l'industrie du cuir, pour la conservation des peaux.

I.3.b. L'arsenic dans les différents compartiments de l'environnement

I.3.b.i. L'arsenic dans les sols

Dans les sols, l'arsenic est présent principalement sous forme inorganique, l'As(V) étant majoritaire dans les conditions d'aération normale. La mobilité de l'arsenic est assez limitée, même si l'As(III) est reconnu pour être plus mobile que l'As(V) (Molénat *et al.,* 2000).

L'activité microbiologique peut conduire à des réactions de méthylation ou déméthylation, et également à des réactions d'oxydoréduction. Dans des conditions anaérobiques, il peut conduire jusqu'à la formation d'espèces volatiles comme l'arsine (AsH_3) (Mandal et Suzuki 2002). Dans des conditions réductrices, l'activité des micro-organismes peut conduire à la formation de composés organo-arséniés (MA, DMA, TMAO et TETRA).

Les concentrations en arsenic mesurées dans les sols sont très variables d'un site à l'autre, selon que l'origine soit naturelle ou due à l'activité humaine, et selon le type de roche. Les sols non contaminés contiennent entre 1 et 40 mg/kg d'arsenic, les plus faibles concentrations correspondant aux sols sablonneux et aux sols granitiques, et les plus fortes aux sols alluviaux. Les concentrations normales usuellement rencontrées sont généralement inférieures à 2 mg/kg, même si dans le cas d'anomalies géochimiques naturelles, cette concentration peut atteindre 1000 mg/kg (Laperche *et al.,* 2003). Les sites où les sols agricoles ont été traités avec des pesticides arséniés contiennent des quantités considérables d'arsenic. De même, certaines zones polluées par des activités industrielles, les sites miniers, les zones à proximité des fonderies, peuvent contenir des teneurs plus élevées en arsenic. Ainsi, une moyenne de 18,8 mg/kg a été mesurée près d'une manufacture de pesticides à Middleport (New York, États-Unis), et jusqu'à 333 mg/kg autour d'anciennes fonderies de cuivre à Anaconda (Montana, États-Unis) (ATDSR 2007). Dans les sédiments, la concentration en arsenic est généralement inférieure à 10 mg/kg, mais varie considérablement en fonction de la zone (Mandal et Suzuki 2002).

I.3.b.ii. L'arsenic dans les compartiments aquatiques

L'arsenic est présent naturellement à de faibles concentration dans l'eau. La mobilité et la répartition de l'arsenic dans les compartiments aquatiques dépend de sa forme chimique et des interactions avec la matière présente.

L'arsenic retrouvé dans l'eau peut provenir de la dissolution des sédiments sous l'action des micro-organismes, et est présent principalement sous forme inorganique (la forme chimique majoritaire thermodynamiquement stable étant l'ion arséniate), mais aussi sous forme organique (MA, DMA, TMAO) provenant de la méthylation de l'arsenic inorganique par les algues ou par la dégradation microbienne des composés organiques complexes (INERIS 2010).

Dans l'eau de mer, la concentration est généralement comprise entre 1 et 8 µg/L alors que dans les eaux douces, les concentrations normales en arsenic sont de l'ordre de 1 à 10 µg/L, et de 100 à 5000 µg/L dans les zones minières (Mandal et Suzuki 2002). Dans les eaux souterraines, les concentrations en arsenic sont généralement de l'ordre de 0,1 à 2 µg/L, mais peuvent atteindre 3 400 µg/L dans les régions volcaniques, et 48 000 µg/L dans des régions minières (EFSA 2009). En Inde et au Bangladesh, les concentrations élevées en arsenic dans les eaux souterraines (jusqu'à 3 700 µg/L) proviennent des sédiments riches en arsenic.

I.3.b.iii. L'arsenic dans l'air

Certains composés arséniés sont très volatils (arsines, composés organiques). L'arsenic présent dans l'air existe généralement sous forme d'un mélange particulaire d'arséniate et d'arsénite, les espèces organiques étant d'importance négligeable, sauf dans les zones où des quantités conséquentes de pesticides arséniés ont été utilisées (Mandal et Suzuki 2002). L'exposition à l'arsenic via l'air ambiant est généralement faible, (concentrations inférieures à 1 à 3 ng/m^3) même si elle peut être de l'ordre de 100 ng/m^3 dans les villes (Mandal et Suzuki 2002; EFSA 2009).

Les principales sources d'arsenic atmosphériques proviennent des fumées émanant des industries de production de trioxyde d'arsenic, de la combustion de produits fossiles, et de la combustion du bois traité avec du CCA.

La répartition des différents secteurs émetteurs d'arsenic est indiquée dans le Tableau 3.

Tableau 3. Sous-secteurs prépondérant des émissions atmosphériques d'arsenic en 2009 (d'après (CITEPA 2011))

Secteur	Part des émissions
Industrie manufacturière	53,3 %
Résidentiel/tertiaire	23,2 %
Transformation d'énergie	22,9 %
Agriculture/sylviculture Transport routier Transport (à l'exclusion du transport routier) Autres sources	< 1 %

I.3.b.iv. L'arsenic dans les organismes vivants

La bioaccumulation fait référence à l'accumulation nette d'une espèce chimique dans un organisme aquatique comme le résultat d'un apport depuis l'environnement (alimentation, eau, sédiments), tandis que la bioconcentration se réfère à un apport dû à l'eau seulement (EFSA 2009). Dans la chaîne alimentaire aquatique, la bioaccumulation ne semble pas être significative (EFSA 2009). La bioconcentration a lieu principalement dans les algues et les invertébrés marins inférieurs. Les poissons qui vivent dans les fonds marins sont exposés à de plus grandes quantité d'arsenic qui s'accumule dans les sédiments. L'arsenic s'accumule principalement dans l'exosquelette des invertébrés et dans le foie des poissons. Il n'y a pas de différence de concentrations selon les différentes espèces de poisson, qu'ils soient herbivore, insectivore ou carnivores (EFSA 2009). Parmi les animaux marins, l'arsenic est présent à des concentrations de 0,005 à 0,3 mg/kg dans les mollusques et peut atteindre parfois jusqu'à 100 mg/kg d'arsenic (Mandal et Suzuki 2002).

Chez les mammifères, l'arsenic s'accumule dans certains tissus ectodermiques comme les cheveux et les ongles (Mandal et Suzuki 2002). Les plantes terrestres peuvent accumuler l'arsenic depuis le sol par le flux hydrique, mais également par les feuilles, par l'absorption de l'arsenic en suspension dans l'air qui se dépose sur les feuilles (EFSA 2009). La quantité d'arsenic dans les plantes dépend de la quantité d'arsenic à laquelle elles sont exposées. Les plantes non contaminées contiennent environ 0,2 à 0,4 mg/kg d'arsenic (Kuehnelt *et al.*, 2001). Certaines espèces peuvent accumuler des teneurs conséquentes, en particulier le riz : d'après le rapport de l'EFSA, le riz et les produits à base de riz contiennent des teneurs moyennes en arsenic d'environ 0,142 et 0,166 mg/kg respectivement (EFSA 2009; INERIS 2010).

I.4. Toxicologie de l'arsenic

L'arsenic est un oligo-élément essentiel à la vie dont les besoins ont été évalués entre 10 et 20 µg/jour (Jacotot et Parco 1999; Laperche *et al.*, 2003). Cependant, à des fortes concentrations, il peut s'avérer néfaste pour les êtres vivants. La toxicité de l'arsenic dépend de sa forme chimique et de son degré d'oxydation (IARC 2004), l'arsenic trivalent étant généralement plus toxique que l'arsenic pentavalent. La dose létale d'arsenic inorganique chez l'Homme est estimée à 1-3 mg/kg/de poids corporel (Hughes 2002).

Les doses létales (LD_{50}) des espèces arséniées d'intérêt chez la souris sont répertoriées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Doses létales des différents composés arséniés chez la souris (d'après Hughes (2002))

Espèce arséniée	LD_{50} (mg As/kg)
As_2O_3	26
As(III)	8
As(V)	22
MA	916
DMA	648
AsB	> 4260
TMAO	5500

I.4.a. Devenir de l'arsenic dans l'organisme

Chez l'homme, l'absorption de l'arsenic se fait à 95 % par voie orale (INERIS 2010), l'absorption par inhalation et par voie cutanée étant beaucoup plus faible. L'absorption des composés arséniés dépend de la solubilité du composé considéré, ainsi que de la nature et de la composition du substrat avec lequel il est ingéré (aliment, sol, eau).

L'arsenic absorbé est fortement lié aux groupements SH des protéines plasmatiques et à l'hémoglobine et est distribué vers tous les organes, principalement au niveau du foie, des reins, des poumons, des muscles, de la peau, des phanères et des os (INERIS 2010), les concentrations les plus élevées étant retrouvées dans les os et les ongles, sauf en cas d'intoxication aiguë dans le foie et les reins (INERIS 2010).

Le métabolisme de l'arsenic se compose de réactions d'oxydoréduction (conversions entre l'As(III) et l'As(V)) et de réactions de méthylation comme le montre la Figure 3. Si l'arsenic est sous forme pentavalente, il va d'abord être réduit en arsenic trivalent. La méthylation qui conduit à la formation de MA, puis de DMA tend à rendre l'arsenic moins réactif et plus facilement éliminé (INERIS 2010).

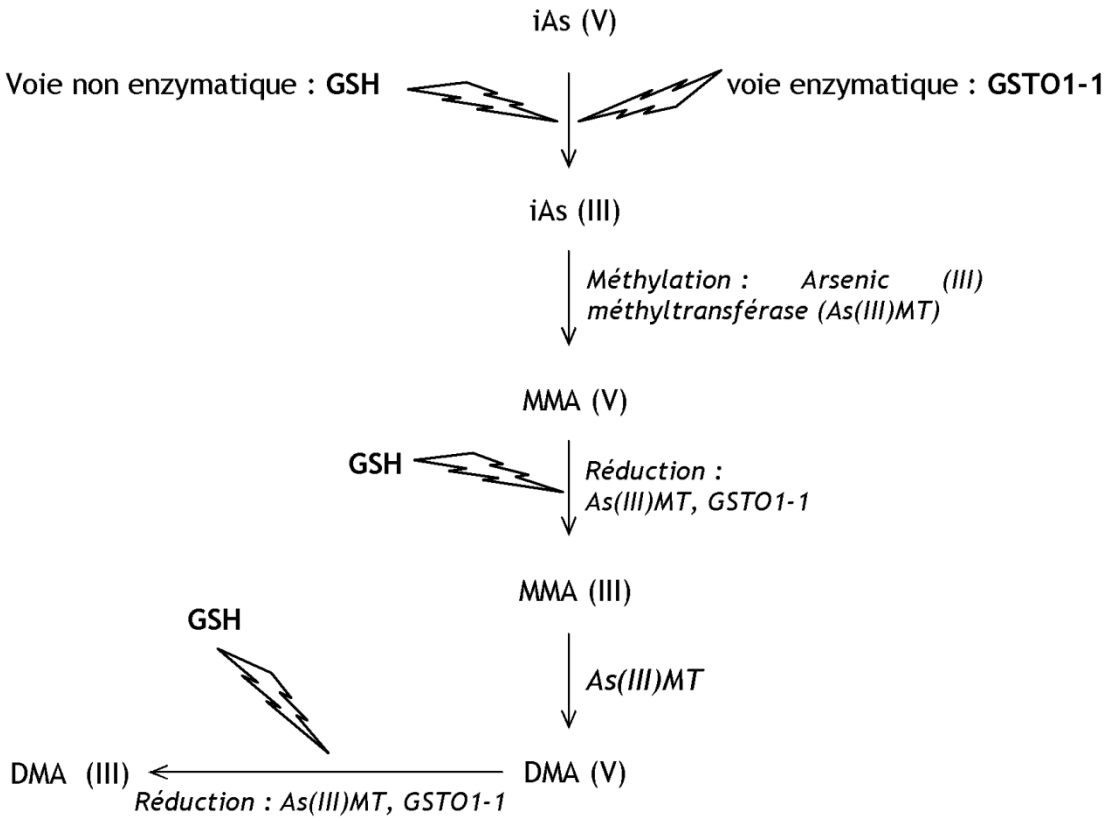


Figure 3. Schéma du métabolisme de l'arsenic inorganique (source INERIS (2010))

L'élimination de l'arsenic se fait principalement par voie urinaire, sous forme inchangée ou sous forme de métabolites méthylés (NRC). Les proportions des différentes formes excrétées dépendent de la forme chimique administrée, de la voie d'exposition, de la dose et varient selon les populations (INVS 2002; INERIS 2010). Le principal métabolite est en général le DMA (55 - 75 %), suivi de l'arsenic inorganique (10 - 30 %) et du MA (10 - 20 %) (INVS 2002).

I.4.a.i. Arsenic organique

Historiquement, la méthylation de l'arsenic inorganique est présentée comme un mécanisme de détoxification puisque les formes méthylées MA et DMA sont considérées comme moins toxiques que les formes inorganiques. Cependant, des travaux récents tendent à remettre en cause cette hypothèse en montrant que les formes trivalentes du MA et du DMA pourraient être plus toxiques que l'As(III) (Dopp *et al.*, 2004).

Yamamoto *et al.*, (1995) ont évalué les effets du DMA sur des composés cancérigènes en administrant différentes quantités de DMA à des rats et ont prouvé que le DMA agit comme un

promoteur de cancer de la vessie, du rein, du foie et de la thyroïde chez le rat. Dopp *et al.*, (2004) ont montré que le MA et le DMA trivalents induisent des effets cytotoxiques et génotoxiques plus importants que les formes pentavalentes en traitant des cellules de hamster avec différentes concentrations d'espèces arséniées et en observant au microscope les effets produits sur ces cellules.

I.4.b. Arsenic inorganique

I.4.b.i. Toxicité aiguë

Les effets aigus observés suite à l'ingestion d'arsenic inorganique surviennent rapidement dans les heures suivant l'ingestion et sont principalement gastro-intestinaux, ressemblant fortement aux symptômes du cholera (nausées, hémorragies gastro-intestinales, douleurs abdominales et diarrhées) (INERIS 2010). Ils sont fréquemment accompagnés d'une instabilité hémodynamique qui se traduit par une tachycardie sinusale d'une hypotension orthostatique (INERIS 2010), et d'une encéphalopathie aiguë. Dans les jours ou semaines qui suivent l'ingestion, d'autres effets peuvent se manifester, tels qu'une neuropathie périphérique conduisant à une atteinte motrice. 30 à 40 jours après l'ingestion, des lésions de la peau et des phanères peuvent être observées.

I.4.b.ii. Toxicité chronique

Effets cutanés

Les effets sur la peau et les muqueuses sont prédominants dans le cas d'intoxication chronique à l'arsenic. Les lésions les plus fréquentes associées à une intoxication chronique orale à l'arsenic sont caractérisées par une hyperkératose (en particulier de la paume des mains et de la plante des pieds) et une hyperpigmentation de la peau parsemée de zones hypo-pigmentées. Elles apparaissent en général à partir d'un niveau d'exposition chronique supérieur à 0,02 mg As/kg/jour, des niveaux d'exposition inférieurs à 0,01 mg As/kg/jour n'ayant généralement pas montré de lésions cutanées (ATDSR 2007).

Ces symptômes ont été observés dans différentes régions du monde où les teneurs en arsenic dans les eaux de boissons étaient élevées (Argentine, Bangladesh, Inde, Chili…) (IARC 2004), et

apparaissent à partir de 10 µg/L (INERIS 2010). A noter qu'en dessous de 1 µg/L, aucun effet toxique n'est mis en évidence.

Des effets sur la peau ont également été observés après une exposition par inhalation à l'arsenic inorganique, bien qu'ils ne constituent pas de diagnostic à une exposition à l'arsenic (INERIS 2010).

Un contact cutané direct avec des composés d'arsenic inorganique peuvent causer des irritations et des dermatoses, et peuvent conduire à des nécroses dans des cas extrêmes (ATDSR 2007).

Effets cardiovasculaires

Les effets cardiovasculaires d'une exposition chronique aux composés inorganiques d'arsenic sont nombreux, et incluent des troubles de la repolarisation du myocarde et des arythmies cardiaques (INERIS 2010).

L'effet sur le système vasculaire le plus caractéristique d'une exposition chronique à l'arsenic inorganique est la « maladie des pieds noirs » (ou « blackfoot disease »), caractérisée par une diminution progressive de la circulation sanguine périphérique au niveau des pieds et des mains, et qui conduit à une nécrose des tissus puis à une gangrène sèche (ATDSR 2007) (Figure 4). Cette intoxication est endémique de la région de Taïwan, consécutive à l'ingestion d'eaux de boissons dont les concentrations en arsenic inorganique sont de l'ordre de 0,17 à 0,80 µg/L, correspondant à des doses journalières de 0,014 à 0,065 mg As/kg/jour (ATDSR 2007; INERIS 2010). Des études ont montré que les sujets dont les capacités de méthylation de l'arsenic inorganique sont plus faibles ont plus de risques de développer les symptômes vasculaires de cette maladie (ATDSR 2007; INERIS 2010). Une exposition chronique à l'arsenic inorganique induit d'autres effets vasculaires comme la maladie de Raynaud, la cyanose des doigts et des orteils, l'hypertension, l'épaississement des artères (INERIS 2010).



Figure 4. La « maladie des pieds noirs » (Source : http://www.betterlifelabs.org/overview05.html)

Effets respiratoires

Après une exposition par inhalation, les effets respiratoires pouvant survenir incluent une détresse respiratoire, une bronchite hémorragique, un œdème pulmonaire, même s'il n'est pas clairement démontré que ces signes sont des effets directs ou liés aux lésions vasculaires du système pulmonaire. Des études ont montré des symptômes respiratoires mineurs comme la toux, la dyspnée, des douleurs thoraciques, et des maux de gorge chez des sujets exposés à des doses allant de 0,03 à 0,05 mg As/kg/jour (ATDSR 2007).

Effets gastro-intestinaux

Une exposition orale chronique à une dose de 0,01 mg As/kg/jour conduit à des symptômes similaires à une exposition aiguë (nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales) (ATDSR 2007; INERIS 2010). Généralement, ces symptômes diminuent ou cessent à l'arrêt de l'exposition. Ces symptômes sont également observés après une exposition par inhalation à des niveaux élevés de poussières et de vapeurs d'arsenic inorganique.

Effets neurologiques

Après une exposition par voie orale ou par inhalation à l'arsenic inorganique, de nombreuses études ont montré la survenue d'atteintes du système nerveux (ATDSR 2007; INERIS 2010). Ces atteintes se manifestent par des neuropathies périphériques symétriques, qui induisent initialement des paresthésies des extrémités des pieds et des mains et une sensation de fourmillement, et progressent vers la racine du membre en quelques jours (INERIS 2010). Certains effets sont partiellement réversibles à l'arrêt de l'exposition (INERIS 2010), mais la récupération n'est jamais complète.

Effets hépatiques

Des effets hépatiques consécutifs à une exposition orale chronique à l'arsenic inorganique ont été mis en évidence et sont caractérisés par une hépatomégalie, des douleurs abdominales, une perte d'appétit et, dans les cas les plus sérieux, les atteintes sont des cirrhoses (INERIS 2010). Des études suggèrent que ces atteintes sont secondaires, consécutives à une atteinte des vaisseaux hépatiques (INERIS 2010).

Effets sur le développement et la reproduction

Une augmentation de l'incidence des avortements spontanés, de morts fœtales tardives, de prématurité et de faible poids des nouveaux nés a été observée suite à une exposition chronique à l'arsenic par l'ingestion d'eaux de boisson dans les zones à teneur élevée en arsenic inorganique (INERIS 2010).

Effets cancérigènes

L'exposition à l'arsenic, que ce soit par voie orale ou par inhalation, augmente le risque de cancers. Ainsi, des relations ont été établies entre l'exposition à de fortes teneurs en arsenic via les eaux de boisson et l'augmentation de l'incidence des cancers de la peau, de la vessie et du poumon, et entre l'inhalation d'arsenic inorganique et l'incidence des cancers du poumon chez des populations exposées professionnellement (travailleurs de fonderies, travailleurs d'usines de fabrication de certains pesticides, travailleurs des vergers, négociants en vin) (INERIS 2010).

I.4.c. Valeurs toxicologiques de référence

Les valeurs toxicologiques de référence (VTR) caractérisent le lien entre l'exposition humaine à une substance toxique et l'occurrence ou la sévérité d'un effet nocif observé. Elles sont spécifiques d'une substance, d'une durée d'exposition (aigüe : de quelques heures à une semaine ; intermédiaire : d'une semaine à quelques mois ; chronique : de quelques années à la vie entière), et d'une voie d'exposition (orale et respiratoire) (AFSSET 2006) et sont construites à partir de données sur les relations dose-réponse ou dose-effet lors des expérimentations. On leur applique

un facteur de sécurité qui correspond au facteur utilisé pour tenir compte de la variabilité dans les transpositions intra- et inter-espèces et des incertitudes dans les bases de données toxicologiques (AFSSET 2006).

La dose critique peut être définie comme une NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) qui est la dose maximale n'entraînant pas d'effet néfaste, une LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) qui est la dose minimale entraînant un effet néfaste, ou encore une BMDL (Benchmark Dose Limit) qui est une dose limite produisant un niveau ou un pourcentage défini de réponse.

Le Tableau 5 donne, pour les espèces arséniées les valeurs de référence publiées par les différents organismes pour les effets à seuil.

Tableau 5. Valeurs toxicologiques de référence

Substance chimique	Source	Voie d'exposition	Facteur de sécurité	Valeur de référence	Année de révision
Asi	ATDSR	Orale aigüe	10	MRL = 5.10^{-3} mg.kg^{-1}.j^{-1}	2007
Asi	ATDSR	Orale chronique	3	MRL = 3.10^{-4} mg.kg^{-1}.j^{-1}	2007
Asi	US EPA	Orale chronique	3	MRL = 3.10^{-4} mg.kg^{-1}.j^{-1}	2001
Asi	RIVM	Inhalation chronique	10	TCA = 10^{-3} mg.m^{-3}	2001
Asi	RIVM	Orale chronique	2	TDI = 10^{-3} mg.kg^{-1}.j^{-1}	2001
Asi	FoBiG	Orale chronique	5	TDI = 0,45 µg.kg^{-1}.j^{-1}	2009
MA	ATDSR	Orale intermédiaire		MRL = 1.10^{-1} mg.kg^{-1}.j^{-1}	2007
MA	ATDSR	Orale chronique		MRL = 1.10^{-2} mg.kg^{-1}.j^{-1}	2007
DMA	ATDSR	Orale chronique		MRL = 2.10^{-2} mg.kg^{-1}.j^{-1}	2007

Asi : arsenic inorganique ; MRL : Minimal Risk Level ; TCA : Tolerable Concentration in Air ; TDI : Tolerable Daily Intake

Le comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (JECFA) a proposé une dose hebdomadaire tolérable provisoire (DHTP) de 15 µg/kg/semaine pour une exposition orale à l'arsenic inorganique dans les eaux de boisson (FAO/WHO, 1989). Mais en 2009, le rapport de l'EFSA conclue que cette valeur n'était plus appropriée compte tenu des effets génotoxiques et cancérigènes de l'arsenic inorganique. Bien que l'arsenic n'agisse pas directement sur l'ADN, l'incertitude à l'égard des modèles de relation dose-réponse montre qu'il n'est pas approprié de définir une dose d'arsenic inorganique qui ne cause pas d'effets néfastes sur la santé (c'est-à-dire une DHTP).

D'autres organismes proposent des valeurs toxicologiques sous des dénominations différentes.

L'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA) définit une valeur toxicologique dite « dose de référence » (RfD) pour l'exposition orale chronique, basée sur l'hypothèse de l'existence d'un seuil pour l'apparition d'effets toxiques comme la nécrose cellulaire. Elle propose une RfD de 0,0003 mg/kg/jour pour l'exposition orale à l'arsenic inorganique établie à partir des LOAEL et NOAEL de 0,014 et 0,0008 mg/kg/jour évaluées lors de deux études (Tseng *et al.,* 1968; Tseng 1977) qui portent sur l'incidence des cancers de la peau à Taïwan et de la « maladie des pieds noirs », en appliquant un facteur de sécurité de 3. L'US EPA accorde cependant un indice de confiance moyen à cette valeur.

L'agence pour le registre des substances toxiques et maladies (ATDSR) définit une valeur de référence dite « minimal risk level » (MRL) comme une estimation de l'exposition humaine à une

substance à partir de laquelle cette substance ne cause aucun effet nocif ou cancérigène, pour une voie d'exposition donnée (inhalation, voie orale) et pour des durées d'exposition spécifique. Elle ne propose aucun MRL pour l'exposition à l'arsenic inorganique par inhalation à cause du manque de données à ce sujet. Pour une exposition orale aigüe (14 jours ou moins) à l'arsenic inorganique, elle propose un MRL de 0,005 mg/kg/jour calculé à partir de la LOAEL de 0,05 mg/kg/jour estimée par Mizuta *et al.,* (1956) suite à un empoisonnement au Japon où 220 personnes ont consommé de la sauce soja contaminée à une concentration approximative de 0,1 µg/L d'arséniate de calcium (les doses journalières absorbées étant estimées à 3 mg/jour, soit 0,05 mg/kg/jour pour une exposition comprise entre 2 et 3 semaines), auquel elle applique un facteur de sécurité de 10. Les premiers symptômes observés étaient l'œdème facial et les effets gastro-intestinaux, puis les lésions de la peau et les neuropathies chez certains sujets. Pour une exposition orale chronique (au moins 365 jours), elle propose un MRL de 0,0003 mg/kg/jour, établi à partir de la NOAEL de 0,0008 mg/kg/jour identifié par Tseng (1977) pour les lésions cutanées, en appliquant un facteur de sécurité de 3.

L'ATDSR propose également un MRL pour une exposition orale chronique au MA de 10 µg/kg/jour basé sur une $BMDL_{10}$ de 1090 µg/kg/jour chez la souris pour des lésions rénales, et un MRL pour une exposition orale chronique au DMA de 20 µg/kg/jour estimé à partir d'une $BMDL_{10}$ de 1800 µg/kg/jour chez la souris pour des lésions de la vessie.

L'institut national de santé publique et de l'environnement des Pays-Bas (RIVM) propose une « tolerable daily intake » (TDI) de 0,001 mg/kg/jour pour une exposition orale chronique à l'arsenic trivalent et pentavalent sans distinction. Cette valeur a été établie à partir de la TDI de 2,1 µg/kg/jour proposée par le JECFA, et un facteur de sécurité de 2 a été appliqué pour corriger les incertitudes liées aux données épidémiologiques. Pour une exposition chronique par inhalation, il propose une « tolerable concentration in air » (TCA) de 10^{-3} mg/m^3, et non une valeur de risque, avec un facteur de sécurité de 10 pour tenir compte de la variabilité au sein de la population humaine.

I.5. Exposition humaine

La voie d'absorption principale de l'arsenic est la voie orale, devant l'inhalation et l'absorption cutanée. En dehors du cadre professionnel, l'exposition à l'arsenic est essentiellement due à l'ingestion d'aliments et d'eau contaminés (Caussy 2003).

Les produits de la pêche, les légumes, le riz et la viande (avec l'utilisation de composés arséniés comme supplément animal) constituent les sources principales d'apports en arsenic dans l'alimentation humaine. Néanmoins, les produits de la pêche sont considérés comme la source d'exposition majeure (ATDSR 2007). En France, une étude récente d'exposition à l'arsenic via la consommation de poissons et de crustacés a montré que les concentrations en arsenic total les plus élevées ont été retrouvées dans les poissons qui vivent au fond la mer (entre 12 et 34 mg/kg de poids sec) (Sirot *et al.,* 2009a), et que la quantité d'arsenic inorganique dans les poissons représente de 0,1 à 3,5 % de l'arsenic total. Dans les mollusques et les crustacés, les concentrations en arsenic total sont similaires, mais l'arsenic inorganique représente de 0,1 à 6 % de l'arsenic total. L'étude EAT 2 (Millour *et al.,* 2011c) rapporte des niveaux moyens d'arsenic total de 1,41 mg/kg de poids humide dans les poissons (1,93 mg/kg dans l'EAT 1) (Leblanc *et al.,* 2005) et 2,54 mg/kg de poids humide dans les mollusques et crustacés (2,24 mg.kg dans EAT 1) (Leblanc *et al.,* 2005).

Au contraire, les aliments terrestres contiennent des proportions d'arsenic inorganique plus importantes. Il a été estimé que les gros consommateurs de riz en Europe, parmi lesquels on retrouve certains groupes ethniques, subissaient une exposition alimentaire d'environ 1 µg/kg de poids corporel par jour à l'arsenic inorganique (EFSA 2009). Au Royaume Uni, une étude sur l'arsenic dans le riz pour l'alimentation infantile a montré que le pourcentage d'arsenic inorganique variait de 33 % à 68 % de l'arsenic total dont la concentration variait de 0,120 à 0,470 mg/kg.

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

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

II.1. Extraction des composés arséniés

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

Les méthodes d'extraction existantes diffèrent par la méthode utilisée et par le solvant employé. On distingue principalement les méthodes d'extraction liquide/solide (avec ou sans ultrasons) et les méthodes d'extractions assistées par micro-ondes qui sont les plus couramment utilisées, mais il existe aussi d'autres méthodes alternatives (ASE, soxhlet, enzymatiques). La plupart des études conduites pour optimiser cette étape cruciale ont été réalisées à l'aide d'un ou plusieurs matériaux de référence certifiés (CRM) pertinents présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Matériaux de référence certifiés en arsenic total et en espèces d'arsenic dans les produits de la pêche (mg/kg)

MRC	Matrice	Organisme	As total	DMA	AsB	TETRA
DOLT-1	Foie de roussette	CNRC	10,1			
DOLT-2	Foie de roussette	CNRC	16,6			
DOLT-3	Foie de roussette	CNRC	10,2			
DOLT-4	Foie de roussette	CNRC	9,66			
DORM-1	Muscle de roussette	CNRC	17,7			
DORM-2	Muscle de roussette	CNRC	18,0		16,4	0,250
DORM-3	Protéine de poisson	CNRC	6,88			
TORT-1	Hépatopancréas de homard	CNRC	24,6			
TORT-2	Hépatopancréas de homard	CNRC	21,6			
SRM 1566	Huître	NIST	13,4			
SRM 1566b	Huître	NIST	7,65			
SRM 1568a	Farine de riz	NIST	0,29			
SRM 1570	Épinard	NIST	0,068			
SRM 1575	Aiguilles de pin	NIST	0,21			
SRM 1572	Feuilles de citron	NIST	3,1			
SRM 1976	Moule	NIST	13,3			
BCR 710	Huitre	IRMM				
BCR 477	Moule	IRMM	non certifié			
BCR 422	Morue	IRMM	21,1			
BCR 627	Thon	IRMM	4,8	0,150	3,9	
BCR 278R	Moule	IRMM	6,07			
NFA-Shrimp	Crevette	NFA	42,2			
NFA-Plaice	Carrelet	NFA	43,2			
NMIJ CRM 7402-a	Morue	NMIJ	36,7			
AGAL-3	Crevette	AGAL	3,85			
AGAL-2	Requin	AGAL	23			
GBW-08751	Moule	Standard Materials of Soils Components	6,1			
IAEA140/TM	Algue	IAEA	44,3			

CNRC (National Reasearch Concil of Canada) ; NIST (National Institute of Standards & Technology) ; NFA (National Food Agency of Denmark) ; NMIJ (National Metrology Institute of Japan) ; AGAL (Australian Government Analytical Laboratory) ; IAEA (International Atomic Energy Agency)

Le Tableau 6 indique que seuls 2 MRC sont certifiés en DMA, AsB ou TETRA et qu'aucun ne l'est en arsenic inorganique. Il serait donc nécessaire de développer de nouveaux MRC qui soient notamment certifiés en Asi et également en d'autres espèces arséniées comme le MA, par exemple.

II.1.a. Extraction liquide solide (SLE)

Les techniques d'extraction liquide/solide, qu'elles soient assistées par une agitation physique ou par ultrasons, sont des techniques très répandues pour la mise en solution des espèces d'arsenic. L'extraction liquide/solide par soxhlet qui est relativement simple, requiert de très grandes quantités de solvants organiques, et son coût et sa durée en font aujourd'hui une technique moins répandue.

Le Tableau 7, le Tableau 8 et le Tableau 9 présentent l'ensemble des études d'analyse de spéciation publiées qui utilisent une technique d'extraction liquide-solide par agitation mécanique, par ultrasons, ou par soxhlet.

Tableau 7. Récapitulatif des méthodes d'extraction liquide-solide par agitation mécanique

Volume (mL ou g)	Prise d'essai (mg)	Durée (min ou h)	Matrice	Autre	Référence
			H_2O		
5 mL	200	Nuit	BCR 710		Raber *et al.*, (2010)
10 g	1000	2 h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
10 mL	200	nuit	DOLT-1, DORM-2, algues, plantes, éponge, moule, poisson, grenouille	Précédé 30 sec ultrasons	Schaeffer *et al.*, (2006)
4 mL	200	14 h	BCR 627, DORM-2, BCR 278R, SRM 1566b		Nischwitz et Pergantis (2005)
10 mL	1000	2 h	Volaille	Filtration C18	Jackson *et al.*, (2003)
2x10 mL	1000	2x10 h	SRM 1568a, DORM-2, riz, poulet, poisson	Suivi de 5 min ultrasons	Pizarro *et al.*, (2003a)
10 mL	100-500	14 h	DORM-2, algues		Kuehnelt *et al.*, (2001)
5 mL	200-500	2 h	DORM-2, champignon		Londesborough *et al.*, (1999)
			MeOH/H_2O (1/3)		
10 g	1000	2 h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
			MeOH/H_2O (1/1)		
10 ou 20 mL	500	15 h	poissons (anguille, chevaine, carpe, mulet)	anguilles pré-extraction n-hexane	Ciardullo *et al.*, (2010)
10 ou 20 mL	250	nuit	DORM-2, poissons (cabillaud, saumon), moule		Dahl *et al.*, (2010)
10 g	1000	2h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
3x20 mL	1000		DORM-2, poisson		Laparra *et al.*, (2007)
3x20 mL	1000	3x15 min	poisson (anchois, sardine, maquereau, sole, colin, saint pierre, encornet), moule, palourde, crevette		Devesa *et al.*, (2005)
20 mL	250	nuit	DORM-2, TORT-2, BCR 627, pétoncles		Sloth *et al.*, (2003)
2x10 mL	1000	2x10 h	SRM 1568a, DORM-2, riz, poulet, poisson		Pizarro *et al.*, (2003a)
2x10 mL	1000	2x10 h	SRM 1568a, riz		Pizarro *et al.*, (2003b)
3x20 mL	1000	3x15 min	BCR 627, poissons (sole, colin, anchois, maquereau, sardine, encornet, morue salée), bivalves (palourdes, moules), crustacés (crevettes) poisson en conserve (thon, sardine)		Suner *et al.*, (2002)
3x20 mL	1000	3x15 min	BCR 627, DORM-2, TORT-2, NFA-Shrimp, NFA-Plaice		Suner *et al.*, (2001)
3x20 mL	1000	3x15 min	poisson (sardine, sole, colin, saint pierre)		Devesa *et al.*, (2001)
			MeOH/H_2O (3/1)		
10 g	1000	2h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
2x10 mL	5000	2x1 h	huile de poisson	précédé d'extraction hexane	Kohlmeyer *et al.*, (2005)
			DORM-2, poisson, coquillages, algues	suivi de 2 lavages 50 % MeOH	Kohlmeyer *et al.*, (2003)
3x20 mL	250	2 min	DORM-2, BCR 477, huître, algue	suivi de 2 lavages 50 % MeOH	Kohlmeyer *et al.*, (2002)
			MeOH/H_2O (8/2)		
15 mL	500	10 min	DORM-2, SRM 1566b, huîtres	Suivi de filtration C18	Hsiung et Huang (2006)
			MeOH/H_2O (9/1)		
2 mL	100	Nuit	DORM-2, algue		Navratilova *et al.*, (2011)
2x10 mL	1000	2x10 h	SRM 1568a, DORM-2, riz, poulet, poisson		Pizarro *et al.*, (2003a)
	100		DORM-2 foie d'animaux marins (cétacés, phoques, lamantins, tortues)	Cf Goessler	Kubota *et al.*, (2002)

Volume (mL ou g)	Prise d'essai (mg)	Durée (min ou h)	Matrice	Autre	Référence
10 mL	100-500	14 h	DORM-2, algue		Kuehnelt *et al.*, (2001)
10 mL	200	Nuit	DORM-2, BCR 627		Falk et Emons (2000)
4x20 mL	200-250	14 h	DORM-1, DORM-2		Goessler *et al.*, (1998)
$MeOH/H_2O$ (1/1) puis (9/1)					
10 mL puis 10 mL	1000	2x10 h	SRM 1568a, DORM-2, riz, poulet, poisson		Pizarro *et al.*, (2003a)
MeOH					
10 mL	1000	2 h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
10 mL	200	14 h	DORM-2, moules d'eau douce		Soeroes *et al.*, (2005)
10 mL	500	15 min	DORM-2, surimi, crevette, huître		Simon *et al.*, (2004)
Autres solvants					
H_2O/H_2O_2 (9/1) (20 mL)	500	nuit	Bulot	acétone à la fin pour précipiter les protéines	Urgast *et al.*, (2010)
H_3PO_4 0.25M (10 mL)	500	12h	DORM-2, TORT-2, DOLT-2, BCR 422, SRM 1566b, NMIJ 7402a		Geng *et al.*, (2009)
TFA 0.2M (3mL)	500	6h	riz, légumes (carotte, tomate, haricots, oignon, radis, tournesol, noix), épices, eau		Signes-Pastor *et al.*, (2008)
TFA 0.2M (2mL)	250	6h	riz		Smith *et al.*, (2008)
TFA 2 M (6-10mL)	1000-2000	6-48h	SRM 1568a, SRM 1570 pomme		Nam *et al.*, (2006)
$CHCl_3$/MeOH (2/1)			poisson grillé		Hanaoka *et al.*, (2001)
TFA 0.2M (2-3mL)	250-1000	6h	SRM 1568a, riz		Heitkemper *et al.*, (2001)
H_3PO_4 1.5M (10mL)	200-500	14h	DORM-2, algue		Kuehnelt *et al.*, (2001)
NaOH 2M (10 mL)	500	8h	DORM-2, poisson (loup de mer, limande, palourde)		Greene et Crecelius (2006)
CH_3COOH 1M (20 mL)	100-200	8h	feuilles		Kirby *et al.*, (2002)

Tableau 8. Récapitulatif des méthodes d'extraction liquide-solide par ultrasons

Volume (mL ou g)	Prise d'essai (mg)	Durée (min ou h)	Matrice	Autre	Référence
H_2O					
3x5 mL	500-1000	3x1 h (bain) ou 3x1min (sonde)	bivalves, gastropodes, crevettes, crabes, poissons, algues, coraux, feuilles		Khokiattiwong *et al.*, (2009)
4 mL	150	10 min	DORM-2, BCR 477, algue rouge		Huang *et al.*, (2008)
10g	1000	1 h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
10 mL	500	1 h	NMIJ 7402-a, poisson, eau		Morita *et al.*, (2007)
10 mL	200	20min-2h (bain) 0.5-3min (sonde)	DORM-2, BCR 627, poulet		Sánchez-Rodas *et al.*, (2006)
3-5 mL	100-300	1-7 min	CRM 627, SRM 1568a, poulet, poisson, riz		Sanz *et al.*, (2005a)
10 mL puis 3x5 mL	250-270	4x20 min	DORM-2, DOLT-2, TORT-2		McSheehy et Mester (2004)
10 mL puis 3x5 mL	250-270	4x20 min	DORM-2, TORT-2, DOLT-2		Wahlen *et al.*, (2004)
2x15 mL	250	2x1 h	Huître		McSheehy *et al.*, (2001)
$MeOH/H_2O$ (1/3)					
10 g	1000	1 h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
10 mL	500-1000	2 h	pomme		Caruso *et al.*, (2001)
20 mL	1000-5000	20 min	TORT-1 CRM 627 huître, coque, moule, algue	ultrafiltration, hexane, ou C-18	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
$MeOH/H_2O$ (1/1)					
3x4 mL	200	3x30 min	TORT-2, sardine, petite friture, calamar, huître, palourde, crevette, algue	précédé extraction 4mL acétone	Cao *et al.*, (2009)
3x0,40 mL	10-20	3x10 min	NMIJ CRM 7402-a, eau, poissons, crustacés d'eau douce, algue		Miyashita *et al.*, (2009)
3x10 mL	1000	3x10 min	poisson	précédé extraction 10mL acétone	Meermann *et al.*, (2008)
	1/10 w/v	3x20 min	poissons d'eau douce		Zheng et Hintelmann (2004)
10 mL	500-5000(frais)	10 min	BCR 627, poissons, fruits de mer, algues		Li *et al.*, (2003)
2x10 mL	500	2.5 h	SRM 1568a ; riz		Heitkemper *et al.*, (2001)
4x10 mL	250-500	4x10 min	SRM 1566a, pétoncle		Lai *et al.*, (2001)
2x15 mL	250	2x1 h	huître		McSheehy *et al.*, (2001)
10 mL	500-1000	2 h	pomme		Caruso *et al.*, (2001)
3x3,5 mL	1000	3x20 min	DORM-2, poisson		Lindemann *et al.*, (2000)
10 mL	500	10 min	DORM-2 saumon, requin, thon, hareng	précédé extraction 10 mL acétone	McKiernan *et al.*, (1999)
$MeOH/H_2O$ (3/1)					
3x10 mL	100	3x2 h	Kriss, thon		Nam *et al.*, (2010)
10 g	1000	1 h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
10 mL	500-1000	2 h	pomme		Caruso *et al.*, (2001)
20 mL	1000-5000	20 min	TORT-1, BCR 627, huître, coque, moule, algue	ultrafiltration, hexane, ou C-18	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
$MeOH/H_2O$ (9/1)					
10 mL	500-1000	2 h	pomme		Caruso *et al.*, (2001)
MeOH					

Volume (mL ou g)	Prise d'essai (mg)	Durée (min ou h)	Matrice	Autre	Référence
10 g	1000	1 h	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
3-5 mL	100-300	1-7 min	BCR 627, SRM 1568a, poulet, poisson, riz		Sanz *et al.*, (2005a)
2x15 mL	250	2x1 h	huître		McSheehy *et al.*, (2001)
20 mL	1000-5000	20 min	TORT-1, CRM 627, huître, coque, moule, algue	ultrafiltration, hexane, ou C-18	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
Autres solvants					
MeOH/$CHCl_3$ (1/1) (10mL)	200	20min-2h (bain) 0.5-3min (sonde)	DORM-2, BCR 627, poulet		Sánchez-Rodas *et al.*, (2006)
MeOH/$CHCl_3$ (2/1) (12 mL)	2000	30 min	huile de noix		Kannamkumarath *et al.*, (2004)
HCOOH 23 M (10 mL)	250-270	2h	DORM-2, TORT-2, DOLT-2		Wahlen *et al.*, (2004)
MeOH/$CHCl_3$ (1/1) (2x20 mL puis H_2O/$CHCl_3$ (1/1) (40mL)	500	2x30 min	DORM-1, DORM-2, poissons (hareng, requin, saumon)		Wrobel *et al.*, (2002)
Acide citrique 0,05 M (10 mL)	500-1000	2 h	pomme		Caruso *et al.*, (2001)
Autre					
0,1% Triton XT-114 (10 mL)	1000	10min	SRM 1568a, céréales	Suivi lavage 10mL 0.1% EDTA	Matos Reyes *et al.*, (2007)

Tableau 9. Récapitulatif des méthodes d'extraction par soxhlet

Volume (mL)	Prise d'essai (mg)	Durée (min)	Matrice	Autre	Référence
MeOH/H_2O (1/1)					
70 mL	300	50 min	DORM-2, BCR 627, poissons		Lin *et al.*, (2008)
150 mL	1000-5000	16h	BCR 627, palourdes		Liu *et al.*, (2007)
150 mL	1000-5000	16h	BCR 627, huîtres		Liu *et al.*, (2006)
150 mL	1000-5000	16h	TORT-1 BCR 627 Huître, coque, moule, algue	ultrafiltration, hexane, ou C-18	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
MeOH					
150 mL	1000-5000	16h	TORT-1 BCR 627 Huître, coque, moule, algue	ultrafiltration, hexane, ou C-18	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)

Quelque soit la méthode d'extraction utilisée, la majorité des études rapporte l'utilisation d'un mélange H_2O/MeOH, mais d'autres solvants sont également utilisés : H_2O seule (Schaeffer *et al.,* 2006; Khokiattiwong *et al.,* 2009; Raber *et al.,* 2010), MeOH seul (Simon *et al.,* 2004; Sanz *et al.,* 2005a; Soeroes *et al.,* 2005), H_3PO_4 (Geng *et al.,* 2009), TFA (Nam *et al.,* 2006; Signes-Pastor *et al.,* 2008; Smith *et al.,* 2008), NaOH (Greene et Crecelius 2006), CH_3COOH (Kirby *et al.,* 2002)… De plus, ces extractions sont souvent réalisées de façon séquentielle (par exemple 3×10 mL).

Laparra *et al.,* (2003) ont comparé le taux de récupération en As total pour différents solvants (H_2O, MeOH/H_2O 1/1, 9/1, 1/1 - 9/1) après SLE classique dans des échantillons de riz, de poulet et de poisson. Les résultats montrent que pour le poisson et le riz, les taux de récupération après trois extractions consécutives sont autour de 90 % avec tous les solvants utilisés sauf avec le mélange MeOH/H_2O 9/1 (85 et 86 % respectivement) et que pour le poulet, les résultats sont similaires quel que soit le solvant utilisé (70-75 %). De plus, ils ont montré que la stabilité des espèces à long terme était affectée par le type de matrice et la nature du solvant d'extraction. Ainsi, il semble que dans le poulet, les espèces soient stables jusqu'à deux mois dans un mélange H_2O/MeOH 9/1 et qu'au delà de deux mois, une dégradation d'AsB en DMA soit observée, tandis que dans le poisson, AsB et une espèce inconnue soient plus stables dans un solvant d'extraction MeOH/H_2O 9/1 et MeOH/H_2O 1/1 suivi de 9/1.

Kuehnelt *et al.,* (2001) ont également étudié les performances d'extraction de différents solvants (H_2O, MeOH/H_2O 1/1, H_3PO_4 1,5 M) dans le DORM-2, et n'ont pas observé de différences de taux de récupération avec les trois solvants testés pour AsB, TETRA, TMAP, AsC, TMAO et pour l'As total (environ 90 %), même si un rendement légèrement plus faible a été obtenu avec H_2O pour AsB.

Cependant, même si leur efficacité en termes de rendement pour l'extraction des espèces d'arsenic dans les matrices biologiques a été démontrée de nombreuses fois, les méthodes d'extraction liquide/solide restent relativement longues à mettre en œuvre et peuvent demander une importante consommation de solvants organiques (Brisbin et Caruso 2002).

II.1.b. Extraction assistée par micro-ondes

Depuis quelques années, l'utilisation de la technique d'extraction assistée par micro-ondes (« microwave-assisted extraction » ou MAE) ne cesse de s'amplifier pour l'analyse de spéciation de l'arsenic dans les denrées alimentaires.

La technique MAE consiste à utiliser les propriétés de certains composés de transformer l'énergie électromagnétique (captée sous forme de radiation de longueur d'onde entre 1 cm et 1 m) en chaleur. En effet, les molécules dipolaires et les ions vont aligner leur moment dipolaire avec le champ électrique des micro-ondes. Ce champ étant en perpétuel mouvement, les molécules tournent dans tous les sens et provoquent ainsi des collisions avec les molécules voisines. Ces agitations créent un dégagement d'énergie, donc une augmentation de la température et de la pression dans les récipients de digestion. Les composés d'intérêt vont alors être dissous dans le solvant en un minimum de temps. (Pare *et al.*, 1994).

Pour la mise en solution des espèces d'arsenic, une température modérée (30 - 90°C) et un temps de chauffage limité (2 - 10 min) sont appliqués afin de ne pas altérer les liaisons carbone-arsenic des composés à étudier (Dietz *et al.*, 2007).

Le Tableau 10 présente les études de spéciation de l'arsenic dans les matrices alimentaires qui utilisent la MAE pour la mise en solution des espèces.

Tableau 10. Récapitulatif des méthodes d'extraction assistée par micro-ondes

Volume (mL ou g)	Prise d'essai (mg)	Durée (min)	Matrice	Autre	Référence
H_2O					
10 g	1000		SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
10 mL	100	10 min	DORM-2, TORT-2, poisson, huître, crevette, pétoncle		Hirata et Toshimitsu (2007)
10 mL	100	10 min	DORM-2 huître, poisson, crevette (muscle et carapace)		Hirata *et al.*, (2006)
10 mL	100	10 min	DORM-2 huître, poisson, crevette		Hirata et Toshimitsu (2005)
10 mL	100	10 min	DORM-2, TORT-2 huître, poisson, crevette		Karthikeyan *et al.*, (2004)
10 mL	100	10 min	crevette, moule		Karthikeyan *et al.*, (2003)
10 mL	150	5-20 min	plantes		Quaghebeur *et al.*, (2003)
10 mL	150	2-6 min	TORT-2, langouste (muscle, organes)		Brisbin *et al.*, (2002)
9.84 g	655	5 min	BCR 627		Nakazato *et al.*, (2000)
10 mL	100-130	4 min	DORM-2, poisson (saumon, requin, hareng)		Ackley *et al.*, (1999)
$MeOH/H_2O$ (1/3)					
10 g	1000		SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
$MeOH/H_2O$ (1/1)					
10 g	1000	30 min	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
10 mL	100	15 min	DORM-2, TORT-2, BCR 279, SRM 1575, SRM 1572, vers marins, algues, ormeau, oursin	précédé extraction 10mL acétone	Foster *et al.*, (2007)
10 mL	500	25 min	SRM 1568a, riz		Ohno *et al.*, (2007)
10 mL	2000	1-4 min	DORM-2, BCR 627, poulet		Sánchez-Rodas *et al.*, (2006)
10 mL	200	20 min	DORM-2, DOLT-2, TORT-2, BCR 627, BCR 278R, BCR 422, SRM 1566a, hareng, maquereau, huître, crabe, thon, …		Sloth *et al.*, (2005)
10 mL	100	10 min	DORM-2, crevette, huître, poisson		Karthikeyan et Hirata (2004)
10 mL	100	10 min	crevette, moule		Karthikeyan *et al.*, (2003)
10 mL	100-150	5-20 min	TORT-2, DORM-1, DORM-2, AGAL-2, AGAL-3, DOLT-1, BCR 627, CRM 278R, SRM 1566a	précédé extraction 10mL acétone	Kirby et Maher (2002)
10 mL	100-200	5 min	SRM 1566, AGAL-2, crabe, isopodes, gastropodes, poisson, crevette, huître	précédé extraction 10mL acétone	Kirby *et al.*, (2002)
	1000-5000	10 min	TORT-1 BCR 627 Huître, coque, moule, algue	ultrafiltration, hexane, ou C-18	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
10 mL	100-130	4 min	DORM-2, poisson (saumon, requin, hareng)		Ackley *et al.*, (1999)
$MeOH/H_2O$ (3/1)					
10 mL	100	20 min	kriss, thon		Nam *et al.*, (2010)
10 g	1000	30 min	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
$MeOH/H_2O$ (8/2)					
5 mL	200	3 min	DORM-2, espadon		Wang *et al.*, (2007)
5 mL	300	10 min	BCR 627, SRM 1566a, poisson		Serafimovski *et al.*, (2006)
10 mL	200	3 min	DORM-2, 1566a, huître, poisson		Yeh et Jiang (2005)

Volume (mL ou g)	Prise d'essai (mg)	Durée (min)	Matrice	Autre	Référence
10 mL	100-130	4 min	DORM-2, poisson (saumon, requin, hareng)		Ackley *et al.*, (1999)
MeOH					
10 g	1000	30 min	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
1 : 10 w : v		10 min	DORM-2, vers polychète marin		Fattorini et Regoli (2004)
	1000-5000	10 min	TORT-1, BCR 627, huître, coque, moule, algue		Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
Autres solvants					
NaOH 0,9M dans EtOH/H_2O (1/1) (10 mL)	200	20 min	morue, saumon, moule		Dahl *et al.*, (2010)
$HClO_4$					Shah *et al.*, (2010)
HNO_3 1 % (10 mL)	200	20min	SRM 1570, riz		Sun *et al.*, (2009)
NaOH 0,9 M dans EtOH/H_2O (1/1) (10 mL)	200	20 min	TORT-2, DORM-2, moules		Sloth et Julshamn (2008)
HNO_3 2 % (5 mL)	100	6 min	DORM-2, TORT-2, vers marins, algues, ormeau, oursin		Foster *et al.*, (2007)
MeOH/H_2O (1/1) (10 mL) puis HNO_3 2 % (5 mL)	100	15 min puis 6 min	DORM-2, TORT-2, vers marins, algues, ormeau, oursin		Foster *et al.*, (2007)
TMAH 25 % (0,3 mL)	300	10 min	BCR 627, SRM 1566a, poisson		Serafimovski *et al.*, (2006)
EtOH/H_2O/NaOH 3M (5/3/2) (10 mL)	1000	20 min	TORT-2, poisson (saumon, carrelet, maquereau)	Asi seulement Extraction 5 mL acétone pour maquereau	Larsen *et al.*, (2005)
NaOH 0,9 M dans EtOH/H_2O (1/1) (10 mL)	200	20 min	DORM-2, DOLT-2, TORT-2, CRM 627, BCR 278R, BCR 422, SRM 1566a, hareng, maquereau, huître, crabe, thon, …		Sloth *et al.*, (2005)
TMAH 10 % (10 mL)	150	5-20 min	plantes		Quaghebeur *et al.*, (2003)
TMAH 5 % (10 mL)	100-130	4 min	DORM-2, poisson (saumon, requin, hareng)		Ackley *et al.*, (1999)
Protéines					
Sucrose 0,33M, MES 50mM, EDTA 5mM, L-ascorbate 5mM (10 mL)	150	20 min	épinard, pousse de riz		Chen *et al.*, (2008)
Sucrose 0,33M, MES 50mM, EDTA 5mM, L-ascorbate 5mM (10 mL)	150	20 min	riz		Smith *et al.*, (2008)
Sucrose 0,33M, MES 50mM, EDTA 5mM, L-ascorbate 5mM (10 mL)	150	20 min	plantes		Quaghebeur *et al.*, (2003)

Le plus souvent, un mélange H_2O/MeOH ou seulement H_2O est utilisé, mais l'utilisation d'autres solvants a également été rapportée comme l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAH) (Ackley *et al.,* 1999; Quaghebeur *et al.,* 2003), l'alcool alcalin pour l'extraction des espèces inorganiques (Larsen *et al.,* 2005; Sloth *et al.,* 2005), l'acide nitrique (Brisbin et Caruso 2002; Foster *et al.,* 2007) ou des protéines modifiées (Quaghebeur *et al.,* 2003; Chen *et al.,* 2008).

Une étude comparative de plusieurs méthodes d'extractions (soxhlet, MAE, sonication, supercritique) sur un matériau de référence d'hépatopancréas de homard (TORT-2) réalisée par Brisbin *et al.,* (2002) ont montré que la MAE était la méthode la plus simple, rapide et reproductible parmi celles étudiées, tout en obtenant des taux de récupération similaires, voire meilleurs.

Foster *et al.,* (2007) ont montré qu'une extraction séquentielle avec 2% d'HNO_3 après une extraction MeOH/H_2O 1/1, améliore le rendement de 13 à 36 % dans les matrices où l'arsenic est difficile à extraire (plantes, algues, ormeau et vers marins), et donne des rendements similaires à ceux obtenus avec un mélange MeOH/H_2O 1/1 dans le DORM-2 et le TORT-2.

Ackley *et al.,* (1999) ont comparé l'utilisation de plusieurs solvants (H_2O seule, TMAH 5%, MeOH/H_2O 1/1, et MeOH/H_2O 8/2) sur le DORM-2. Leurs résultats montrent que le TMAH 5% semble fournir le meilleur rendement (95 % contre 74 à 86%). Cependant, Quaghebeur *et al.,* (2003) ont montré que ce réactif provoquait l'oxydation de l'As(III) en As(V) pendant l'extraction.

L'utilisation de protéines modifiées rapportée dans les travaux de Smith *et al.,* (2008), Chen *et al.,* (2008) et Quaghebeur *et al.,* (2003) permet des taux de récupérations satisfaisants dans les matrices végétales.

Plusieurs études basées sur les travaux de Sloth *et al.,* (2005) rapportent l'utilisation de NaOH dans de l'éthanol (EtOH) pour une extraction spécifique de l'arsenic inorganique dans les produits de la pêche (Dahl *et al.,* 2010), mais cette méthode ne permet pas une quantification individuelle de chaque forme inorganique car elle provoque l'oxydation de l'As(III) en As(V).

Enfin, les travaux de thèse de Dufailly (2008) ont montré que l'utilisation d'H_2O seule ou de MeOH/H_2O 8/2 donnent généralement des résultats similaires en As total et en spéciation, mais que la présence de MeOH peut induire une surestimation de l'As(III).

II.1.c. Extraction accélérée par solvant (ASE)

L'extraction accélérée par solvant (« Accelerated solvent extraction » ou ASE), appelée aussi extraction liquide pressurisée (« Pressurized liquid extraction » ou PLE) est une technique d'extraction dont le principe est basé sur l'application de températures croissantes, qui augmentent les cinétiques d'extraction, et d'une pression élevée qui permet de garder le solvant en dessous de son point d'ébullition, ce qui rend les extractions plus sûres et plus rapides. Elle permet ainsi de réduire la consommation de solvant et de la durée de l'extraction. L'ensemble des études qui utilisent des méthodes d'extraction accélérées par solvant est regroupé dans le Tableau 11.

Tableau 11. Récapitulatif des méthodes d'extraction par ASE

Volume cellule (mL)	Prise d'essai (mg)	Matrice	Autre	Référence
H_2O				
11 mL		SRM 1568a		Nam *et al.*, (2006)
11 mL	500-2000	riz		Heitkemper *et al.*, (2001)
5 mL	250-1250	carotte	Filtration de l'extrait sur cartouche C18	Vela *et al.*, (2001)
MeOH/H_2O (1/3)				
11 mL		SRM 1568a		Nam *et al.*, (2006)
11 mL	500-2000	riz		Heitkemper *et al.*, (2001)
MeOH/H_2O (1/1)				
11 mL		SRM 1568a		Nam *et al.*, (2006)
11 mL	250	DORM-2	Extraction ASE avec acétone préalable	Gallagher *et al.*, (2002)
11 mL	500-2000	riz		Heitkemper *et al.*, (2001)
10 mL	100-500	DORM-2, saumon, requin, thon, hareng	Extraction ASE avec acétone préalable	McKiernan *et al.*, (1999)
MeOH/H_2O (3/1)				
11 mL	1000	SRM 1568a, riz		Narukawa *et al.*, (2008)
nc	100	GBW-08751, DORM-2, BCR 278R, poisson, moule		Mato-Fernandez *et al.*, (2007)
11 mL	500-2000	riz		Heitkemper *et al.*, (2001)
MeOH				
11 mL		SRM 1568a		Nam *et al.*, (2006)
CH_3COOH/MeOH (1/1)				
11 mL	250-270	DORM-2, TORT-2, DOLT-2		Wahlen *et al.*, (2004)

nc : non communiqué

Cette technique a été testée à plusieurs reprises pour l'extraction de l'As dans les matrices alimentaires. Les travaux de McKiernan *et al.*, (1999) ont rapporté des taux de récupération de l'As total satisfaisants et similaires à ceux obtenus avec une extraction liquide/solide avec sonication dans le DORM-2 (environ 87 %) et dans le hareng (85 et 98 %), alors que dans le requin, le saumon et le thon, les résultats étaient inférieurs à ceux obtenus après une sonication

(80, 75 et 72 % contre 89, 88 et 85 %). De plus, il semble que les deux méthodes d'extractions extraient dans les mêmes proportions les différentes espèces.

Wahlen *et al.,* (2004) ont également comparé l'extraction liquide/solide avec sonication, avec l'ASE dans les produits de la pêche et ont obtenu des résultats comparables pour l'extraction d'AsB dans les trois MRC utilisés (DORM-2, DOLT-4, et TORT-2), mais différents pour DMA (quantité plus importante avec ASE qu'avec sonication).

Plus récemment, les travaux de Mato-Fernandez *et al.,* (2007) dans des MRC de moule (GBW 08751 et BCR 278R) et de poisson (DORM-2) ont permis d'obtenir des taux de récupération en As total plus ou moins satisfaisants (93, 69 et 65% respectivement).

Nam et al 2006 ont comparé les rendements d'extraction de l'arsenic dans du riz avec différents mélanges MeOH/H_2O à deux températures différentes, et ont obtenu des taux de récupération entre 42 et 64 % pour le SRM 1568a, bien inférieurs à ceux précédemment rapportés par Heitkemper *et al.,* (2001) qui obtenaient dans des conditions semblables des rendements d'extraction compris entre 95 et 105 %. Néanmoins, leurs résultats sur matrices réelles de riz ont montré des rendements d'extraction nettement plus faibles, de 24 à 36 %.

En conclusion, la méthode d'extraction par ASE reste encore peu utilisée pour l'extraction des composés arséniés dans les matrices alimentaires.

II.1.d. Extraction enzymatique

Les enzymes peuvent être utilisées pour déterminer une fraction bioaccessible d'un élément en mimant l'environnement vivant, mais également comme traitement initial pour l'extraction des composés arséniées dans certains types de matrice alimentaires. Les différents travaux qui rapportent l'utilisation d'enzymes pour l'extraction des espèces d'arsenic dans les matrices alimentaires sont présentés dans le Tableau 12.

Tableau 12. Récapitulatif des méthodes d'extraction enzymatiques

Solvant (volume)	Prise d'essai (mg)	Durée	Matrice	Autre	Référence
Liquide-solide					
20 mg pepsine dans HCl 0,1M (7 mL)	250	6h	DORM-2, BCR 627, moules, coques, huîtres, palourdes, colin, sole, sardine, maquereau, lotte, morue	Filtration C18	Moreda-Pineiro *et al.*, (2011)
0,1 g trypsine dans NH_4HCO_3 0,1M (10 mL)	250	12h	DORM-1, TORT-1, crabe, crevette, sardine		Rattanachongkiat *et al.*, (2004)
60 - 80 mg α-amylase dans H_2O (20mL)	500	24h	riz, céréales		Kohlmeyer *et al.*, (2003)
0,1 g trypsine dans NH_4HCO_3 0,1M (10 mL)	250	4h	TORT-2, huîtres		Fitzpatrick *et al.*, (2002)
30 mg trypsine dans NH_4HCO_3 0,1M (10 mL)	500	nuit	pomme	Suivi d'extraction sonication avec 10mL MeOH/H_2O 1/1, ou 4/6, ou ACN/H_2O 4/6	Caruso *et al.*, (2001)
0,1 g α-amylase dans NH_4HCO_3 0,1M (10 mL)	500	nuit	riz		Heitkemper *et al.*, (2001)
100 mg trypsine ou pancréatine dans NH_4HCO_3 0,1M (5 mL)		nuit	DORM-2, TORT-2, aliment pout bébé (sole, colin)		Pardo-Martinez *et al.*, (2001)
Ultrasons					
α-amylase et protéase type XIV (3 mL)	200	3 min (sonde)	riz, moules, lait, soja, thon, céréales		Dufailly *et al.*, (2011)
75 mg pepsine dans HCl 0,1 M (7,5 mL)	250	5 min	DORM-2, BCR 627, moules, coques, huîtres, palourdes, colin, sole, sardine, maquereau, lotte, morue	Filtration C18	Moreda-Pineiro *et al.*, (2011)
30 g α-amylase dans 10 mL 0,2 mL $(NH_4)_2CO_3$	500	nuit	SRM 1568a, SRM 1570, pomme	Suivi de sonication 6 h dans ACN/H_2O 8/2	Nam *et al.*, (2006)
10 mg α-amylase dans 3 mL H_2O, puis 30 mg protéase XIV	300	1 + 2 min (sonde)	SRM 1568a, riz		Sanz *et al.*, (2005b)
α-amylase et protéase type XIV (3 - 5 mL)	100-300	1-7 min	BCR 627, SRM 1568a, poulet, poisson, riz		Sanz *et al.*, (2005a)
MAE					
20 mg lipase; 5 mL tampon Tris 75 mM pH 7,5 puis 40 mg protéase XIV (5 mL)	200	30 min + 30 min	DOLT-3, foie de poisson		Hsieh *et al.*, (2010)
20 mg pronase E +5 mg lipase dans tampon phosphate pH 7,25 (10 mL)	200	30 min	DOLT-3, BCR 627, poisson		Reyes *et al.*, (2009)

Plusieurs travaux rapportent l'utilisation d' α-amylase seule (Heitkemper *et al.,* 2001; Kohlmeyer *et al.,* 2003; Nam *et al.,* 2006) ou en complément d'une protéase de type XIV (Sanz *et al.,* 2005b; Dufailly *et al.,* 2011) pour l'extraction des espèces arséniées dans des matrices de riz, de céréales, de pomme.

D'autres études sur des produits de la pêche rapportent l'utilisation de la trypsine (Pardo-Martinez *et al.,* 2001; Fitzpatrick *et al.,* 2002; Rattanachongkiat *et al.,* 2004). Rattanachongkiat *et al.,* (2004) ont obtenu des rendements d'extraction satisfaisants dans des matériaux de référence (DORM-1 et TORT-1) et dans des produits de la pêche (82-106 %). Cependant, même si les travaux de Pardo-Martinez *et al.,* (2001) ne se sont intéressés qu'à l'AsB et ceux de Fitzpatrick *et al.,* (2002) à l'AsB et au DMA, leurs travaux rapportent des taux de récupération en As total de 105% dans le DORM-2 (uniquement lié à l'AsB qui est la seule espèce quantifiée) et de 106% dans le TORT-2 qui sont considérés acceptables.

Un inconvénient majeur de l'extraction enzymatique est le temps d'incubation qui doit être appliqué, qui est souvent long (généralement de 12 à 24 h dans un bain à 37°C). Cependant, un développement prometteur de cette technique est la combinaison de la sonication et de l'utilisation d'enzymes (Dietz *et al.,* 2007), qui permet la facilitation de l'action des enzymes et une réduction du traitement de l'échantillon de quelques heures à quelques minutes voire quelques secondes. Ainsi, Moreda-Pineiro *et al.,* (2011) ont réduit le temps d'hydrolyse à 5 min et ont obtenu des taux de récupération de 91 et 97% en DMA et AsB dans le BCR 627, et de 83 et 96% en As total dans le BCR 627 et le DORM-2.

II.1.e. Conclusion

En conclusion, l'extraction liquide/solide et l'extraction assistée par micro-ondes sont les deux techniques les plus couramment utilisées pour la mise en solution des espèces arséniées, et elles permettent toutes les deux d'atteindre des taux de récupération proches de 100%. Cependant, la MAE présente plusieurs avantages par rapport à la SLE : elle est plus rapide, plus simple à mettre en œuvre, plus reproductible, et elle permet de réduire les quantités de solvants utilisés.

II.2. Méthodes de séparation des espèces arséniées

Les analyses de spéciation requièrent deux techniques analytiques complémentaires pour d'une part séparer les différentes formes de l'élément considéré, et d'autre part pour les détecter et les quantifier. Diverses techniques sont rapportées pour la détection des différentes espèces :

techniques spectrophotométriques, HG-(CT)-GC-AAS (ou AFS), HG-AAS (ou AFS), MS, ES-MS-MS... (Francesconi et Kuehnelt 2004), mais la grande majorité des travaux utilise une détection par ICP-MS (Guerin *et al.,* 1999; Gong *et al.,* 2002; B'Hymer et Caruso 2004; Francesconi et Kuehnelt 2004; Le *et al.,* 2004; Leermakers *et al.,* 2006). En effet, l'ICP-MS est aujourd'hui largement utilisé pour la détection des éléments traces en sortie de colonne chromatographique pour sa capacité multi-élémentaire spécifique, sa grande sensibilité pour une large gamme d'éléments et la compatibilité du débit d'introduction de l'échantillon avec la chromatographie liquide, permettant une acquisition des données en ligne.

II.2.a. Séparation par chromatographie liquide (LC)

Les espèces d'arsenic les plus couramment rencontrées peuvent être sous forme d'anions, de cations, ou neutres, et leur forme chimique dépend des conditions de pH du milieu. Pour la séparation des différentes espèces, la chromatographie d'échange d'ions et la chromatographie en phase inverse par appariement d'ions peuvent être utilisées.

II.2.a.i. Chromatographie d'échange d'ions

La chromatographie d'échange d'ions est couramment utilisée pour la séparation des ions et des substances facilement ionisables. Elle est basée sur un mécanisme d'équilibre et d'échanges entre une phase stationnaire d'une part, qui comporte à sa surface des ions et d'autre part, des ions de charge opposée dans une phase mobile. La chromatographie d'échange d'ions peut être utilisée en mode d'échange d'anions ou de cations. La séparation peut être influencée par la force du soluté, le pH de la phase mobile, la force ionique et la concentration du tampon, la température…

Les colonnes échangeuses d'anions et de cations sont toutes deux utilisées pour les analyses de spéciation de l'arsenic. Les colonnes échangeuses d'anions (PRP-X 100, LC SAX, AS7) séparent le plus souvent les espèces As(III), As(V), MA et DMA, avec une rétention minimale de l'AsB et de l'AsC, tandis que les colonnes échangeuses de cations (PRP-X 200, LC SCX, 300 SCX) sont utilisées pour la séparation de l'AsB, l'AsC, le TMAO, et le TETRA.

Le Tableau 13 et le Tableau 14 présentent respectivement les travaux d'analyse de spéciation de l'arsenic dans les matrices alimentaires qui font référence à l'utilisation de colonnes échangeuse de cations et d'anions.

Tableau 13. Récapitulatif des séparations par échange de cations

Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps (min)	Espèces séparées (par ordre d'élution)	Matrice	Détection	Référence
Mode isocratique						
PRP X-200 (Hamilton)						
4mM C_5H_5N ; pH 2,8	1,5	8,3	As(III), AsB, (DMA+MA+As(V))	SRM 1568a, DORM-2, poisson, riz, poulet	ICP-MS	Pizarro *et al.*, (2003a); Pizarro *et al.*, (2003b)
IonPac CS-10 (Dionex)						
5 mM C_5H_5N ; pH 2	1,0	10	AsS-PO4, DMA, AsB, AsC, AsS-OH	algue, poisson, crustacés (encornet, huître, moule, crabe, crevette, palourde)	ICP-MS	Li *et al.*, (2003)
Ionospher 5C (Chromopak)						
10 mM C_5H_5N ; pH 2,7	1,5	10	AsS-PO4, AsS-SO3, AsB, AsS-OH, DMAE, TMAO, AsC	DORM-2, algue, IAEA 140-TM	ICP-MS	Navratilova *et al.*, (2011)
C_5H_5N, 3 % MeOH ; pH 2,7	nc	25	DMA, DMAA, DMAP, AsB, TMAO, TMAP, AsC, TETRA	DORM-2, poissons (cabillaud, saumon), moule	ICP-MS	Dahl *et al.*, (2010)
Nucleosil 5SA						
30 mM C_5H_5N, 2 %, MeOH ; pH 3	1,0	15	As(V), DMA, AsB, TMAO, AsC, TETRA	DORM-2, BCR 627	ICP-MS	Falk et Emons (2000)
Nucleosil 10SA						
100 mM C_5H_5N ; pH 3,1	1,0	nc	AsB, TMA^+	poisson grillé	GF-AAS	Hanaoka *et al.*, (2001)
Supelcosil LC-SCX (Supelco)						
20 mM C_5H_5N ; pH 2,6	1,5	6	AsB, TMAO, AsC, TETRA	bivalves, gastropodes, crevettes, crabes, poissons, algues, coraux, feuilles	ICP-MS	Khokiattiwong *et al.*, (2009)
20 mM C_5H_5N ; pH 2,6	1,5	12	AsB, AsS-OH, AsS, TMAP, AsC, TETRA	DORM-2, TORT-2, vers marins, algues, ormeau, oursin	ICP-MS	Foster *et al.*, (2007)
2,5 mM C_5H_5N ; pH 2,65	1,5	20	DMA, AsB, AsC, TETRA	DORM-2, vers marin	ICP-MS	Fattorini et Regoli (2004)
20 mM C_5H_5N ; pH 3	nc	nc	AsB, TMAP, AsC, TETRA	DORM-2, TORT-2, DOLT-2	ICP-MS	Wahlen *et al.*, (2004)
20 mM C_5H_5N ; pH 2,2	1,5	10	AsB, AsS-gly, TMAP, AsC, TMAO, TETRA	SRM 1566, AGAL-2, crabe, isopodes, gastropodes, poisson, crevette, huître	ICP-MS	Kirby *et al.*, (2002)
20 mM C_5H_5N ; pH 2,2	1,5	10	AsB, TMAP, AsC, TMAO, TETRA	TORT-2, DORM-1, DORM-2, AGAL-2, AGAL-3, DOLT-1, BCR 626, BCR 278R, SRM 1566b	ICP-MS	Kirby et Maher (2002)
6,3 mM C_5H_5N ; pH 2,6	nc	nc	nc	DORM-2 foie d'animaux marins (cétacés, phoques, lamantins, tortues)	ICP-MS	Kubota *et al.*, (2002)
10 mM C_5H_5N ; pH 5,0	1,5	12	AsB, TMAO, AsC, TETRA	poisson grillé	ICP-MS	Hanaoka *et al.*, (2001)
20 mM C_5H_5N ; pH 2,5	1,5	6	DMA, AsB, TMAP, AsC, TMAO, TETRA	DORM-2 algue	ICP-MS	Kuehnelt *et al.*, (2001)
20 mM C_5H_5N ; pH 2,9	1,0	16,6	AsB, As(III), DMAE, TMAO, AsC, TMA^+	algue, fluides de mouton (urine, sang) NIST SRM 2670 (urine)	ICP-MS	Feldmann *et al.*, (2000)
20 mM C_5H_5N ; pH 2-3	1,5	6,6	AsB, TMAO, AsC, TETRA	DORM-1, DORM-2	ICP-MS	Goessler *et al.*, (1998)
Zorbax 300 SCX (Agilent)						
10 mM C_5H_5N ; pH 2,3	1,5	8	AsB, TMAO, TMAP, AsC, TETRA	Sauce de poisson	ICP-MS	Rodriguez *et al.*, (2009)
20 mM C_5H_5N ; pH 2,6	1,5	5	AsB, TMAO, AsC, TETRA, oxo glycérol arsénoribose	sédiments, algues, plantes, éponge, moule, poisson, grenouille DOLT-1, DORM-2	ICP-MS	Schaeffer *et al.*, (2006)
10 mM C_5H_5N ; pH 2,6	1,5	9	AsB, TMAO, AsC, TETRA, glycérol arsénoribose	moules, DORM-2	ICP-MS	Soeroes *et al.*, (2005)

Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps (min)	Espèces séparées (par ordre d'élution)	Matrice	Détection	Référence
RSpak NN-614 (Showa Deenko)						
6 mM NH_4NO_3, 1,5 mM PDCA	0,8	nc	As(III), DMA	SRM 1568a, riz		Ohno *et al.*, (2007)
Mode gradient						
PRP X-200 (Hamilton)						
A : 100 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 4,5 B : H_2O	1,0	15	TMAO, TMA+, AC	DORM-2, poisson	UV-HG-AFS	Laparra *et al.*, (2007)
A : 100 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 4,5 B : H_2O	1,0	15	TMAO, TMA+, AsC	poisson (anchois, sardine, maquereau, sole, colin, saint pierre, encornet), moule, palourde, crevette	UV-HG-AFS	Devesa *et al.*, (2001); Devesa *et al.*, (2005)
A : 1 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3	1,0	15	TMAO, TMA+, AC	poissons (sole, colin, anchois, maquereau, sardine, encornet, morue salée) bivalves (palourdes, moules), crustacés (crevettes) poisson en conserve (thon, sardine), BCR 627	UV-HG-AFS	Suner *et al.*, (2002)
A : 100 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 4,5 B : H_2O	1,0	15	TMAO, TMA+, AsC	CRM 627, DORM-2, TORT-2, NFA-Shrimp, NFA-Plaice	UV-HG-AFS	Suner *et al.*, (2001)
Ionospher 5C (Chromopak)						
A : 3 % MeOH B: 50 mM C_5H_5N, 3 % MeOH ; pH 2,7	1,0	25	DMA, AsB, TMAO, AsC, TETRA, arsénosucres	poissons (anguille, chevaine, carpe, mulet)	ICP-MS	Ciardullo *et al.*, (2010)
A : 0,5 mM C_5H_5N, 3 % MeOH ; pH 2,7 B : 5 mM C_5H_5N, 3 % MeOH ; pH 2,7 C : 20 mM C_5H_5N, 3% MeOH ; pH 2,7	1,0	20	DMA, DMAA, AsB, TMAO, TMAP, AsC, TMA+	DORM-2, TORT-2, BCR 627, scallop, krill	ICP-MS	Sloth *et al.*, (2003)

Les colonnes d'échange de cations ne permettent pas de retenir les espèces toxiques As(III) et As(V). Elles sont donc utilisées généralement en complément d'une colonne d'échange d'anions, avec un éluant composé de formate de pyridine, pour la détermination des espèces organiques. Dans la littérature, leur utilisation est principalement en mode isocratique sur une colonne Supelcosil LC-SCX couplée à une détection par ICP-MS.

Tableau 14. Récapitulatif des séparations par échange d'anions

Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps (min)	Espèces séparées (par ordre d'élution)	Matrice	Détection	Référence
Mode isocratique						
PRP X-100 (Hamilton)						
25 mM KH_2PO_4 ; pH 5,8	1,1	15	As(III)+AsB, DMA, MA, As(V)	DORM-2, DOLT-2, TORT-2, SRM 1566b, BCR 422, NMIJ 7402	HG-AFS	Geng *et al.*, (2009)
10 mM KH_2PO_4/ K_2HPO_4 ; pH 6	0,8	15	As(III), DMA, MA, As(V)	riz, légumes (carotte, tomate, haricots, oignon, radis, tournesol, noix), épices, eau	HG-AFS	Signes-Pastor *et al.*, (2008)
17,5 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 7,0	1,5	nc	As(III), DMA, MA, As(V)	GBW-08751, DORM-2, BCR 278R, poisson, moule	UV-HG-AFS	Mato-Fernandez *et al.*, (2007)
H_2O ; pH 4,0	1,0	nc	AsB, AsC	GBW-08751, DORM-2, BCR 278R, poisson, moule	UV-HG-AFS	Mato-Fernandez *et al.*, (2007)
25 mM KH_2PO_4/ K_2HPO_4 ; pH 5,8	1,0	12	As(III)+AsB, DMA, MA, As(V)	DORM-2, BCR 627, poulet	UV-HG-AFS	Sánchez-Rodas *et al.*, (2006)
10 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 10,0	1,0	45	TMA, AsC, AsB, TMAP, arsénosucres	BCR 627, DORM-2, BCR 278R, SRM 1566b	ESI-MS	Nischwitz et Pergantis (2005)
12,5 mM $NH_4H_2PO_4$	1,2	11,6	AsB, DMA, As(V)	DORM-2, bulot	ICP-MS, HG-AFS	Urgast *et al.*, (2010)
12,5 mM NH_4HCO_3	0,6	30	AsB, DMA, As(V)	DORM-2, bulot	ICP-MS, HG-AFS	Urgast *et al.*, (2010)
25mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 8,6	1,0	60	As(III), DMA, As(V)	SRM 1568a, riz	ICP-MS, HG-AFS	Ackerman *et al.*, (2005)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 6,0	1,5	14	DMA, As(V), arsénosucres	DORM-2, algue, IAEA 140-TM	ICP-MS	Navratilova *et al.*, (2011)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	20	As(III)+AsS, DMA, MA, As(V),arsénosucres	bivalves, gastropodes, crevettes, crabes, poissons, algues, coraux, feuilles	ICP-MS	Khokiattiwong *et al.*, (2009)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 6	1,5	8	DMA	sauce de poisson	ICP-MS	Rodriguez *et al.*, (2009)
6,66 mM $NH_4H_2PO_4$,6,66 mM NH_4NO_3 ; pH 6.2		8	As(III), DMA, MA, As(V)	SRM 1568a, riz	ICP-MS	Sun *et al.*, (2009)
30 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,0	10	As(III), DMA, MA, As(V)	épinard, pousse de riz, sols	ICP-MS	Chen *et al.*, (2008)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	10	As(III)+AsB, DMA, MA, As(V)	DORM-2, BCR 477, algue rouge	ICP-MS	Huang *et al.*, (2008)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	nc	As(III), DMA, MA, As(V)	riz	ICP-MS	Smith *et al.*, (2008)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6		12	As(III), DMA, MA, As(V), arsénosucres	DORM-2, TORT-2, vers marins, algues, ormeau, oursin	ICP-MS	Foster *et al.*, (2007)
20 mM NH_4HCO_3 ; pH 8,4	1,0	17	Arsénosucres	algues	ICP-MS	Hirata et Toshimitsu (2007)
30mM (NH4)2CO3 pH 8.5	1,0	15	As(III), DMA, As(V)	SRM 1568a, SRM 1570, BCR 627, pomme	ICP-MS	Nam *et al.*, (2006)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	10	As(III), DMA, MA, As(V), arsénosucres	DOLT-1, DORM-2, sédiments, algues, plantes, éponge, moule, poisson, grenouille	ICP-MS	Schaeffer *et al.*, (2006)
20 mM NH_4HCO_3, 3% MeOH ; pH 10,3	1,5	10	arsénosucres	DOLT-1, DORM-2, sédiments, algues, plantes, éponge, moule, poisson, grenouille	ICP-MS	Schaeffer *et al.*, (2006)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,0	40	arsénosucres	algues	ICP-MS	Hirata et Toshimitsu (2005)
10 mM KH_2PO_4/ K_2HPO_4 ; pH 6	1,0	12	As(III), As(V), MA, DMA	SRM 1568a, riz	ICP-MS	Sanz *et al.*, (2005b)
10 mM KH_2PO_4/ K_2HPO_4, 2 % MeOH ; pH 8,5	1,5	12	AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	SRM 1568a, BCR 627, riz, poulet, poisson, sol,	ICP-MS	Sanz *et al.*, (2005a)
20 mM NH_4HCO_3 ; pH 10,3	1,0	60	As(V), arsénosucres	DORM-2, moules	ICP-MS	Soeroes *et al.*, (2005)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	nc	DMA, MA, As(V), arsénosucres	DORM-2, moules	ICP-MS	Soeroes *et al.*, (2005)
10 mM $NH_4H_2PO_4$, 10 mM NH_4NO_3 ; pH 6,3	1,0	10	As(III); DMA, MA, As(V)	huile de noix	ICP-MS	Kannamkumarath *et al.*, (2004)

Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps (min)	Espèces séparées (par ordre d'élution)	Matrice	Détection	Référence
2,2 mM NH_4HCO_3, 2,5 mM acide tartrique, 1 % MeOH ; pH 8,4	nc	nc	nc	DORM-2, TORT-2, DOLT-2	ICP-MS	Wahlen *et al.*, (2004)
20 mM NH_4HCO_3 ; pH 10,3	1,5	15	AsB, As(III), DMA, MA, As(V) + arsénosucres	algue, poisson, crustacés (encornet, huître, moule, crabe, crevette, palourde)	ICP-MS	Li *et al.*, (2003)
10 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 6,0	1,5	14	As(III)+AsB; DMA; MA; As(V)	SRM 1568a, DORM-2, poisson, riz, poulet	ICP-MS	Pizarro *et al.*, (2003a)
10 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 6,0	1,5	16	As(III)+AsB; DMA; MA; As(V)	SRM 1568a, riz	ICP-MS	Pizarro *et al.*, (2003b)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	10	As(III)+AsB, DMA, MA, As(V)	plantes	ICP-MS	Quaghebeur *et al.*, (2003)
10-30 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 8,5	0,8-1,0	18	AsC, AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	TORT-2 langouste (muscle, organes)	ICP-MS	Brisbin *et al.*, (2002)
10 mM K_2SO_4 ; pH 10,2	1,0	1	AsB, As(III), DMA, As(V)	TORT-2, huître	ICP-MS	Fitzpatrick *et al.*, (2002)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	40	As(III)+AsB, DMA, MA, As(V), arsénosucres	NIST SRM 1566b, AGAL-2, crabe, isopodes, gastropodes, poisson, crevette, huître	ICP-MS	Kirby *et al.*, (2002)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	35	As(III)+AsB, DMA, MA, As(V), arsénosucres	TORT-2, DORM-1, DORM-2, AGAL-2, AGAL-3, DOLT-1, BCR 627, BCR 278R, SRM 1566a crabes, gastropodes, poissons	ICP-MS	Kirby et Maher (2002)
6,3 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 6,0	8,3	nc	AsC, AsB, DMA, MA	DORM-2 foie d'animaux marins (cétacés, phoques, lamantins, tortues)	ICP-MS	Kubota *et al.*, (2002)
10 mM $NH_4H_2PO_4$, 10 mM NH_4NO_3 ; pH 6,2	1,0	10	As(III)+AsB; DMA, MA, As(V)	pomme	ICP-MS	Caruso *et al.*, (2001)
10 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 9,0	1,0	35	As(III), DMA, MA, As(V) + arsénosucres	algues	ICP-MS	Gallagher *et al.*, (2001)
10 mM $NH_4H_2PO_4$,10 mM NH_4NO_3 ; pH 6,3	1,0	10	As(III)+AsB, DMA, MA, As(V)	SRM 1568a, riz	ICP-MS	Heitkemper *et al.*, (2001)
30 mM H_3PO_4 ; pH 6,0	1,3	20	As(III)+AsB; DMA; MA; As(V); arsénosucres	SRM 2670 (urine), algue, fluides de mouton (urine, sang)	ICP-MS	Feldmann *et al.*, (2000)
25 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,8	1,1	12	As(III)+AsB; DMA; MMA; As(V)	TORT-1, BCR 627, huître, coque, moule, algue	(UV)-HG-ICP-MS	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6	1,5	18	As(III)+glycérol ribose, DMA, MA, As(V	algues	ICP-MS	Raber *et al.*, (2000)
30 mM NH_4HCO_3 ; pH 9,0	1,0	25	AsC, AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	DORM-2, poisson (saumon, requin, hareng)	ICP-MS	Ackley *et al.*, (1999)
AS7 (Dionex)						
12,5 mM HNO_3 ; pH 1,8	0,5	nc	As(III)+MA, As(V), DMA, AsB, TMAO+AsC, TMA	riz, SRM 1566a	ICP-MS	Heitkemper *et al.*, (2001)
IC Sep ION-120 (Transgenomics)						
20 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 9,0	1,0	nc	nc	SRM 1568a, riz	ICP-MS, ESI-MS-MS	Ackerman *et al.*, (2005)
10 - 20 mM $(NH_4)_2CO_3$, 3 % MeOH ; pH 10,3	1,7	20	As(III), MA, As(V), arsénosucres	poissons d'eau douce (anguille, chevaine, carpe, mulet)	ICP-MS	Ciardullo *et al.*, (2010)
$(NH_4)_2CO_3$, 3 % MeOH ; pH 10,3	nc	nc	As(III), MA, As(V)	DORM-2, poissons (cabillaud, saumon), moule	ICP-MS	Dahl *et al.*, (2010)
40 mM $(NH_4)_2CO_3$, 3 % MeOH ; pH 10,3	1,0	10	As(III), As(V)	TORT-2, DORM-2, moules	ICP-MS	Sloth et Julshamn (2008)
50 mM $(NH_4)_2CO_3$, 3 % MeOH ; pH 10,3	1,0	7	As(III), MA, As(V)	TORT-2, DORM-2, BCR 278R, crabe, homard, morue, crevette, maquereau, hareng, huître pétoncle, phoque	ICP-MS	Sloth *et al.*, (2005)
30 mM NH_4HCO_3, 2 % MeOH ; pH 10,0	1,0	13	AsB, DMA, As(III), MA, As(V)	DORM-2, BCR 627	ICP-MS	Falk et Emons (2000)
Supelcosil LC-SAX1 (Supelco)						
15 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 6,1	1,0	nc	nc	DORM-2, vers marins	ICP-MS	Fattorini et Regoli (2004)
15 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,1	1,5	nc	As(III), As(V), MA, DMA, AsB (ordre non communiqué)	DORM-1, DORM-2	ICP-MS	Goessler *et al.*, (1998)

Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps (min)	Espèces séparées (par ordre d'élution)	Matrice	Détection	Référence
IC-Pak Anion HR						
10 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 10	1,0	20	AsB, DMA, As(III), MA, As(V)	SRM 1568a, riz	ICP-MS	Heitkemper *et al.*, (2001)
10 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 10	1,0	7	AsB, DMA, As(III), MA, As(V)	Carottes	ICP-MS	Vela *et al.*, (2001)
Excelpak G1836A (Agilent)						
2 mM NaH_2PO_4, 2mM EDTA ; pH 8,7	0,8	nc	As(V), MA	SRM 1568a, riz	ICP-MS	Ohno *et al.*, (2007)
G3154-650 (Agilent)						
10 mM NH_4HCO_3 ; pH 10,7	1,3	12	DMA, As(III), MA, As(V)	bivalves, gastropodes, crevettes, crabes, poissons, algues, coraux, feuilles	ICP-MS	Khokiattiwong *et al.*, (2009)
Mode gradient						
PRP X-100 (Hamilton)						
A : 1 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3	1,0	15	AsB, As(III), DMA, MMA, As(V)	DORM-2, poisson	UV-HG-AFS	Laparra *et al.*, (2007)
A : 1 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3	1,0	15	AsB, DMA, MA	poisson (anchois, sardine, maquereau, sole, colin, saint pierre, encornet), moule, palourde, crevette	UV-HG-AAS	Devesa *et al.*, (2005)
A : 1 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3	1,0	15	AsB, As(III), DMA, MMA, As(V)	poissons (sole, colin, anchois, maquereau, sardine, encornet, morue salée) bivalves (palourdes, moules), crustacés (crevettes) poisson en conserve (thon, sardine), BCR 627	UV-HG-AAS	Suner *et al.*, (2002)
A : 1 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3	1,0	15	AsB, As(III), DMA, MMA, As(V)	BCR 627, DORM-2, TORT-2, NFA-Shrimp, NFA-Plaice	UV-HG-AAS	Suner *et al.*, (2001)
A : 1 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 9,3	1,0	15	AsB, DMA, MA	poisson (sardine, sole, colin, saint pierre)	UV-HG-AAS	Devesa *et al.*, (2001)
A : 20 mM $NH_4H_2PO_4$; pH 5,6 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$, 50 % MeOH ; pH 5,6	0,4	25	As(III) + arsénosucre, DMA, MA, As(V), arsénosucres	BCR 710	ICP-MS	Raber *et al.*, (2010)
A : H_2O B : 50 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 9,5	1,5	30	AsC, AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	TORT-2, sardine, huître, palourde, crevette, calamar	ICP-MS	Cao *et al.*, (2009)
A : 0,25 mM $NH_4H_2PO_4$, 2 % MeOH ; pH 9,0 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$, 2 % MeOH ; pH 8,8	nc	25	AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	DORM-2, BCR 627, poissons	ICP-MS	Lin *et al.*, (2008)
A : 10 mM $(NH_4)_2CO_3$, 2 % MeOH ; pH 9,0 B : 50 mM $(NH_4)_2CO_3$, 2 % MeOH ; pH 9,0	1,0	13	AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	DORM-2, espadon, urine	ICP-MS	Wang *et al.*, (2007)
A : 0,25 mM $NH_4H_2PO_4$, 2 % MeOH ; pH 9,3 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$, 2 % MeOH ; pH 9,0	nc	30	AsC, AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	DORM-2, SRM 2976, moules	ICP-MS	Argese *et al.*, (2005)
A : 5 mM Na_2SO_4 ; pH 10-10,5 B : 50 mM Na_2SO_4 ; pH 10-10,5	1,5	15	AsB, DMA, MA, As(V)	DORM-1, TORT-1, sardine, crabe, crevette, loup de mer	ICP-MS	Rattanachongkiat *et al.*, (2004)
A : 5 mM CH_3COOH, 5 mM NH_4COOCH_3 B : 50 mM CH_3COOH, 50 mM NH_4COOCH_3	nc	30	MA, As(V), arsénosucres	DORM-2, TORT-2, DOLT-2	ICP-MS	Wahlen *et al.*, (2004)
A : 15 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 8,5 B : 50 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 8,5	0,8	30	AsC, AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	TORT-2, langouste (muscle, organes)	ICP-MS	Brisbin *et al.*, (2002)

Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps (min)	Espèces séparées (par ordre d'élution)	Matrice	Détection	Référence
A : 0,25 mM $NH_4H_2PO_4$, 2 % MeOH ; pH 9 B : 20 mM $NH_4H_2PO_4$, 2 % MeOH ; pH 8,8	1,0	25	AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	DORM-2, BCR 627	ICP-MS	Falk et Emons (2000)
A : 5 mM NH_4NO_3, 5 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 9 B : 50 mM NH_4NO_3, 5 mM $(NH_4)_2CO_3$; pH 9	1,0	12	AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	DORM-2, saumon, requin, thon, hareng	ICP-MS	McKiernan *et al.*, (1999)
AS7 (Dionex)						
A : 0,5 mM CH_3COOH/CH_3COO^- pKa 4,8 B : 25 mM HNO_3	nc	30	As(III), DMA, MA, As(V), AsB), TMAO, AsC, TMA^+	DORM-2, surimi, crevettes, huîtres	UV-HG-AFS	Simon *et al.*, (2004)
A : 0,3 mM HNO_3 B : 25 mM HNO_3	nc	30	As(III), DMA, MA, As(V), AsB), TMAO, AsC, TMA	DORM-2, surimi, crevettes, huîtres	UV-HG-AFS	Simon *et al.*, (2004)
A : 0,7 mM CH_3COOH/CH_3COO^- ; pH 4,65 B : 0,5 mM HNO_3 C : 50 mM HNO_3	1,3 - 1,5	5,5	As(III), MA, DMA, As(V), AsB	BCR 627, SRM 1568a, riz, moules, lait, soja, thon, céréales	ICP-MS	Dufailly *et al.*, (2011)
A : 1 mM HNO_3, 1 % MeOH ; pH 2,9 B : 80 mM HNO_3, 1 % MeOH ; pH 1,3	1,35	9,5	As(III), MA, DMA, As(V), AsB, AsC	DORM-2, BCR 627, moules, coques, huîtres, palourdes, colin, sole, sardine, maquereau, lotte, morue	ICP-MS	Moreda-Pineiro *et al.*, (2011)
A : 0,5 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA ; pH 3,4 B : 50 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA ; pH?	1,0	18	As(III), MA, DMA, As(V), AsB, TMAO	BCR 627, krill, thon	ICP-MS	Nam *et al.*, (2010)
A : 1,0 mM HNO_3, 1 % MeOH ; pH 2,9 B : 80 mM HNO_3, 1 % MeOH ; pH 1,3	1,35	9,5	As(III), MA, DMA, As(V), AsB, AsC	mollusques (moules, coques, coquilles st jacques), poisson (maquereau, sole, sardine)	ICP-MS	Moreda-Pineiro *et al.*, (2008)
A : 0,5 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA, 0,5 % MeOH ; pH 3,4 B : 50 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA, 0,5 % MeOH ; pH 1,8			As(III), MMA, DMA, As(V), AsB, TMAO, AC, TETRA arsénosucres	huile de poisson	ICP-MS	Kohlmeyer *et al.*, (2005)
A : 0,5 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA, 0,5 % MeOH ; pH 3,4 B : 50 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA, 0,5 % MeOH ; pH 1,8	1,0	18	As(III), MMA, DMA, As(V), AsB, TMAO, AC, TETRA+, arsénosucres	riz, SRM 1568a, algue, DORM-2, huître	ICP-MS	Kohlmeyer *et al.*, (2003)
A : 0,5 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA, 0,5 % MeOH ; pH 3,4 B : 50 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA, 0,5 % MeOH ; pH 1,8	1,0	18	As(III), MMA, DMA, As(V), AsB, TMAO, AC, TETRA, arsénosucres	DORM-2, BCR 477, huître, algue	ICP-MS	Kohlmeyer *et al.*, (2002)
A : 0,4 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA ; pH 3,4 B : 50 mM HNO_3, 0,05 mM BDSA ; pH 1,3	1,0	22	As(III), MA, DMA, As(V), AsB, TMAO, AsC, TMA+	DORM-2, champignons	ICP-MS	Londesborough *et al.*, (1999)
A : 0,5 mM HNO_3 ; pH 3,3 B : 50 mM HNO_3 ; pH 1,3	1,0	20	As(III), DMA, As(V) AsB, AsC	DORM-2, eau	ICP-MS	Mattusch et Wennrich (1998)
A : H_2O B : 0,3 M $NaHCO_3$; pH 9	0,7-1,5	40	AsB, As(V), DMA, AsC, MA, PAA, As(III)	moule, poisson	ICP-MS	Caroli *et al.*, (1994)
AS14 (Dionex)						

Phase mobile	Débit (mL/min)	Temps (min)	Espèces séparées (par ordre d'élution)	Matrice	Détection	Référence
A : 2 mM NH_4HCO_3, 2,2 mM $C_4H_6O_6$ pH 8,2 B : 2 mM NH_4HCO_3 45 mM $C_4H_6O_6$; pH 8,2	nc	13	AsB, As(III), DMA, MA, As(V), PAA	NIST 2670n, DORM-2, NIST 2710, eau, urine, poissons, sols	ICP-MS	Lindemann *et al.*, (2000)
AS4A (Dionex)						
A : 0,4 mM HNO_3 ; pH 3,3 A : 50 mM HNO_3 ; pH 1,3	1,2	20	As(III), MA, DMA, As(V), AsB, TMAO, AsC, TMA+	DORM-2, huître, poisson, crevette	ICP-MS	Karthikeyan et Hirata (2004)
AS16 (Dionex)						
A : 20 mM TMAOH B : 50 mM TMAOH	1,0 - 1,5	10	DMA, As(III), MA, p-ASA, As(V), 3-AHPA, ROX	Volaille	ICP-MS	Jackson *et al.*, (2003)
IC Sep ION-120 (Transgenomics)						
A : 1 mM $(NH_4)_2CO_3$, 3 % MeOH ; pH 10,3 B : 100 mM $(NH_4)_2CO_3$, 3 % MeOH ; pH 10,3	0,7 -1,5	17	As (III), MA, As(V)	TORT-2, saumon, carrelet, maquereau	ICP-MS	Larsen *et al.*, (2005)
A : 5 mM NH_4HCO_3, 2 % MeOH ; pH 10,3 B : 50 mM NH_4HCO_3, 2 % MeOH ; pH 10,3	1	10	AsB, DMA, As(III), MA, As(V)	DORM-2, BCR 627	ICP-MS	Falk et Emons (2000)
Benson AX10						
A : 0,1 mM K_2SO_4 ; pH 10,2 B : 0,1 M K_2SO_4 ; pH 10,2	1,0	23	AsB, DMA, MA, Asi	TORT-2, huître	ICP-MS	Fitzpatrick *et al.*, (2002)
Supelcosil LC-SAX1 (Supelco)						
A : 2,5 mM $NH_4H_2PO_4$ B : 25 mM $NH_4H_2PO_4$	NC	NC	nc	DORM-2, TORT-2, DOLT-2	ICP-MS	Wahlen *et al.*, (2004)
BAX-10 (Benson)						
A : 0,05 mM Na_2SO_4 ; pH 10 B : 100 mM Na_2SO_4 ; pH 10	1,1	16,6	AsB, DMA, MA, As(V)	DORM-2, TORT-2, aliments pour enfant à base de sole et de colin	ICP-MS	Pardo-Martinez *et al.*, (2001)
Metrosep anion Dual (Metrohm)						
A : 5 mM NH_4NO_3 B : 50 mM NH_4NO_3, 2 % MeOH ; pH 8,7	1,0	7	AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	BCR 627, DOLT-3, poisson	ICP-MS	Reyes *et al.*, (2009)

Pour la séparation des espèces par chromatographie d'échange d'anions, la colonne la plus fréquemment utilisée est la colonne Hamilton PRP-X100. Les études rapportent son utilisation en mode isocratique et en mode gradient en association avec une éluant phosphaté le plus souvent ou également carbonaté (Francesconi et Kuehnelt 2004; Ammann 2011). Cependant, l'utilisation de cette colonne en mode isocratique ne permet pas une bonne séparation des pics d'As(III) et d'AsB. Les travaux de Brisbin *et al.,* (2002) rapportent qu'en mode isocratique, en diminuant la concentration en carbonate d'ammonium dans la phase mobile, on améliore la séparation entre l'AsC et l'AsB, mais on augmente le temps de rétention des autres composés, donc le temps d'analyse.

Quelques travaux rapportent l'utilisation de la colonne ION 120 en mode isocratique (Sloth et Julshamn 2008; Ciardullo *et al.,* 2010; Dahl *et al.,* 2010) mais seul Falk et Emons (2000) rapportent une séparation satisfaisante de 5 espèces (AsB, DMA, As(III), MA et As(V)) à l'aide d'un éluant carbonate, les autres espèces (TMAO, AsC, TETRA) sortant dans le volume mort. De même, la séparation de ces cinq composés dans des échantillons de riz et de carotte a été rapportée de manière satisfaisante avec une colonne Pak anion HR à l'aide d'une phase mobile carbonée (Heitkemper *et al.,* 2001; Vela *et al.,* 2001). Toutefois, l'usage de cette colonne n'est plus rapporté par la suite. D'une manière générale, l'utilisation unique d'une colonne échangeuse d'anions en mode isocratique apparaît délicate dans la mesure où cela ne permet pas une bonne résolution des pics As(III) et AsB.

En mode gradient, les colonnes de type IonPac (Dionex) connaissent un intérêt croissant depuis une dizaine d'années et remplacent peu à peu la colonne Hamilton PRP-X100, car elles permettent de séparer simultanément certaines espèces cationiques et anioniques. Mattusch et Wennrich (1998) et Londesborough *et al.,* (1999) ont été les premiers à rapporter l'utilisation de la colonne AS7 pour la séparation simultanée de nombreuses espèces à l'aide d'un gradient composé d'HNO_3 en présence ou non d'un agent d'appariement d'ions (BDSA). Une autre étude de Kohlmeyer *et al.,* (2002) décrit la séparation de jusqu'à 17 composés arséniés dans un échantillon d'huître en moins de 20 minutes. De plus, un des avantages considérable de ce type de colonne est de pouvoir utiliser comme éluant uniquement de l'HNO_3, parfaitement compatible avec une détection par ICP-MS et qui permet de se soustraire des problèmes d'encrassement de l'ICP-MS rencontrés avec des éluants phosphatés ou carbonés.

En conclusion, les deux modes de séparation (isocratique et gradient) ont été utilisés pour la séparation des espèces d'arsenic par chromatographie d'échange d'anions. Même si la séparation en mode isocratique a été plus utilisée, la séparation en mode gradient permet toutefois une meilleure séparation des pics tout en réduisant la durée de séparation (B'Hymer et Caruso 2004).

II.2.a.ii. Chromatographie en phase inverse

La chromatographie en phase inverse est une technique émergente de choix dans les sciences analytiques depuis les années 1980. Elle est largement utilisée pour la spéciation de nombreux ions métalliques à l'aide d'une grande variété de colonnes et de phases mobiles (Ali et Jain 2004). La chromatographie en phase inverse utilise une phase mobile aqueuse contenant une certaine quantité de solvant organique. La séparation est réalisée à l'aide d'une phase stationnaire dont la surface est moins polaire que la phase mobile. Pour séparer les espèces d'arsenic, un contre-ion est ajouté à la phase mobile pour former une paire d'ions. Classiquement, les ions utilisés pour l'appariement avec les espèces d'arsenic sont des chaînes alkyles.

La séparation des espèces est influencée par l'hydrophobie de l'ion apparié, de la concentration de l'ion apparié, de la concentration du tampon, du pH de la phase mobile, de la phase stationnaire…

Les différents travaux qui rapportent l'utilisation de la chromatographie en phase inverse pour la spéciation des espèces d'arsenic dans des matrices alimentaires sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15. Récapitulatif des séparations en phase inverse

Phase mobile	Débit	Temps	Espèces séparées	Matrice	Détection	Référence
En mode isocratique						
Zorbax SB-AQ (Agilent)						
20 mM acide citrique, 5 mM hexanesulfonate ; pH 2,0	0,9	25	MA, DMA, p-ASA, ROX, NIT	poulet, roquette, nourriture pour chien	UV-HG-AFS	Monasterio *et al.*, (2011)
Capcell Pak C18 ODS (Shiseido)						
10 mM $NaC_4H_9SO_3$, 4 mM TMAH, 4 mM $CH_2(COOH)_2$, 0,5 % MeOH ; pH 3,0	1,0	11,6	As(V), As(III), MA, DMA, AsB, TMAO, TMA, AsC, arsénosucres	CRM 7402, eau, poissons, crustacés d'eau douce, algue	ICP-MS	Miyashita *et al.*, (2009)
2 mM $CH_2(COOH)_2$, 0,3 mM $NaC_4H_9SO_3$, 5 mM $NaC_6H_{13}SO_3$, 0,5 % MeOH ; pH 3,0	1,0	16	As(V), MA+As(III), DMA, AsB, TMAO, AsC, TMA+	poisson, crevette, coquille saint jacques, huîtres, DORM-2, TORT-2, algues	ICP-MS	Hirata et Toshimitsu (2005) Hirata et Toshimitsu (2007) Hirata *et al.*, (2006)
Develosil C30						
10 mM $NaC_4H_9SO_3$, 4 mM $CH_2(COOH)_2$, 4 mM TMAH, 0,1 % MeOH, 20 mM ammonium tartrate ; pH 2,0	0,75	15	As(V), As(III), MA, DMA, AsB, TMAO, TMA+, AsC	CRM 7402, poisson, eau	ICP-MS	Morita *et al.*, (2007)
ODS						
10 mM $NaC_4H_9SO_3$, 4 mM $CH_2(COOH)_2$, 4 mM TMAH, 0,05 % MeOH ; pH 3,0	nc	6,6	As(V), As(III), MA, DMA	SRM 1568a, riz	ICP-MS	Narukawa *et al.*, (2008)
C18 altima						
5 mM acide citrique/NaOH 5 mM $NaC_6H_{13}SO_3$; pH 4,5	0,9	5	As(V), MA, As(III), DMA, AsB	DORM-1, DORM-2 poisson (saumon, requin)	ICP-MS	Wrobel *et al.*, (2002)
Inertsil ODS (GL Sciences)						
10 mM TEAH, 4,5 mM $CH_2(COOH)_2$, 0,1 % MeOH ; pH 6,8	0,8	16,6	AsB, DMA, 4 arsénosucres	SRM 1566b, coquille saint jacques (gonades)	ICP-MS	Lai *et al.*, (2001)
En mode gradient						
Inertsil ODS (GL Sciences)						
A : 4 mM TBA, 0,5 % MeOH ; pH 9,3 B : 4 mM TBA, 10 mM $CH_2(COOH)_2$, 0,5 % MeOH pH 9,3	1,2	11,6	AB, As(III), DMA, MMA, As(V)	DORM-2, TORT-2, huître, poisson, crevette	ICP-MS	Karthikeyan *et al.*, (2004)

Avec une séparation en phase inverse, le mode isocratique et la détection par ICP-MS sont les plus couramment utilisés. Le mode gradient est peu utilisé car une dérive du signal est probable lors des changements de composition de solvant organique de la phase mobile (B'Hymer et Caruso 2004).

Même si la chromatographie en phase inverse permet de pouvoir séparer à la fois les analytes chargés et non chargés, elle reste peu utilisée pour la spéciation de l'arsenic dans les denrées alimentaires car elle est plus sensible aux changements de composition des matrices injectées (Beauchemin *et al.,* 1989; B'Hymer et Caruso 2004).

II.2.b. Électrophorèse capillaire (CE)

L'électrophorèse est une méthode de séparation basée sur le rapport taille/charge des espèces chimiques soumises à un champ électrique. L'appareillage est constitué de deux récipients, remplis d'une solution électrolyte tamponnée, dans lesquelles trempent les extrémités d'un tube capillaire (diamètre interne entre 25 et 75 µm) ainsi que deux électrodes de platine. Le mélange à analyser est injecté par pression dans le capillaire, puis une tension de plusieurs kilovolts est appliquée entre les deux électrodes. Le champ électrique ainsi créé induit un mouvement des molécules et permet la séparation de celles-ci.

L'avantage de l'électrophorèse capillaire par rapport aux techniques chromatographiques est son faible coût et sa grande vitesse d'analyse. Le Tableau 16 présente les travaux d'analyse de spéciation de l'arsenic qui utilisent cette technique dans des matrices alimentaires.

Tableau 16. Récapitulatif des séparations par électrophorèse capillaire

Tampon	Voltage (kV)	Espèces séparées	Temps (min)	Matrice	Détection	Référence
25 mM CAPS, 0,5 mM SDS ; pH 9,5	+25	AsB, As(III), DMA, MA, As(V)	10	DOLT-3	ICP-MS	Hsieh *et al.*, (2010)
25 mM tampon borate, 10% MeOH; pH 9.2	+30	AsB, As(III), DMA, As(V)	15	poisson	ICP-MS, ESI-TOF-MS	Meermann *et al.*, (2008)
20 mM NaH_2PO_4, 5 mM $Na_2B_4O_7$; pH 6,5	+12	As(III), DMA, MA, As(V)	10	crevette, palourde	ICP-MS	Yang *et al.*, (2009)
15 mM Tris, 15 mM SDS ; pH 9,0	+22	AsB, As(III), AsC, DMA, MA, As(V)	13,3	DORM-2, SRM 1566a, huître poisson	ICP-MS	Yeh et Jiang (2005)
20 mM sodium phosphate ; pH 5.7	+30	As(III), DMA, 3-AHPAA, 4-HPAA, o-ASA, MA, 3-ROX, As(V)	20	fumier de poulet	ICP-MS	Rosal *et al.*, (2005)

L'électrophorèse capillaire (CE) reste peu utilisée pour l'analyse de matrices complexes en raison de la complexité d'optimisation des conditions de séparation (choix du tampon, pH et force

ionique du tampon, tension appliquée, température, dimensions du capillaire, utilisation d'additifs) et à cause des interférences dues aux effets de matrice. En effet, la séparation des espèces dans les échantillons riches en ions peut être difficile du fait que la force ionique induit une résistance électrique basse, ce qui donne des pics larges et mal résolus (Ali et Jain 2004). Par conséquent, pour le moment, la CE est difficilement applicable dans des conditions de routine du fait de son manque de reproductibilité et des faibles limites de détection dues aux faibles volumes d'échantillon (Ali et Jain 2004; Francesconi et Kuehnelt 2004).

II.3. Choix analytiques retenus

Dans le cadre de cette étude de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche, la technique de couplage entre la chromatographie d'échange d'ions et une détection par ICP-MS, après une extraction assistée par micro-ondes utilisée a été retenue puis optimisée au sein du laboratoire lors d'une étude précédente (Dufailly *et al.*, 2007).

En effet, pour la mise en solution des espèces d'arsenic dans les produits de la pêche, la méthode d'extraction assistée par micro-ondes (MAE) semblait l'alternative la plus appropriée en raison de sa rapidité et sa simplicité de mise en œuvre, son absence de perte d'éléments volatils et de contamination par les particules atmosphériques (système fermé) et l'utilisation de volumes de solvant plus faibles impliquant moins de déchets et de risques de contamination. L'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction s'est avérée la plus adaptée car elle permet une extraction satisfaisante des différentes espèces arséniées dans les produits de la pêche, tout en étant adaptée à une détection par ICP-MS. Ces avantages comparés aux autres techniques d'extraction testées dans la littérature sont des atouts précieux pour une utilisation 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 sensible et robuste. Le couplage entre la séparation par chromatographie liquide et la détection par ICP-MS semblait répondre de la façon la plus pertinente à ces critères. Parmi le large choix de colonnes à échange d'ions (types de colonnes les plus utilisées pour la séparation des composés arséniés) testées dans la littérature, il apparaît que la colonne IonPac AS7 (Dionex) semblait potentiellement être le choix le plus adapté pour une séparation simple, rapide et simultanée des composés inorganiques et organiques contenus dans des matrices réelles. De plus, cette colonne nécessite un éluant (acide nitrique) qui s'avère être le plus compatible avec la détection par ICP-MS, technique de détection la plus utilisée pour les analyses de spéciation de l'arsenic.

La deuxième partie de ce mémoire portera donc sur la validation complète de ce protocole analytique et sur ses applications (Article I), afin de compléter les données nationales d'occurrence des espèces d'arsenic dans les produits de la pêche.

III. Bioaccessibilité de l'arsenic et d'autres éléments traces d'intérêt dans les aliments : état de l'art

La toxicité des contaminants dans les aliments ont montré que les risques sanitaires ne correspond pas de manière systématique aux doses d'exposition mesurées, dans la mesure où les teneurs totales ou en spéciation des contaminants présents dans les aliments ne donnent pas d'information sur leur bioaccessibilité ou leur biodisponibilité (Caussy *et al.,* 2003). En effet, certains aliments peuvent être déclarés impropres à la consommation car ils contiennent une teneur en un contaminant supérieure à une limite fixée, alors que cet élément ne serait peut-être pas libéré de manière significative dans l'organisme pendant la digestion.

III.1. Biodisponibilité et bioaccessibilité

La biodisponibilité est définie comme la fraction d'un analyte absorbée et distribuée du système gastro-intestinal vers la circulation systémique (Ruby *et al.*, 1996). La détermination de la biodisponibilité d'un élément toxique dans les aliments est cruciale dans le cadre de l'évaluation des risques. Cela nécessite l'utilisation de modèles *in vivo* (en dosant des concentrations d'un composé cible chez l'Homme ou l'animal après lui en avoir préalablement administré une quantité connue), ou des méthodes *in vitro*.

Des études *in vivo* sur des modèles animaux (primates, porc, chien, lapin, rongeurs) ont été rapportées pour évaluer la biodisponibilité de l'arsenic dans les sols (Davis *et al.,* 1992; Freeman *et al.,* 1995; Ng *et al.*, 1998 ; Juhasz *et al.,* 2007; Juhasz *et al.,* 2008). La proximité génétique de l'Homme et du singe en font un animal de choix pour les études de biodisponibilité *in vivo*, mais qui restent néanmoins difficiles à réaliser devant le coût des expérimentations. Les rongeurs sont utilisés pour de nombreuses applications médicales et environnementales mais ne permettent pas une représentation assez proche du métabolisme humain. Le porc représente un bon modèle pour des études de biodisponibilité *in vivo* en raison de sa similarité avec l'Homme en termes de physiologie, de système digestif, de développement, de besoins nutritionnels, et de métabolisme minéral. Néanmoins, l'utilisation de l'expérimentation animale pour les études de biodisponibilité

s'avère difficile à mettre en œuvre, du fait du coût élevé qu'elle représente et de la durée des expérimentations d'une part, et du problème éthique qu'elle soulève.

Comme alternative aux méthodes *in vivo,* des méthodes *in vitro* permettant d'estimer la bioaccessibilité de composés ont été développées. En effet, l'étude de la bioaccessibilité, qui correspond à la fraction d'un composé qui est libérée de la matrice ingérée dans le tractus gastro-intestinal, et qui devient donc disponible pour l'absorption intestinale vers le réseau sanguin (Intawongse et Dean 2006; Koch *et al.,* 2007), constitue une première étape dans l'évaluation de la biodisponibilité d'un composé. Ces méthodes impliquent de reproduire les conditions retrouvées chez l'Homme pendant la digestion (température, agitation, pH, composition chimique, présence d'enzymes…), dans les différentes zones de l'appareil digestif humain (bouche, estomac et intestin).

Ces méthodes *in vitro* présentent l'avantage d'une plus grande simplicité de mise en œuvre par rapport aux méthodes *in vivo* en étant plus rapides, plus précises, plus reproductibles, et à moindre coût.

En 1981, Miller *et al.,* (1981) ont testé une méthode qui permet d'évaluer la bioaccessibilité et donc indirectement la disponibilité du fer dans les aliments pour des études nutritionnelles. Depuis, de nombreuses méthodes ont été développées pour évaluer la bioaccessibilité de métaux dans le sol et les aliments (Intawongse et Dean 2006).

On peut distinguer les méthodes « statiques » (ou « batch ») des méthodes « dynamiques ». Les méthodes statiques simulent le transit digestif en exposant de manière séquentielle l'échantillon aux différents compartiments digestifs (Intawongse et Dean 2006) et sont les plus fréquemment utilisées. Les méthodes dynamiques miment le passage graduel de l'échantillon dans le tractus gastro-intestinal à travers les différentes conditions physiologiques. Parmi ces méthodes, celle développée par Chu et Beauchemin (2004) pour l'évaluation de la bioaccessibilité du Zn et du Pb dans les céréales implique la lixiviation en continu d'un échantillon d'aliment solide par les différents fluides digestifs artificiels, le système étant directement relié à un ICP-MS afin de mesurer de manière continue la libération progressive des éléments traces de l'aliment par un réactif donné.

De plus, la majorité des études se limite généralement à la simulation des étapes gastriques et intestinales sans inclure d'interactions avec la salive (Intawongse et Dean 2006), en considérant que la salive a une influence négligeable sur la bioaccessibilité des contaminants. Cependant, même si de nombreuses études ont été réalisées sur les sols, peu d'études se sont intéressées aux aliments, en particulier aux produits de la pêche.

Le Tableau 17 et le Tableau 18 présentent l'ensemble des études évaluant la bioaccessibilité de l'arsenic et des autres éléments dans les poissons et autres produits de la pêche.

Tableau 17. Études de bioaccessibilité de l'arsenic dans les poissons et autres produits de la pêche

Matrice et Résultats			Technique de détection	Fluides digestifs	Conditions de digestion	Référence
	AsT		FI-HG-AAS	Suc gastrique : pepsine, pH 2 Suc pancréatique : pancréatine, bile, pH 5	Modèle statique (SM) Gastrique : 2 g d'échantillon dans 100 mL de suc gastrique pendant 2 h Intestinale : 2 g d'échantillon dans 100 mL de suc intestinal pendant 5 h	Torres-Escribano *et al.*, (2011a)
TORT-2	71 %					
IAEA 140-TM	72 %					
	AsT			Suc gastrique : pepsine, lipase, pH 6,4 à 2 Suc intestinal : pancréatine, bile, pH 6,4-7,2	Modèle dynamique (TIM-1) Gastrique : ~ 4 g d'échantillon dans 250 mL de suc gastrique pendant 2h (réduction du pH de 6,4 à 2) Intestinale : transfert de l'échantillon dans le compartiment intestinal. passage de 30 mL (duodénum, pH 6,4) et 70 mL (jéjunum, pH 6,9 et iléum, pH 7,2) de suc intestinal pendant 6 h	
TORT-2	67 %					
IAEA 140-TM	47 %					
	AsT	**Espèces**	HG-ICP-MS	Suc gastrique : 0,16 g de pepsine dans 1 mL d'HCl 0,2 M Suc intestinal : 0,2 mg de pancréatine, 0,004 g de pancréatine, 0,025 g de bile dans 5 mL de NaHCO3 0,001 M	Modèle dynamique (continuous flow dialysis) 3 g d'échantillon dans 12,5 mL d'eau ajustée à pH 2 avec HCl 6 M Gastrique : ajout de 375 µL de suc gastrique et agitation pendant 2h Intestinale : 2 g du mélange introduits dans un sac de dialyse dont la surface est balayée par une solution dialysante de NaHCO3. Le pH est augmenté de 2 à 5 pendant 30 min et ajout de 625 µL de la solution intestinale. Dialyse poursuivie pendant 1 h 30	Arkasuwan *et al.*, (2011)
Crevette	54 %	Asi : 1 – 2 % As organique 52 – 57 %				
	AsT		HPLC/ICP-MS	Suc gastrique : 1,25 g/L de pepsine, 0,5 g/L de citrate de sodium, 0,5 g/L d'acide malique, 1 mL/L d'acide acétique glacial, 0,15 M NaCl), pH ajusté à 1.8 avec HCl Suc intestinal : 0,175 g de bile, 0,05 g de pancréatine	Modèle statique (PBET) Gastrique : 0,1 - 0,15 g d'échantillon dans 10 mL de solution gastrique pendant 1 h Intestinale : ajustement du pH à 7 avec Na_2CO_3 et ajout des enzymes intestinales. Agitation pendant 4 h	Williams *et al.*, (2009)
Écrevisse	sauvages : 38 – 69 % exposées à As(III) et As(V): 12 – 78 %					
	AsT		ICP-MS, HPLC/ICP-MS	Salive : 6,8 g de KH_2PO_4, 77 mL NaOH 0,2 M dans 1 L d'H_2O, pH 6,5	Modèle statique Salive : 0,200 g d'échantillon dans 6 mL de salive	Dufailly *et al.*, (2008a)
TORT-2	52 %					
DOLT-3	69 %					
DORM-3	57 %					
BCR 627	53 %					
	AsT	**Espèces (mg/kg)**			Modèle dynamique ~ 0,200 g d'échantillon dans un tube en PTFE Salive : lixiviation pendant 5 min	
TORT-2	57 %	As(III) : 0,69 DMA : 0,74 AsB : 9,46 AsC : 0,26	MA : 0,24 As(V) : 0,37 TMAO : 1,42			
DOLT-3	42 %	As(III) : 0,32 DMA :0,24 AsB : 2,90 AsC : <LQ	MA : 0,17 As(V) : <LQ TMAO : <LQ			
DORM-3	59 %	As(III) : <LQ DMA : 0,30 AsB : 3,23 AsC : 0,31	MA : <LQ As(V) : 0,27 TMAO : <LQ			
BCR 627	42 %	As(III) : <LQ DMA :0,09 AsB : 1,57 AsC : <LQ	MA : <LQ As(V) : 0,20 TMAO : <LQ			

Matrice et Résultats				Technique de détection	Fluides digestifs	Conditions de digestion	Référence
	AsT	**Espèces**					
DORM-2	95 %	AsB : 67 % DMA : 32 %	MA : 800% TETRA : 42 %	HG-AAS, HPLC/HG-AFS	Suc gastrique : 1 g de pepsine dans 10 mL d'HCl 0,1 M, pH 2 Suc intestinal : 0,2 mg de pancréatine, 1,25 g de bile dans 50 mL $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 5	Modèle statique 5 g d'échantillon dans 90 mL d'eau ajustée à pH 2 avec HCl 6 M Gastrique : ajout de 10 mL de suc gastrique et agitation pendant 2 h Intestinale : augmentation du pH à 5 avec addition de $NaHCO_3$ 0,1 M et ajout de 50 mL suc intestinal. Agitation pendant 2 h	Laparra *et al.*, (2007)
sole crue	98 %	AsB : 107 %	MA : 612 %				
sole cuite	102 %	AsB : 114 %	MA : 235 %				
flétan cru	79 %	AsB : 100 %	TMAO : 71 %				
flétan cuit	100 %	AsB : 124 %	TMAO : 57 %				
	AsT	**Asi**					
palourdes contaminées	36 – 44 %	86 -98% de l'AsT		ICP-MS, HPLC/ICP-MS HG-AAS	Suc gastrique : 30,03 g de glycine dans 1 L d'eau, pH ajusté à 1,5 avec HCl 1 M Suc intestinal : 0,0175 g de bile et 0,005 g de pancréatine, pH 7	Modèle statique Gastrique : 0,25 - 1 g d'échantillon dans 10 mL de suc gastrique pendant 1 h Intestinale : ajustement du pH à 7 et ajout des enzymes intestinale. Agitation pendant 4 h	Koch *et al.*, (2007)
palourdes non contaminées	83 - 88 %	6,2 - 6,8 % de l'AsT					
	AsT	**Asi**					
algue crue	32 - 67 %	49 – 77 %		HG-AAS		Idem Laparra *et al.*, (2007)	Laparra *et al.*, (2003)
algue cuite	66 – 80 %	73 – 88 %					

La plupart des travaux de bioaccessibilité de l'arsenic implique un modèle statique (en batch) (Laparra *et al.,* 2003; Koch *et al.,* 2007; Laparra *et al.,* 2007; Williams *et al.,* 2009), mais quelques études utilisent un modèle dynamique (Arkasuwan *et al.,* 2011). Toutefois, les études en mode statique ne permettent pas de recueillir des données en temps réel sur la quantité libérée par chaque réactif digestif. Torres-Escribano *et al.,* (2011a) et Dufailly *et al.,* (2008a) ont comparé les deux approches. Les travaux de Torres-Escribano *et al.,* (2011a) ont montré des résultats significativement différents en fonction du modèle utilisé (72 % avec le modèle statique et 47 % avec le modèle dynamique). De même, Dufailly *et al.,* (2008a) rapportent des résultats de bioaccessibilité pour l'arsenic total différents pour le DOLT-3 et le CRM 627 avec une méthode statique (69 % et 53 %) et avec une méthode de lixiviation en ligne (42 % et 42 %).

Dans les travaux sur la bioaccessibilité de l'arsenic, l'étape de la salive n'est le plus souvent pas prise en compte et son action n'a été évaluée que par une seule étude (Dufailly *et al.,* 2008a). Cependant, les résultats ont montré que cette étape devrait être considérée, considérant dans cette étude que la totalité de l'arsenic bioaccessible est libéré par la salive, et que quasiment plus rien n'est ensuite libéré par les sucs gastrique et intestinal.

Quelques études se sont également intéressées à considérer la nature des espèces libérées lors de la simulation de la digestion des les produits de la pêche (Koch *et al.,* 2007; Laparra *et al.,* 2007; Dufailly *et al.,* 2008a; Arkasuwan *et al.,* 2011). Ainsi, (Laparra *et al.,* 2003) ont étudié l'influence de la cuisson sur la bioaccessibilité de l'arsenic dans les algues et ont montré que la bioaccessibilité de l'As total et de l'As inorganique augmente après la cuisson, la bioaccessibilité de l'Asi atteignant jusqu'à 73 % et 88 % pour H. fusiforme et Porphyra sp. respectivement. Laparra *et al.,* (2007) ont également étudié l'influence de la cuisson sur la bioaccessibilité de l'arsenic total dans les poissons et leur résultats ont montré cette fois que la cuisson ne modifiait pas la bioaccessibilité de l'arsenic total ni des espèces organiques (MA, DMA, AsB, TMAO, AsC et TETRA).Koch *et al.,* (2007) ont comparé la bioaccessibilité de l'arsenic dans des palourdes contaminées et non contaminées. Les résultats ont montré que, dans la fraction bioaccessible qui représente entre 34 et 46 % de l'arsenic total dans des palourdes contaminées en As inorganique, l'arsenic inorganique est majoritaire (86 - 98% de l'As total). En revanche, dans les palourdes non contaminées, l'As inorganique dans la fraction bioaccessible (83 – 88 %) ne représentait que 6 à 7 % de l'As total.

De la même manière, Williams *et al.,* (2009) ont évalué la bioaccessibilité de l'arsenic total dans des écrevisses sauvages et dans des écrevisses exposées à l'As(III) et à l'As(V), et rapportent que l'arsenic présent dans le muscle abdominal des écrevisses exposées à l'arsenic inorganique est présent sous forme inorganique et est très bioaccessible.

Arkasuwan *et al.*, (2011) se sont également intéressés à la bioaccessibilité de l'arsenic inorganique dans des crevettes et ont montré qu'il contribuait à hauteur de 1 à 2 % seulement de l'arsenic total bioaccessible.

Sur les espèces organiques, Laparra *et al.*, (2007) rapportent des niveaux de bioaccessibilité de 67 à 100 % pour l'AsB, 30 % pour le DMA, 45 % pour le TETRA et supérieurs à 50 % pour le TMAO dans les produits de la pêche.

Tableau 18. Études de bioaccessibilité des autres éléments dans les poissons et autres produits de la pêche

Matrice étudiée	Élément						Technique de détection	Fluides digestifs	Conditions de digestion	Référence
	Mn	Cu	Zn	Cd	Hg	Pb				
Moule (crue)				68-79%			GF-AAS		Modèle statique Salive : 6 mL de salive ajouté à 4,5 g d'échantillon, pendant 5 min Gastrique : ajout de 12 mL de suc gastrique pendant 2 h Intestinal : ajout mu mélange 12 mL solution duodénale, 6 mL de bile, 2 mL HCO_3^- pendant 2 h	Houlbrèque *et al.*, (2011)
Moule (bouillie)				42-70%						
TORT-2				21%	4%	19%	FI-HG-AAS	Suc gastrique : pepsine, pH 2 Suc pancréatique : pancréatine, bile, pH 5	Modèle statique (SM) Gastrique : 2 g d'échantillon dans 100 mL de suc gastrique pendant 2 h Intestinale : 2 g d'échantillon dans 100 mL de suc intestinal pendant 5 h	Torres-Escribano *et al.*, (2011a)
				53%	21%	7%		Suc gastrique : pepsine, lipase, pH 6,4 à 2 Suc intestinal : pancréatine, bile, pH 6,4-7,2	Modèle dynamique (TIM-1) Gastrique : ~4 g d'échantillon dans 250 mL de suc gastrique pendant 2 h (réduction du pH de 6,4 à 2) Intestinale : transfert de l'échantillon dans le compartiment intestinal. passage de 30 mL (duodénum, pH 6,4) et 70 mL (jéjunum, pH 6,9 et iléum, pH 7,2) de suc intestinal pendant 6 h	
Espadon (cru)					59-87%		HPLC-TO-CV-AFS, CV-AFS		Idem Torres-Escribano *et al.*, (2010)	Torres-Escribano *et al.*, (2011b)
Espadon (cuisiné)					35-49%					
Requin (cru)					43-69%					
Requin (cuisiné)					34-47%					
Bonito (cru)					17-23%					
Bonito (cuisiné)					12-17%					
Thon (cru)					13-19%					
Thon (cuisiné)					6-10%					
Bar (cru)		81-84%	70-72%	85-93%			ICP-AES		Modèle statique Salive : 6 mL de salive ajouté à 4,5 g d'échantillon, pendant 5 min Gastrique : ajout de 12 mL de suc gastrique pendant 2 h Intestinal : ajout mu mélange 12 mL solution duodénale, 6 mL de bile, 2 mL HCO_3^- pendant 2h	He *et al.*, (2010)
Bar (cuisiné*)		54-71%	37-52%	36-86%						
Dorade (crue)		83-85%	67-73%	83-85%						
Dorade (cuisiné*)		58-71%	28-51%	58-71%						
Espadon (cru)					38-83%		HPLC-TO-CV-AFS, CV-AFS	Suc gastrique : 1 g de pepsine dans 10 mL d'HCl 0,1 M, pH 2 Suc intestinal : 0,2 mg de pancréatine, 1,25 g de bile dans 50 mL $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 5	Modèle statique 10 g d'échantillon frais dans 90 mL d'eau ajustée à pH 2 avec HCl 6 M Gastrique : ajout de 10 mL de suc gastrique et agitation pendant 2 h Intestinale : augmentation du pH à 5 avec addition de $NaHCO_3$ 0,1 M et ajout de 50 mL suc intestinal. Agitation pendant 2 h	Torres-Escribano *et al.*, (2010)

Matrice étudiée	Élément						Technique de détection	Fluides digestifs	Conditions de digestion	Référence
	Mn	Cu	Zn	Cd	Hg	Pb				
Beluga (cru) Phoque (bouilli) Phoque (cru) Morse Narval (cru) Omble arctique (cru)					41% f 4,.6% g 19% h 1% i 66% j 15-48% k 0.5% f 33-94% k		C-GA-AAS		Modèle statique Gastrique : 0,2 g d'échantillon dans 8 mL d'HCl dilué à pH 1,5. Ajout de 6,8 µL de pepsine. Agitation pendant 2 h Intestinal : Ajout de 4 mL de solution intestinale, ajustement du pH à 6,5, agitation pendant 2 h. ajout de 8 mL de solution de colon, ajustement du pH à 6,3, agitation pendant 18 h	Laird *et al.*, (2009)
Moule (crue) Moule (cuisinée)	79% 82%		70% 47%	72% 34%			Radiotraceur gamma		Modèle statique Salive : 6 mL de salive ajouté à 4,5 g d'échantillon, pendant 5 min Gastrique : ajout de 12 mL de suc gastrique pendant 2 h Intestinal : ajout mu mélange 12 mL solution duodénale, 6 mL de bile, 2 mL HCO_3^- pendant 2 h	Metian *et al.*, (2009)
Maquereau					68%		AAS	Suc gastrique : pepsine à 3 mg/mL Suc intestinal : 0,4 mg/mL pancréatine, 0,2 mg/mL lipase, 2,4 mg/mL de bile	Modèle statique Gastrique :, ajout de solution pepsine, acidification pH 2, pendant 1 h Intestinal : augmentation du pH avec 100 mL de $NaHCO_3$ ajout de 9 mL du mélange bile pancréatine lipase, ajustement du pH à 7, pendant 2 h	Shim *et al.*, (2009)
Bulot (cru) Huître (crue) Moule Palourde Pétoncle		90% b 61-97% b 30% a 63% b 88% a 68% b 24% a 38% c	73% b 59-82% b 84% a 34% b 84% a 60% b 44% a 60% c	72% b 62-84% b 29% a 36% b 64% a 48% b 44% a 20% c		52% b 19-34% b 28% a 44% b 48% a 37% b 31% a 29% c	FAAS, EAAS		Modèle statique Salive : 6 mL de salive ajouté à 4,5 g d'échantillon, pendant 5 min Gastrique : ajout de 12 mL de suc gastrique pendant 2 h Intestinal : ajout du mélange 12 mL solution duodénale, 6 mL de bile, 2 mL HCO_3^- pendant 2 h	Amiard *et al.*, (2008)
Moule (crue)	40% * 25% **	25-30% * 30% **				15-25%* 10% **	ICP-MS	Suc gastrique : 1,25 g de pepsine, 500 mg de malate, 500 mg de citrate, 500 µL d'acide acétique, 420 µL d'acide lactique dans 1 L d'eau. pH 2,5 avec HCl Suc intestinal : 52,5 mg de bile, 15 mg de pancréatine dans solution saturée en $NaHCO_3$ pH 7	Modèle statique Gastrique :0,3 g d'échantillon dans 30 mL de suc gastrique Intestinal : ajout 5 mL de suc intestinal, pendant 2 h	Navarro *et al.*, (2008)
Poisson (thon, espadon, sardine) (cru)					< 20%		HG-AFS	Suc gastrique : pepsine 6% (w/v) dans NaCl 0,15 M Suc intestinal : pancréatine 1,5 % (w/v), amylase 0,5% (w/v), bile 0,15% (w/v)	Modèle statique Gastrique :25 g d'échantillon dans 75 mL pendant 4 h de suc gastrique Intestinal : ajustement du pH à 6,8 avec $NaHCO_3$, ajout 50 mL de suc intestinal	Cabanero *et al.*, (2007)

Matrice étudiée	Élément						Technique de détection	Fluides digestifs	Conditions de digestion	Référence
	Mn	Cu	Zn	Cd	Hg	Pb				
Colin (frit)		87%	30%				GFAAS, FAAS	Suc gastrique : 1,6 g de pepsine dans 10 mL d'HCl Suc intestinal : 0,4 g de pancréatine, 2,5 g de bile dans 100 mL de $NaHCO_3$ 0,1 M	Modèle statique Gastrique : 30 g d'échantillon dans 70 mL d'H_2O, ajustement pH à 2, ajout solution gastrique (5 g de pepsine pour 100 g d'échantillon) pendant 2 h Intestinal : ajustement du pH à 5 avec $NaHCO_3$, ajout de 18,8 mL de suc intestinal pendant 2 h	Camara *et al.*, (2005)
Filet de colin (précuisiné)		87%	59%							
Huître (crue)		26-80%	50-80%	44-75%					Gastrique*(biodisponibilité)	Bragigand *et al.*, (2004)
Thon (cru)					9%		HG-AFS	Suc gastrique : pepsine 6% (w/v) dans NaCl 0,15 M Suc intestinal : pancréatine 1,5 % (w/v), amylase 0,5% (w/v), bile 0,15% (w/v)	Modèle statique Gastrique :25 g d'échantillon dans 75 mL pendant 4 h de suc gastrique Intestinal : ajustement du pH à 6,8 avec $NaHCO_3$, ajout 50 mL de suc intestinal	Cabanero *et al.*, (2004)

a : glandes digestives ; b :in toto ; c : muscle ; d : langue ; e : rein ; f : peau ; g : intestin ; h : foie ; i : cerveau ; j : sang ; k : chair ; * gastrique seulement ; ** intestinale seulement

Plusieurs travaux ont étudié la bioaccessibilité d'autres éléments traces dans les produits de la pêche. La bioaccessibilité du mercure a été évalué dans le TORT-2 par Torres-Escribano *et al.,* (2011a), dans les mammifères marins par Laird *et al.,* (2009) et surtout dans les poissons par Cabanero *et al.,* (2004, 2007); Shim *et al.,* (2009); Torres-Escribano *et al.,* (2010); Torres-Escribano *et al.,* (2011b). Dans les poissons, d'autres éléments ont également été étudiés : Camara *et al.,* (2005) se sont intéressés au Cu et au Zn et He *et al.,* (2010) au Cu, Zn et Pb. La bioaccessibilité de plusieurs autres éléments traces a été évaluée dans les bivalves par plusieurs travaux : Bragigand *et al.,* (2004) pour le Cu, le Zn et le Cd, Navarro *et al.,* (2008) pour le Mn, le Cu, et le Pb, Amiard *et al.,* (2008) pour le Cu, le Zn, le Cd, et le Pb, Metian *et al.,* (2009) pour le Mn, le Zn, et le Cd, et Houlbrèque *et al.,* (2011) pour le Cd.

La plupart de ces études de bioaccessibilité ont été réalisées à l'aide d'un modèle statique. Seuls Torres-Escribano *et al.,* (2011a) ont comparé une approche dynamique et une approche statique pour la détermination de la bioaccessibilité totale du cadmium, du mercure et du plomb dans le TORT-2 et ont observé des différences significatives en fonction du modèle utilisé et des éléments étudiés (modèle statique : Cd 21 %, Pb 19 %, Hg 4 % ; modèle dynamique Cd 53 %, Pb 7 %, Hg 21 %). Seules les études basées sur les travaux de Versantvoort *et al.,* (2005) intègrent la salive dans leurs travaux de bioaccessibilité (Amiard *et al.,* 2008; Metian *et al.,* 2009; He *et al.,* 2010; Houlbrèque *et al.,* 2011), les autres études négligent cette étape et ne considérent que les étapes gastriques et intestinales.

Parmi les études de bioaccessibilité, Plusieurs travaux se sont intéressés à l'influence du mode de préparation sur la bioaccessibilité des éléments. Ainsi, la bioaccessibilité du Mn, du Zn et du Cd (Metian *et al.,* 2009), et du Cd (Houlbrèque *et al.,* 2011) ont été comparées dans des échantillons de moules crues et cuites, et celle du Cd, du Cu et du Zn (He *et al.,* 2010) et du Hg (Torres-Escribano *et al.,* 2011b) ont été comparées dans des poissons. Les résultats ont montré que dans les matrices étudiées, la cuisson diminue la bioaccessibilité de tous ces éléments.

Amiard *et al.,* (2008) se sont eux intéressés à l'influence de l'ajout de vinaigre ou de citron sur la bioaccessibilité du Cd, du Cu, du Pb et du Zn dans des huîtres et ont montré cela entrainait une diminution de la bioaccessibilité du Cu et du Pb, alors que pour le Cd et le Zn, les effets pouvaient être plus variables selon les matrices et le type de mastication.

III.2. Choix analytiques retenus

Pour l'estimation de la bioaccessibilité de l'arsenic dans les produits de la pêche, nous avons choisi d'utiliser une méthode dynamique de lixiviation en ligne. La méthode de lixiviation en continu mise au point précédemment (Chu et Beauchemin 2004) et adaptée à l'arsenic par Dufailly *et al.*, (2008a) se présente comme une approche pragmatique puisqu'elle permet la détermination de la quantité maximale d'un élément donné libérée par chacun des réactifs gastro-intestinaux en temps réel, via la détection par ICP-MS. Cette approche permet de plus d'acquérir des informations sur les interactions entre un élément et une matrice donnée tout en limitant les éventuelles contaminations durant les étapes de préparation de l'échantillon dans la mesure où le système de travail est fermé.

La troisième partie de ce mémoire portera sur le développement, les améliorations apportées à cette méthode de lixiviation en continu et ses applications, fournissant ainsi des éléments d'informations sur la bioaccessibilité de l'arsenic total et des espèces d'arsenic (Article II) dans les produits de la pêche, mais également à l'application de cette méthode à d'autres éléments traces en total sur ces échantillons (Article III).

Deuxième partie. Méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche : extraction assistée par micro-ondes et analyse par couplage HPLC/ICP-MS

I. Introduction

Le Laboratoire de Sécurité des Aliments (LSA) a été désigné par le Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche (Arrêté du 29 décembre 2009) comme Laboratoire National de Référence (LNR) dans le domaine de compétence des « Métaux lourds dans les denrées alimentaires d'origine Animale ».

Parmi les missions qui incombent aux LNR, on peut citer le développement, l'optimisation et la validation de méthodes d'analyse et la participation à leur normalisation, l'animation technique du réseau de laboratoires agréés notamment au regard des méthodes officielles du LNR, et la mission de répondre à toute demande d'expertise scientifique ou technique du ministère chargé de l'agriculture et des autres ministères intéressés.

C'est dans ce contexte que se situe cette seconde partie du mémoire qui est consacrée à l'évaluation de la méthode analytique permettant la spéciation de sept composés arséniés dans les produits de la pêche (As(III), As(V), MA, DMA, AsB, TMAO et AsC) par couplage HPLC/ICP-MS, et aux applications relatives à cette méthode. L'objectif est de transférer ensuite cette méthode et notre savoir-faire à plusieurs laboratoires agréés, afin de compléter par l'étude de la spéciation de l'arsenic, les prochains plans de surveillance et plan de contrôle des contaminants chimiques du milieu aquatique dans les produits de la pêche.

Après avoir présenté les aspects théoriques et pratiques des systèmes d'extraction assistée par micro-ondes, de séparation par chromatographie d'échange d'ions, et de détection par ICP-MS qui ont été retenus, nous présenterons l'évaluation des performances analytiques de la méthode suivant les normes NF V03-110 (AFNOR 1993), XPT 90-210 (AFNOR 1999), FD V03-115 (AFNOR 1996), ainsi que les différents contrôles qualité mis en place. Enfin, nous présenterons les résultats des applications de cette méthode sur des matériaux de référence et sur divers produits de la pêche qui ont fait l'objet de l'article I publié dans « Talanta ».

II. Conditions expérimentales

II.1. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

II.1.a. Principe de la MAE

Contrairement aux techniques classiques de chauffage par conduction ou convection, l'utilisation des micro-ondes implique une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matière. Le chauffage par micro-ondes d'un produit résulte ainsi de la conversion en chaleur de l'énergie d'une onde électromagnétique (captée sous forme de radiation de longueur d'onde entre 1 cm et 1 m) au sein de ce matériau. Ce transfert d'énergie particulier induit un transfert de matière lui aussi particulier et dont les mécanismes diffèrent notablement de ceux de l'extraction solide-liquide traditionnelle.

Les durées des procédés d'extraction assistée par micro-ondes sont de l'ordre de quelques minutes et les rendements sont dans la plupart des cas comparables à ceux obtenus par les procédés traditionnels d'extraction.

Un programme de chauffage déterminant la puissance des micro-ondes en fonction du temps est constitué de trois étapes : une montée progressive en température et en pression afin de limiter les risques d'emballement thermique pouvant entraîner des surpressions, une étape de chauffage à température constante suivie d'une étape de refroidissement.

II.1.b. Préparation des échantillons

Pour éviter une éventuelle contamination, le matériel utilisé a été nettoyé suivant une procédure de nettoyage de la vaisselle de laboratoire spécifique : rinçage à l'eau ultrapure, décontamination dans un bac de HNO_3 à 10 % pendant six heures minimum, rinçage à l'eau ultrapure et séchage en étuve à 50°C.

Les conditions d'extraction ont été préalablement optimisées par les travaux de thèse de Vincent Dufailly. Une prise d'essai d'environ 0,150 g d'échantillon lyophilisé est introduite dans un récipient de digestion en quartz. Un volume de 10 mL d'eau ultrapure est ajouté pour la mise en solution des espèces arséniées. En plus des échantillons, chaque série d'extraction comprend, un blanc d'extraction, et un MRC.

À la fin du programme (Tableau 19), l'extrait est transféré dans un tube en polyéthylène de 50 mL, complété au volume final avec de l'eau ultrapure, puis centrifugé à 3500 rpm. Le surnageant est filtré sur filtre seringue.

Tableau 19. Programme MAE

Étape	Température initiale (°C)	Température finale (°C)	Durée (min)	Puissance (W)
1	20	80	2	800
2	80	80	6	800
3	80	20	20	-

II.2. Couplage HPLC-ICP-MS

Le couplage de la chromatographie en phase liquide avec l'ICP-MS a été proposé pour la première fois à la fin des années 80, et l'ICP-MS est aujourd'hui largement utilisé pour la détection des éléments traces en sortie de colonne chromatographique en raison de :

- sa capacité multi-élémentaire ;
- sa spécificité ;
- la compatibilité du débit d'introduction de l'échantillon avec la chromatographie liquide, permettant une acquisition des données en ligne ;
- sa grande sensibilité pour une large gamme d'éléments.

II.2.a. Séparation

II.2.a.i. Séparation des espèces par chromatographie d'échange d'anions

Une chaîne HPLC Ultimate 3000 (Dionex) a été utilisée lors de cette étude.

La séparation des espèces arséniées a été réalisée sur une colonne chromatographique IonPac AS7 (250 mm × 4 mm, Dionex) précédée d'une garde IonPac AG7 (50 mm × 4 mm, Dionex). La phase stationnaire hydrophobe de cette colonne est constituée d'un polymère sur lequel sont greffés des groupements ammonium quaternaires d'alkyle.

La forme chimique des différentes espèces d'arsenic étudiées est influencée par les conditions du milieu, comme le montre la Figure 5.

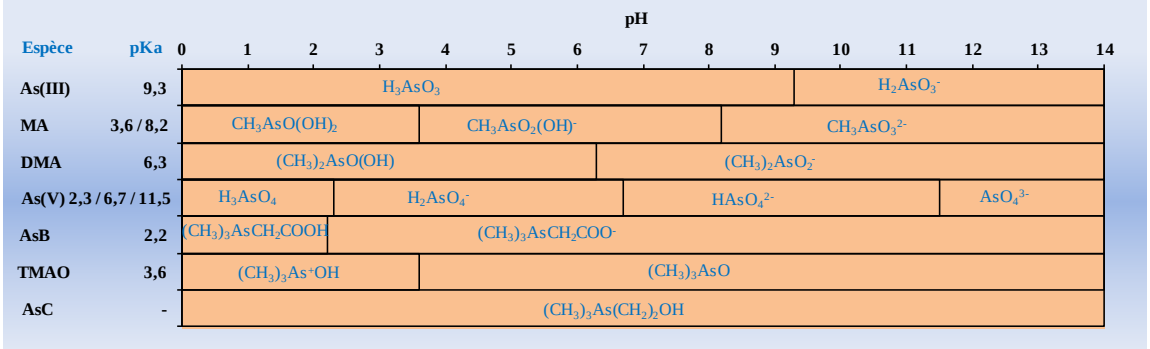


Figure 5. pKa et formes chimiques prédominantes des différentes espèces d'arsenic selon le pH (d'après Suner *et al.*, (2001))

II.2.b. Détection par ICP-MS

II.2.b.i. Principe général

L'ICP-MS est le couplage d'une torche à plasma et d'un spectromètre de masse. La Figure 6 présente le schéma simplifié des différents éléments qui constituent un appareil d'ICP-MS.

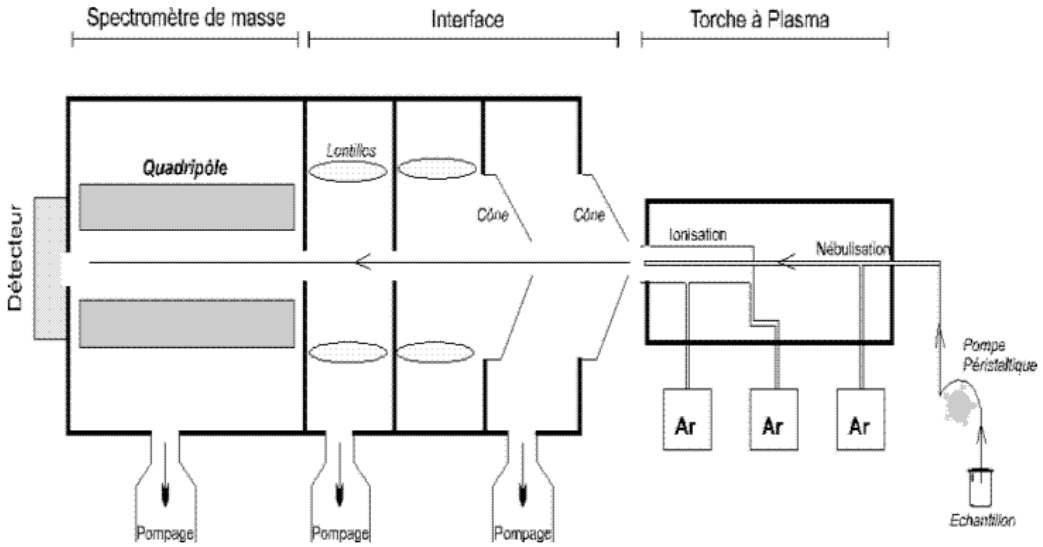


Figure 6. Représentation schématique d' ICP-MS (source : http://iramis.cea.fr/Images/astImg/348_2.gif)

L'aérosol généré par le nébuliseur est introduit au centre du plasma par l'intermédiaire de la torche à plasma, généralement constituée de 3 tubes concentriques en quartz. Elle est située au centre d'une bobine inductive qui permet de générer et d'entretenir le plasma. Ainsi, l'échantillon est désolvaté, atomisé, puis ionisé sous forme de cations monovalents. Les ions formés au centre

de la décharge sont transférés dans le spectromètre de masse par l'intermédiaire de l'interface, constituée de deux cônes, l'échantillonneur (ou « sampler ») et l'écorceur (ou « skimmer ») qui permettent d'extraire les ions du plasma. Une pompe primaire permet de maintenir un vide de l'ordre de 10^1 Pa entre les deux cônes. Derrière l'orifice du cône échantillonneur se forme un jet supersonique qui traverse l'orifice du cône écorceur puis les lentilles ioniques qui permettent de focaliser le faisceau d'ions avant d'atteindre le spectromètre de masse. L'analyseur est un filtre quadripolaire constitué de quatre barres cylindriques soumises à un potentiel continu et un potentiel alternatif qui permettent de sélectionner un rapport masse/charge (*m/z*) à envoyer jusqu'au détecteur qui est un multiplicateur d'électrons et qui nécessite un vide poussé assuré par des pompes turbo moléculaires.

II.2.b.ii. Quantification de l'arsenic total

La quantification de l'arsenic total est basée sur une méthode interne de l'unité CIME «analyse multi-élémentaire (As, Cd, Hg et Pb) dans les denrées alimentaires d'origine animale par ICP-MS après minéralisation par micro-ondes en système fermé» qui est accréditée par le COFRAC (Noël et al. 2005). L'ICP-MS utilisé est un X-Series II (Thermo Scientific). Les solutions sont drainées par une pompe péristaltique à partir des tubes disposés sur un passeur d'échantillons automatique ASX 510 (CETAC).

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

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

Avec 3,127 = $(Abondance\ ^{75}ArCl)\ /\ (Abondance\ ^{77}ArCl\ )$

et 0,826 = $(Abondance\ ^{77}Se)\ /\ (Abondance\ ^{82}Se\ )$.

L'acquisition des données a donc été réalisée en mode continu aux rapports masses sur charges *m/z* = 75 (^{75}As), *m/z* = 77 (^{77}ArCl), *m/z* = 82 (^{82}Se), en mode standard et en appliquant une correction mathématique pour pallier l'interférence $^{40}Ar^{35}Cl^+$.

II.2.b.iii. Couplage HPLC-ICP-MS

L'ICP-MS utilisé est le même que celui décrit au paragraphe II.2.b.iiII.2.b.ii. Le système chromatographique est relié au nébuliseur de l'ICP par un capillaire en PEEK de 50 cm de long et de 0,17 mm de diamètre interne qui doit être le plus court possible pour limiter le temps mort d'élargissement des pics. Une carte électronique dite « trigger » permet de synchroniser l'injection de l'échantillon dans la colonne chromatographique réalisée à l'aide de la chaîne HPLC et l'acquisition des données par l'ICP-MS. L'acquisition des données est réalisée en mode « temps résolu » (Time-Resolved-Analysis, ou TRA) au rapport *m/z* = 75. L'ensemble des paramètres chromatographiques et d'ICP-MS est résumé dans le Tableau 20.

Tableau 20. Paramètres chromatographiques et d'ICP-MS

Paramètres HPLC	
Débit de phase mobile :	1,35 mL/min
Température colonne :	25°C
Phase mobile A :	0,8 mM HNO_3, 1 % MeOH ; pH 3,8
Phase mobile B :	500 mM HNO_3, 1 % MeOH ; pH 1,4
Gradient :	0 - 3 min : 99 % A 3 - 5 min : 10 % A 5 - 12 min : 80 % A
Paramètres ICP-MS	
Puissance RF :	1450 W
Débit de gaz plasmagène :	14,9 L/min
Débit de gaz auxiliaire :	0,8 L/min
Débit de gaz de nébulisation :	0,9 L/min
Dwell time :	500 ms
Isotopes mesurés :	*m/z* 75 (^{75}As), *m/z* 77 ($^{40}Ar^{37}Cl$)

Les conditions chromatographiques ont préalablement été optimisées par les travaux de Dufailly *et al.*, (2007) à l'aide de plans d'expérience afin de séparer de manière satisfaisante les sept espèces d'arsenic (As(III), MA, DMA, As(V), AsB, TMAO, et AsC) en moins de 12 minutes ; la Figure 7 représente un chromatogramme des espèces étudiées, ainsi que les conditions de gradient appliquées.

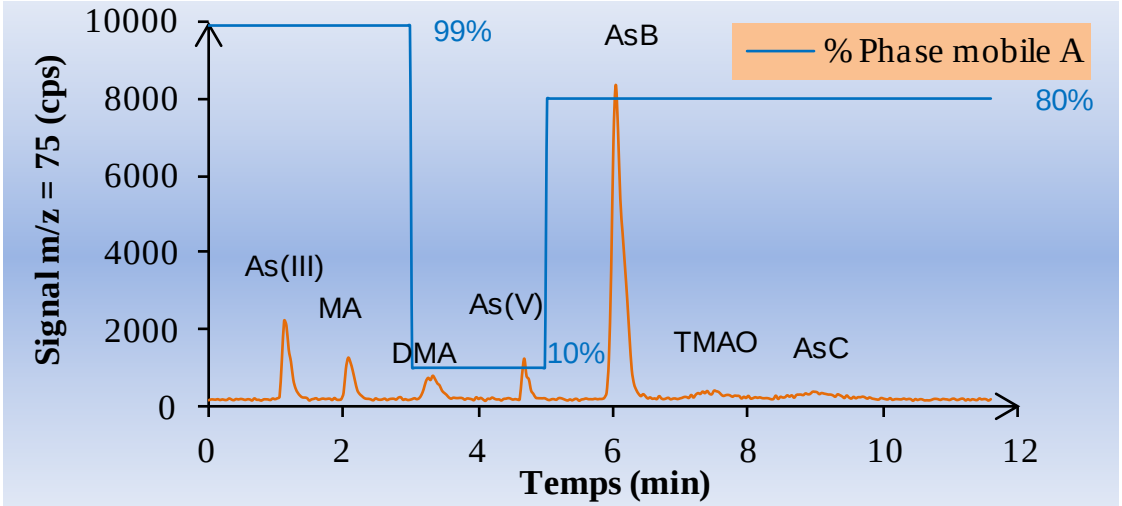


Figure 7. Chromatogramme d'une solution étalon de 7 espèces d'As (2 µg/L en As(III), MA, DMA, As(V), TMAO et AsC et 6 µg/L en AsB) obtenu dans les conditions chromatographiques données

III. Validation et applications de la méthode de spéciation

III.1. Résultats expérimentaux

Les analyses de spéciation de l'arsenic nécessitent que la matrice à analyser soit lyophilisée. Dans le cadre de la validation de la méthode d'analyse, plusieurs matériaux de référence certifiés (MRC) pertinents comme le TORT-2 (hépatopancréas de homard), le DORM-3 (protéine de poisson), le BCR 627 (thon), le SRM 1566b (huître) et le DOLT-4 (foie de roussette) ont été utilisés (Première partie II.1), ainsi que plusieurs échantillons réels de produits de la pêche (moules, crevettes, crabe, colin, saumon…). Une fois la méthode validée, des contrôles qualités internes (CQI) pertinents ont été mis en place. Ils ont été complétés par des contrôles qualités externes (CQE) lors de notre participation à des essais interlaboratoires d'aptitude (Eilas), afin de tester également cette méthode sur des échantillons inconnus (en situation réelle) et aussi sur d'autres matrices d'intérêt comme le riz… Enfin, cette méthode a été utilisée afin de déterminer d'une part les concentrations exactes en espèces arséniées dans les 65 échantillons de produits de la pêche de l'étude EAT 2 et d'autre part, d'estimer plus précisément les % d'As_i présents dans chacun de ces échantillons. Nous avons également eu l'opportunité de participer à un exercice de certification d'un échantillon de riz pour l'As(III), l'As(V) et le DMA, organisé par l'Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM).

Une grande partie de ces travaux ont été publiés dans le journal Talanta et sont présentés dans l'Article I (Leufroy *et al.*, 2011). Toutefois, il nous apparait primordial d'apporter au préalable des

résultats complémentaires permettant de mieux appréhender l'ensemble de la démarche de mise sous assurance qualité analytique (AQA) de cette méthode. Enfin, les résultats non inclus dans cette publication sont également ajoutés dans cette partie du mémoire (Eilas et certification notamment).

III.2. Validation de la méthode

La validation de la méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche a été réalisée en utilisant comme support les normes NF V03-110 (AFNOR 1993), XPT 90-210 (AFNOR 1999), FD V03-115 (AFNOR 1996). Ainsi, la validation a été conduite selon quatre plans d'essais distincts :

- Le plan A, pour caractériser le domaine de linéarité, les limites de détection et de quantification ;
- Le plan B, pour évaluer la spécificité de la méthode (effets de matrice) ;
- Le plan C, pour évaluer la fidélité et la justesse de la méthode ;
- Le plan D, pour estimer la reproductibilité interne de la méthode.

III.2.a. Plan A

III.2.a.i. Étalonnage

La linéarité est la capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon. Il s'agit donc de vérifier le domaine de linéarité et d'en déduire les caractéristiques de l'étalonnage. La norme NF V03-110 (AFNOR 1993) stipule de réaliser n ($n \geq 5$) gammes d'étalonnage à des jours différents, chaque gamme comprenant p ($p \geq 5$) niveaux, et de mesurer la réponse instrumentale.

L'étalonnage consiste à construire un modèle qui permet de prédire les concentrations dans les échantillons par analogie avec les concentrations des solutions étalons. On définit ainsi la sensibilité b_1 de la méthode comme étant l'accroissement de la réponse rapportée à l'accroissement de la concentration. Par ailleurs, on assimile un coefficient b_0 à la réponse instrumentale en l'absence de l'analyte.

La gamme d'étalonnage a été réalisé à des concentrations allant de 2 à 60 µg/L (0, 2, 5, 10 et 20 µg/L pour As(III), MA, DMA, As(V), TMAO et AsC, et de 0 ; 3 ; 6 ; 15 ; 30 et 60 µg/L pour AsB), de manière à couvrir les concentrations susceptibles d'être retrouvées dans les échantillons analysés.

Les résultats de l'étalonnage et du test de linéarité sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21. Étalonnage et test de linéarité

		As(III)	**MA**	**DMA**	**As(V)**	**AsB**	**TMAO**	**AsC**
Étalonnage	Domaine de linéarité (µg/L)	0-20	0-20	0-20	0-20	0-60	0-20	0-20
	Nombre de niveaux *p*	5	5	5	5	5	5	5
	Nombre de mesures *np*	100	100	100	100	100	100	100
	Sensibilité b_1 (cps)	12406	13400	13382	12939	15820	6123	7261
	Blanc b_0 (cps)	296	1009	-592	-1565	-1511	198	-1327
Test de linéarité	Régression SCE_l (y) ddl = 1	7,86E+11	9,16E+11	9,14E+11	8,54E+11	1,15E+13	1,91E+11	2,69E+11
	Erreur de modèle SCE_{nl} (y) ddl = *p*-2	1,88E+06	1,95E+07	1,93E+07	7,11E+07	6,54E+07	5,99E+06	3,13E+07
	Résiduelle SCE_e (y) ddl = $p(n-1)$	2,93E+09	3,77E+09	3,19E+09	2,68E+09	4,02E+10	7,05E+08	1,03E+09
	Totale SCE (y) ddl = *np*-1	1,07E+10	1,29E+10	1,23E+10	1,12E+10	1,55E+11	2,61E+09	3,71E+09
	F_l observé	268	243	286	318	286	272	260
	F_l critique				**6,909**			
	F_{nl} observé	0,001	0,005	0,006	0,027	0,002	0,009	0,030
	F_{nl} critique				**3,995**			

Le test de linéarité permet de vérifier que le modèle de régression est acceptable (F_l observé > F_l critique), et qu'il n'y a pas d'erreur de modèle, c'est-à-dire que c'est bien une droite dans tout le domaine choisi (F_{nl} observé < F_{nl} critique). Selon ce test, le modèle de régression est acceptable et le domaine de linéarité choisi est validé pour les sept espèces d'As considérées.

III.2.a.ii. Limites de détection et de quantification

La limite de détection (LD) est définie comme la plus petite concentration que l'on peut détecter dans les conditions expérimentales décrites de la méthode. La limite de quantification (LQ) est la plus petite concentration que l'on peut quantifier avec une incertitude acceptable, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode (NF V03-110).

Les LD et LQ ont été calculées suivant les indications issues du programme COFRAC n° 99-3/02 (1994) et de la norme NF EN 13804 (AFNOR 2002). Elles sont numériquement égales à trois et six fois l'écart-type de la moyenne des essais à blancs (n > 20). Les LD et LQ présentés dans le Tableau 22 sont exprimées en mg/kg en tenant compte d'une prise d'essai de 0,150 g et d'un volume de reprise de 50 mL normalement utilisés lors de l'analyse. Elles ont été estimées sur 21 blancs analysés dans des conditions de reproductibilité, c'est-à-dire à des jours différents et sur une période de temps de plusieurs mois (déc. 2008 à déc. 2009).

Tableau 22. Évaluation des LD et LQ (n = 21)

	As(III)	**MA**	**DMA**	**As(V)**	**AsB**	**TMAO**	**AsC**
Moyenne (µg/L)	0,015	0,016	0,021	0,029	0,22	0,035	0,042
Écart-type (µg/L)	0,010	0,011	0,011	0,010	0,11	0,026	0,038
LD (µg/L)	0,029	0,034	0,033	0,030	0,034	0,080	0,113
LQ (µg/L)	0,058	0,068	0,066	0,060	0,069	0,159	0,226
LD (mg/kg)	**0,010**	**0,011**	**0,011**	**0,010**	**0,011**	**0,027**	**0,038**
LQ (mg/kg)	**0,019**	**0,023**	**0,022**	**0,020**	**0,023**	**0,053**	**0,075**

Ces limites de quantification ont ensuite été vérifiées suivant les indications de la norme XPT 90-210 (AFNOR 1999). Pour cela, une solution dopée à une concentration correspondant à la limite de quantification présupposée est préparée puis fractionnée en dix prises d'essai identiques. Ces solutions sont ensuite analysées dans des conditions de répétabilité (Tableau 23).

Tableau 23. Vérification des LQ (n = 10)

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	TMAO	AsC
LQ cible (µg/L)	0,060	0,060	0,060	0,060	0,060	0,160	0,230
Moyenne (µg/L)	0,056	0,056	0,055	0,066	0,065	0,194	0,230
Écart-type (µg/L)	0,006	0,003	0,008	0,006	0,008	0,030	0,027
Critère de justesse : $(LQ - M_{LQ})/(s_{LQ}/\sqrt{n}) < 10$	2,1	3,8	1,9	2,7	1,8	3,6	0,03
Critère de fidélité : $(s_{LQ}/M_{LQ}) \times 100 < 20\%$	10,2	5,5	15,2	9,9	12,7	15,5	11,9
Conclusion	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
LQ retenue (mg/kg)	**0,020**	**0,020**	**0,020**	**0,020**	**0,020**	**0,050**	**0,080**

La vérification des limites de quantification retenues est considérée comme acceptable en termes de justesse et de fidélité. Les LQ retenues sont donc de 0,020 mg/kg pour l'As(III), le MA, le DMA, l'As(V), l'AsB, de 0,050 mg/kg pour le TMAO et de 0,080 mg/kg pour l'AsC. Comme discuté dans la publication I, ces limites de quantification peuvent être parfois plus élevées que certaines évaluées dans des conditions de détermination moins strictes (à plus court-terme) ; cependant, elles restent satisfaisantes et cohérentes par rapport à celles rapportées dans la littérature (Leufroy *et al.*, 2011).

III.2.b. Plan B

Spécificité

La spécificité est la propriété d'une méthode d'analyse de mesurer l'analyte considéré avec la garantie que le signal instrumental ne provient que de l'analyte. Cette étude permet de mettre en évidence les éventuels effets de matrice de la méthode, et très souvent, la spécificité se fonde sur une absence d'interférences.

Pour cette étude, il convient d'effectuer *p* ajouts dosés sur des échantillons choisis (matériaux de référence et échantillons réels) de façon à couvrir le domaine d'application de la méthode. La Figure 8 présente les résultats de spécificité obtenus pour les sept espèces.

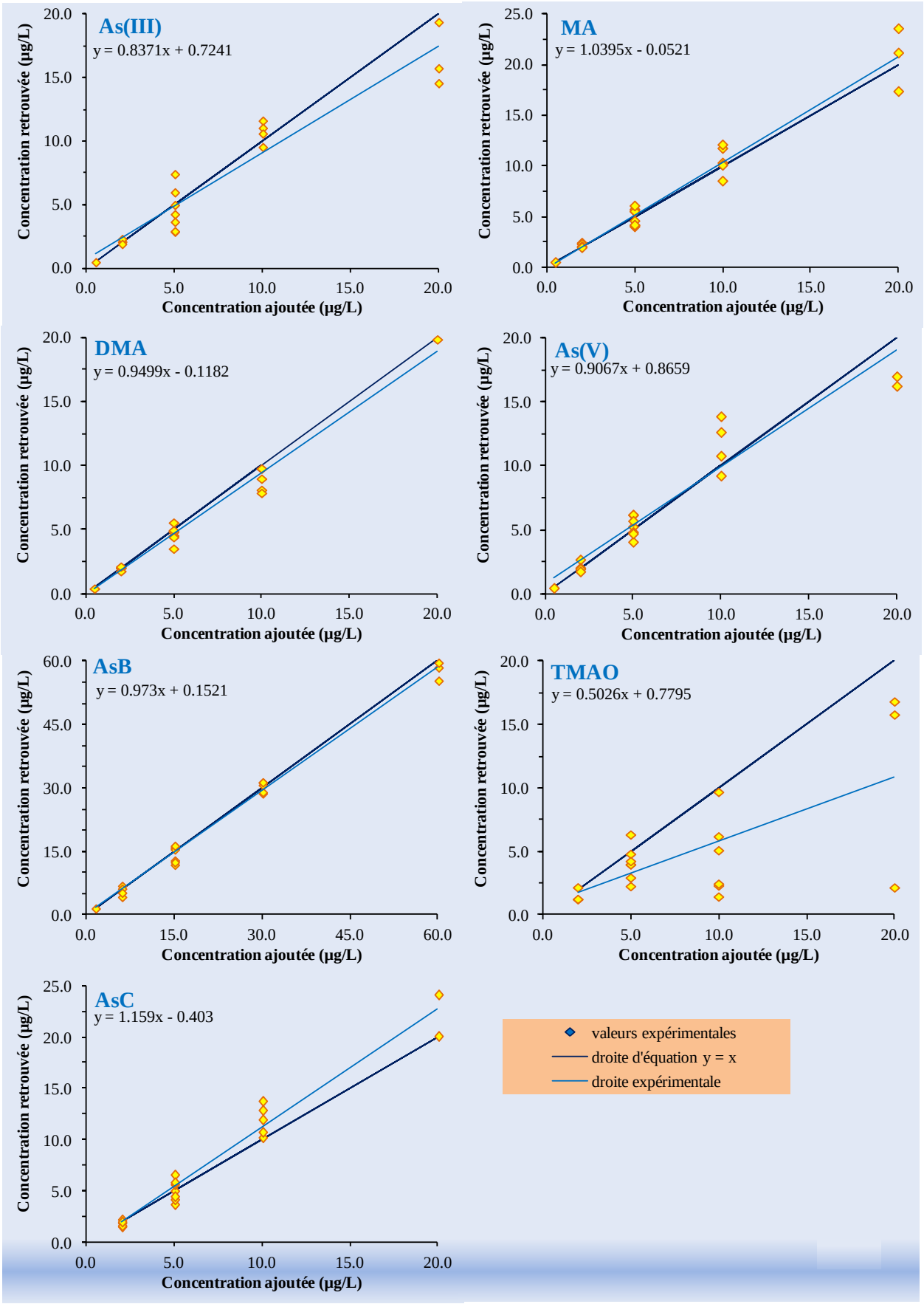


Figure 8. Étude de la spécificité

La mesure de la spécificité consiste à vérifier que la pente est égale à 1 ($t_{obs} \leq t_{critique}$), et que l'ordonnée à l'origine est égale à 0 ($t'_{obs} \leq t_{critique}$). Les résultats de ce test sont présentés dans le Tableau 24.

Tableau 24. Vérification de la spécificité

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	TMAO	AsC
$t_{critique}$	2,898	2,861	2,898	2,898	2,878	2,845	2,898
Test de signification de la pente t_{obs}	2,630	0,803	1,429	1,519	1,315	3,733	2,885
Test de signification de l'intersection t'_{obs}	1,204	0,111	0,439	1,452	0,254	0,190	0,824

Dans toutes les matrices étudiées, les tests de signification de la pente et de l'intersection ont été inférieurs aux valeurs critiques lues dans la table de Student, concluant à une absence d'interférences matricielles pour As(III), MA, DMA, As(V), AsB et pour AsC pour lequel le résultat est proche de $t_{critique}$ pour le test de signification de la pente. Concernant TMAO, le test indique un manque de spécificité pour ce composé. En effet, en raison de la présence de sels dans les échantillons, une mauvaise résolution des pics de TMAO et d'AsC était observée malgré la dilution au 1/5 (une dilution au 1/10 n'étant pas envisageable à cause de la faible teneur en TMAO dans les échantillons), ce qui explique également la valeur limite pour l'AsC. La spécificité de la méthode est donc estimée acceptable pour toutes les espèces hormis pour TMAO.

III.2.c. Plan C

III.2.c.i. Justesse

La justesse d'une méthode exprime 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. Elle a été étudiée selon la norme FD V 03-115 (AFNOR 1996) qui décrit l'utilisation de matériaux de référence.

Pour cela, il convient de mesurer la teneur de l'analyte sur n ($n = 5$) prises d'essais, de comparer la moyenne M des cinq mesures à la teneur certifiée de l'analyte concerné, puis de vérifier que cette moyenne est comprise dans l'intervalle de confiance (IC) calculé autour de la valeur de référence tel que :

$IC = M \pm (k \times \frac{CV_R \times M}{100 \times \sqrt{n}})$ (k = 3).

En l'absence de teneurs certifiées en As(III), MA, As(V), TMAO, et AsC, la justesse a été évaluée en réalisant des ajouts de quantité connues (comprises dans le domaine de linéarité) sur des matériaux de référence. Les ajouts ont été réalisés avant la procédure d'extraction.

La Figure 9 présente les résultats de justesse obtenus à l'aide des ajouts réalisés sur des matériaux de référence, ou à l'aide du BCR 627, ainsi que les écart-types obtenus sur 5 réplicats.

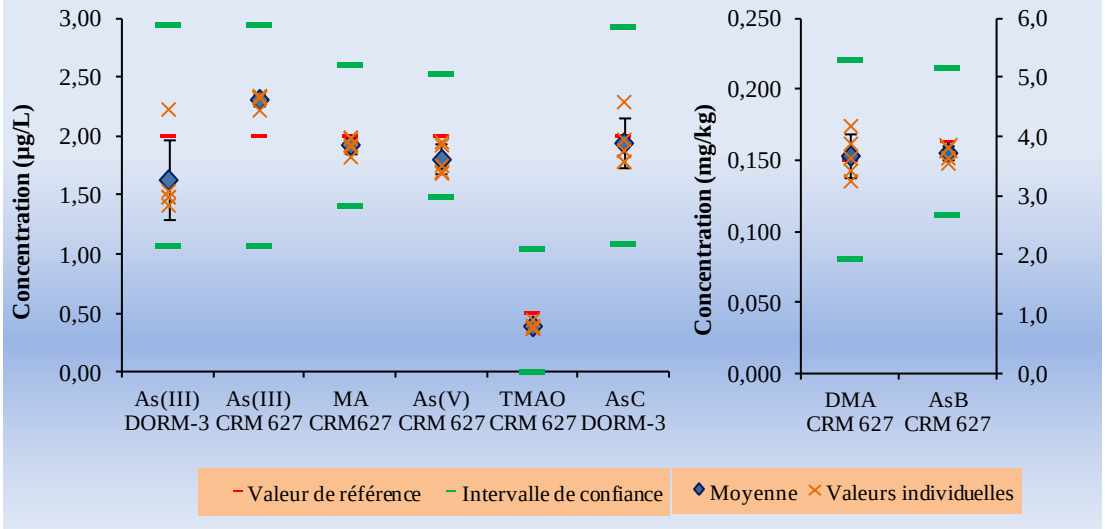


Figure 9. Justesse estimée sur chacune des espèces arséniées

Les résultats ont montré que les écarts entre les teneurs obtenues et les valeurs de référence des MRC ou des ajouts sont compris dans les intervalles de confiance définis à partir des coefficients de variation de reproductibilité (CV_R) estimés lors de la validation de la méthode (cf résultats du plan D ci-dessous). La justesse de la méthode a donc été jugée acceptable.

III.2.c.ii. Fidélité en termes de répétabilité

La répétabilité mesure l'étroitesse de l'accord entre des mesures effectuées sur des prises multiples d'un échantillon homogène, les mesures étant faites par un même opérateur, sur un même instrument, et dans un délai court au regard de la durée d'une mesure. Pour tester la répétabilité, il convient d'analyser plusieurs échantillons au moins en double. Les résultats obtenus (Tableau 25) permettent de définir un coefficient de répétabilité moyen de répétabilité intra-laboratoire (CV_r) calculé tel que :

$CV_r = \sqrt{s_r^2 / X_f} \times 100$ avec X_f la moyenne des valeurs observées, s_r^2 la variance de répétabilité.

On effectue un test de Cochran afin de vérifier si les variances sont égales entre elles et si la fidélité est constante dans tout le domaine d'application ($C_{obs} \leq C_{1\%}$).

Tableau 25. Répétabilité et stabilité de la fidélité

	As(III)	**MMA**	**DMA**	**As(V)**	**AsB**	**TMAO**	**AsC**
Écart-type de répétabilité s_r	0,096	0,037	0,029	0,107	0,414	0,096	0,049
Variance de répétabilité S^2_r	0,009	0,001	0,001	0,011	0,171	0,009	0,002
Nombre d'échantillons *p*	16	9	15	12	19	8	4
Nombre total de mesures *N*	48	27	45	36	57	24	12
CV_r moyen (%)	**13**	**8,9**	**11**	**22**	**5,0**	**25**	**15**
Variance S_{max}^2 (*x*)	0,048	0,004	0,004	0,039	3,76*	0,032	0,003
C_{obs}	0,321	0.310	0,298	0,281	0,117*	0,432	0,290
$C_{1\%}$	0,388	0,573	0,407	0,475	0,343	0,615	0,864

* log S_{max}^2

Les CV_r estimés sont compris entre 5,0 % et 25 % pour l'ensemble des espèces. Le test de Cochran a montré que les variances pour l'ensemble des matrices étudiées étaient homogènes : la répétabilité est donc considérée acceptable pour l'ensemble des espèces étudiées.

Il est important de préciser que les coefficients de répétabilité (CV_r) présentés dans l'Article I, ont été évaluée à partir de l'analyse (n = 5) d'un seul matériau de référence (avec ou sans ajout) et il est donc normal qu'ils soient plus petits que les CV_r calculés selon la norme NF V03-110 (AFNOR 1993), c'est-à-dire avec l'analyse en doubles (ou triples) de 4 à 19 échantillons réels différents dont les teneurs, notamment en arsenic inorganique, sont par ailleurs souvent faibles.

III.2.d. Plan D

Fidélité en termes de reproductibilité interne

La reproductibilité mesure 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 : à des jours différents, dans différents laboratoires, par différents opérateurs. L'étude de la reproductibilité interne est réalisée en analysant un matériau de référence en double à des jours différents, par des opérateurs différents. Le coefficient de variation de reproductibilité est calculé tel que :

$CV_R = \sqrt{s_r^2 + s_L^2/X_f} \times 100$ avec X_f la moyenne des valeurs observées, s_r^2 la variance de répétabilité, s_L^2 la variance inter-échantillon.

Les résultats de reproductibilité sont présentés dans le Tableau 26.

Tableau 26. Estimation de la reproductibilité

	As(III)	MMA	DMA	As(V)	AsB	TMAO	AsC
Nombre de répétition n_i	2	2	2	2	2	2	2
Nombre de jour p	10	10	16	10	16	9	10
*Moyenne X_f	1,86	2,07	0,150	2,06	3,6	1,20	2,06
*Écart-type de répétabilité s_r	0,234	0,185	0,008	0,179	0,009	0,357	0,235
*Écart-type de reproductibilité s_R	0,290	0,208	0,023	0,180	0,380	0,433	0,315
CV_R (%)	**16**	**10**	**16**	**9**	**11**	**36**	**15**

* en µg/L sauf pour DMA et AsB (en mg/kg)

Comme attendu, les coefficients de variation de reproductibilité (CV_R) obtenus sont supérieurs aux coefficients de variation de répétabilité (CV_r) calculés au plan C, car la reproductibilité d'une méthode englobe la répétabilité, sauf pour l'As(V) et l'AsC pour lesquels les CV_r sont de 22 % et 15 %. Cela peut s'expliquer par le fait que pour la répétabilité, les mesures ont été réalisées sur des échantillons réels où la teneur en ces deux espèces était souvent très faible, alors que lors de cette étude, les mesures ont été réalisées sur des ajouts effectués sur un matériau de référence.

L'estimation fine de la reproductibilité de la méthode est un paramètre très important car ensuite, ces CV_R seront utilisés pour définir les intervalles de confiance (IC) et les incertitudes lors des analyses pratiquées en routine. Ils permettront donc de définir les bornes de certains contrôles qualités internes pertinents et adaptés aux capacités de la méthode mise en œuvre au sein de ce laboratoire.

III.2.e. Conclusion de la validation

L'évaluation des performances analytiques de la méthode à été réalisée pour un seul type de matrice alimentaire, à savoir les produits de la pêche.

Après évaluation des critères de linéarité, de spécificité, de limites de détection et de quantification, de fidélité et de justesse, la méthode de spéciation de l'arsenic est acceptable dans le domaine d'application défini, avec des réserves pour le TMAO qui, en raison de ses

coefficients de variation de répétabilité et de reproductibilité assez élevés (25 % et 36 % respectivement) et de sa spécificité non satisfaisante, ne sera suivi qu'à titre indicatif.

III.2.f. Mise en place de contrôles qualité internes (CQI)

Le contrôle qualité regroupe l'ensemble des techniques opératoires et les activités qui sont utilisées pour répondre aux exigences en matière de qualité.

Au cours d'une analyse, un certain nombre de contrôles sont réalisés dans le but de s'assurer de la fiabilité des résultats rendus. Ces contrôles permettent de surveiller d'éventuelles contaminations pouvant se produire entre l'échantillonnage et l'analyse. Compte tenu des incertitudes liées au prélèvement, au traitement, à la conservation de l'échantillon ou encore à la représentativité de l'échantillonnage, ces contrôles permettent de s'assurer de la fiabilité des résultats par rapport à la technique utilisée même s'ils ne sont toutefois pas les garants du « bon » résultat. Ainsi, les contrôles qualité internes (CQI) mis en place et leurs critères sont détaillés ci-dessous :

- Contrôle des performances analytiques de l'appareil

Les premiers contrôles à effectuer correspondent au réglage des paramètres de fonctionnement de l'appareillage, à savoir la sensibilité et la stabilité du signal de l'ICP-MS. Ils permettent un suivi quotidien de l'appareil et sont effectués par l'utilisateur avant la réalisation des analyses, dans le but principal d'optimiser le signal. Ainsi, une répétabilité à court terme consistant à effectuer dix mesures consécutives d'une minute chacune à partir d'une solution multiélémentaire à 1 µg/L est réalisée. Le critère est d'obtenir environ 80000 coups/s sur l'indium et une stabilité du signal avec une variation < 2 %.

- Contrôle de la linéarité des gammes d'étalonnage

Les résultats d'une mesure par ICP-MS sont donnés en nombre de coups par seconde (cps) pour un rapport masse/charge (*m/z*) donné, ce qui impose que la réponse coup/concentration du système ait été préalablement établie au travers d'une droite d'étalonnage. Pour que le dosage puisse être considéré comme valide, cette droite doit avoir un coefficient de corrélation r^2 supérieur à 0,995 pour chaque espèce, établi au minimum avec 4 points de la gamme.

- Contrôle de la dérive du signal

La dérive instrumentale peut être induite par les variations de température extérieure ou intérieure à l'ICP-MS (cône, etc.…), les problèmes de vide, la chute de débit (nébuliseur,

auxiliaire et plasma), un bouchage progressif des cônes au cours du temps... L'analyse d'une solution étalon de concentration connue à intervalle régulier dans la séquence analytique, permet de s'assurer qu'il n'y a pas de dérive du signal pendant toute la durée de la séquence d'analyse. Lors des analyses, une solution étalon de bas de gamme (2 µg/L pour As(III), MA, DMA, As(V), TMAO et AsC ou 6 µg/L pour AsB) a été intercalée tous les 5 à 6 échantillons, le contrôle qualité étant jugé satisfaisant si la variation du signal ne dépassait pas 30 % de son intensité initiale pour l'ensemble des espèces considérées.

- Contrôle des blancs d'extraction

Pour tenir compte d'une éventuelle contamination ou d'un effet mémoire, la vérification des blancs est nécessaire. Un blanc d'extraction est introduit dans chaque série et doit être ≤ LD établies.

- Contrôle de la justesse sur des matériaux de référence certifiés

Les matériaux de référence certifiés dans les matrices alimentaires disponibles commercialement pour la spéciation de l'arsenic sont très limités : seul le BCR 627 présente des teneurs certifiées en deux espèces, le DMA et l'AsB. Lors de chaque série d'essai, le recouvrement de la valeur dite « vraie » est considéré comme acceptable si la teneur obtenue est comprise dans l'intervalle de confiance calculé à partir des CV_R respectifs ($k = 3$) autour de la valeur de référence de chacune des espèces.

A plus long-terme, la justesse de la méthode est suivi par des cartes de contrôle afin de suivre la variation aléatoire dans le temps des performances de la méthode (Figure 10). Elles permettent de détecter d'éventuels biais sur un échantillon de contrôle analysé périodiquement au fur et à mesure que les résultats sont obtenus et de démontrer l'exactitude des données afin de s'assurer que la maîtrise de l'analyse est maintenue. Elles sont construites de la manière suivante :

Limites de surveillance : $M \pm 2s$

Limites de contrôle : $M \pm 3s$

avec M la valeur cible calculée à partir de la moyenne obtenue sur les dix premières analyses, et s l'écart-type des dix valeurs.

Si les valeurs de contrôle sont de part et d'autres de la valeur de référence et entre les limites de surveillance, alors la situation est sous contrôle.

Si une valeur est entre les limites de surveillance et de contrôle, ou six valeurs ont une tendance ascendante ou descendante (alarme dérive), ou neuf valeurs consécutives sont en dessous ou au dessus de la valeur de référence (alarme dérive), alors la situation est à surveiller.

Si une valeur est hors de la limite de contrôle, ou deux valeurs sur trois consécutives sont situées entre les limites de surveillance et de contrôle voisines, alors la situation est hors de contrôle. Dans ce cas, il convient de rechercher les causes de dérive sur l'analyse.

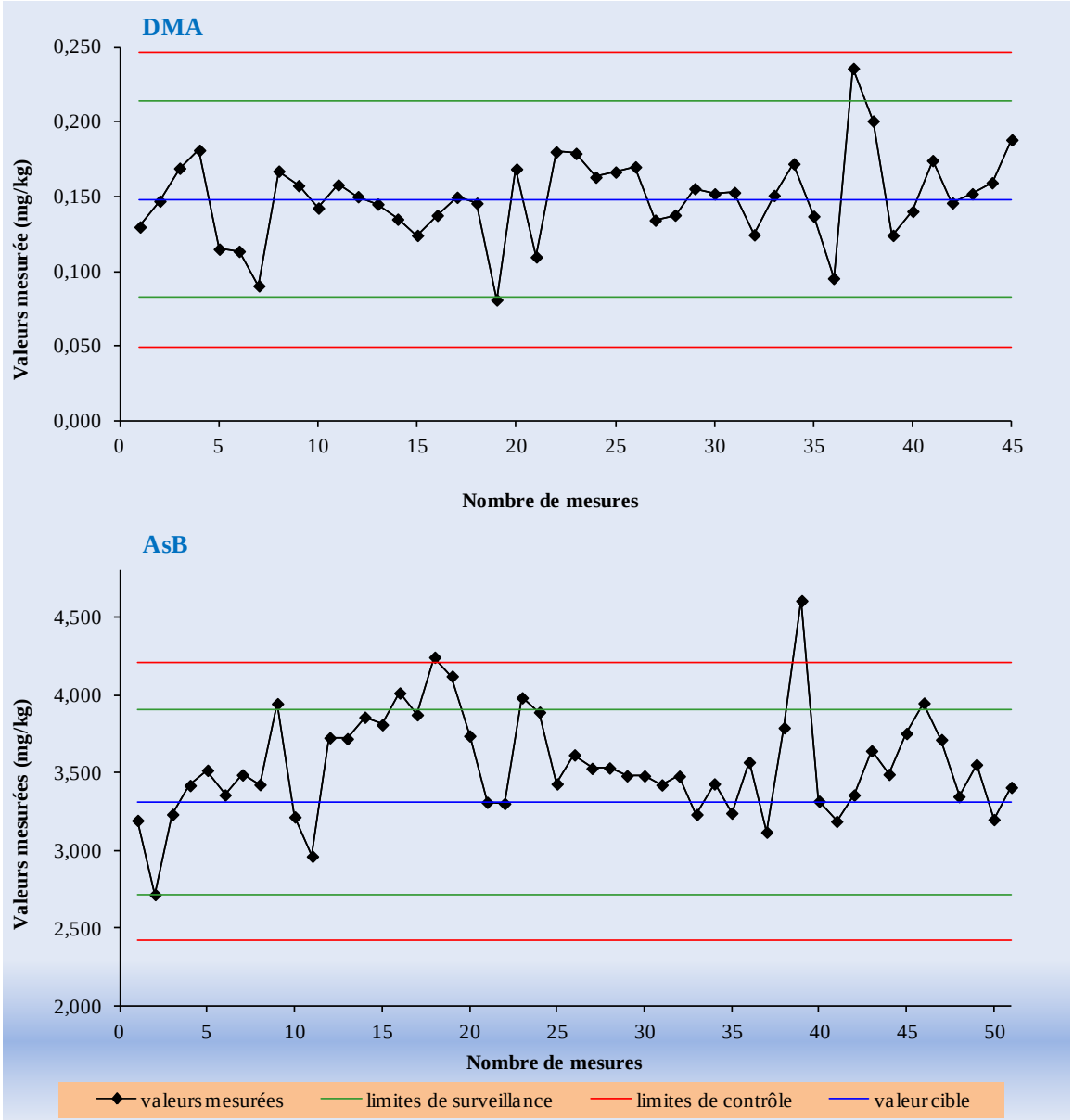


Figure 10. Cartes de contrôle du BCR 627 certifié en DMA (0,150 mg/kg) et en AsB (3,9 mg/kg)

Sur la période définie, pour le DMA, seules deux valeurs sont situées en dehors des limites de surveillance. Ces deux valeurs restent cependant comprises entre les limites de contrôles.

Pour l'AsB, on constate que la valeur cible est inférieure à la valeur certifiée, plus proche de 3,4 mg/kg que de 3,9 mg/kg. Ce biais est du au standard utilisé pour la quantification de l'arsénobétaïne (BCR 626). En effet, l'IRMM vient de nous informer suite à la transmission de cette carte de contrôle, que cette solution a été retiré du commerce en 2010 car contenait

finalement 10 % de plus que ce qui était certifié, ce qui induit une sous-estimation de 10 %. Néanmoins, en considérant l'incertitude du matériau de référence utilisé (BCR 627) et de notre méthode, le biais observé n'a pas de conséquence majeure sur les résultats donnés. En effet, les valeurs mesurées sont généralement comprises entre les limites de surveillance ou de contrôle. Parmi les dix valeurs qui sont en dehors de ces limites, huit sont situées à l'intérieur des limites de contrôle, et les deux autres en dehors et considérés comme non conformes. Dans ce cas, l'analyse doit être refaite.

La justesse de la méthode est donc démontrée sur la période des analyses.

III.2.g. Comparaison des résultats avec la littérature

Une comparaison des résultats obtenus sur l'arsenic et les espèces d'arsenic (certifiés et non certifiés) de plusieurs MRC de produits de la pêche a été faite et discuté dans la publication I (Leufroy *et al.,* 2011). Toutefois, nous avons complété ces données pour le CRM 627 et ajouté un autre MRC dans le Tableau 27.

Tableau 27. Teneurs observées dans la littérature dans les principaux MRC de produits de la pêche (mg/kg)

As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	TMAO	AsC	TMAP	TETRA	Asi	As total/Σ espèces	Référence
CRM 627 (thon)											
0,068	*0,045*	*0,148*	*0,041*	*3,6*	*0,082*	*< 0,08*			*0,109*	*4,0*[*]	*Cette étude*
		0,150		**3,9**						**4,8**[**]	**certifié**
	< 0,014	0,141		3,9					0,036	4,1[*]	Dufailly *et al.*, (2011)
0,074	< 0,028	0,137	< 0,040	3,8			< 0,015			4,0[*]	Moreda-Pineiro *et al.*, (2011)
nd	nd	0,18	nd	4,2						4,4[*]	Reyes *et al.*, (2009)
0,076	< 0,016	0,157	< 0,024	4,1	0,037	< 0,042				4,4[*]	Dufailly *et al.*, (2007)
		0,17		3,7							Lin *et al.*, (2008)
0,080		0,150		3,7						3,9[*]	Moreda-Pineiro *et al.*, (2008)
< 0,0006	< 0,002	0,166	0,070	4,3						4,6[*]	Cava-Montesinos *et al.*, (2005)
		0,050		4,0	nd	0,008	nd	0,029		4,1[*]	Nischwitz et Pergantis (2005)
									0,015		Sloth *et al.*, (2005)
nd	nd	0,14	0,01	3,6						3,8[*]	Sanz *et al.*, (2005a)
		0,14		3,7	0,010	0,033	0,012	0,037		4,1[*]	Sloth *et al.*, (2003)
	< 0,003	0,163		4,1	< 0,001		< 0,003	< 0,003		4,2[*]	Suner *et al.*, (2001)
nd	nd	0,139	nd	3,8						4,1[*]	Gomez-Ariza *et al.*, (2000)
0,0018	0,010	0,154	0,0045	4,068	0,0063					4,2[*]	Nakazato *et al.*, (2000)
SRM 1566b (huître)											
0,357	*0,649*	*0,771*	*0,427*	*1,11*	*< 0,50*	*< 0,05*			0,784	*3,31*[*]	*Cette étude*
										7,65[**]	**certifié**
nd	nd	0,70	nd	1,61						2,31[*]	Geng *et al.*, (2009)
		0,20		0,64	0,013	nd	0,019	nd			Nischwitz et Pergantis (2005)
									0,004		Sloth *et al.*, (2005)
									0,647		Munoz *et al.*, (1999)

nd : non détecté ; * Σ espèces ; ** As total

Les teneurs obtenues en DMA (0,148 mg/kg avec une valeur certifiée de 0,150 mg/kg) et AsB (3,6 mg/kg avec une valeur certifiée de 3,9 mg/kg) dans le CRM 627 sont également en accord avec celles reportées par les autres auteurs, à l'exception de celle inférieure pour DMA (0,050 mg/kg) reportée par Nischwitz et Pergantis (2005). Même si peu de valeurs ont été rapportées en As(III), les teneurs observées sont en accord avec Moreda-Pineiro *et al.*, (2008), Moreda-Pineiro *et al.*, (2011) et Dufailly *et al.*, (2007). Pour le MA et l'As(V), la comparaison s'avère plus délicate. En effet, sur neuf études s'intéressant au MA, une seule présente également une valeur quantifiée à 0,010 mg/kg pour 0,045 mg/kg dans notre étude. Pour l'As(V), seules trois études sur huit présentées rapportent des teneurs quantifiées, comprises entre 0,0045 et 0,07 mg/kg. Ces résultats sont difficilement comparables à la teneur d'As(V) obtenue dans notre étude (0,041 mg/kg), même si elle se situe dans l'intervalle des teneurs présentées. Finalement, la somme des espèces observée est en accord avec celle rapportée par l'ensemble des auteurs (3,8 à 4,6 mg/kg).

Pour le SRM 1566b, sur les quatre études présentant des résultats sur ce MRC, aucune valeur n'est rapportée en MA, As(III) et As(V). Deux études présentent des teneurs en Asi, l'une en accord avec notre valeur (0,647 mg/kg pour 0,784 mg/kg dans notre étude) (Munoz *et al.,* 1999), l'autre très inférieure (0,004 mg/kg) (Sloth *et al.,* 2005). Pour le DMA, la teneur obtenue dans notre étude (0,771 mg/kg) est en accord avec celle rapportée par Geng *et al.,* (2009) (0,70 mg/kg), et supérieure à celle reportée par Nischwitz et Pergantis (2005) (0,20 mg/kg). Pour l'AsB, ces deux études rapportent des teneurs comprises entre 0,64 et 1,61 mg/kg, notre valeur se situant dans cet intervalle (1,11 mg/kg). Finalement, la somme des espèces observée est rapportée dans une seule étude (2,31 pour 3,31 mg/kg dans notre étude) (Geng *et al.,* 2009), indiquant que beaucoup d'autres espèces arséniées (probablement des arsénosucres) n'ont pas été quantifiés par ces 2 méthodes, si l'on compare ces résultats à la valeur certifiée de 7,65 mg/kg.

En conclusion, il apparaît donc délicat d'obtenir un consensus sur les teneurs en espèces non certifiées dans les matériaux de référence étudiés, notamment sur les espèces inorganiques, du fait de la grande variabilité des valeurs rapportées dans la littérature obtenues avec des méthodes d'extraction et de séparation différentes (Sloth *et al.,* 2003).

Enfin, comme nous nous sommes intéressés à l'extension de la méthode à d'autres produits alimentaires et notamment le riz, le Tableau 28 compare les teneurs des espèces d'arsenic obtenues sur le SRM 1568a (riz) au cours de ces travaux avec celles rapportées dans la littérature.

Tableau 28. Teneurs observées dans la littérature dans un MRC de riz

As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	Asi	As total ou Σ espèces	Référence
SRM 1568a (riz)							
0,068	*< 0,020*	*0,156*	*0,035*		*0,103*	*0,259*[*]	*Cette étude*
						0,29[**]	**certifié**
	0,016	0,19		< 0,017	0,098	0,304[*]	Dufailly *et al.*, (2011)
	0,18				0,11	0,29[*]	Sun *et al.*, (2009)
0,052	0,012	0,173	0,044			0,281[*]	Narukawa *et al.*, (2008)
0,069	0,009	0,155	0,033			0,266[*]	Matos Reyes *et al.*, (2007)
nd	0,010	0,116	0,058			0,184[*]	Nam *et al.*, (2006)
	0,012	0,168			0,087	0,267[*]	Ackerman *et al.*, (2005)
0,068	0,008	0,135	0,020			0,231[*]	Sanz *et al.*, (2005b)
0,068	0,008	0,1354	0,021	nd		0,232[*]	Sanz *et al.*, (2005a)
	0,002	0,16			0,080	0,242[*]	Williams *et al.*, (2005)
0,067	0,013	0,158	0,039			0,277[*]	Kohlmeyer *et al.*, (2003)
0,088	0,008	0,174	0,092			0,362[*]	Heitkemper *et al.*, (2001)

nd : non détecté ; * Σ espèces ; ** As total

Dans le riz, les teneurs observées en As(III), MA, DMA et As(V) sont en accord avec celles rapportées par les autres auteurs. De plus, la somme des espèces quantifiées est cohérente avec la valeur certifiée en arsenic total. Il semble qu'un consensus soit plus facile à trouver dans cette matrice que dans les produits de la pêche, notamment concernant l'Asi.

III.3. Applications de la méthode de spéciation

III.3.a. Contrôles qualité externes (CQE)

Les contrôles qualité externes (CQE), appelés également essais interlaboratoires d'aptitude (Eilas) ou essais d'aptitude, permettent à un laboratoire d'évaluer ses performances par rapport à la fois à ses propres exigences, et par rapport aux autres laboratoires. Les Eilas sont reconnus comme étant un moyen essentiel du contrôle de la qualité au niveau international.

Nous avons participé à plusieurs essais d'aptitude pour la détermination de l'arsenic inorganique dans des produits de la pêche (poisson, crabe mais également algue) et des matrices végétales (riz, froment, épinard) entre décembre 2009 et juin 2011. Pour chaque essai, une valeur de référence est assignée par un groupe de laboratoires experts, sauf dans le cas des produits de la

pêche (IMEP 109 (Seafood) et FAPAS 07160 (Crab meat)) où il n'a pas été possible d'assigner de valeur de référence devant l'étendue des résultats obtenus.

Les résultats obtenus sont évalués à l'aide du Z-score, qui exprime l'écart entre la valeur obtenue et la valeur assignée, calculé de la manière suivante :

$$Z = \frac{X_{lab} - X_{ref}}{\sigma}$$

avec X_{lab} la valeur obtenue, X_{ref} la valeur assignée, σ l'écart-type de l'essai interlaboratoires.

Les Z-scores sont interprétés de la manière suivante :

- Si $|Z| \leq 2$, le résultat est conforme ;
- Si $2 < |Z| \leq 3$, le résultat est questionnable ;
- Si $|Z| > 3$, le résultat est non conforme.

Les résultats des Z-score obtenus lors de notre participation à différents essais interlaboratoires sont représentés dans la Figure 11.

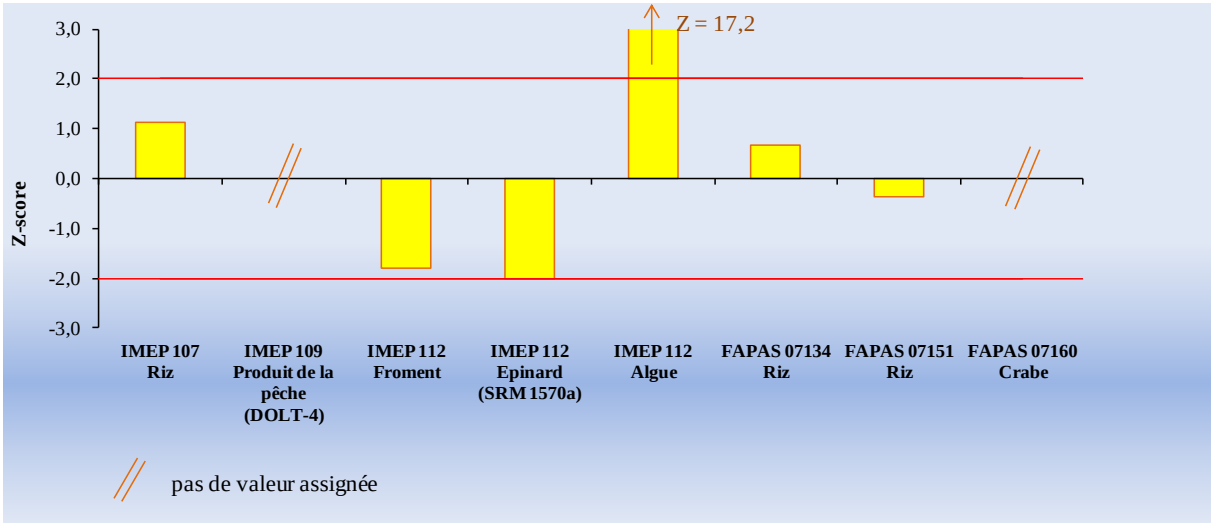


Figure 11. Résultats obtenus lors de nos participations à différents essais interlaboratoires

Les résultats obtenus pour l'arsenic inorganique lors des différents tests sont conformes ($-2 \leq Z \leq 2$), excepté pour l'échantillon d'algue (Z = 17,2), Ces résultats indiquent que le protocole analytique est également bien adapté à la matrice riz et au froment (4 essais conformes), mais que ce protocole analytique ne permet pas une quantification juste des teneurs en composés arséniés dans les algues.

Le Tableau 29 présente les différents paramètres des essais interlaboratoires auxquels nous avons participé.

Tableau 29. Résumé des différents essais interlaboratoires

	FAPAS 07160	**IMEP 109**	**IMEP 112**	**IMEP 112**	**IMEP 112**	**FAPAS 07134**	**IMEP 107**	**FAPAS 07161**
Matrice	Crabe	Produit de la pêche (DOLT-4)	Algue	Froment	Épinard (SRM 1570a)	Riz	Riz	Riz
Nombre de participants	28	11	40	43	41	19	31	21
Nombre de "inférieur à"	1	4	2	3	11	0	3	1
Valeur assignée (mg/kg)	-	-	**0,188**	**0,169**	**0,054**	**1,33**	**0,107**	**0,390**
Notre valeur (mg/kg)	0,269	0,230	0,898	0,123	0,027	1,47	0,125	0,364
Intervalle des valeurs (mg/kg)	0,012 - 0,465	0,083 - 5,75	0,03 - 42,7	0,037 - 0,39	0,0113 - 0,12	0,206 - 1,1672	0,031 - 0,29	0,315 - 0,844
% valeurs satisfaisantes		-	16 %	57,5 %	77 %	95 %	75 %	95 %
% valeurs questionnables		-	8 %	15,0 %	13 %	0 %	11 %	0
% valeurs non satisfaisantes		-	76 %	27,5 %	10 %	5 %	14 %	5 %

Les résultats du Tableau 29 indiquent que la détermination de l'arsenic inorganique dans les produits de la pêche (IMEP 109 (DOLT-4) et FAPAS 07160 (crabe) présente des difficultés analytiques. Concernant l'IMEP 109, les laboratoires experts n'ont pas pu s'accorder sur une valeur consensuelle en Asi, et la même dispersion dans les résultats de l'ensemble des participants a été observée. Les résultats des deux tests où le produit de la pêche distribué était le DOLT-4 (IMEP 109 est uniquement organisés pour les LNR européens et l'IMEP 130 est le même Eila dédié à tous les autres laboratoires d'analyse, nous n'y avons donc pas participé) indiquent que la teneur en Asi est très faible (entre 0,047 et 0,75 mg/kg, soit 0,5 à 8 % de l'As total). A noter que la valeur que nous avons mesurée (0,23 mg/kg) se situe dans cet intervalle. Pour le crabe (FAPAS 07160), il n'a également pas été possible d'assigner une valeur en arsenic inorganique, en raison de la grande dispersion des résultats.

Concernant la matrice algue (IMEP 112), la détermination de l'Asi reste délicate en raison de la grande variété d'espèces organiques et de la concentration à laquelle elles sont présentes comparativement à l'arsenic inorganique. C'est pourquoi seulement 16 % des laboratoires (n = 40) ont obtenu un résultat satisfaisant à ce test, les autres participants ayant une tendance à surestimer les teneurs en Asi comme nous, en raison d'une coélution probable avec d'autres composés arséniés organiques et d'un décalage des temps de rétention due à cette matrice

complexe. Par ailleurs, il est également probable que la méthode d'extraction utilisée ne permet pas une extraction quantitative d'Asi dans ce type de matrice.

Par contre, dans les autres matrices comme le froment, l'épinard et le riz, les résultats de ces différents essais interlaboratoires indiquent clairement qu'une majorité de laboratoires dont le nôtre (de 75% à 95% des participants) obtiennent des résultats satisfaisants.

III.3.b. Certification d'un matériau de référence

En février 2011, l'unité CIME du Laboratoire de Sécurité des Aliments a été reconnue comme laboratoire de référence par l'IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements). Ce statut permet à l'unité d'être sollicité pour participer à des certifications de matériaux de référence.

Dans ce cadre, nous avons participé en septembre 2011 à la certification d'un échantillon de riz pour l'As(III), l'As(V) et le DMA. Le Tableau 30 présente les teneurs mesurées en arsenic inorganique et en DMA.

Tableau 30. Teneurs en Asi et DMA mesurées dans l'ERM BC211 (µg/g)

	Asi	**DMA**
Échantillon 1564 (n = 3)	145 ± 27	64 ± 12
Échantillon 1617 (n = 3)	147 ± 27	95 ± 18
Échantillon de contrôle (n = 2)	97 ± 31	< LQ

Malheureusement, les résultats de cette étude sont en cours de traitement statistique par l'IRMM (au 1er février 2012) et ne pourront pas être discutés plus amplement dans ce mémoire.

III.3.c. Données d'occurrence issues de l'EAT 2

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 de la population française. 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) (Sirot *et al.,* 2009b) 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 consommation individuelles nationales actualisées, à savoir l'enquête INCA 2 (seconde enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires) réalisée en 2006-2007.

Les 65 échantillons lyophilisés de produits de la pêche issus de l'EAT 2 (poissons, crustacés et mollusques) ont été analysés pour déterminer leurs concentrations en arsenic total et en espèces d'arsenic par IEC/ICP-MS. Les échantillons étudiés comprenaient des poissons (6 colins, 16 saumons, 2 saumons fumés, 2 thons cuits, et 4 thons en conserve), et des mollusques et des crustacés (15 crevettes, 5 pétoncles, 5 huîtres, 10 moules). Les matériels et méthodes utilisés ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans l'Article I.

De manière synthétique, les résultats de cette étude indiquent que les crustacés et les mollusques contiennent plus d'arsenic total que les poissons avec en moyenne 12,4 mg/kg contre 4,51 mg/kg dans les poissons. L'AsB est l'espèce majoritaire dans toutes les matrices étudiées. Dans les poissons, seul du DMA a été quantifié à de faibles concentrations (< 0,117 mg/kg) alors que dans les mollusques et crustacés, le MA et le DMA ont tous les deux été quantifiés a de faibles teneurs. L'Asi a été quantifié dans la majorité des mollusques et crustacés sous forme d'As(III) et As(V) (en moyenne 0,331 et 0,252 mg/kg), tandis que dans les poissons, il a été quantifié à des niveaux beaucoup plus faibles (proches des limites de quantification), surtout dans le colin et sous forme d'As(III) principalement (0,034 mg/kg).

Article I. Leufroy A. Noël L., Beauchemin D., Guérin T., (2011). "Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled with inductively plasma mass spectrometry following microwave assisted extraction."Talanta, 83, 770-779.

Author's personal copy

Talanta 83 (2011) 770–779

Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and occurrence data

Axelle Leufroy [a], Laurent Noël [a], Vincent Dufailly [a], Diane Beauchemin [b], Thierry Guérin [a,*]

[a] Unité des Contaminants Inorganiques et Minéraux de l'Environnement, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, ANSES, Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort unité CIME 23, Avenue du Général de Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort, France
[b] Department of Chemistry, Queen's University, 90 Bader Lane, Kingston, Ontario K7L 3N6, Canada

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 August 2010
Received in revised form 11 October 2010
Accepted 26 October 2010
Available online 5 November 2010

Keywords:
IEC/ICP-MS
Seafood
Arsenic
Speciation
Microwave assisted extraction

ABSTRACT

The determination of seven arsenic species in seafood was performed using ion exchange chromatography on an IonPac AS7 column with inductively coupled plasma mass spectrometry detection after microwave assisted extraction. The effect of five parameters on arsenic extraction recoveries was evaluated in certified reference materials. The recoveries of total arsenic and of arsenic species with the two best extraction media (100% H_2O and 80% aqueous MeOH) were generally similar in the five seafood certified reference materials considered. However, because MeOH co-elutes with arsenite, which would result in a positively biased arsenite concentration, the 100% H_2O extraction conditions were selected for validation of the method. Figures of merit (linearity, LOQs (0.019–0.075 mg As kg^{-1}), specificity, trueness (with recoveries between 82% (As(III)) and 104% (As(V) based on spikes or certified concentrations), repeatability (3–14%), and intermediate precision reproducibility (9–16%) of the proposed method were satisfactory for the determination of arsenite, monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid, arsenate, arsenobetaine and arsenocholine in fish and shellfish. The performance criteria for trimethylarsine oxide, however, were less satisfactory. The method was then applied to 65 different seafood samples. Arsenobetaine was the main species in all samples. The percentage of inorganic arsenic varied between 0.4–15.8% in shellfish and 0.5–1.9% at the utmost in fish. The main advantage of this method that uses only H_2O as an extractant and nitric acid as gradient eluent is its great compatibility with the long-term stability of both IEC separation and ICP-MS detection.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Arsenic (As) speciation in marine ecosystems has been the subject of much attention over the past 20 years. Seafood was identified as a source of major exposure to As through human consumption, and various As species have been detected in fish products [1–3]. Among these species, inorganic arsenite (As(III)) and arsenate (As(V)) are the most toxic forms and are carcinogenic [4] while the methylated forms monomethylarsonic acid (MA) and dimethylarsinic acid (DMA) are cancer promoters [5]. Arsenobetaine (AsB) the major species in fish and crustaceans, and arsenocholine (AsC), trimethylarsine oxide (TMAO) and tetramethylarsonium ion (TMAs) are regarded as being non toxic [1]. Because of its species-dependent toxicity, traditional approaches involving the determination of total As concentration are not adequate to truly assess the health risk to consumers from As exposure and intake [6].

Many methods have been developed to perform As speciation analysis [7–9]. Separation of the species by high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with element-specific detection by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) is a widely applied technique [10]. This hyphenation indeed combines a rapid, powerful and reproducible separation method with a very efficient detector that is known for its high sensitivity and large linear dynamic range [11].

The chemical nature of As compounds differs in charge and pK_a value, molecular size, and functional groups. Consequently, many chromatographic approaches have been applied, including anion exchange [12–15], cation exchange [10], reversed phase and size exclusion [9,10]. The Dionex Ion pac AS7 column has strong anion-exchange and hydrophobic properties. Based on the work of Londesborough et al. [14], chromatographic conditions (nitric

* Corresponding author. Tel.: +33 149772711.
E-mail address: thierry.guerin@anses.fr (T. Guérin).

0039-9140/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.talanta.2010.10.050

Author's personal copy

acid gradient as eluent) have already been optimized [16]. They are most compatible with ICP-MS detection, as they avoid the clogging problems that are frequently encountered with phosphate- or carbonate-based eluents.

The sample extraction of arsenicals from solid samples is a critical step in the sequence of analytical operations due to possible loss of analyte, changes of the species or incomplete extraction, which may lead to poor or erroneous results. Extraction recoveries depend of the matrix, species present, type of solvents and extraction time and temperature. Traditional techniques such as Soxhlet and liquid–solid extractions as well as sonication are time-consuming and require large amounts of solvents. More recent approaches, including accelerated solvent extraction (ASE), pressurised liquid extraction (PLE), supercritical fluid extraction (SFE) and microwave assisted extraction (MAE), avoid some of these problems [17]. MAE has been successfully applied to various food samples such as fish products [18–21] or plants [13]. A low power is generally selected to keep the carbon–arsenic bonds intact [10]. Commonly reported is solvent extraction using a methanol/water (MeOH/H_2O) mixture [13,18–20,22–26], or only water [19,24,26–29]. Sometimes, other solvents were tested such as tetramethylammonium hydroxide (TMAH) [24,30,31], HNO_3 [13], alkaline alcohol for inorganic species [32,33] or a "Suc/2(*N-morphilino*)ethanesulphonic acid (MES)/ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)/ascorbate" mixture [30]. Foster et al. [13] showed that 2% HNO_3 (or extraction with a MeOH/H_2O mixture followed by 2% HNO_3) improved the extraction of arsenic from difficult-to-extract materials (plant and animal digestive tissue). However, the total As extraction recoveries reported with HNO_3 from DORM-2 and TORT-2 (102% in both cases) were similar to those observed with 50% MeOH (98 and 88%, respectively). Moreover, the low HNO_3 pH is likely to disturb the chromatographic separation of arsenic species in extracted samples. Ackley et al. [24] reported that TMAH allowed a satisfactory extraction of total As (95%) from DORM-2 [25]. Nevertheless, Quaghebeur et al. [30] showed that this reagent induced oxidation of As(III) to As(V) during the extraction process [25]. Brisbin and Caruso [26] studied a MAE method for various solvents (water, methanol/water mixture or nitric acid) and various extraction times (2–6 min) on a certified reference material (CRM) of lobster (TORT-1) [25]. They showed that MAE was the simplest, fastest and most reproducible extraction method, which resulted in better or similar extraction rates than those observed with other extraction methods. A second paper from this group confirmed that these conditions were suitable for the quantification of As species in lobster [25].

The three aims of this work were: firstly, to optimize conditions of the MAE procedure for the determination of total As and As species in seafood samples, secondly, to evaluate the figures of merit of the IEC/ICP-MS method that was previously developed [16]: linearity, limits of detection and quantification, specificity, trueness, repeatability and intermediate precision reproducibility in order to validate the method, and finally to analyze samples of the second French total diet study (TDS) to assess extraction recoveries on real samples and to provide As occurrence data on fish and shellfish [34].

2. Experimental

2.1. Instrumentation

IEC/ICP-MS analysis was performed with an Ultimate 3000 chromatographic system equipped with an injection valve and a 100-μL injection loop, an IonPac AG7 guard column and an IonPac AS7 ion exchange column (250 mm × 4 mm; 10-μm particles) (all Dionex, Voisins le Bretonneux, France). The chromatographic system was coupled to an X-Series^{II} instrument (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) equipped with a concentric nebulizer and impact bead spray chamber) via a 50-cm-long PEEK tubing (0.17-mm i.d.). The sample solutions for total As analysis, were fed by a peristaltic pump from tubes arranged on an ASX 500 autosampler model 510 (CETAC, Omaha, NE, USA). Torch position and ion lenses of the ICP-MS system were optimized daily by performing short-term stability tests with a 1 μg L^{-1} tuning solution (containing especially arsenic (As), barium (Ba) and indium (In)) to maximize As signal and stability while minimising oxide levels ($BaO^+/Ba^+ < 2\%$). 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 equipments were as follows: closed-vessel microwave digestion system (Anton-Paar, Courtaboeuf, France) equipped with 80-mL quartz vessels (80-bar operating pressure), Universal 32R centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany).

Table 1
Instrumental operating conditions for IEC/ICP-MS system.

ICP-MS parameters	
Plasma gas flow	14.9 L min^{-1}
Auxiliary gas flow	0.8 L min^{-1}
Nebulizer gas flow	0.9 L min^{-1}
Plasma power	1450 W
Monitored signals	m/z 75 (^{75}As), m/z 77 ($^{40}Ar^{37}Cl$)
Dwell time	500 ms
IC parameters	
Guard column	IonPac AG7 (50 mm × 4 mm, 10-μm particles, Dionex)
Analytical column	IonPac AS7 (250 mm × 4 mm, 10-μm particles, Dionex)
Flow rate	1.35 mL min^{-1}
Mobile phase A	0.8 mM HNO_3, 1% MeOH, pH = 3.8
Mobile phase B	500 mM HNO_3, 1% MeOH, pH = 1.4
Gradient program	0–3 min: 99% A 3–5 min: 10% A 5–12 min: 80% A

2.2. 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^{TM} PLUS system combined to an Elix 5 pre-system (Millipore S.A., St Quentin en Yvelines, France). Methanol (HPLC gradient grade, Sigma Aldrich), and nitric acid (Suprapur, 67%, Merck) were used as eluents. Standard solutions of the individual As species with an As concentration of 0.5 or 1 g L^{-1} were prepared from the following reagents: sodium (meta) arsenite (≥99.0%), sodium arsenate dibasic heptahydrate (≥98.5%), disodium methylarsenate (≥98.4%), cacodylic acid (≥99.0%) (all Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), methylarsonic acid, arsenocholine, trimethylarsine oxide (all Tri-Chemicals, Yamanashi, Japan), arsenobetaine calibrated solution (BCR 626, 1031 ± 6 mg kg^{-1} Community Bureau of Reference, Geel, Belgium) and tetramethylarsonium ($TMAs^+$) kindly provided by Prof. K.A. Francesconi (Institute of chemistry, University Graz, Austria). Each stock solution was further diluted to 1 mg L^{-1}. Stock solutions were stored in the dark at 4 °C to prevent decomposition or oxidation. The stability of these standards in terms of total As content and purity of the species was checked by ICP-MS using As stock solution from Analytika (Prague, Czech Republic). An internal standard solution was prepared with 1000 mg L^{-1} standard stock solutions of indium (In), purchased from Analytika (Prague, Czech Republic). Multi-species calibration standard solutions of 0–20 μg L^{-1} were prepared daily from these stock solutions by appropriate dilution. A multi-elemental standard solution (10 mg L^{-1}) (Perkin–Elmer, Courtaboeuf, France) was used to prepare tuning solutions in 6% (v/v) nitric acid.

Author's personal copy

Table 2
As species and total As concentrations (mg kg^{-1}) for both extraction conditions in 5 seafood CRMs ($n = 5$).

		As(III)	MA	DMA	As(V)	AB	TMAO + TMAP	AC	ΣAs species	Total As extracted	Total As certified
TORT-2	A	0.408 ± 0.095[a]	0.460 ± 0.060	1.27 ± 0.14	0.725 ± 0.017	13.0 ± 1.8	1.41 ± 0.11	<0.080[b]	17.3 ± 2.2	20.6 ± 1.2	21.6 ± 1.8
	B	0.588 ± 0.113	0.364 ± 0.150	0.711 ± 0.150	0.645 ± 0.099	12.2 ± 0.6	1.25 ± 0.18	<0.080	15.8 ± 1.3	22.2 ± 1.4	
DORM-2	A	0.031 ± 0.014	0.061 ± 0.008	0.359 ± 0.032	0.029 ± 0.018	16.7 ± 0.6	0.201 ± 0.016	<0.080	17.6 ± 0.7	17.9 ± 0.9	18.0 ± 1.1
	B	0.064 ± 0.011	0.033 ± 0.024	0.314 ± 0.029	0.026 ± 0.002	18.3 ± 0.7	0.200 ± 0.041	<0.080	19.2 ± 0.8	19.7 ± 0.4	
DOLT-3	A	0.074 ± 0.011	0.047 ± 0.008	0.480 ± 0.032	0.073 ± 0.007	8.11 ± 0.65	0.357 ± 0.093	<0.080	9.1 ± 0.8	10.0 ± 0.4	10.2 ± 0.5
	B	0.136 ± 0.004	<0.020	0.417 ± 0.024	<0.020	7.56 ± 0.20	0.452 ± 0.048	0.081 ± 0.022	8.6 ± 0.3	9.6 ± 1.1	
DORM-3	A	0.085 ± 0.014	0.091 ± 0.028	0.459 ± 0.007	0.243 ± 0.023	4.69 ± 0.16	0.221 ± 0.028	<0.080	5.8 ± 0.3	5.8 ± 0.4	6.9 ± 0.3
	B	0.129 ± 0.018	0.066 ± 0.024	0.495 ± 0.054	0.276 ± 0.036	5.24 ± 0.26	0.188 ± 0.064	<0.080	6.4 ± 0.5	7.1 ± 0.4	
BCR 627	A	0.054 ± 0.014	0.063 ± 0.010	0.154 ± 0.011	<0.020	4.86 ± 0.3	0.051 ± 0.010	<0.080	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.5	4.8 ± 0.3
	B	0.172 ± 0.071	<0.020	0.158 ± 0.019	<0.020	3.82 ± 0.4	0.099 ± 0.044	<0.080	4.2 ± 0.5	4.8 ± 0.3	

A: 100% H_2O, and B: 80% MeOH extraction.
[a] ±SD ($n \geq 3$).
[b] Limit of quantification (see Table 4).

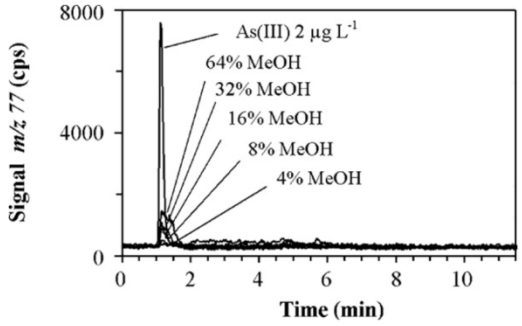


Fig. 1. Methanol effect on the measurement at m/z 75.

2.3. Reference materials

Certified reference materials DORM-2 (Dogfish muscle), DOLT-3 (Dogfish liver), DORM-3 (Fish protein), DOLT-4 (Dogfish liver), and TORT-2 (Lobster hepatopancreas) from the National Research Council of Canada (CNRC), and BCR 627 (Tuna fish tissue) from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), were all purchased from Promochem (Molsheim, France). All samples were used as provided without further grinding.

2.4. Seafood samples

All the seafood composite samples from the second French Total Diet Study (TDS) were analysed: fish (saithe, salmon, smoked salmon, tuna and canned tuna), mollusc (mussel, oyster, 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 removed). Then the core foods were prepared as consumed, i.e., as prepared by the average consumer (salmon smoked or steamed, tuna oven cooked or canned in oil or brine, saithe cooked, oyster raw, shrimp and mussel boiled, scallop steamed). So, the TDS has considered the impact of home cooking on the possible decomposition of less stable chemicals and the formation of new ones [34].

2.5. Total arsenic 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 as described previously [35]. After cooling, sample solutions were quantitatively transferred into 50-mL calibrated polyethylene flasks. Before final dilution with water to 50 mL, 1 mg L^{-1} internal standard solution (In,) was added to a final concentration of 2 µg L^{-1} to allow drift correction and to compensate for possible matrix effects. Total As concentration in extracted samples was determined by ICP-MS according to a validated and accredited "in-house" method [36]. Quantification was performed by external calibration using five aqueous As standard solution from 0 to 20 µg L^{-1}.

2.6. Arsenic speciation

Aliquots of ~0.150 g freeze-dried sample were separately weighed in the microwave digestion vessels and 10 mL of a MeOH/H_2O mixture or water was added. The vessels were closed and placed into the microwave system. The samples were heated and maintained at 80 °C for 6 min. After cooling, suspensions were transferred into 50-mL polyethylene flasks, filled to volume with

Author's personal copy

Table 3
As species concentrations (mg kg^{-1}) observed in literature for DORM-2, TORT-2 and BCR 627.

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	TMAO + TMAP	AC	TMA+	Total As	References	Extraction
DORM-2	*0.031*	*0.061*	*0.359*	*0.029*	*16.7*	*0.201*	*<0.08*[a]	*0.265*	*17.9*	This work	A
					16.4			**0.248**	**18.0**	**Certified**	
	0.075	nd	0.281	0.024	18.3	0.152	nd		18.8	[16]	A
	nd	0.070	0.320	0.020	17.1	0.160	nd	0.270	18.4	[13]	A
	nd	0.050	0.340	0.020	16.2	0.160	0.010	0.250	17.4	[13]	A
	nd	0.019	0.320	0.004	17.5				17.8	[23]	A
	0.200		0.410	0.650	13.2	0.010	nd	0.430	15.0	[22]	A
	nd		0.160	1.90	16.5	nd	nd	0.360	18.9	[49]	A
			0.250	0.360	16.0					[19]	A
	0.110	0.310	0.160	nd	16.9	0.340	nd	0.360	18.2	[18]	A
	nd	nd	0.280	nd	16.8	0.170	0.023	0.240	18.5	[20]	A
			0.390		15.0		0.460		15.9	[48]	B
			0.235		17.9	0.18	nd	0.173	16.84	[58]	B
			0.300		16.9	0.181	0.010	0.260	17.8	[37]	B
	0.050	0.140	0.490	0.050	16.1	0.300	nd	0.300	17.4	[39]	B
	nd	nd	0.290	0.050	16.1					[59]	B
		<0.003	0.300		15.9	<0.001	0.110	0.110	18.0	[60]	B
	0.100	nd	0.300	0.400	13.5	0.400	0.020	0.100	14.8	[14]	B
			0.204	nd	15.6				17.2	[17]	C
	nd	0.015	0.230	0.006	17.6	0.154	0.024	0.266	19.6	[61]	C
	nd	0.123	0.610	0.330	16.7				17.8	[54]	D
	0.079		0.309		16.2				16.6	[15]	E
TORT-2	*0.408*	*0.460*	*1.27*	*0.725*	*13.0*	*1.41*	*<0.08*		*20.6*	This work	*A*
									21.6	**Certified**	
	nd	nd	1.04	0.320	13.9	1.20	0.040	0.050	19.0	[13]	A
	nd	nd	1.70	0.780	14.4	1.40	0.060	0.050	22.0	[13]	A
	0.500		1.10	0.500	12.2	0.80	nd	nd	15.1	[22]	A
				0.190[b]						[33]	A
			1.06	0.470	12.8				19.1	[19]	A
		0.147	1.33	0.684	13.6		0.299		16.2	[25]	A
	nd	0.200	1.03	0.410	13.1	1.20	nd	0.055	19.9	[20]	A
			1.39		13.0	1.08	0.024	0.055		[37]	B
		0.030	0.97		13.8	0.150	<0.003	<0.003	23.0	[60]	B
	nd	0.093	0.84	0.093	14.3	0.84	0.043	0.044	19.7	[61]	C
	0.093	0.093	0.84	0.093	14.2		0.024		21.6	[12]	D
BCR 627	*0.068*	*0.045*	*0.148*	*0.041*	*3.6*	*0.082*	*<0.08*		*5.2*	This work	A
			0.150		**3.9**				**4.8**	**Certified**	
	0.076	<0.016	0.157	<0.024	4.1	0.037	< 0.042		4.4	[16]	A
	0.002	0.010	0.154	0.005	4.1	<0.002			4.2	[28]	A
			0.050		4.0	nd	0.008	0.029	4.1	[58]	B
				0.015[b]						[33]	B
			0.140		3.7	0.043	0.012	0.037	4.1	[37]	B
		<0.003	0.163		4.1	<0.001	<0.003	<0.003	4.9	[60]	B
			nd	nd	5.3		nd		5.8	[17]	C
	nd	nd	0.166	0.070	4.3				4.6	[54]	D
	nd	nd	0.140	0.010	3.6				3.8	[31]	D
	nd	nd	0.135	nd	3.8				4.1	[62]	D
	0.080		0.150		3.7				3.9	[15]	E
	nd	nd	0.180	nd	4.2				4.5	[3]	AF

A: MAE, B: liquid/solid, C: ASE, D: sonication, E: matrix solid phase extraction, F: enzymatic, G: soxhlet. nd: not detected.
[a] Limit of quantification (see Table 4).
[b] As(III) + As(V) values.

ultra-pure water and centrifuged at 3500 rpm for 5 min. Supernatants were filtered through a 0.45-μm Millipore syringe filter and 5-fold diluted before injection. Dilution of the extract reduced matrix effect, resulting in similar retention times for a given species in standard solutions and various seafood matrices. Although this approach degrades the limit of quantification (LOQ), it is common practice [37] because it greatly simplifies the analysis and increases sample throughput as it avoids the time-consuming method of standard addition. The separation was performed at a flow rate of 1.35 mL min^{-1}, using a nitric acid gradient between pH 3.4 and pH 1.8 [16]. For quantification using peak area, the chromatographic software (PlasmaLab) of the ICP-MS instrument was used. A five-point external calibration with the respective standard compounds was carried out to compensate for any difference in sensitivity between species as a result of gradient elution. The concentrations of unknown species were estimated using the calibration curve of the nearest eluting standard compound.

2.7. Calculations and statistical methods

The concentrations of arsenic species were always expressed in milligrams of As per kg (mg kg^{-1}) of dry mass. The average moisture of the 65 seafood was calculated to be 71%. All TDS samples were analyzed in triplicate. For several samples, concentrations were below the LOQs. For calculations, values below the LOQs were taken as equal to the LOQs.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of MAE procedure

A preliminary study was made to determine factors that could have a significant effect on the total As extraction recovery from seafood samples. Five factors were selected for the study: (1) sample weight (0.050–0.200 g, in 0.050-g increments), (2) heating time

Author's personal copy

Table 4
Figures of merit of the speciation method.

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	TMAO + TMAP	AsC
Linearity							
Range ($\mu g\,L^{-1}$)	0–20	0–20	0–20	0–20	0–60	0–20	0–20
LOQ							
(mg As kg^{-1})	0.020	0.020	0.020	0.020	0.020	0.050	0.080
Specificity							
$t_{critical\ value}$	2.898	2.861	2.898	2.898	2.878	2.845	2.898
$t_{observed}$ (slope $\neq$ 1)	2.630	0.803	1.429	1.520	1.315	3.733	2.885
$t_{observed}$ (intercept $\neq$ 0)	1.204	0.111	0.439	1.454	0.254	0.190	0.824
Trueness							
Recovery (%)							
BCR 627	–	–	102	–	96	–	–
Spikes							
0.500 $\mu g\,L^{-1}$	–	98[a]	–	104[a]	–	78[a]	99[b]
2.00 $\mu g\,L^{-1}$	82[c]	96[a]	–	90[a]	–	–	97[c]
Repeatability							
CV_r (%) ($n \geq 5$)	5	4	10	4	3	20	14
Reproducibility							
CV_R (%) ($n \geq 10$)	16	10	16	9	11	36	15

[a] Spike on BCR 627.
[b] Spike on TORT-2.
[c] Spike on DORM-3.

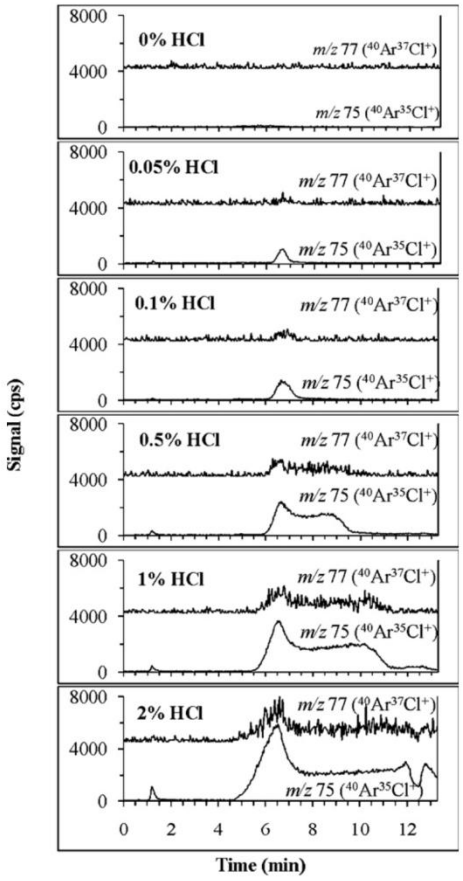


Fig. 2. ArCl interferences on the measurement at m/z 75 and m/z 77.

(2, 4, 6 min), (3) MeOH concentration (0–100%, in 20%-increments), (4) solvent volume (10–20 mL) and (5) heating temperature (80, 100, 120 °C). Initially, the total As extraction recovery (R) from each of DORM-2 and BCR 627 (certified in total As: 18.0 and 4.8 mg kg^{-1}, respectively) was selected as the response to optimise, which was calculated as $R = (X_f/X_c) \times 100$ (with X_f and X_c being, respectively, the found and certified total arsenic concentrations). Results of this preliminary study (data not shown) indicated that the MeOH concentration had the most effect on the 2 responses and that the best total As extraction recoveries were obtained with either 100% H_2O or 80% MeOH. These results agree with those of Brisbin and Caruso [26] (95–106%) for TORT-2, Ackley et al. [24] (79–98%) and Wang et al. [23] (99%) for DORM-2 who reported the best total As extraction recovery with 80% MeOH. Moreover, the extraction recovery observed in 100% H_2O with TORT-2 by Brisbin and Caruso [26] (89–93%) was also satisfactory, as well as results obtained by Narukawa et al. [29] in rice (97–106%). Even if Hirata et al. [22] reported slightly better total As extraction recovery in DORM-2 with 50% MeOH, only H_2O was used for the extraction of others seafood matrices. Finally, total As extraction recoveries observed by Karthikeyan et al. [19] in seafood samples after 100% H_2O extraction were in the range of 85–105%, whereas those reported by Karthikeyan and Hirata [18] using a 50% MeOH ranged from 84 to 105%.

The other parameters appeared to have no significant effect on extraction recoveries. Hence, a 0.150-g sample weight, with 6-min heating time at 80 °C in 10 mL of solvent was used to compare the effect of 100% H_2O and 80% MeOH on both total As and As species extraction recoveries from several seafood CRMs.

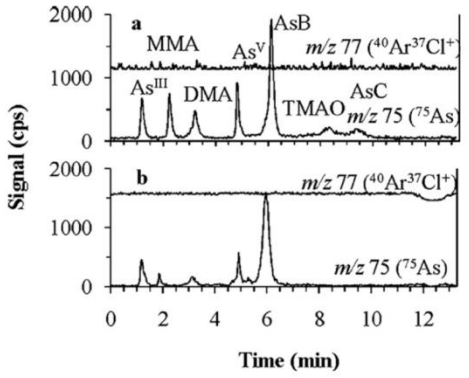


Fig. 3. Chromatographic separation of arsenic species (a) in standard solution 0.2 $\mu g\,L^{-1}$ and (b) in a mussel extract (5-fold diluted).

Author's personal copy

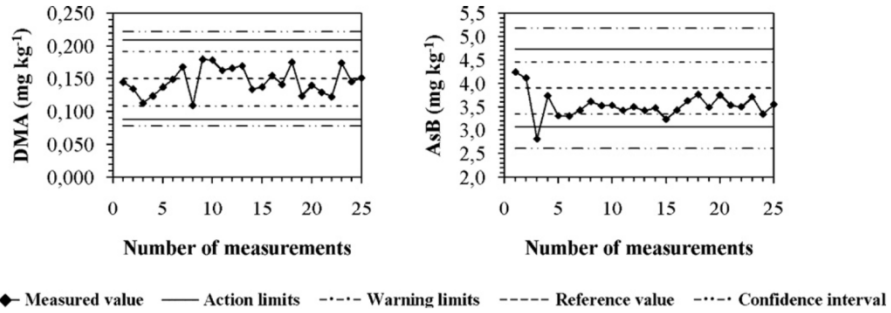


Fig. 4. Control charts for DMA and AsB in BCR 627 from 25 measurements. Means of 0.147 mg kg^{-1} and 3.5 mg kg^{-1} with *CV* of 14% and 8% RSD were found. Warning limits were calculated as $M \pm 2s$, action limits as $M \pm 3s$, confidence interval as $M \pm (k \times CV_R \times M)/100$ with M the certified value, s the standard deviation, $k = 3$ ($p = 99\%$) and CV_R, the intermediate precision coefficient of variation, set at 16% for DMA and 11% for AsB.

Table 5a
Concentration of As in shellfish (mg kg^{-1} dry mass).

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	TMAO + TMAP	AsC	Sum of As species	Total As	%Asi	Humidity (%)
	0.928	0.278	0.085	0.468	4.27	0.284	*0.080*	7.15	9.63	14	72
	0.220	0.472	0.192	0.362	4.82	0.116	0.121	6.38	11.4	5.1	74
	0.559	0.334	0.311	0.689	2.85	0.104	*0.080*	5.23	10.3	12	72
	0.409	0.109	0.222	0.677	3.67	0.198	*0.080*	5.41	12.3	8.8	74
	0.681	0.623	0.413	0.839	3.83	*0.050*	*0.080*	6.88	13.1	12	72
Mussel	0.296	0.502	0.287	0.390	4.40	*0.050*	*0.080*	6.23	13.5	5.1	72
	0.279	0.449	0.155	0.478	4.05	*0.050*	*0.080*	5.65	11.8	6.4	72
	0.303	0.150	0.180	0.685	3.86	*0.050*	*0.080*	5.34	10.0	9.9	75
	0.888	0.322	0.300	1.00	4.78	*0.050*	*0.080*	7.49	12.0	16	77
	0.460	0.171	0.316	0.464	3.06	*0.050*	*0.080*	4.65	8.92	10	72
Mean ($n = 10$)	0.502	0.341	0.246	0.606	3.96	0.100	0.084	6.04	11.3	9.8	73
	1.14	0.612	0.299	0.496	13.2	*0.050*	0.448	16.5	20.9	7.8	89
	0.800	1.19	0.376	0.482	11.6	*0.050*	*0.080*	15.1	20.7	6.2	91
Oyster	0.714	1.38	0.302	0.132	13.5	*0.050*	1.085	17.6	20.6	4.1	91
	1.13	0.512	0.975	0.754	1.08	0.378	*0.080*	8.41	24.2	7.8	91
	0.749	1.40	0.347	0.099	11.5	*0.050*	*0.080*	14.2	15.6	5.4	90
Mean ($n = 5$)	0.908	1.02	0.459	0.393	10.2	0.116	0.355	14.4	20.4	6.4	90
	0.173	*0.020*	*0.020*	0.217	0.676	*0.050*	*0.080*	1.24	10.4	3.7	74
	0.075	0.022	*0.020*	*0.020*	3.16	0.349	*0.080*	3.72	8.06	1.2	73
Scallop	0.127	0.025	*0.020*	*0.020*	5.40	0.380	*0.080*	6.06	12.4	1.2	73
	0.091	*0.020*	0.028	0.026	4.38	0.987	*0.080*	5.61	9.03	1.3	73
	0.102	*0.020*	*0.020*	0.030	4.90	0.677	*0.080*	5.83	8.19	1.6	73
Mean ($n = 5$)	0.114	0.021	0.022	0.063	3.70	0.488	0.080	4.49	9.61	1.8	73
	0.020	*0.020*	0.054	0.103	8.22	*0.050*	*0.080*	8.55	8.21	1.5	74
	0.063	*0.020*	*0.020*	*0.020*	17.3	*0.050*	*0.080*	17.6	21.2	0.4	74
	0.123	*0.020*	*0.020*	0.036	3.54	*0.050*	*0.080*	3.87	4.75	3.4	74
	0.168	*0.020*	*0.020*	0.049	8.63	*0.050*	*0.080*	9.02	10.9	2.0	74
	0.086	*0.020*	*0.020*	0.036	5.68	*0.050*	*0.080*	5.97	7.52	1.6	74
	0.021	*0.020*	*0.020*	*0.020*	0.826	*0.050*	*0.080*	1.04	1.98	2.1	74
	0.094	*0.020*	*0.020*	*0.020*	12.3	*0.050*	*0.080*	12.6	15.9	0.7	74
Shrimp	*0.020*	*0.020*	*0.020*	*0.020*	0.710	*0.050*	*0.080*	0.920	1.84	2.2	74
	0.096	*0.020*	*0.020*	*0.020*	4.66	0.072	*0.080*	4.97	12.7	0.9	74
	0.073	*0.020*	*0.020*	*0.020*	4.52	*0.050*	*0.080*	4.78	6.74	1.4	74
	0.088	*0.020*	*0.020*	*0.020*	3.75	*0.050*	*0.080*	4.03	7.21	1.5	74
	0.186	*0.020*	*0.020*	*0.020*	24.6	*0.050*	*0.080*	25.0	34.1	0.6	75
	0.245	*0.020*	0.367	0.052	8.31	*0.050*	*0.080*	9.13	17.7	1.7	74
	0.136	*0.020*	0.092	0.030	7.76	*0.050*	*0.080*	8.16	13.3	1.2	74
	0.039	*0.020*	*0.020*	*0.020*	3.04	*0.050*	*0.080*	3.26	5.98	1.0	74
Mean ($n = 15$)	0.097	0.020	0.050	0.032	7.59	0.051	0.080	7.92	11.3	1.5	74
Total mean ($n = 35$)	**0.331**	**0.255**	**0.161**	**0.252**	**6.37**	**0.137**	**0.120**	**7.82**	**12.4**	**4.6**	**76**
Median	0.173	0.020	0.054	0.052	4.52	0.050	0.080	6.06	11.4	2.2	74
P90	0.853	0.619	0.359	0.687	12.9	0.366	0.080	16.0	20.8	11.1	89
Minimum	0.020	0.020	0.020	0.020	0.676	0.050	0.080	0.920	1.84	0.4	72
Maximum	1.14	1.40	0.975	1.00	24.6	0.987	1.08	25.0	34.1	16	91
$n <$ LOQ	2	18	16	11	0	25	32	–	–	–	–

*Values below the LOQ are indicated in italic.

Author's personal copy

Table 5b
Concentration of As in fish (mg kg^{-1} dry mass).

	As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	TMAO + TMAP	AsC	Sum of As species	Total As	Asi (%)	Humidity (%)
	0.036	*0.020*	0.033	0.025	4.47	0.069	*0.080*	4.73	7.23	0.8	76
	0.023	*0.020*	0.033	*0.020*	3.86	*0.050*	*0.080*	4.08	7.94	0.5	77
Saithe	0.045	*0.020*	*0.020*	*0.020*	6.40	*0.050*	*0.080*	6.64	7.96	0.8	76
	0.043	*0.020*	*0.020*	*0.020*	6.74	*0.050*	*0.080*	6.98	8.52	0.7	76
	0.035	*0.020*	*0.020*	*0.020*	8.00	*0.050*	*0.080*	8.23	10.7	0.5	76
	0.025	*0.020*	*0.020*	*0.020*	5.83	*0.050*	*0.080*	6.05	8.39	0.5	76
Mean (n = 6)	0.034	0.020	0.024	0.021	5.88	0.053	0.080	6.12	8.46	0.7	76
	0.020	*0.020*	*0.020*	*0.020*	2.11	*0.050*	*0.080*	2.32	2.92	1.4	61
	0.020	*0.020*	*0.020*	*0.020*	2.24	*0.050*	*0.080*	2.45	3.41	1.2	61
	0.020	*0.020*	0.027	0.025	1.88	*0.050*	*0.080*	2.10	2.43	1.9	61
	0.020	*0.020*	0.080	*0.020*	2.43	*0.050*	*0.080*	2.70	3.16	1.3	61
	0.026	*0.020*	0.071	*0.020*	2.63	*0.050*	*0.080*	2.90	3.24	1.4	63
	0.043	*0.020*	*0.020*	*0.020*	5.54	*0.050*	*0.080*	5.77	5.07	1.2	62
	0.020	*0.020*	0.049	*0.020*	1.42	*0.050*	*0.080*	1.66	2.36	1.7	63
Salmon	*0.020*	*0.020*	0.037	*0.020*	1.93	*0.050*	*0.080*	2.15	3.25	1.2	63
	0.020	*0.020*	0.045	0.024	2.09	*0.050*	*0.080*	2.32	3.72	1.2	59
	0.020	*0.020*	0.035	*0.020*	1.92	*0.050*	*0.080*	2.14	3.15	1.3	60
	0.020	*0.020*	*0.020*	*0.020*	2.41	*0.050*	*0.080*	2.62	4.06	1.0	63
	0.020	*0.020*	0.051	*0.020*	1.96	*0.050*	*0.080*	2.20	3.07	1.3	63
	0.020	*0.020*	0.059	*0.020*	2.57	*0.050*	*0.080*	2.82	3.63	1.1	63
	0.020	*0.020*	0.048	*0.020*	2.22	*0.050*	*0.080*	2.46	3.63	1.1	63
	0.020	*0.020*	*0.020*	*0.020*	2.37	*0.050*	*0.080*	2.58	3.40	1.2	60
	0.020	*0.020*	*0.020*	*0.020*	2.11	*0.050*	*0.080*	2.32	2.92	1.4	61
Mean (n = 16)	0.022	0.020	0.042	0.021	2.36	0.050	0.080	2.60	3.34	1.3	62
Smoked salmon	0.028	*0.020*	0.037	*0.020*	3.01	*0.050*	*0.080*	3.25	3.95	1.2	64
	0.020	*0.020*	0.070	*0.020*	3.03	*0.050*	*0.080*	3.29	3.79	1.1	64
Mean (n = 2)	0.024	0.020	0.054	0.020	3.02	0.050	0.080	3.27	3.87	1.1	64
Tuna	0.031	*0.020*	0.117	*0.020*	4.79	*0.050*	*0.080*	5.11	6.74	0.8	66
	0.020	*0.020*	0.053	*0.020*	5.53	*0.050*	*0.080*	5.77	7.32	0.5	68
Mean (n = 2)	0.025	0.020	0.085	0.020	5.16	0.050	0.080	5.44	7.03	0.7	67
	0.020	*0.020*	*0.020*	*0.020*	1.56	*0.050*	*0.080*	1.77	2.49	1.6	65
Canned tuna	*0.020*	*0.020*	0.030	*0.020*	1.44	*0.050*	*0.080*	1.66	2.22	1.8	65
	0.020	*0.020*	0.034	*0.020*	1.48	*0.050*	*0.080*	1.71	2.31	1.7	65
	0.020	*0.020*	*0.020*	*0.020*	1.72	*0.050*	*0.080*	1.93	2.45	1.6	65
Mean (n = 2)	0.020	0.020	0.026	0.020	1.55	0.050	0.080	1.77	2.37	1.7	65
Total mean (n = 30)	**0.024**	**0.020**	**0.040**	**0.020**	**3.19**	**0.051**	**0.080**	**3.42**	**4.51**	**1.2**	**66**
Median	0.020	0.020	0.033	0.020	2.39	0.050	0.080	2.60	3.52	1.2	63
P90	0.037	0.020	0.072	0.020	5.89	0.050	0.080	6.10	8.00	1.7	76
Minimum	0.020	0.020	0.020	0.020	1.42	0.050	0.080	1.66	2.22	0.5	59
Maximum	0.045	0.020	0.117	0.025	8.00	0.069	0.080	8.23	10.7	1.9	77
n < LOQ	20	30	11	27	0	29	30	–	–	–	–

*Values below the LOQ are indicated in italic.

3.2. Comparison of 100% H_2O and 80% MeOH extraction conditions

Table 2 shows the concentration of extracted As in five CRMs. For DORM-2 and BCR 627, it was within the allowable certified value's error (10%, k = 2) with both extractants. No significant difference was noticed between both extraction conditions. Because of the co-elution of TMAO and trimethylarsoniopropionate (TMAP) under the chromatographic conditions used [38], the sum of the two species are given as results.

Total As recoveries in TORT-2, DORM-2 and BCR 627 using both 100% H_2O (95%, 99% and 108%) and 80% MeOH (103%, 109% and 100%) were in substantial agreement with those reported in literature [3,13,18–24,26]. However, in TORT-2 and BCR 627, the quantitative recoveries obtained using H_2O were higher than those reported by Hirata et al. [22] and Nakazato et al. [28] (respectively, 76 and 88%). The concentrations for DMA, As(V), AsB, TMAO + TMAP and AsC after 100% H_2O extraction were generally close to those obtained with 80% MeOH for all CRMs. However, As(III) values were systematically higher with 80% MeOH. In fact, the overestimation of As(III) is likely due to the elution of MeOH in conjunction with As(III) (Fig. 1), as reported by Kohlmeyer et al. [39]. Consequently, in order to avoid the possible over-estimation of As(III), and also to simplify the extraction procedure, the 100% H_2O extraction conditions were selected for the remainder of this work. Moreover, these conditions are also the most compatible with the long-term stability of ICP-MS detection.

In TORT-2, the difference between the sum of As species concentrations and the total extracted As concentration may be partially explained by the presence of arsenosugars identified as OH-arsenoribose and PO_4-arsenoribose (0.35 and 0.56 mg kg^{-1}, respectively) by Foster et al. [13].

Concentrations of As species and total As for DORM-2, TORT-2 and BCR 627 are compared with those reported in the literature over the last decade in Table 3. To the best knowledge of the authors, no other study reported As species concentrations in DOLT-3 and

Author's personal copy

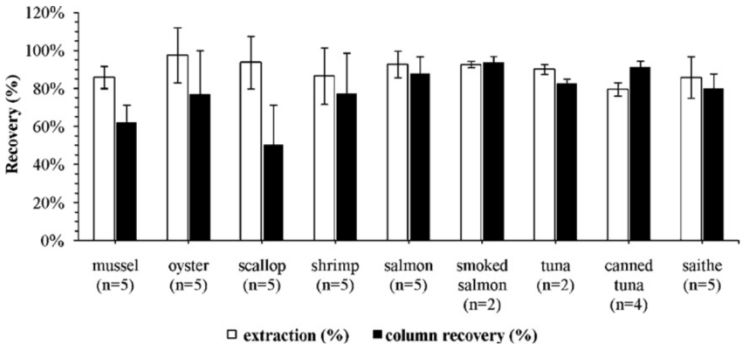


Fig. 5. Extraction recoveries of total arsenic and arsenic species after 100% H_2O MAE extraction. Error bars indicate the standard deviation of the results.

DORM-3. The values for DMA, AB, TMAO + TMAP, AC and $TMAs^+$ for the 3 CRMs were generally in good agreement with the majority of mean values reported previously.

As discussed by Sloth et al. [33], a large variability exists between the reported species concentrations obtained by different extraction and separation methods. Hence, no consensus value for inorganic arsenic could be established in any of these CRMs. This is particularly obvious in the case of As(V) in DORM-2 where six values are higher than 0.280 mg kg^{-1} (including one higher than 1 mg kg^{-1}) whereas 8 values are lower than 0.05 mg kg^{-1} (including 5 similar to the value in this work).

3.3. Validation parameters

The optimised extraction and separation conditions for arsenic speciation analysis of seafood samples were used to validate the method. Figures of merit including linearity, limits of quantification, specificity, trueness, repeatability and intermediate precision reproducibility are presented in Table 4.

3.3.1. Linearity and limits of quantification

A linearity study was performed with standard solutions ($n = 20$) of different concentration levels (0, 2, 5, 10 and 20 μg L^{-1}). Statistical tests based on application of analysis of variance to the least-squares regression (data not shown) indicated that the linear regression model was acceptable for the seven species in the defined range. The LOQs (in mg As kg^{-1}) were defined as six times the standard deviation of the average from the blank samples ($n = 21$) quantified on different days over several months, following correction for sample weight (0.150 g of dry material) and dilution (50 mL). The LOQs were experimentally verified, by measuring a spiked standard solution of each species corresponding to the target value of LOQ under repeatability conditions ($n = 10$) and by checking that the found value was acceptable under both trueness and precision conditions. These LOQ values, obtained and verified under robust conditions (Table 4), can be higher than those previously obtained over short-term conditions [16,18,23,31,37,39], but are sometimes in good agreement with those previously reported in marine samples [3,15,18,22,39–41] or better [42]. In general, the large variability existing between reported LOQs can be attributed to differences in methods of evaluation, such as extrapolation of the calibration curve, number of blanks analysed, LOQs estimated over short or long terms conditions.

3.3.2. Specificity (freedom from interferences)

Specificity involves the confirmation that interferences on the ICP-MS measurement process are not significant.

3.3.2.1. Spectroscopic interferences. In the speciation analysis of As, interference by chloride cannot be disregarded. The $^{40}Ar^{35}Cl^+$ polyatomic ion can interfere with the detection of As species at m/z 75 when analyzing seafood containing a substantial amount of chlorides. In order to evaluate the possible interference of chlorides on the chromatographic separation and ICP-MS detection, several HCl solutions (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, and 2%) were prepared and analyzed in the same conditions as for the samples. Under the selected conditions, two peaks due to $^{40}Ar^{35}Cl^+$ appeared on the chromatogram at the retention time of As(III) and soon after the retention time of AsB from 0.1% HCl (Fig. 2). Those peaks increase with the concentration of HCl and the second one results in a deformation of the baseline and an increase of the apparent AsB peak width. At 0.05% HCl, this interference is negligible and from 0.1% HCl the deformation of the baseline just after AsB and the increase of AsB peak width would indicate the presence of chloride in the solutions. It must be noticed that the peak quantified as As(III) at 0.1% HCl was lower than the LOQ (0.03 μg L^{-1}).

Moreover, the signal at m/z 77 (corresponding to $^{40}Ar^{37}Cl^+$) was monitored simultaneously during the As measurement and systematically checked. Chromatograms indicate that the presence of chlorides is evident from 0.1% HCl added. Therefore, the $^{40}Ar^{35}Cl^+$ interference on the measurement of As species does not appear to be significant when analysing real samples (Fig. 3).

3.3.2.2. Matrix effects. In order to check for possible matrix effects, recoveries of 0.5–20 μg L^{-1} (or 60 μg L^{-1} for AsB) spikes were measured in several real samples (oyster, mussel, scallop, shrimp, salmon and tuna). Spiking was done before extraction, each spiked sample then being processed in the same way as the unspiked sample. The regression line was tested against the line of unity (slope = 1, intercept = 0) by simultaneously testing the hypotheses of slope different from 1 and intercept different from 0, using Student's t-test. These results ($t_{observed} < t_{critical}$) show that specificity of the method is acceptable for all species except TMAO. In fact, a bad resolution of the TMAO peak was achieved in spite of the 5-fold dilution, which is likely due to the remaining salt concentration. Owing to the low concentration of TMAO in the samples, a 10-fold dilution was not possible. However, as this species is non toxic and thus its accurate determination is not critical for risk assessment purposes, the method was not further modified.

3.3.3. Trueness

Trueness was assessed either using available CRMs with certified species concentrations, such as DMA and AsB in BCR 627 [43,44] or by spiking BCR 627, TORT-2 and DORM-3 with 0.5 and 2.0 μg L^{-1} of each species. The mean of five analyses must lie within the confidence interval (CI) calculated from the certified value (M)

Author's personal copy

of the CRM or spike as: $CI = M \pm (k \times CV_R \times M)/(100 \times n^{1/2})$ where $k = 2$, n the number of samples, and CV_R the intermediate precision coefficient of variation ($p = 99\%$) defined as intermediate precision reproducibility for each of species. Furthermore, the coefficient of variation obtained from these results ($n = 5$) must be less than the defined CV_R.

The results presented in Table 4 demonstrate a satisfactory trueness for the seven species on the three CRMs. The obtained recoveries from the certified values of DMA and AsB in BCR 627 are 102 and 96%, respectively. In BCR 627, DORM-3 and TORT-2, the recoveries from spikes are in the range of 78–104%, with the lowest recovery obtained for TMAO.

3.3.3.1. Precision under repeatability and intermediate reproducibility conditions. Repeatability was evaluated by analyzing BCR 627 spiked with 2 $\mu g\,L^{-1}$ of As(III), MA, As(V), TMAO and AsC. The calculated CV_r for the seven species are in the range of 3–20%, with the highest CV_R observed for TMAO and AsC.

The intermediate precision reproducibility was investigated by analyzing a homogeneous sample in duplicate ($n \geq 10$), on different days and by three different analysts. BCR 627 spiked with 2 $\mu g\,L^{-1}$ of As(III), MA, As(V), TMAO and AsC was also used. Intermediate reproducibility variance () was calculated as: where S_L^2 is the variance due to sample variations and S_r^2 is the repeatability variance.

The calculated CV_R was in the range of 9–16% for all species, except for TMAO (36%) (Table 4).

Compared to the literature, CV_r seems higher but in these previous studies, repeatability was estimated on standard solutions and not on sample extracts [14,18,22]. In conclusion, the performance of this method in terms of precision is satisfactory.

3.4. Application

3.4.1. Quality assurance

Following the proposed IEC/ICP-MS procedure, sample solutions were analyzed in batches including internal quality control (IQC) such as the 5-point calibration standards to monitor linearity ($r^2 \geq 0.995$), a reagent blank to monitor possible cross-contamination or memory effects, a CRM to check trueness, and a standard solution every six samples and at the end of the sequence to monitor instrument drift. The mean values obtained for DMA and AsB were 0.147 and 3.5 $mg\,kg^{-1}$ with a RSD of 14 and 8%, respectively ($n = 25$). Control charts indicate that the concentrations found were well within the confidence interval (CI) (Fig. 4).

3.4.2. Extraction recoveries for real samples

All real samples of fish and shellfish selected for the second French TDS were used to assess the effect of fat content on extraction recoveries. The average fat content, obtained from the French Data Centre on Food Quality unit of ANSES (CIQUAL), was 12.4% for fish 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 mussel, 1.4% for steamed scallop, 1.1% for boiled shrimp and 0.53% for raw oyster [45]. These samples correspond to the species most consumed by the general French population and were prepared as consumed [34]. Extraction recoveries were calculated as As_{TE}/As_T, with As_{TE} the total As extracted by H_2O and MAE and As_T the total As mineralized with HNO_3 and quantified by ICP-MS. To ensure and confirm the analytical accuracy of the As_T method, the laboratory regularly participated in proficiency test schemes (PT-Schemes) as an external quality control such as the Central Science Laboratory-Food Analysis Performance Assessment Scheme (CSL-FAPAS) and the Community Reference Laboratory for Heavy Metals (Instituto Superiore di Sanità – ISS). The results for total arsenic in fish and shellfish were considered satisfactory with Z-score in the range −2 and +2 [46].

Total extraction (extracts directly quantified by ICP-MS) and column recoveries (the sum of species quantified by IEC/ICP-MS) for various real seafood samples after MAE using 100% H_2O are shown in Fig. 5. Total extraction recoveries were in the range of 80–98%, with a minimum for canned tuna ($n = 4$) and a maximum for oyster ($n = 5$). In a fatty fish such as salmon, an extraction recovery rate of 93% was achieved ($n = 7$, including two smoked salmons).

A difference was observed between the sum of As species and the total As extracted in shellfish (50–77% against 86–98% on average, respectively), whereas in fish, both were in concordance (80–94% against 80–93% on average, respectively). A greater difference was found in scallop (44% difference on average) than in mussel and oyster (about 22% difference on average), as previously observed [22]. However, the results for a given sample type indicated a variation in the proportion of unknown arsenic species (13–35% in mussels, 7–37% in oysters and 33–68% in scallop), such as arsenosugars (not determined by this method), as already reported in the literature [9,27,47]. This hypothesis is further supported by the presence of unknown peaks in the mussel, oyster and scallop chromatograms. The identification of this type of compound is difficult because of the lack of commercially-available certified standards. Since arsenosugars are non toxic, further studies were not undertaken as the aim of this work was to validate a method for risk assessment of French seafood consumers.

3.5. Occurrence data

A selection of 65 seafood samples representing different types, such as shellfish and fish, were analyzed for their content of As species and total As. The results are reported in Table 5a for shellfish and in Table 5b for fish.

Shellfish samples contained more total As than fish. A mean level of 12.4 $mg\,kg^{-1}$ dry mass (dm) was found in shellfish, against 4.51 $mg\,kg^{-1}$ in fish. The highest level of total As was found in shrimp (34.1 $mg\,kg^{-1}$) where As levels were very variable. These results are in good agreement with those previously reported [3,15,48–51] but sometimes much higher than those from the previous French study, notably in shrimps and mussels [51]. Even if the contamination results are generally consistent with the literature, nevertheless, as it was underlined by the 2004 EU SCOOP report, the diversity of origins of seafood results in variability in contamination levels. For example, data from European countries show a mean As level range for fish, molluscs, crustaceans and echinoderms from less than 0.1 to 18 mg As kg^{-1} fresh mass [52]. Recent studies indicate a great As concentration range for different samples of a same species: for example $[5.4 \pm 0.6;\ 34.2 \pm 6.4]$ $mg\,kg^{-1}$ for shrimp [22]. This large range could be related to geographical, seasonal or environmental differences [51].

The non toxic AsB was quantified in 100% of samples as the prevalent species. In canned tuna, the low values compared with cooked tuna are probably due the migration of AsB from muscle to brine. This phenomenon can be explained by the weak electrostatic interaction of AsB and fish muscle and the greater osmotic pressure of the external medium [53]. Two samples were found to contain abnormally low level of AsB (an oyster and a scallop containing 1.08 $mg\,kg^{-1}$ and 0.676 $mg\,kg^{-1}$, respectively). Since these samples had a dubious aspect (smell and colour), these differences might be due to AsB degradation occurring during cooking.

The less toxic MA and DMA were quantified in 26% and 58% of all the samples, respectively. MA was only quantified in mussel and oyster, whereas DMA was detected as a minor component in mussel, oyster and fish, as previously reported in the literature [12,15,51,53,54]. TMAO and AsC were below the LOQ for 83% and 95% of samples but were found in some mussels, oysters and scallops.

Author's personal copy

Inorganic arsenic (Asi) forms were quantified in 94% of the shellfish samples as As(III) and in 69% as As(V), whereas, in fish, As(III) was quantified in 33% of the samples and As(V) in only 10%. Oysters were found to be the most contaminated on average by Asi (1.30 mg kg^{-1}), followed by mussels (1.11 mg kg^{-1}) in shellfish, and to a lesser extent by salmon (0.063 mg kg^{-1}) and saithe (0.061 mg kg^{-1}) in fish. The concentrations of Asi in shrimp were very low for all samples analysed, as previously observed [32,33,51,55–57]. Asi represents on average 4.6% of the total As content in shellfish (min–max 0.4–15.8%) and 1.2% at the utmost in fish (min–max 0.5–1.9%). These results are generally in good agreement with those reported in literature [15,18,32,48,50,51,54,57] but sometimes higher [33,51].

4. Conclusions

In this work, figures of merit (linearity, LOQ, specificity, trueness, repeatability, and intermediate precision reproducibility) of the proposed IEC/ICP-MS procedure were satisfactory for the determination of As(III), MA, DMA, As(V), AsB and AsC in fish and shellfish. The procedure was successfully applied to various real samples, e.g., mussels, oysters, shrimps, and different types of fish containing more or less fat. Using only H_2O as extractant and a nitric acid gradient as eluent is most compatible with the long-term stability of both IEC separation and ICP-MS detection. Combined to a fast continuously leaching system [38], this method will allow the determination of bio-accessible As species in these samples.

Acknowledgment

The authors thank J-C. Leblanc, AFSSA DERNS, coordinator of the 2nd French TDS for his helpfulness.

References

[1] ATDSR, Toxicological Profile for Arsenic, 2007.
[2] S.-H. Nam, H.-J. Oh, H.-S. Min, J.-H. Lee, Microchem. J. 95 (2010) 20–24.
[3] L.H. Reyes, J.L.G. Mar, G.M.M. Rahman, B. Seybert, T. Fahrenholz, H.M.S. Kingston, Talanta 78 (2009) 983–990.
[4] W.P. Tseng, H.M. Chu, S.W. How, J.M. Fong, C.S. Lin, S. Yeh, J. Natl. Cancer I 40 (1968) 453–463.
[5] J.L. Brown, K.T. Kitchin, M. George, Teratog. Carcinog. Mutagen 17 (1997) 71–84.
[6] J.S. Edmonds, K.A. Francesconi, Mar. Pollut. Bull. 26 (1993) 665–674.
[7] K.A. Francesconi, D. Kuehnelt, Analyst 129 (2004) 373–395.
[8] Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt, X.C. Le, Talanta 58 (2002) 77–96.
[9] M. Leermakers, W. Baeyens, M. De Gieter, B. Smedts, C. Meert, H.C. De Bisschop, R. Morabito, P. Quevauviller, TrAC: Trend Anal. Chem. 25 (2006) 1–10.
[10] C. B'Hymer, J.A. Caruso, J. Chromatogr. A 1045 (2004) 1–13.
[11] D. Beauchemin, Anal. Chem. 80 (2008) 4455–4486.
[12] X. Cao, C. Hao, G. Wang, H. Yang, D. Chen, X. Wang, Food Chem. 113 (2009) 720–726.
[13] S. Foster, W. Maher, F. Krikowa, S. Apte, Talanta 71 (2007) 537–549.
[14] S. Londesborough, J. Mattusch, R. Wennrich, Fresen. J. Anal. Chem. 363 (1999) 577–581.
[15] A. Moreda-Pineiro, E. Pena-Vasquez, P. Hermelo-Herbello, P. Bermejo-Barrera, J. Moreda-Pineiro, E. Alonso-Rodriguez, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahia, D. Prada-Rodriguez, Anal. Chem. 80 (2008) 9272–9278.
[16] V. Dufailly, L. Noel, J.M. Fremy, D. Beauchemin, T. Guerin, J. Anal. Atom. Spectrom. 22 (2007) 1168–1173.
[17] M.J. Mato-Fernandez, J.R. Otero-Rey, J. Moreda-Pineiro, E. Alonso-Rodriguez, P. Lopez-Mahia, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodriguez, Talanta 71 (2007) 515–520.
[18] S. Karthikeyan, S. Hirata, Appl. Organomet. Chem. 18 (2004) 323–330.
[19] S. Karthikeyan, S. Hirata, C.S.P. Iyer, Int. J. Environ. Anal. Chem. 84 (2004) 573–582.
[20] J. Kirby, W. Maher, J. Anal. Atom. Spectrom. 17 (2002) 838–843.
[21] J. Kirby, W. Maher, A. Chariton, F. Krikowa, Appl. Organomet. Chem. 16 (2002) 192–201.
[22] S. Hirata, H. Toshimitsu, M. Aihara, Anal. Sci. 22 (2006) 39–43.
[23] R.Y. Wang, Y.L. Hsu, L.F. Chang, S.J. Jiang, Anal. Chim. Acta 590 (2007) 239–244.
[24] K.L. Ackley, C. B'Hymer, K.L. Sutton, J.A. Caruso, J. Anal. Atom. Spectrom. 14 (1999) 845–850.
[25] J.A. Brisbin, C. B'Hymer, J.A. Caruso, Talanta 58 (2002) 133–145.
[26] J.A. Brisbin, J.A. Caruso, Analyst 127 (2002) 921–929.
[27] S. Hirata, H. Toshimitsu, Appl. Organomet. Chem. 21 (2007) 447–454.
[28] T. Nakazato, T. Taniguchi, H. Tao, M. Tominaga, A. Miyazaki, J. Anal. Atom. Spectrom. 15 (2000) 1546–1552.
[29] T. Narukawa, K. Inagaki, T. Kuroiwa, K. Chiba, Talanta 77 (2008) 427–432.
[30] M. Quaghebeur, Z. Rengel, M. Smirk, J. Anal. Atom. Spectrom. 18 (2003) 128–134.
[31] E. Sanz, R. Munoz-Olivas, C. Camara, Anal. Chim. Acta 535 (2005) 227–235.
[32] J.J. Sloth, K. Julshamn, J. Agric. Food Chem. 56 (2008) 1269–1273.
[33] J.J. Sloth, E.H. Larsen, K. Julshamn, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 6011–6018.
[34] V. Sirot, J.L. Volatier, G. Calamassi-Tran, C. Dubuisson, C. Menard, A. Dufour, J.C. Leblanc, Food Addit. Contam. A 26 (2009) 623–639.
[35] L. Noel, T. Guerin, J.M. Fremy, H. Huet, M. Kolf-Clauw, J. AOAC Int. 86 (2003) 1225–1231.
[36] L. Noel, V. Dufailly, N. Lemahieu, C. Vastel, T. Guerin, J. AOAC Int. 88 (2005) 1811–1821.
[37] J.J. Sloth, E.H. Larsen, K. Julshamn, J. Anal. Atom. Spectrom. 18 (2003) 452–459.
[38] V. Dufailly, T. Guerin, L. Noel, J.M. Fremy, D. Beauchemin, J. Anal. Atom. Spectrom. 23 (2008) 1263–1268.
[39] U. Kohlmeyer, J. Kuballa, E. Jantzen, Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 965–974.
[40] S. de Rosemond, Q. Xie, K. Liber, Environ. Monit. Assess. 147 (2008) 199–210.
[41] H.T. Lin, S.W. Chen, C.J. Shen, C. Chu, J. Food Drug Anal. 16 (2008) 70–75.
[42] S. Miyashita, M. Shimoya, Y. Kamidate, T. Kuroiwa, O. Shikino, S. Fujiwara, K.A. Francesconi, T. Kaise, Chemosphere 75 (2009) 1065–1073.
[43] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Pure Appl. Chem. 74 (2002) 835–855.
[44] L. Jorhem, Accredit. Qual. Assur. 9 (2004) 305–310.
[45] AFSSA/ANSES, French Food Composition Table – TABLE CIQUAL 2008. Available at: http://www.afssa.fr/TableCIQUAL/.
[46] S. Millour, L. Noel, R. Chekri, C. Vastel, A. Kadar, T. Guerin, Accredit. Qual. Assur. 15 (2010) 503–513.
[47] J. Borak, H.D. Hosgood, Regul. Toxicol. Pharm. 47 (2007) 204–212.
[48] E. Argese, C. Bettiol, C. Rigo, S. Bertini, S. Colomban, P.F. Ghetti, Sci. Total Environ. 348 (2005) 267–277.
[49] S. Hirata, H. Toshimitsu, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 454–460.
[50] R.M. Lorenzana, A.Y. Yeow, J.T. Colman, L.L. Chappell, H. Choudhury, Hum. Ecol. Risk Assess. 15 (2009) 185–200.
[51] V. Sirot, T. Guerin, J.L. Volatier, J.C. Leblanc, Sci. Total Environ. 407 (2009) 1875–1885.
[52] 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, 2004.
[53] M.A. Suner, V. Devesa, M.J. Clemente, D. Velez, R. Montoro, I. Urieta, M. Jalon, M.L. Macho, J. Agric. Food. Chem. 50 (2002) 924–932.
[54] P. Cava-Montesinos, K. Nilles, M.L. Cervera, M.D.L. Guardia, Talanta 66 (2005) 895–901.
[55] O. Munoz, V. Devesa, M.A. Suner, D. Velez, R. Montoro, I. Urieta, M.L. Macho, M. Jalon, J. Agric. Food. Chem. 48 (2000) 4369–4376.
[56] O. Munoz, D. Velez, R. Montoro, Analyst 124 (1999) 601–607.
[57] R.A. Schoof, J.W. Yager, Hum. Ecol. Risk Assess. 13 (2007) 946–965.
[58] V. Nischwitz, S.A. Pergantis, Anal. Chem. 77 (2005) 5551–5563.
[59] K. Wrobel, B. Parker, S.S. Kannamkumarath, J.A. Caruso, Talanta 58 (2002) 899–907.
[60] M.A. Suner, V. Devesa, O. Munoz, D. Velez, R. Montoro, J. Anal. Atom. Spectrom. 16 (2001) 390–397.
[61] R. Wahlen, S. McSheehy, C. Scriver, Z. Mester, J. Anal. Atom. Spectrom. 19 (2004) 876–882.
[62] J.L. Gomez-Ariza, D. Sachez-Rodas, I. Giraldez, E. Morales, Analyst 125 (2000) 401–407.

IV. Conclusions

Les performances analytiques de la méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche ont été évaluées selon la norme française NF V03-110 (AFNOR 1993) et ont montré que les conditions d'extraction et de séparation utilisées étaient satisfaisantes. La méthode a donc été validée et des contrôles qualité internes ont ensuite été mis en place afin de garantir la fiabilité de nos résultats. De plus, ils ont été renforcés par des contrôles qualité externes au travers de notre participation régulière à des essais interlaboratoires d'aptitude qui se sont avérés satisfaisants dans les produits de la pêche et qui indiquent que cette méthode peut également s'appliquer à des échantillons de riz et de froment. La fiabilité de ces résultats a également permis de participer à la certification d'un échantillon riz organisée par l'IRMM.

La méthode de spéciation a ensuite été appliquée sur des échantillons réels de produits de la pêche les plus couramment consommés par la population française afin de compléter les données d'occurrence. L'ensemble de ces travaux a été publié en 2011 dans le journal « Talanta ».

Par ailleurs, la méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche (Anses Maisons-Alfort CIME 09) a récemment été accréditée par le Comité français d'accréditation (COFRAC) fin 2011 selon la norme NF EN ISO/CEI 17025 pour les six espèces As(III), MA, DMA, As(V), AsB et AsC. Cette évaluation au niveau technique a concerné le personnel (compétences requises, habilitation), les installations, la méthode (développement, validation, incertitudes), l'équipement (dossier de vie, contrôle, étalonnage) et la traçabilité des mesures (réactifs, instruments, échantillons…).

Suite à ces travaux, la DGAL a ajouté en 2011 la recherche d'arsenic inorganique dans la chair de poisson dans le plan de surveillance des contaminants chimiques du milieu aquatique dans les produits de la pêche. Ce plan se poursuivra en 2012 et sera de nouveau pris en charge par le LNR qui assurera parallèlement le transfert de cette méthode à une partie de réseau de laboratoires. Ces données pourront permettre de contribuer à l'établissement de teneurs maximales en arsenic inorganique dans certains groupes d'aliments.

Enfin, cette méthode de spéciation pourra être utilisée lors des prochaines EAT.

Troisième partie. Détermination de la bioaccessibilité de l’arsenic dans les produits de la pêche : lixiviation en continu et spéciation par couplage HPLC/ICP-MS

I. Introduction

Cette troisième partie est consacrée à la mise au point d'une méthode pour l'évaluation de la bioaccessibilité de l'arsenic total et des différentes formes arséniées dans les produits de la pêche, en combinant une technique de lixiviation en ligne et la méthode de spéciation par couplage HPLC/ICP-MS présentée dans la deuxième partie de ce mémoire.

Après avoir décrit le principe de la méthodologie utilisée pour la lixiviation en ligne et les optimisations réalisées, nous présenterons et discuterons les résultats obtenus avec cette méthode en As total ainsi que pour les espèces arséniées dans des produits de la pêche au travers de l'article II publié dans le journal « Analytical & Bioanalytical Chemistry ». Enfin, nous présenterons également les résultats de bioaccessibilité obtenus sur d'autres éléments traces en total dans ces mêmes produits de la pêche au travers de l'article III, soumis en octobre 2011 (accepté le 12 mars 2012) dans le journal « Food Chemistry ».

II. Lixiviation en continu et spéciation de l'arsenic par couplage HPLC/ICP-MS

II.1. Conditions expérimentales

II.1.a. Instrumentation

L'ensemble du matériel utilisé est décrit en détail dans l'**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**

II.1.b. Méthodologie

La procédure de lixiviation en ligne est basée sur les travaux de Dufailly *et al.*, (2008a). L'ensemble des étapes de la procédure de lixiviation en ligne est résumé dans la Figure 12. Le protocole se décompose en quatre étapes distinctes :

- La calibration externe réalisée par l'injection de solutions étalons à travers une boucle d'injection de 100 µL reliée au nébuliseur de l'ICP, pour la quantification de l'arsenic total bioaccessible ;

- La lixiviation en ligne de l'échantillon lyophilisé pour évaluer la quantité d'arsenic total bioaccessible en temps réel par ICP-MS ;

- La spéciation des lixiviats pour estimer la bioaccessibilité des différentes espèces d'arsenic par HPLC/ICP-MS ;

- La digestion acide des résidus par micro-ondes pour la vérification du bilan en masse (détermination de l'arsenic total non bioaccessible par ICP-MS).

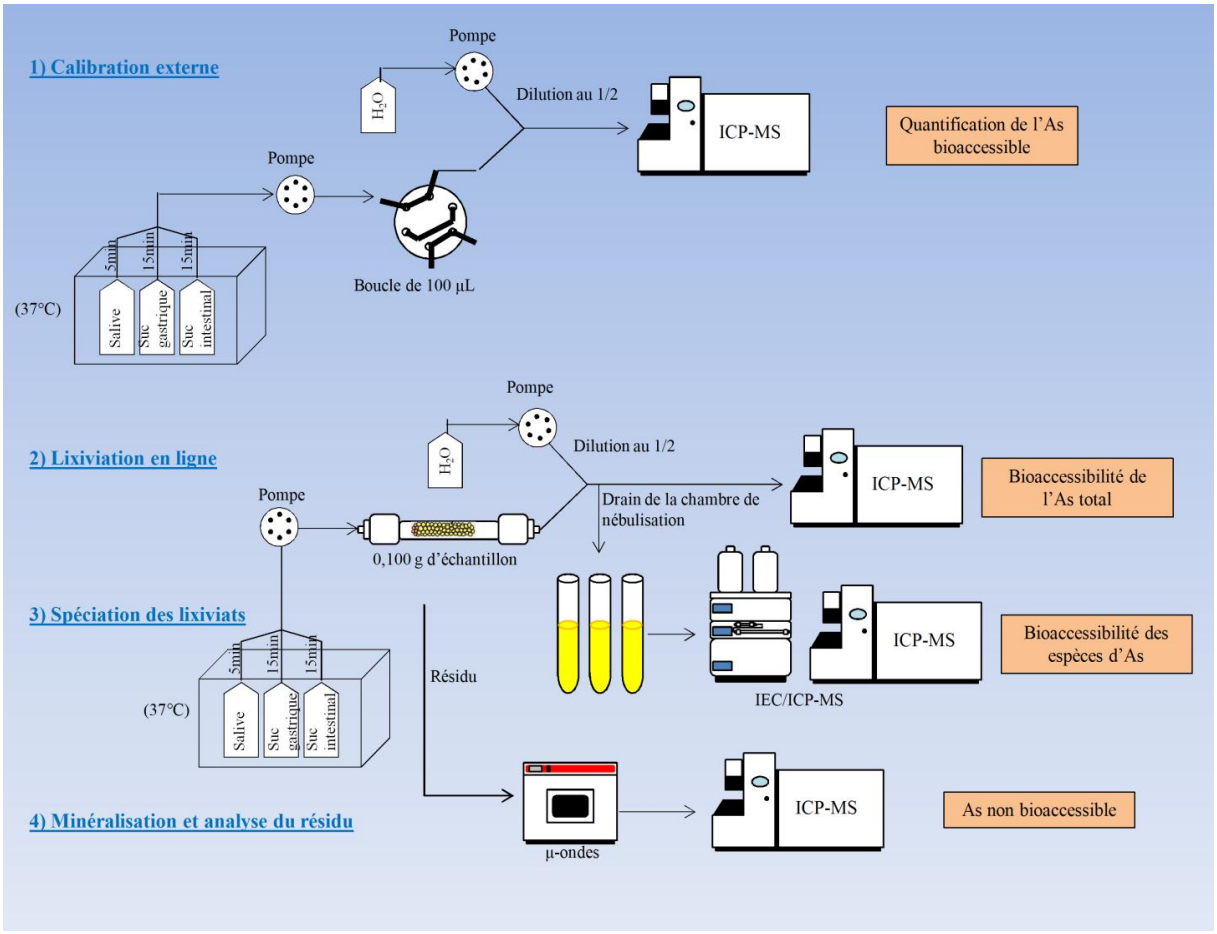


Figure 12. Schéma du dispositif de lixiviation en ligne

Par rapport aux travaux de Dufailly *et al.*, (2008a), les différentes améliorations qui ont depuis été apportées sont détaillées ci-après.

II.1.c. Lixiviation en ligne

Initialement, la procédure consistait à introduire environ 200 mg d'échantillon lyophilisé dans un filtre Isopore (0,4 mm, ∅ 47 mm – *Millipore*) disposé à l'intérieur d'un tube en PTFE (8 cm de long, 3/16 de diamètre externe et 1/8 de diamètre interne). Le système était fermé par deux morceaux de laine de quartz (non tassés afin d'éviter les phénomènes de surpressions à l'intérieur de la mini-colonne) et relié au nébuliseur de l'ICP par le biais d'un tuyau en PTFE (0,8 mm de diamètre interne). L'échantillon était alors lixivié par les différents sucs digestifs (salive, suc gastrique et intestinal) maintenus à 37°C qui étaient introduits séquentiellement dans la mini-colonne à l'aide d'une pompe péristaltique afin de déterminer la bioaccessibilité de l'arsenic total.

La quantification de l'arsenic total bioaccessible était réalisée par calibration externe, par l'injection de solutions étalons à travers une boucle d'injection de 100 µL montée à la place de la mini-colonne.

Lors de ces travaux, après plusieurs essais, le tube de PTFE qui constituait la mini-colonne a été remplacé par une colonne HPLC vide en inox (diamètre 3/16), et la pompe péristaltique a été remplacée par une pompe de chromatographie liquide, afin d'avoir un meilleur contrôle du débit, et d'optimiser les raccords avec la colonne pour éviter les fuites qui se produisaient fréquemment. De plus, la composition de la salive a été modifiée selon le protocole de Oomen *et al.*, (2003), afin d'inclure l'action des enzymes sur la bioaccessibilité de l'arsenic. La composition complète de la salive est détaillée dans l'Article II.

Pour cette étape, l'acquisition des données a été réalisée en mode « temps résolu » (TRA) au rapport masse sur charge $m/z = 75$, et a été déclenchée manuellement au début de la lixiviation des échantillons.

II.1.d. Quantification des espèces arséniées dans les lixiviats

À l'origine, le processus de lixiviation était répété deux fois : la première fois, le lixiviat était dirigé vers le nébuliseur de l'ICP-MS pour la détermination de la bioaccessibilité de l'arsenic total ; la deuxième fois, le lixiviat d'un doublon de l'échantillon était recueilli dans un flacon pour pouvoir ensuite l'injecter dans la chaine HPLC afin de déterminer cette fois les teneurs bioaccessibles de chaque espèce d'arsenic.

Une idée simple permet désormais d'utiliser le même lixiviat : une majeure partie du volume du 1er lixiviat injecté « on-line » dans l'ICP-MS part dans le drain de la chambre de nébulisation,

qu'il suffit de récupérer dans un flacon pour l'analyse de spéciation. Cette simple modification représente un gain de temps non négligeable et permet une meilleure comparaison des résultats en total et en spéciation.

Hormis le volume d'injection qui a été diminué à 25 µL afin de réduire la quantité de sels injectée dans la colonne, les conditions chromatographiques sont identiques à celles décrites dans la deuxième partie en II.2.b.iii.

Pour la quantification des espèces arséniées, les solutions étalons (0, 1, 2, 5, 10 et 20 µg/L pour l'As(III), le MA, le DMA, l'As(V), le TMAO et l'AsC, et 0, 3, 6, 15, 30 et 60 µg/L pour l'AsB) sont analysées dans les mêmes conditions que les lixiviats (réactif digestif dilué au ½).

Pour la spéciation des lixiviats, l'acquisition des données a également été réalisée en mode TRA, avec l'utilisation de la carte « Trigger » pour synchroniser l'acquisition des données avec l'injection dans la colonne chromatographique.

II.1.e. Vérification du bilan en masse

Les résidus sont recueillis pour être minéralisés à l'aide d'un mélange HNO_3/H_2O (1/1) conformément à la méthode décrite dans l'Article I.

L'acquisition des données pour l'analyse des résidus est identique à celle décrite en II.2.b.ii.

II.1.f. Optimisation du débit de nébulisation de l'ICP

Les premiers résultats ont montré une divergence entre l'arsenic total lixivié et la somme des espèces d'arsenic lixiviées : la quantité d'arsenic libérée mesurée en temps réel lors de la lixiviation était sous-estimée dans certaines matrices (parfois jusqu'à un facteur 2) (Figure 13a). Une hypothèse était que cette diminution du signal, entrainant une sous-estimation de l'arsenic libéré était due à des effets de matrices et aux sels présents dans les réactifs digestifs.

Afin de tester cette hypothèse, les lixiviats collectés ont dans un premier temps été ré-analysés en total dans les même conditions que lors des analyses en total après minéralisation (6 % HNO_3, utilisation d'étalons internes, quantification par étalonnage externe (Noel *et al.*, 2005) afin de vérifier la teneur en arsenic total bioaccessible. Puis, les échantillons ont été lixiviés de nouveau, en faisant varier le débit de nébulisation, tout en maintenant une sensibilité satisfaisante.

Les résultats ont montré qu'avec un débit de nébulisation abaissée à 0,8 L/min, la quantité d'arsenic total libéré déterminée après lixiviation en ligne était en accord avec celle déterminée en

ré-analysant le lixiviat en total, et également avec la somme des espèces mesurées après l'analyse de spéciation des lixiviats (Figure 13b).

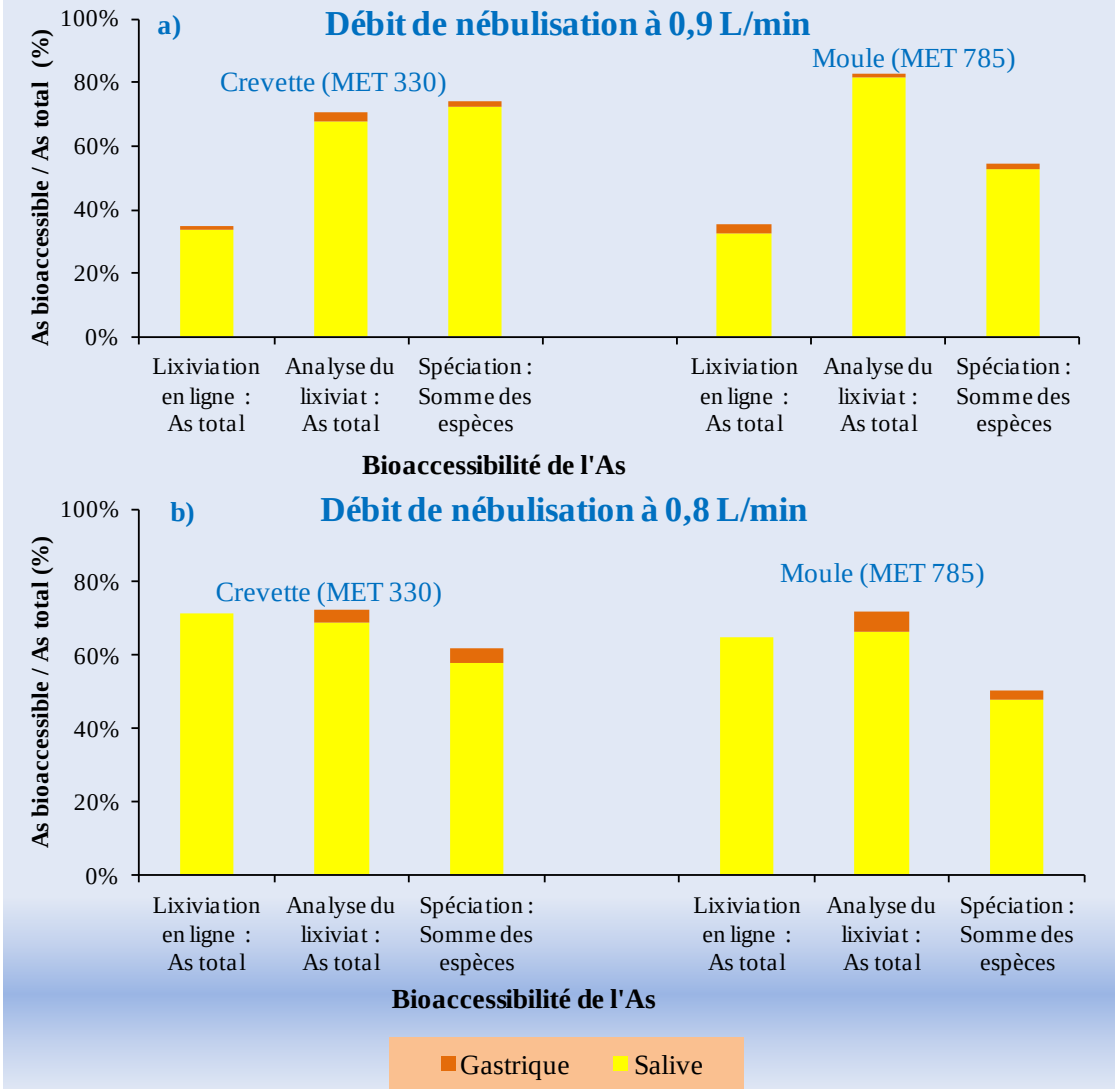


Figure 13. Comparaison des résultats obtenus en fonction du débit de nébulisation pour un échantillon de crevette et un échantillon de moule.

Cette diminution contrôlée du débit de nébulisation permet donc de réduire les interférences non spectrales (effets de matrice) entraînant une sous-estimation de l'arsenic libéré. Il est intéressant de noter que Dufailly *et al.*, (2008b) avait démontré que cette diminution du débit de nébulisation pouvait également être plus efficace que l'usage d'une chambre de collision/réaction (CCT) pour réduire un biais positif (surestimation) lié aux interférences polyatomiques à la masse *m/z* = 75, notamment en présence de fortes concentrations en calcium, chlore et/ou fer dans des matrices complexes. Ainsi, cette approche pourrait être considérée à l'avenir pour pallier ces deux grands types d'interférences en fonction des matrices analysées.

II.2. Résultats expérimentaux et discussion (Article II)

Comme pour les analyses de spéciation, les études de bioaccessibilité ont été réalisées sur des matrices lyophilisées, tout d'abord sur des matériaux de référence certifiés (DORM-3 (protéine de poisson), BCR 627 (thon), SRM 1566b (huître) et DOLT-4 (foie de roussette)) puis sur les mêmes produits de la pêche que pour la spéciation, à savoir des échantillons provenant des études Calipso et EAT 2 (moules, crevettes, crabe, bigorneau, colin, saumon…). Les matériels et méthodes ainsi que les résultats de cette étude sont présentés et discutés dans l'Article II ci-dessous.

Les principaux résultats de cette étude indiquent que l'arsenic présent dans les échantillons étudiés semble être lié de manière relativement faible avec les matrices, puisque sa bioaccessibilité est > 50 % dans toutes les matrices étudiées. De plus, l'arsenic bioaccessible est libéré principalement par la salive (plus de 2/3 de l'arsenic libéré), et le suc gastrique, alors que l'action du suc intestinal est négligeable. Les résultats de spéciation des lixiviats indiquent que la bioaccessibilité de l'Asi varie selon la matrice étudiée. À l'inverse, la bioaccessibilité de l'AsB est supérieure à 60 % dans toutes les matrices analysées.

Article II. Leufroy A. Noël L., Beauchemin D., Guérin T. (2012). "Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method" Analytical & Bioanalytical Chemistry, 402, 2849-2859.

Anal Bioanal Chem (2012) 402:2849–2859
DOI 10.1007/s00216-012-5774-4

ORIGINAL PAPER

Bioaccessibility of total arsenic and arsenic species in seafood as determined by a continuous online leaching method

Axelle Leufroy · Laurent Noël · Diane Beauchemin · Thierry Guérin

Received: 28 November 2011 / Revised: 17 January 2012 / Accepted: 19 January 2012 / Published online: 4 February 2012
© Springer-Verlag 2012

Abstract A continuous leaching method coupled online with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) detection was used to assess the maximum bioaccessibility of arsenic (As) in seafood samples. The method simulates continuous-flow digestion by successively pumping artificial saliva, gastric and intestinal juices through a mini-column of powdered sample directly connected to the nebuliser of an ICP-MS instrument. The method allows the real-time measurement of As being released by a given reagent. Because the analyte is continuously removed from the system, in contrast to batch methods, the dissolution equilibrium is driven to the right, hence quickly providing information about the worst-case scenario. Following consecutive leaching by the digestive reagents, the leachates were subject to speciation analysis by ion-exchange chromatography with ICP-MS detection to determine the arsenic species released. Finally, the remaining residue from the mini-column was fully digested to verify mass balance. The method was used to determine the bioaccessibility of total As and As species in four certified reference materials and in several real seafood samples. The mass balance was verified in each case. Generally speaking, the non-toxic form was easily released whereas the inorganic forms were poorly bioaccessible.

Keywords Bioaccessibility · Arsenic · Speciation · IEC/ICP-MS · Seafood

A. Leufroy · L. Noël · 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, Maisons-Alfort,
94706 Paris, France
e-mail: thierry.guerin@anses.fr

D. Beauchemin
Department of Chemistry, Queen's University,
90 Bader Lane,
Kingston, ON K7L 3N6, Canada

Introduction

In terms of human risk assessment, seafood consumption is considered a major source of exposure to arsenic (As) [1–3]. However, because of its species-dependent toxicity, the chemical forms of As must be known for accurate risk assessment. The inorganic forms (As_i), i.e. arsenite (As(III)) and arsenate (As(V)), are the most toxic forms [4], with As(III) species being more toxic than As(V) [5, 6]. Their methylated metabolites, monomethylarsonic acid (MA) and dimethylarsinic acid (DMA), are less toxic [7], whereas other organic forms, such as arsenobetaine (AsB), trimethylarsine oxide (TMAO) and arsenocholine (AsC), are considered non-toxic [1]. Recent studies regarding different seafood samples showed that As_i represents less than 16% of the total As in shellfish, and 2% in fish, but minor concentrations of methylated compounds were also found [8–11]. However, the amount of an ingested contaminant does not reflect the extent to which it is released in the organism. Ideally, exposure to a contaminant through food should take into account its oral bioavailability, i.e. its ability to be absorbed into the systemic circulation system [12, 13]. Unfortunately, this requires in vivo studies, which necessitate the collection and analysis of blood, urine, etc., making these approaches complex and very time-consuming.

A simpler way of evaluating bioavailability is to assess bioaccessibility, which is defined as the fraction of an analyte released from its matrix in the gastrointestinal tract [14],

because bioavailability can only be smaller than or equal to bioaccessibility. The bioaccessibility of an element depends not only on the matrix, but also on the chemical form of the analyte and the model used. Interest in evaluating bioaccessibility has grown over the last few years, with various methods being developed to assess the bioaccessibility of trace metals [15–18]. However, most of them use batch gastrointestinal models, where samples are sequentially exposed to artificial gastric and intestinal juices. Only a few dynamic models have been developed: the TIM (TNO GastroIntestinal Model), a computer-controlled system with several computer-controlled chambers simulating conditions in the stomach, duodenum, jejunum ileum and large intestine [19, 20]; and a continuous-flow dialysis system originally developed to study the mobility and fractionation of elements in soils, where dialysed components are continuously removed during simulated intestinal digestion [21–23]. Moreover, many studies exclude the action of saliva, thereby limiting their work to the gastrointestinal compartments. Chu and Beauchemin [24] developed a continuous leaching method which they used to determine the bioaccessibility of zinc and lead in corn bran. This method successively leaches the food sample by artificial saliva, gastric then intestinal juices in that order. This method was subsequently adapted and applied to arsenic in seafood by Dufailly et al. [25].

Few researchers have reported bioaccessibility results for arsenic species: organo-As species in DORM-2, sole and halibut [26], As_i in clams and seaweeds [27], As_i in shrimps [21], six As species in the muscle of yabbies [28], As_i in seaweeds [15], arsenosugars in seaweeds [29] and seven As species (organic and inorganic) in certified reference materials (TORT-2, DOLT-3, DORM-3 and CRM 627) [25].

This work describes a quick and simple technique to assess the maximum bioaccessibility of total arsenic in seafood in real time, and to determine the main arsenic species released during the digestion process in order to supplement the scarce data available on the bioaccessibility of arsenic species.

Experiment

Instrumentation

An X-Series^{II} ICP-MS instrument (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) equipped with a concentric nebuliser and impact bead spray chamber was used under operating conditions summarised in Table 1. The torch position, gas flow rates and ion lens settings of the ICP-MS system were optimised daily by short-term stability tests with a 1 µg/L tuning solution (containing As in particular, barium (Ba) and indium (In)) to maximise the As signal and stability while minimising interference effects from oxide levels (BaO^+/Ba^+<2%) and doubly-charged ions (Ba^{2+}/Ba^+<2%).

Table 1 Experimental conditions

ICP-MS parameters	
Plasma gas flow rate	14.9 L min^{-1}
Auxiliary gas flow rate	0.80 L min^{-1}
Nebuliser gas flow rate	0.82 L min^{-1}
Plasma power	1450 W
Monitored signal	*m/z* 75 (^{75}As)
Dwell time	500 ms
IEC parameters	
Injection volume	25 µL
Guard column	IonPac AG7 (50×4 mm, 10-µm particles, Dionex)
Analytical column	IonPac AS7 (250×4 mm, 10-µm particles, Dionex)
Flow rate	1.35 mL min^{-1}
Mobile phase A	0.8 mM HNO_3, 1% MeOH, pH=3.8
Mobile phase B	500 mM HNO_3, 1% MeOH, pH=1.4
Gradient programme	0–3 min: 99% A
	3–5 min: 10% A
	5–12 min: 80% A

Digestive reagents for the continuous leaching procedure were supplied by an L-6200A pump (Merck), and data acquired in the time-resolved analysis (TRA) mode of the ICP-MS software. An Ultimate 3000 chromatographic system integrating an injection valve and a 25-µL injection loop, an IonPac AG7 guard column and an IonPac AS7 ion-exchange column (250×4 mm; 10-µm particles) (all Dionex, Voisins le Bretonneux, France) was used for chromatographic analysis of the leachates, and data were again acquired in TRA mode. The operating parameters may be seen in Table 1.

For total analysis, the sample solutions were supplied by a peristaltic pump from tubes arranged on an ASX 500 autosampler model 510 (CETAC, Omaha, Nebraska, USA). Residues and samples were digested using a closed-vessel microwave digestion system (Anton-Paar, Courtaboeuf, France) fitted with 80-mL quartz vessels (80-bar operating pressure).

Chemicals

All solutions were prepared with analytical reagent grade chemicals and ultrapure water (18 MΩ cm) produced 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).

All the chemicals for the digestive fluids were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) except for urea, uric acid and sodium hydroxide (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Artificial saliva was prepared following

the procedure of Oomen et al. [30], while gastric and intestinal juices were prepared according to USP XXIII. For saliva, 0.896 g of KCl, 0.2 g of KSCN, 0.888 g of NaH_2PO_4, 0.57 g of Na_2HPO_4, 0.298 g of NaCl, 0.072 g of NaOH, 0.2 g of urea, 145 mg of α-amylase, 15 mg of uric acid and 50 mg of mucin were diluted to 500 mL with ultrapure water, and the pH was adjusted to 6.5 using NaOH 0.2 M. Artificial gastric juice was prepared by diluting 1.0 g of NaCl, 1.6 g of pepsin and 3.5 mL of concentrated HCl to 500 mL with ultrapure water and the pH was adjusted to 1.2 using concentrated HCl. For intestinal juice, 3.4 g of KH_2PO_4, 5 g of pancreatin and 38.5 mL of 0.2 M NaOH were diluted to 500 mL and the pH was adjusted to 6.8 using NaOH 0.2 M.

For speciation analysis, standard solutions of the individual As species with an As concentration of 0.5 or 1 g/L were prepared from the following reagents: sodium (meta) arsenite (≥99.0%; As(III)), sodium arsenate dibasic heptahydrate (≥98.5%; As(V)), cacodylic acid (≥99.0%; DMA; all Sigma Aldrich, St Fallavier, France), MA, AsC, TMAO (all TriChemicals, Yamanashi, Japan) and AsB-calibrated solution (BCR 626, 1,031±6 mg/kg Community Bureau of Reference, Geel, Belgium). Each stock solution was further diluted to 1 mg/L or 3 mg/L for arsenobetaine. Stock solutions were stored in the dark at 4 °C to prevent decomposition or oxidation. Multi-species calibration standard solutions of 0–20 μg/L were prepared daily from these stock solutions by appropriate dilution. Methanol (HPLC-gradient grade, Sigma Aldrich) and nitric acid (Suprapur, 67%, Merck) were used as eluents. Arsenic standard solutions and internal standard solution containing indium (In) were prepared using 1,000 mg/L mono-elemental stock solution (Analytika, Prague, Czech Republic). A multi-elemental standard solution (10 mg/L; Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France) was used to prepare tuning solutions in 6% (*v*/*v*) nitric acid.

Reference materials

Certified reference materials (CRMs) BCR 627 (tuna fish) from the Institute of Reference Materials and Measurements (IRMM), DORM-3 (fish protein) and DOLT-4 (dogfish liver) from the National Research Council of Canada (NRCC), and SRM 1566b (oyster tissue) from the National Institute of Standards and Technology (NIST) were purchased from Promochem (Molsheim, France). They were all used as provided, without further grinding.

Seafood samples

Freeze-dried seafood composite products were analysed from the second French Total Diet Study (TDS) (fish: saithe, salmon, smoked salmon, tuna and canned tuna; shellfish: mussel, oyster, scallop and shrimp) [31] and from the previous Calipso study, which aimed to assess the fish and seafood consumption as well as biomarkers of exposure to trace elements, pollutants and omega 3 (shellfish: crab and periwinkle) [32]. To obtain relevant bioaccessibility data, the samples were selected for their As_i, MA and DMA [10, 32] content. The TDS samples were composed of up to 15 sub-samples and prepared as consumed, whereas the Calipso samples were composed of up to five sub-samples and not cooked. Thirty seafood samples were analysed for total As bioaccessibility: five different samples of mussel, three of scallop, six of shrimp, one of crab (white meat only), two of periwinkle, three of saithe, three of salmon, three of smoked salmon, two of tuna and two of canned tuna. Of these samples, only two each of the mussel, shrimp, periwinkle, salmon and smoked salmon samples, and one each of the scallop, crab, saithe, tuna and canned tuna samples were also analysed for arsenic speciation.

Analytical process

The whole analytical process is summarised in Fig. 1. The proposed leaching method may first be used to determine total bioaccessible arsenic, then the different arsenic species released during the consecutive leaching stages. Finally, the remaining residue was digested and analysed to check mass balance.

Continuous online leaching procedure The method was modified from the previous work of Dufailly et al. [25]. Artificial digestive reagents—saliva, gastric juice and intestinal juice—were successively pumped by an L-6200A pump (i.e. a high-pressure liquid chromatography (HPLC) pump instead of a peristaltic pump) at 1 mL/min through a 5-cm long, 3/16-in. OD stainless steel column (instead of a PTFE tube) packed with about 100 mg of solid sample, which was connected directly to the nebuliser of the ICP-MS instrument to assess total bioaccessible As in real time. A stainless steel column was used, because empty columns are commercially available and they can withstand the high pressure of the HPLC system, which was used to overcome the back-pressure problems experienced with low-pressure systems. The leachate, which was diluted twofold by merging an equal flow rate of water through a Y-piece, was simultaneously collected from the spray chamber drain for subsequent speciation analysis (Fig. 1). Artificial digestive reagents were maintained at 37 °C in a thermostated water bath. Leaching times were initially selected according to human physiology [18]—5 min for saliva, and 60 min each for gastric and intestinal juices. The latter two times were then reduced to 15 min each, as no arsenic was released after this period. Quantification was performed by external calibration with an injection of standard solutions through a 100-μL injection loop (Vici, Interchim, Montluçon, France)

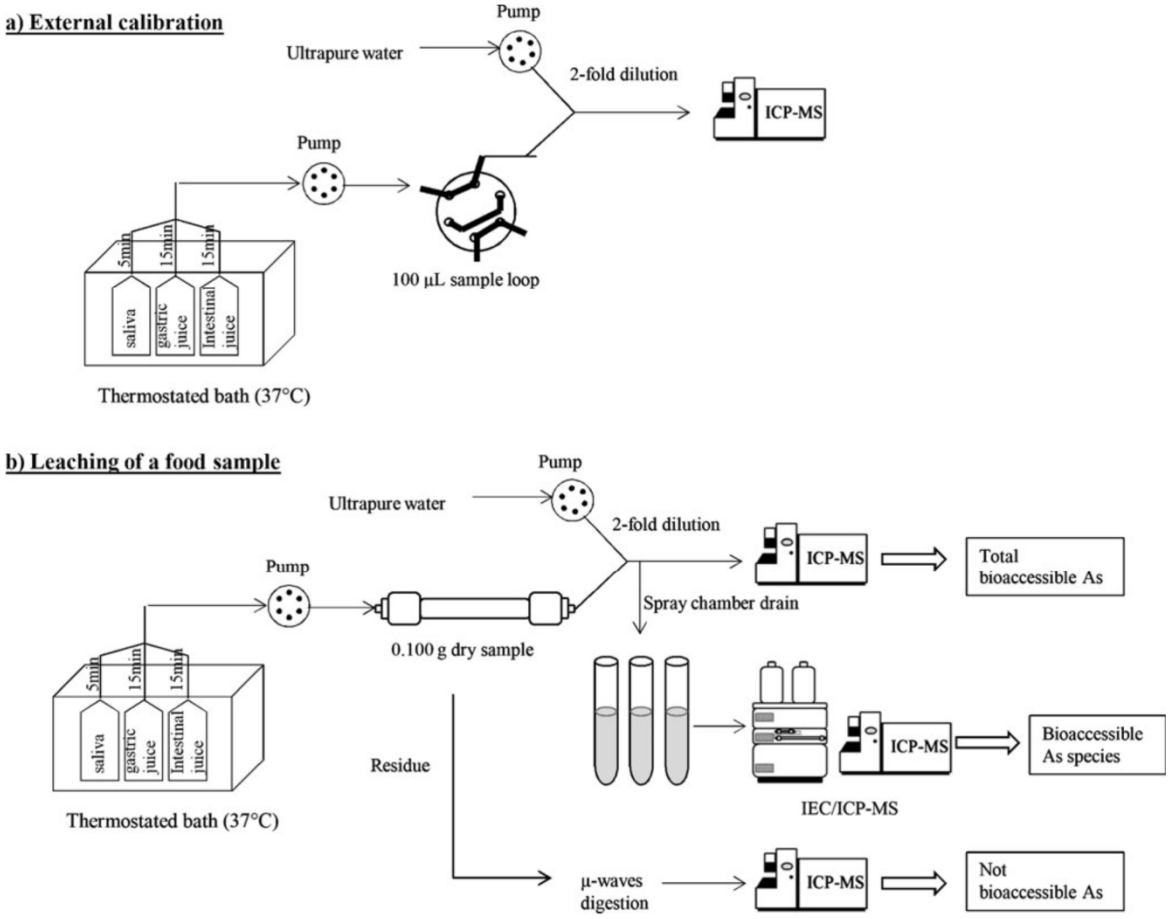


Fig. 1 Schematic diagram of the procedure for bioaccessibility assessment

which replaced the sample column in the set-up of Fig. 1. The nebuliser gas flow rate was decreased to 0.82 L/min in order to reduce analytical bias arising from polyatomic interferences such as $ArCl^+$ [33].

Speciation analysis The twofold-diluted leachates collected from the spray chamber drain (Fig. 1) were analysed by ion-exchange chromatography (IEC) with ICP-MS detection, using a previously developed speciation analysis method [10]. The seven As species were separated in a single chromatographic run using a nitric acid gradient between pH 3.4 and pH 1.8 with 1% of methanol in the mobile phase. A four-point external calibration was carried out with standard solutions of the respective species, prepared daily in each artificial digestive reagent.

Digestion of residues In order to check for mass balance, residues from the column were collected and microwave-digested with 3 mL of concentrated nitric acid prior to analysis by ICP-MS according to a validated and accredited in-house method [34].

Calculations

Concentrations are expressed in milligrams of elements per kilogram (mg/kg) of dry material. The percentage of bioaccessibility was defined as the proportion of total arsenic available for absorption, and was calculated as $X_l/X_t \times 100$ (where X_l is the total amount of As leached (saliva + gastric juice + intestinal juice), and X_t the total amount of As present in the sample). The signal was integrated throughout the leaching window and the blank concentrations subtracted from the leachate concentrations. The limit of quantification (LOQ) of As in leachates was as defined previously [10], but corrected for sample weight (0.100 g of dry mass) and leachate volume (5 mL for saliva and 15 mL for gastric juice). The LOQ was 0.010 and 0.040 mg/kg in saliva and gastric juice respectively, i.e. similar to previously reported on the same ICP-MS

instrument (0.007–0.020 mg/kg) [25]. Data were subjected to linear regression and statistical analyses using the Data Analysis function in Microsoft Office Excel 2007. Z scores were used to assess trueness. A Z score expresses the difference between the laboratory mean value and the target value. It was calculated as $Z = (X_s - X_c)/(s_R/\sqrt{n})$ where X_s is the mass balance result, X_c the certified value, s_R the reproducibility standard deviation and n the number of independent replicates.

Quality assurance

Following the proposed leaching procedure, samples were analysed in batches along with internal quality control solutions including calibration standard solutions to monitor linearity, a blank (obtained by leaching a mini-column containing no sample) to monitor for possible cross-contamination, a standard solution after every two samples and at the end of the sequence to monitor instrument drift, and a CRM to verify the method's trueness. As this leaching method has never been applied to such a variety of food matrices, a high frequency of standard solution analysis was selected to enable straightforward drift correction if needed. All TDS and Calipso samples were analysed in duplicate.

Results and discussion

Optimisation of the online coupled leaching procedure

The continuous leaching method was improved compared to the previous work of Dufailly et al. [25], where a powdered sample was packed into a PTFE tube between two quartz wool plugs and the digestive reagents introduced into the column using a peristaltic pump. The back-pressure of the column caused frequent leakage at the tube joints. The process also had to be repeated, the first run to directly determine total bioaccessible As, and the second for speciation analysis of the leachate.

In this study, the PTFE tube was replaced by an empty stainless steel chromatography column equipped with screw connections, and the digestive reagents were introduced using a liquid chromatography pump, as it overcomes back-pressure problems. This combination allows an increase in sample weight, and makes the method more stable, repeatable and therefore more robust. Regarding digestive fluids, the saliva composition was modified according to the protocol of Oomen et al. [30] so as to include enzyme effects. Finally, the leachates were diluted twofold online and collected from the drain of the spray chamber for speciation analysis (Fig. 1), resulting not only in important time savings but also a better comparison between total As and As species bioaccessibilities.

Total arsenic bioaccessibility

Figure 2 shows the leaching profiles for four CRMs and a blank sample with artificial saliva, gastric and intestinal juices, respectively. For the four CRMs, As was mostly released by saliva and gastric juice. The same behaviour was observed in several real samples (data not shown). Because leaching with intestinal juice often led to clogging of the column due to enzymatic action on the food, and that the amount of arsenic released by this reagent was very small compared to that released by the other two reagents (especially saliva), this step was removed. In many cases, removal was fully justified (see Table 3) as most of the As was released by saliva and gastric juice. Indeed, for all the samples studied, As was mobilised rapidly, i.e. within a minute of leaching with saliva, which suggests that this element is adsorbed on the sample or weakly bound to it. A similarly high efficiency was reported for the leaching of As from rice by saliva [35].

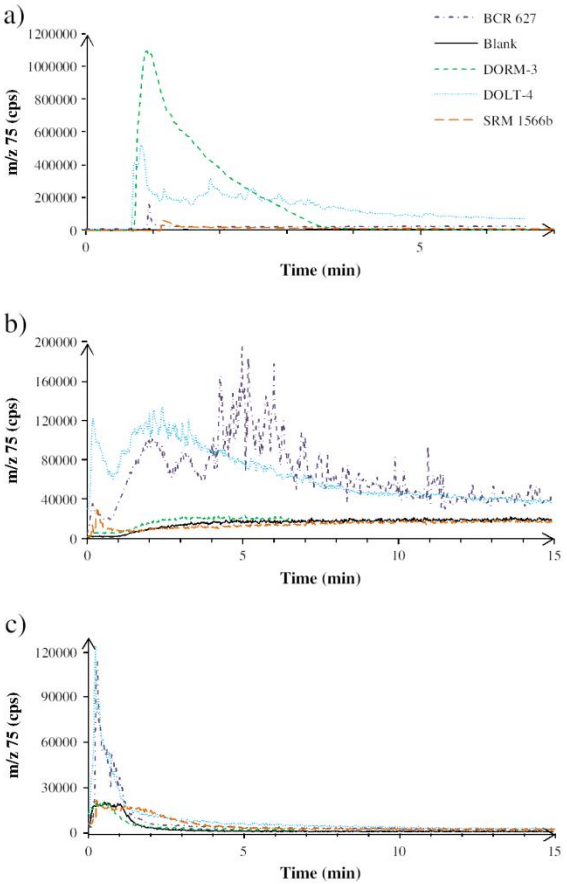


Fig. 2 Arsenic mobilisation profiles during leaching by saliva (**a**), gastric juice (**b**), and intestinal juice (**c**) in four CRMs and a blank

Calibration curves had correlation coefficients r^2>0.995 (five points) for total As (as well as for all As species). The mean concentration of the drift monitoring solution always lay between 70% and 130% of the expected concentration. Instrumental drift was therefore considered acceptable, making the entire analytical sequence valid. There were no outliers for blank controls.

Table 2 presents the bioaccessibility results obtained for total As in four CRMs. Based on the mass balance calculated as the sum of the observed total bioaccessible As and total As remaining in the residue, all Z scores observed vs the certified value of the four CRMs were acceptable (−3<Z<+3), indicating that trueness was satisfactory.

The bioaccessibility figures of total As in DORM-3 (fish protein) and BCR 627 (tuna fish; 55% and 46%, respectively) in Table 2 are consistent with those previously reported by Dufailly et al. [25] (61% and 42%, respectively). In DOLT-4 (dogfish liver) and SRM 1566b (oyster tissue), the bioaccessibility of total As was only 33% and 29% respectively. Total As bioaccessibility was also assessed on real samples of fish and shellfish (Table 3). No data are reported for oyster because of the clogging problems experienced with this slimy matrix. The calculated mass balance is always within the confidence interval (CV_R= 10%; p=95%) of the total As value. Total bioaccessibility was greater than 50% in all cases (53–83% for fish and 58–117% for shellfish). To the best of the authors' knowledge, there are only a few studies in which the bioaccessibility of total As was assessed in seafood [20, 21, 25–28]. None but Dufailly et al. [25] included the saliva step, but they only looked at CRMs. Comparisons with other work can therefore only be based on total arsenic bioaccessibility, irrespective of the different leaching steps used in this work. These results are in good agreement with the literature, 77–92% in uncontaminated clams [27]; 39–69% in crayfish [28]; 54% in shrimp (vs 67–72% in this study) [21]; as well as 98% and 102% in raw and cooked sole, respectively [26]. Different matrices behaved differently. The highest bioaccessibility values were observed in scallop and crab (117% and 98%, respectively), whereas in canned tuna, salmon or periwinkle, bioaccessibility lay between 53% and 65%. Even though most studies did not consider the oral cavity, Fig. 3 shows that the As released by saliva should not be neglected since it represents at least half of the bioaccessible As in all the CRMs and real samples studied. Moreover, in fish protein (DORM-3), mussel, shrimp and saithe, the fraction released by gastric juice was less than 5% of the total As concentration, and no As was released by gastric juice in scallop and canned tuna (Fig. 3). The difference between tuna and canned tuna arises from the fact that a large proportion of the major species, AsB, has already migrated into the brine of canned tuna, and the remaining AsB is readily mobilised by saliva.

Bioaccessibility of arsenic species

Salivary and gastric leachates were analysed to determine the As species they contained using a previously described IEC/ICP-MS method [10]. Concentrations were compared with those obtained after microwave-assisted extraction (MAE) with water [10]. The amount of species released was reported only when the concentration in the original sample was quantified. The results obtained in CRMs and in real samples are summarised in Tables 4 and 5, respectively and a chromatogram obtained for SRM 1566b upon leaching with saliva and gastric juice is presented in Fig. 4. Although seven As species were determined by the speciation analysis method, the results for TMAO and AsC were not presented because their concentration was generally lower than the LOQ, except for one mussel sample (0.284 mg/kg for TMAO and 0.121 mg/kg for AsC) and the scallop sample (0.677 mg/kg for TMAO and <0.080 mg/kg for AsC) [10]. Unknown peaks were also included in the sum of species used to calculate the percentage of total bioaccessible arsenic species presented in Tables 4 and 5.

Concerning CRM results, the bioaccessibility of As_i in DORM-3 and DOLT-4 was very low (less than 6%), but higher in BCR 627 and in SRM 1566b (25% and 14%, respectively). The amounts of As_i released from DORM-3 and CRM 627 (0.019 and 0.027 mg/kg, respectively) concord with the values previously reported by Dufailly et al.

Table 2 Internal quality control for bioaccessibility results (in milligrams per kilogram dry mass)

Sample	Reference value[a]	Total bioaccessible[b]	Residue[b]	Mass balance[b]	Z score	% Bioaccessible
DORM-3 (n=3)	6.88±0.30	3.78±0.44	2.00±0.23	5.77±0.49	−1.6	55
DOLT-4 (n=2)	9.66±0.62	3.19±0.45	4.31±0.61	7.50±0.76	−2.2	33
BCR 627 (n=2)	4.8±0.3	2.2±0.3	2.1±0.1	4.3±0.4	−1.1	46
SRM 1566b (n=3)	7.65±0.65	2.19±0.22	4.60±0.46	6.80±0.51	−1.1	29

[a] Reference value±confidence interval of the CRM

[b] Meanvalue ± $U = k \times \frac{CV_R \times M}{100 \times \sqrt{n}}$ with k=2; CV_R=10%; and M = mean value

Table 3 Bioaccessibility results for total arsenic in real samples (mg/kg dry mass)

Sample	Total As[a]	Total bioaccessible[b]	Residue[b]	Mass Balance[b]	% Mass balance[c]	% Bioaccessible[d]
Mussel	9.63±1.93	8.05±1.14	1.69±0.24	9.74±1.16	101	84
	11.4±2.3	7.42±1.05	2.14±0.30	9.55±1.09	84	65
Scallop	8.19±1.64	9.56±1.35	0.528±0.075	10.1±1.35	123	117
Shrimp	7.52±1.50	5.42±0.77	0.163±0.023	5.58±0.77	74	72
	4.75±0.95	3.20±0.45	0.509±0.072	3.71±0.46	78	67
Crab	43.2±6.1	42.3±6.0	1.91±0.27	44.2±6.0	102	98
Periwinkle	20.1±2.8	11.7±1.7	8.38±1.19	20.1±2.0	100	58
	30.6±4.3	21.7±3.1	11.6±1.6	33.4±3.5	109	71
Saithe	7.23±1.45	5.97±0.84	0.130±0.018	6.10±0.84	84	83
Salmon	3.72±0.74	1.96±0.28	0.677±0.096	2.63±0.29	71	53
	2.43±0.49	1.82±0.26	0.076±0.011	1.90±0.26	78	75
Smoked salmon	3.79±0.76	2.30±0.33	0.493±0.070	2.79±0.33	74	61
	3.95±0.79	3.06±0.43	0.358±0.051	3.42±0.44	87	77
Tuna	7.32±1.46	5.92±0.84	0.637±0.090	6.56±0.84	90	81
Canned tuna	2.31±0.46	1.50±0.21	0.248±0.035	1.75±0.21	76	65

[a] Mean value ± U (k=2; CV_R=10%; n=1)

[b] Mean value ± U (k=2; CV_R=10%; n=2)

[c] Total As/mass balance

[d] Bioaccessibility of total arsenic

[25] (0.027 and 0.020 mg/kg, respectively). In shellfish, the bioaccessibility of As_i ranged from 7% to 66% except in scallop (188%), where the bioaccessibility of As_i appears to be overestimated for an unknown reason. The lowest As_i bioaccessibility figures were found in the two periwinkle samples (7% and 11%). In other samples, bioaccessibilities were higher (30–66%). Arkasuwan et al. [21] reported lower bioaccessibilities in shrimps without or with the addition of fruit juices and ascorbic acid (1% or 2%). Regarding the contribution of As_i compared to total As, As_i accounted for 1–6% of total bioaccessible As, agreeing with Koch et al. [27] in uncontaminated clams (6–7%). The high bioaccessibilities observed for As(III) and As(V) in shrimp, mussel, crab and scallop are in good agreement with the results of Williams et al. [28], who showed that As_i in the muscle of yabbies is highly bioaccessible during human digestion (12–78%). Nevertheless, it should also be noted that, even if high amounts of As(III) were found in the two periwinkle samples, the bioaccessibility of As(III) was very low (3% and 1% respectively).

In fish, the bioaccessibility of As_i was quantified only as As(III) in saithe (31%) and smoked salmon (68%). To the authors' knowledge, no bioaccessibility data for As_i in fish is available.

The bioaccessibility of non-toxic AsB ranged from 52% to 64% in the four CRMs. The amount of bioaccessible AsB accounted for more than 60% of the total bioaccessible As, except in SRM 1566b where it was lower (26%). In real

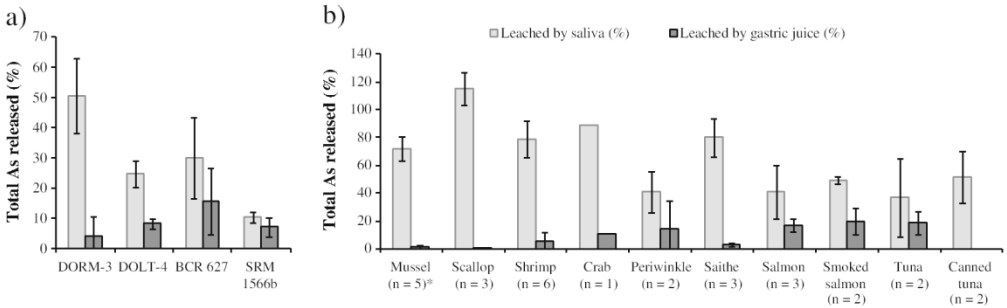


Fig. 3 Mean (of three replicates) percentage of total arsenic released by saliva (*light grey*) and gastric juice (*dark grey*) from CRMs (**a**) and real samples (**b**). *Error bars* denote standard deviation. *n number of different samples analysed

Table 4 Initial and bioaccessible contents for arsenic species in CRMs (mg/kg)

CRM		As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	As_i[a]	% Total bioaccessible[b]
DORM-3	Initial[c]	0.134±0.008	0.071±0.003	0.423±0.026	0.263±0.009	3.88±0.16	0.397±0.012	38
	Bioaccessible[d]	<LOQ[e]	0.046±0.007	0.293±0.066	0.019±0.002	2.22±0.35	0.019±0.002	
DOLT-4	Initial	0.253±0.019	0.073±0.003	0.270±0.020	0.134±0.006	4.59±0.23	0.387±0.019	34
	Bioaccessible	<LOQ	0.104±0.021	0.228±0.073	0.022±0.004	2.93±0.65	0.022±0.004	
BCR 627	Initial	0.068±0.003	0.045±0.001	0.150±0.045[f]	0.041±0.001	3.9±1.2[f]	0.109±0.003	55
	Bioaccessible	0.015±0.003	0.018±0.003	0.144±0.023	0.020±0.002	2.36±0.26	0.035±0.004	
SRM 1566b	Initial	0.357±0.057	0.649±0.065	0.771±0.123	0.427±0.038	1.11±0.12	0.784±0.069	15
	Bioaccessible	0.074±0.024	0.279±0.056	0.169±0.054	0.038±0.007	0.578±0.127	0.112±0.025	

[a] Sum of As(III) and As(V)

[b] Sum of bioaccessible arsenic species/sum of arsenic species determined by IEC/ICP-MS after MAE expressed as a percentage

[c] Values determined by IEC/ICP-MS after MAE ± U (k=2; CV_R=10%; n>4)

[d] Values determined by IEC/ICP-MS after continuous leaching ± U (k=2; CV_R=10%; n=1–4)

[e] <LOQ in saliva (0.010 mg/kg) and <LOQ in gastric juice (0.040 mg/kg)

[f] Certified values ± confidence interval (k=2, CV_R=10%)

samples, AsB bioaccessibility ranged from 66% to 134% in shellfish and from 64% to 103% in fish. These high percentages agree with the results of Laparra et al. [26] (67% in DORM-2, 106–114% in sole, and 100–124% in halibut).

With regard to methylated species, the bioaccessibilities in CRMs ranged from 40% in BCR 627 to 142% in DOLT-4 for MA and from 22% in SRM 1566b to 96% in BCR 627 for DMA. The amount of DMA species measured in the bioaccessible fraction of DORM-3 is in good agreement with that reported by Dufailly et al. [25]. In some real samples, the high bioaccessible values observed for MA and DMA (up to four times higher than that measured in the water extract from MAE) suggest that methylated species are overestimated under simulated digestion conditions for a yet to be determined reason, such as an unknown matrix effect, which would require the method of standard additions, or the MAE method did not quantitatively extract these species. This will be the subject of a future study. In any case, this discrepancy between the bioaccessible and the extracted content has previously been observed for MA in DORM-2 and sole by Laparra et al. [26]. The effect of saliva and gastric juice on the speciation of As was studied by Laparra et al. [26] and verified in this work (data not shown). The results indicated no degradation or methylation of other detected species to generate MA and DMA. Laparra et al. [26] suggested that a methanol/water extraction mixture may not be quantitative for MA, even if MA added prior to extraction with methanol/water is quantitatively recovered. This is because, when spiking, the added species is not bound to the sample matrix in the same way as that naturally present. Nonetheless, the analysis of BCR 627 with a certified value for DMA previously showed that the extraction of this species was complete with our MAE method [10]. However, this extraction efficiency might be matrix-dependent but the specificity of the method was previously assessed on spiked real samples (oyster, mussel, scallop, shrimp, salmon and tuna) and considered as acceptable [10]. A recent study indicated that there may be some biotransformation of arsenic species in the stomach's acidic conditions [36]. Moreover, a study of the chemical stability of arsenosugars in simulated gastric juice and acidic environments [37] showed that the degradation of arsenosugars produced no detectable DMA, but a non-native arsenic species. Nevertheless, Palacios et al. [38] studied arsenic stability in deionised water and observed that DMA concentration increased from the first day at ambient temperature, while AsB slowly disappeared, indicating that AsB could be transformed into DMA. It would be beneficial to use ESI-MS/MS to confirm the structural identity of the detected species.

Finally, the total bioaccessibilities calculated from the sum of As species ranged from 15% to 55% in CRMs (Table 4), from 39% to 86% in shellfish and from 49% to 65% in fish (Table 5). These results are generally in good agreement with those calculated for total As (Tables 2 and 3) with a difference generally less than 25%. The higher differences observed in shellfish (up to 33%) could be explained by the presence of arsenosugars not determined by this method, arsenosugars being highly bioaccessible [29].

Conclusion

The combination of a simple and rapid continuous leaching method coupled with ICP-MS was successfully employed to assess the maximum bioaccessibility of total As in both CRMs and real seafood products. Moreover, the bioaccessibility of arsenic species was also evaluated by IEC/ICP-MS.

Table 5 Initial and bioaccessible contents for arsenic species in real samples (mg/kg dry mass)

Sample		As(III)	MA	DMA	As(V)	AsB	As_i[a]	% Total bioaccessible[b]
Mussel	Initial[c]	0.928±0.171	0.278±0.032	0.085±0.016	0.468±0.049	4.27±0.54	1.40±0.18	55
	Bioaccessible[d]	0.052±0.012	0.822±0.116	0.302±0.068	0.400±0.051	3.25±0.51	0.452±0.052	
	Initial	0.220±0.041	0.472±0.054	0.192±0.036	0.362±0.038	4.82±0.61	0.582±0.055	39
	Bioaccessible	0.064±0.015	0.536±0.076	0.320±0.073	0.071±0.009	3.17±0.49	0.135±0.017	
Scallop	Initial	0.102±0.019	<0.020	<0.020	0.030±0.003	4.90±0.62	0.132±0.019	84
	Bioaccessible	0.158±0.036	–[e]	–	0.088±0.011	6.54±1.02	0.247±0.038	
Shrimp	Initial	0.086±0.016	<0.020	<0.020	0.036±0.004	5.68±0.72	0.121±0.016	57
	Bioaccessible	0.050±0.011	–	–	0.031±0.004	4.15±0.65	0.081±0.012	
	Initial	0.123±0.020	<0.020	<0.020	0.036±0.004	3.54±0.45	0.160±0.023	54
	Bioaccessible	0.048±0.011	–	–	< LOQ[f]	2.33±0.36	0.048±0.011	
Crab	Initial	1.07±0.24	0.393±0.056	0.210±0.048	0.548±0.070	34.7±5.4	1.62±0.25	86
	Bioaccessible	0.344±0.078	0.776±0.110	0.138±0.031	0.151±0.019	35.7±5.5	0.495±0.080	
Periwinkle	Initial	3.57±0.81	0.369±0.052	0.199±0.045	1.71±0.22	5.49±0.85	5.29±0.84	48
	Bioaccessible	0.118±0.038	1.44±0.29	0.083±0.027	0.474±0.085	5.95±1.31	0.591±0.093	
	Initial	6.11±1.38	0.217±0.031	0.340±0.077	0.713±0.091	13.2±2.1	6.82±1.38	43
	Bioaccessible	0.041±0.013	0.217±0.043	0.180±0.058	0.409±0.074	10.2±2.2	0.450±0.075	
Saithe	Initial	0.036±0.007	<0.020	0.033±0.006	0.025±0.003	4.47±0.57	0.061±0.007	65
	Bioaccessible	0.019±0.004	–	0.066±0.015	< LOQ	4.62±0.72	0.019±0.004	
Salmon	Initial	<0.020	<0.020	0.045±0.008	0.024±0.003	2.09±0.26	0.024±0.003	55
	Bioaccessible	–	–	0.095±0.021	< LOQ	1.90±0.30	< LOQ	
	Initial	<0.020	<0.020	0.027±0.005	0.025±0.003	1.88±0.24	0.025±0.003	64
	Bioaccessible	–	–	0.114±0.026	< LOQ	1.41±0.22	–	
Smoked salmon	Initial	<0.020	<0.020	0.070±0.013	<0.020	3.03±0.39	–	64
	Bioaccessible	–	–	0.121±0.027	–	2.30±0.36	–	
	Initial	0.028±0.005	<0.020	0.037±0.007	<0.020	3.01±0.38	0.028±0.005	57
	Bioaccessible	0.019±0.004	–	0.085±0.019	–	2.15±0.33	0.019±0.004	
Tuna	Initial	<0.020	<0.020	0.053±0.010	<0.020	5.53±0.70	–	49
	Bioaccessible	–	–	0.042±0.009	–	3.53±0.55	–	
Canned tuna	Initial	<0.020	<0.020	0.034±0.006	<0.020	1.48±0.19	–	51
	Bioaccessible	–	–	0.041±0.009	–	1.06±0.16	–	

[a] Sum of As(III) and As(V)

[b] Sum of bioaccessible arsenic species/sum of arsenic species determined by IEC/ICP-MS after MAE expressed as a percentage

[c] Values determined by IEC/ICP-MS after MAE ± U (k=2; CV_R=10%; n=2–3)

[d] Values determined by IEC/ICP-MS after continuous leaching ± U (k=2; CV_R=10%; n=1)

[e] Not determined

[f] <LOQ in saliva (0.010 mg/kg) and <LOQ in gastric juice (0.040 mg/kg)

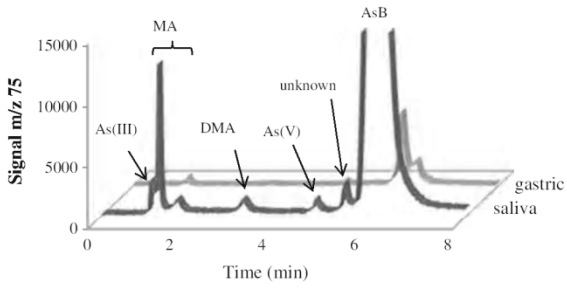


Fig. 4 Chromatograms obtained for SRM 1566b upon leaching with saliva and gastric juice

No difference was noted between fish and shellfish in terms of total As bioaccessibility. Saliva was shown to play an important role in the mobilisation of As during digestion. The bioaccessibility of the most toxic inorganic forms ranged from 7% to 66% in shellfish (except in scallop), and was found to be 31% and 68% in two fish samples. The major organic form AsB and the methylated forms were highly bioaccessible (64–134% for AsB and more than 78% for MA and DMA). Although a small amount of As was released by intestinal juice in most seafood cases, the clogging problem encountered during this step may be a limitation for other sample types. It would also be advantageous to use ESI-MS/MS to confirm the structural identity of the overestimated DMA and MA species.

Nonetheless, this online coupled leaching procedure is suitable for the simultaneous determination of the bioaccessibility of a wide range of elements in seafood and other types of samples. These additional data are being validated and will be published separately.

Acknowledgment The authors wish to thank J.C. Leblanc (ANSES DER) for allowing us to use TDS2 and Calipso samples.

References

1. ATDSR (2007) toxicological profile for arsenic
2. Nam S-H, Oh H-J, Min H-S, Lee J-H (2010) A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC-ICP-MS. Microchem J 95(1):20–24
3. Reyes LH, Mar JLG, Rahman GMM, Seybert B, Fahrenholz T, Kingston HMS (2009) Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. Talanta 78(3):983–990
4. Tseng WP, Chu HM, How SW, Fong JM, Lin CS, Yeh S (1968) Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. J Natl Cancer Inst 40(3):453–463
5. Le XC, Lu X, Li XF (2004) Arsenic speciation. Anal Chem 76 (1):26A–33A
6. Mandal BK, Suzuki KT (2002) Arsenic round the world: a review. Talanta 58(1):201–235
7. Brown JL, Kitchin KT, George M (1997) Dimethylarsinic acid treatment alters six different rat biochemical parameters: relevance to arsenic carcinogenesis. Teratog Carcinog Mutagen 17(2):71–84
8. Moreda-Pineiro A, Pena-Vasquez E, Hermelo-Herbello P, Bermejo-Barrera P, Moreda-Pineiro J, Alonso-Rodriguez E, Muniategui-Lorenzo S, Lopez-Mahia P, Prada-Rodriguez D (2008) Matrix solid-phase dispersion as a sample pretreatment for the speciation of arsenic in seafood products. Anal Chem 80 (23):9272–9278
9. Sloth JJ, Julshamn K (2008) Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (*Mytilus edulis* L.) from Norwegian fiords: revelation of unusual high levels of inorganic arsenic. J Agric Food Chem 56(4):1269–1273
10. Leufroy A, Noël L, Dufailly V, Beauchemin D, Guérin T (2011) Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: method validation and occurrence data. Talanta 83(3):770–779
11. Cao X, Hao C, Wang G, Yang H, Chen D, Wang X (2009) Sequential extraction combined with HPLC-ICP-MS for As speciation in dry seafood products. Food Chem 113(2):720–726
12. Caussy D (2003) Case studies of the impact of understanding bioavailability: arsenic. Ecotoxicol Environ Saf 56(1):164–173
13. Caussy D, Gochfeld M, Gurzau E, Neagu C, Ruedel H (2003) Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. Ecotoxicol Environ Saf 56(1):45–51
14. Versantvoort CHM, Oomen AG, Van De Kamp E, Rompelberg CJM, Sips AJAM (2005) Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. Food Chem Toxicol 43(1):31–40
15. Laparra JM, Velez D, Montoro R, Barbera R, Farre R (2003) Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. J Agric Food Chem 51(20):6080–6085
16. Moreda-Pineiro J, Moreda-Pineiro A, Romaris-Hortas V, Moscoso-Perez C, Lopez-Mahia P, Muniategui-Lorenzo S, Bermejo-Barrera P, Prada-Rodriguez D (2011) In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. TrAC Trends Anal Chem 30(2):324–345
17. Ruby MV, Davis A, Schoof R, Eberle S, Sellstone CM (1996) Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. Environ Sci Technol 30(2):422–430
18. Intawongse M, Dean JR (2006) In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. TrAC Trends Anal Chem 25(9):876–886
19. Minekus M, Smeets-Peeters M, Havenaar R, Bernalier A, Fonty G, Marol-Bonnin S, Alric M, Marteau P, Huis In't Veld JHJ (1999) A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. Appl Microbiol Biotechnol 53(1):108–114
20. Torres-Escribano S, Denis S, Blanquet-Diot S, Calatayud M, Barrios L, Velez D, Alric M, Montoro R (2011) Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). Sci Total Environ 409(3):604–611
21. Arkasuwan C, Siripinyanond A, Shiowatana J (2011) Inductively coupled plasma mass spectrometry with a continuous-flow dialysis simulated gastrointestinal digestion for study of arsenic bioaccessibility in shrimp. International Journal of Mass Spectrometry
22. Judprasong K, Ornthai M, Siripinyanond A, Shiowatana J (2005) A continuous-flow dialysis system with inductively coupled plasma optical emission spectrometry for in vitro estimation of bioavailability. J Anal At Spectrom 20(11):1191–1196
23. Shiowatana J, Kitthikhun W, Sottimai U, Promchan J, Kunajiraporn K (2006) Dynamic continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for in vitro estimation of mineral bioavailability of food. Talanta 68(3):549–557
24. Chu M, Beauchemin D (2004) Simple method to assess the maximum bio-accessibility of elements from food using flow injection and inductively coupled plasma mass spectrometry. J Anal At Spectrom 19(9):1213–1216
25. Dufailly V, Guerin T, Noel L, Fremy JM, Beauchemin D (2008) A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. J Anal At Spectrom 23(9):1263–1268
26. Laparra JM, Velez D, Barbera R, Montoro R, Farre R (2007) Bioaccessibility and transport by Caco-2 cells of organoarsenical species present in seafood. J Agric Food Chem 55(14):5892–5897
27. Koch I, McPherson K, Smith P, Easton L, Doe KG, Reimer KJ (2007) Arsenic bioaccessibility and speciation in clams and seaweed from a contaminated marine environment. Mar Pollut Bull 54(5):586–594
28. Williams G, West JM, Koch I, Reimer KJ, Snow ET (2009) Arsenic speciation in the freshwater crayfish, Cherax destructor Clark. Sci Total Environ 407(8):2650–2658
29. Almela C, Laparra JM, Velez D, Barbera R, Farre R, Montoro R (2005) Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: characterization and bioaccessibility. J Agric Food Chem 53(18):7344–7351
30. Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Sips AJAM (2003) Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. Arch Environ Contam Toxicol 44(3):281–287
31. 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 A 26(5):623–639
32. Leblanc JC, Sirot V, Volatier JL, Bemrah-Aouachria N (2006) CALIPSO—Fish and seafood consumption study and biomarker of exposure to trace elements, pollutants and omega 3. AFSSA
33. Dufailly V, Noël L, Guérin T (2008) Optimisation and critical evaluation of a collision cell technology ICP-MS system for the

determination of arsenic in foodstuffs of animal origin. Anal Chim Acta 611(2):134–142
34. Noel 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
35. Horner NS, Beauchemin D (2012) A simple method using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in rice. Anal Chim Acta(0). doi:10.1016/j.aca.2011.12.049
36. Coutros K Estimating bioavailability of arsenicals in dietary and composite diet samples via a synthetic stomach extraction. US-EPA. (http://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?dirEntryId=18325). Accessed 25/11/2011
37. Gamble BM, Gallagher PA, Shoemaker JA, Wei X, Schwegel CA, Creed JT (2002) An investigation of the chemical stability of arsenosugars in simulated gastric juice and acidic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. Analyst 127 (6):781–785
38. Palacios MA, Gomez M, Camara C, Lopez MA (1997) Stability studies of arsenate, monomethylarsonate, dimethylarsinate, arsenobetaine and arsenocholine in deionized water, urine and clean-up dry residue from urine samples and determation by liquid chromatography with microwave-assisted oxidation-hydride generation atomic absorption spectrometric detection. Anal Chim Acta 340 (1–3):209–220

III. Application de la lixiviation en continu à d'autres éléments d'intérêt

III.1. Introduction

Peu de travaux ont évalué simultanément la bioaccessibilité sur plusieurs éléments (cf Table 5 Article III). Compte tenu de la méthodologie mise en place pour l'étude de la bioaccessibilité de l'arsenic en total (Figure 12) et de la capacité d'analyse multiélémentaire qu'offre l'ICP-MS, la méthode de lixiviation en ligne décrite précédemment a aussi été testée afin d'estimer la bioaccessibilité d'autres éléments traces sur les mêmes échantillons. Les éléments d'intérêt retenus sont les mêmes que ceux préalablement étudiés dans le cadre des études EAT 2 et CALIPSO (Guérin *et al.,* 2011; Millour *et al.,* 2011a; Noël *et al.,* 2012) et pour lesquels la méthode a été validée et accréditée COFRAC (Millour *et al.,* 2010; Millour *et al.,* 2011b), à savoir :

Aluminium (Al), Antimoine (Sb), Argent (Ag), Baryum (Ba), Cadmium (Cd), Chrome (Cr), Cobalt (Co), Cuivre (Cu), Étain (Sn), Gallium (Ga), Germanium (Ge), Lithium (Li), Manganèse (Mn), Mercure (Hg), Molybdène (Mo), Nickel (Ni), Plomb (Pb), Sélénium (Se), Strontium (Sr), Tellure (Te), Vanadium (V) et Zinc (Zn).

A partir de cette liste, et après plusieurs essais préliminaires, plusieurs éléments ont été retirés de cette étude multiélémentaire en raison soit :

- D'une trop faible concentration en certains éléments (Ag, Ba, Co, Ga, Ge, Te, Sn, Sb et Sr) dans les échantillons considérés, rendant inutile l'estimation de leur bioaccessibilité ;
- de l'obligation d'utiliser une méthode ICP-MS plus spécifique avec une chambre de collision / réaction (CCT) pour s'affranchir ou atténuer certaines interférences polyatomiques présentes en mode standard notamment pour le sélénium, le chrome et le fer ;
- D'une libération de certains éléments présents dans la colonne en acier inoxydable utilisée (pouvant contenir environ 18 % de Cr, 13 % de Ni et 2.5 % de Mo), rendant l'emploi de ce protocole inadaptée pour ces trois éléments.

Ainsi, huit éléments ont été au final retenus, dont quatre contaminants (Al, Cd, Hg, et Pb) et quatre éléments essentiels (V, Mn, Cu, et Zn) afin d'estimer leur bioaccessibilité sur dix matrices différentes issues des études Calipso et EAT 2. Cela représente déjà un travail conséquent en termes de traitement et d'exploitation des données.

III.2. Résultats expérimentaux (Article III)

Les matériels et méthodes ainsi que les résultats sont présentés et discutés dans l'Article III actuellement paru dans le journal « Food Chemistry ».

A travers l'analyse des différentes matrices, il est possible d'obtenir des informations sur le comportement de chaque élément en termes de bioaccessibilité. Ainsi, l'aluminium est faiblement bioaccessible dans tous les échantillons analysés (< 7 % de l'Al total), sauf dans l'araignée de mer (27 %). Le cadmium semble lui être fortement bioaccessible (> 53 % et jusqu'à 100 % du Cd total présent dans les moules et crevettes) et libéré principalement par le suc gastrique, sauf pour l'araignée de mer. La bioaccessibilité du plomb semble plus variable d'une matrice à l'autre. Elle est plus faible dans les crevettes (6 %), et supérieure à 35 % dans les autres matrices, avec un maximum de 75% obtenu dans le tourteau. De plus, dans la moule, le tourteau et le bigorneau, il est libéré majoritairement par le suc gastrique alors que dans le pétoncle, l'araignée de mer et la crevette, c'est la libération salivaire qui prédomine. La bioaccessibilité du mercure est également très variable selon le type de matrice (de 4 % chez la moule et la crevette à 80 % chez le tourteau) et il est principalement libéré par le suc gastrique. La bioaccessibilité du vanadium est variable selon les échantillons. Elle est très faible dans la crevette et la moule, et beaucoup plus importante dans le tourteau, le bigorneau, le colin et le saumon. Cependant, il semble qu'il soit libéré dans des proportions similaires par la salive et le suc gastrique. La bioaccessibilité du manganèse est assez forte (> 50 % dans les mollusques et crustacés, et entre 10 % et 44 % dans les poissons). Selon le type de matrice, la libération du Mn est due principalement à la salive (araignée de mer, pétoncle et thon en conserve), au suc gastrique (bigorneau, crevette), ou bien aux deux réactifs (moule, tourteau, colin, thon). Le zinc est très bioaccessible dans toutes les matrices étudiées (> 56 %), sauf le thon (24 %). Il est généralement plus bioaccessible par le suc gastrique que par la salive, sauf pour l'araignée de mer. La bioaccessibilité du cuivre est variable dans les produits de la pêche étudiés (29 – 92 %). Dans le colin, le saumon et le saumon fumé, le Cu est libéré majoritairement par le suc gastrique alors que dans les autres matrices, il est libéré autant pas la salive que par le suc gastrique.

Article III. Leufroy A., Noël L., Dufailly V., Beauchemin D., Guérin T. "Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood", Food Chemistry, 135, 623-633.

Food Chemistry 135 (2012) 623–633

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood

Axelle Leufroy [a], Laurent Noël [a], Diane Beauchemin [b], Thierry Guérin [a,*]

[a] ANSES, 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, 23 Avenue du général de Gaulle, 94706 Maisons-Alfort, France
[b] Queen's University, Department of Chemistry, 90 Bader Lane, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 November 2011
Received in revised form 15 February 2012
Accepted 12 March 2012
Available online 11 May 2012

Keywords:
Bioaccessibility
Trace elements
Seafood
ICP-MS
Continuous leaching

ABSTRACT

A continuous leaching method, coupled online with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used on seafood samples to assess the maximum bioaccessibility of several trace elements. The method indeed involves continuous leaching of the food sample by artificial saliva and gastric juice, successively, where this exposition of the food to fresh reagent drives the dissolution equilibrium to the right. Leaching with intestinal juice had to be omitted because it resulted in clogging problems. The experimental apparatus includes a mini-column of powdered sample, which is directly connected to the nebulizer of an ICP-MS instrument. The on-line approach allows a quick assessment of the maximum bioaccessibility of elements of interest by monitoring the real-time release of elements by a given reagent. The method was applied to determine the bioaccessibility of four toxic elements (Al, Cd, Hg, and Pb) and of four essential elements (V, Mn, Cu, and Zn) in certified reference materials and in actual seafood samples. In all cases, mass balance was verified by carrying out the total digestion of the remaining residue from the mini-column and the relationship between total concentration and bioaccessibility was examined.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Seafood products are considered to be an important source of minerals, high-quality proteins and unsaturated lipids (Leblanc, Sirot, Volatier, & Bemrah-Aouachria, 2006), and are thus ideal components of a healthy and balanced diet. In addition to their nutritive properties, seafoods are known to accumulate substantial concentrations of toxic metals and are therefore a major source of exposure through consumption. Risk assessment is based solely on the total concentration of contaminants in food products, despite the fact that the amount of an ingested contaminant does not reflect the extent to which it is released and absorbed in the organism. Ideally, the exposure to a contaminant through food should take into consideration its oral bioavailability, i.e., its ability to be absorbed into the systemic circulation system (Caussy, 2003; Caussy, Gochfeld, Gurzau, Neagu, & Ruedel, 2003), thus requiring complex and time-consuming *in vivo* studies involving the measurement of the amount of the contaminant in blood, urine, etc. However, oral bioavailability can only be equal to or smaller than oral bio-accessibility, which is the fraction of a compound dissolved in the gastrointestinal tract (Versantvoort, Oomen, Van De Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005). The latter can thus be used to evaluate the worst-case scenario, i.e. when all of a bioaccessible compound is bioavailable.

Several approaches have been developed to assess the bioaccessibility of trace metals (Intawongse & Dean, 2006; Laparra, Velez, Barbera, Farre, & Montoro, 2005; Laparra, Velez, Montoro, Barbera, & Farre, 2003; Laparra et al., 2005; Moreda-Pineiro et al., 2011) by mimicking the human digestive process. Most of them use batch gastro-intestinal models, involving sequential exposure of samples to artificial digestive solutions. Some dynamic models have also been developed, such as the TIM (TNO Intestinal Model) which is a multi-compartment, computer-controlled system with several computer-controlled chambers simulating the conditions of the stomach, duodenum, jejunum ileum, and large intestine (Minekus et al., 1999; Torres-Escribano, Denis et al., 2011). Another more recent model involves a continuous-flow dialysis system, which was originally developed to study the mobility and fractionation of elements in soils, in which dialysed components were continuously removed during a simulation of intestinal digestion (Judprasong, Ornthai, Siripinyanond, & Shiowatana, 2005; Shiowatana, Kitthikhun, Sottimai, Promchan, & Kunajiraporn, 2006). Moreover, many studies exclude the action of saliva, and limit their work to gastro-intestinal aspects. Chu and Beauchemin (2004) developed a continuous leaching method for zinc and lead in corn bran based on sequential leaching of food samples by artificial saliva, gastric juice and intestinal juice, successively, and this method was also

* Corresponding author. Tel.: +33 1 49 77 27 11; fax: +33 1 49 77 26 50.
E-mail address: thierry.guerin@anses.fr (T. Guérin).

0308-8146/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.119

applied to seafood for determining arsenic concentration by Dufailly, Guérin, Noël, Frémy, and Beauchemin (2008).

In this paper, the continuous leaching method was applied to seafood samples from both the second French total diet study and the Calipso study to assess the maximum oral bioaccessibility of several trace elements (Al, V, Mn, Cu, Zn, Cd, Hg, and Pb). Furthermore, the potential correlation between total concentration and bioaccessibility was examined for all these elements.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

An X-Series^{II} ICP-MS instrument (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) equipped with a concentric nebulizer and an impact bead spray chamber was used. The operating conditions are summarized in Table 1. For the continuous leaching procedure, the digestive reagents were supplied by an L-6200A pump (Merck), and data acquisition was carried out using the Time Resolved Analysis (TRA) mode of the ICP-MS software. For total analysis, the sample solutions were fed by a peristaltic pump from tubes arranged on an ASX 500 autosampler model 510 (CETAC, Omaha, Nebraska, USA). The residue was digested by means of a closed-vessel microwave digestion system (Anton-Paar, Courtaboeuf, France) equipped with 80-ml quartz vessels (80-bar operating pressure).

2.2. Chemicals

All solutions were prepared with analytical reagent-grade chemicals and ultra pure water (18 MΩcm) produced by purifying distilled water with a Milli-Q^{TM} PLUS system combined with an Elix 5 pre-system (Millipore S.A., St Quentin en Yvelines, France).

All chemicals for the digestive fluids were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France), except for urea, uric acid and sodium hydroxide (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Artificial saliva was prepared following the procedure of Oomen et al. (2003), while gastric and intestinal juices were prepared according to USP XXIII. For saliva, 0.896 g of KCl, 0.2 g of KSCN, 0.888 g of NaH_2PO_4, 0.57 g of Na_2HPO_4, 0.298 g of NaCl, 0.072 g of NaOH, 0.2 g of urea, 145 mg of α-amylase, 15 mg of uric acid, and 50 mg of mucin were diluted to 500 ml with ultrapure water, and the pH was adjusted to 6.5 using 0.2 M NaOH. Artificial gastric juice was prepared by diluting 1.0 g of NaCl, 1.6 g of pepsin, and 3.5 ml of concentrated HCl to 500 ml with ultrapure water and the pH was adjusted to 1.2 using concentrated HCl. For intestinal juice, 3.4 g of KH_2PO_4, 5 g of pancreatin, and 38.5 ml of 0.2 M NaOH were diluted to 500 ml and the pH was adjusted to 6.8 using 0.2 M NaOH.

Multi-element standard solutions were prepared using 1000 mg l^{-1} mono-elemental stock solution (Analytika, Prague, Czech Republic). For the total analysis, an internal standard solution was prepared with 1000 mg l^{-1} standard stock solutions of scandium (Sc), yttrium (Y), indium (In), rhenium (Re) and bismuth (Bi) (Analytika, Prague, Czech Republic). A multi-element standard solution (10 mg l^{-1}) (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France) was used to prepare tuning solutions in 6% (v/v) nitric acid (Suprapur, 67%, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Nitric acid was used to digest the residue from the mini-column.

Table 1
Experimental conditions.

ICP-MS parameters	
Plasma gas flow rate	14.9 l min^{-1}
Auxiliary gas flow rate	0.80 l min^{-1}
Nebulizer gas flow rate	0.82 l min^{-1}
Plasma power	1450 W
Monitored signals	*m/z 27* (^{27}Al), *m/z 51* (^{51}V), *m/z* 55 (^{55}Mn), *m/z* 65 (^{65}Cu), *m/z* 64 (^{64}Zn), *m/z* 66 (^{66}Zn), *m/z* 77 (^{77}Se), *m/z* 111 (^{111}Cd), *m/z* 114 (^{114}Cd), *m/z* 202 (^{202}Hg), *m/z* 206 (^{206}Pb), *m/z* 207 (^{207}Pb), *m/z* 208 (^{208}Pb)
Dwell time	500 ms
Sample uptake	1 ml min^{-1}

2.3. Reference materials

Certified reference materials (CRMs) DORM-3 (Fish protein), DOLT-4 (Dogfish liver), SRM 1566b (Oyster tissue), and BCR 278R (Mussel tissue) were purchased from Promochem (Molsheim, France). They were all used as provided, without further grinding. The CRMs were analysed in the same way as for the seafood samples, in order to evaluate the total bioaccessibility of several elements. All results were corrected for moisture content.

2.4. Seafood samples

Freeze-dried, composite seafood samples from the second French Total Diet Study (TDS) (fish: saithe, salmon, smoked salmon, tuna and canned tuna; shellfish: mussel, oyster, scallop and shrimp) (Sirot et al., 2009) and from the Calipso study (shellfish: crab – common crab and spider crab – and periwinkle) (Leblanc et al., 2006) were analysed. The TDS samples, composed of up to 15 sub-samples, were prepared as consumed, whereas the Calipso samples, composed of up to five sub-samples, were not cooked.

2.5. Analytical process

The whole analytical process is summarized in Fig. 1. The proposed leaching method allowed determination of the total bioaccessible elements of interest, following which the remaining residue was digested and analysed in order to check for mass balance.

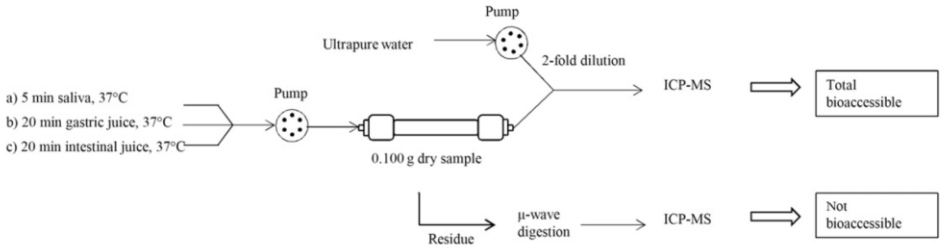


Fig. 1. Schematic diagram of the procedure for bioaccessibility assessment.

applied to seafood for determining arsenic concentration by Dufailly, Guérin, Noël, Frémy, and Beauchemin (2008).

In this paper, the continuous leaching method was applied to seafood samples from both the second French total diet study and the Calipso study to assess the maximum oral bioaccessibility of several trace elements (Al, V, Mn, Cu, Zn, Cd, Hg, and Pb). Furthermore, the potential correlation between total concentration and bioaccessibility was examined for all these elements.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

An X-Series^{II} ICP-MS instrument (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) equipped with a concentric nebulizer and an impact bead spray chamber was used. The operating conditions are summarized in Table 1. For the continuous leaching procedure, the digestive reagents were supplied by an L-6200A pump (Merck), and data acquisition was carried out using the Time Resolved Analysis (TRA) mode of the ICP-MS software. For total analysis, the sample solutions were fed by a peristaltic pump from tubes arranged on an ASX 500 autosampler model 510 (CETAC, Omaha, Nebraska, USA). The residue was digested by means of a closed-vessel microwave digestion system (Anton-Paar, Courtaboeuf, France) equipped with 80-ml quartz vessels (80-bar operating pressure).

2.2. Chemicals

All solutions were prepared with analytical reagent-grade chemicals and ultra pure water (18 MΩcm) produced by purifying distilled water with a Milli-Q^{TM} PLUS system combined with an Elix 5 pre-system (Millipore S.A., St Quentin en Yvelines, France).

All chemicals for the digestive fluids were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France), except for urea, uric acid and sodium hydroxide (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Artificial saliva was prepared following the procedure of Oomen et al. (2003), while gastric and intestinal juices were prepared according to USP XXIII. For saliva, 0.896 g of KCl, 0.2 g of KSCN, 0.888 g of NaH_2PO_4, 0.57 g of Na_2HPO_4, 0.298 g of NaCl, 0.072 g of NaOH, 0.2 g of urea, 145 mg of α-amylase, 15 mg of uric acid, and 50 mg of mucin were diluted to 500 ml with ultrapure water, and the pH was adjusted to 6.5 using 0.2 M NaOH. Artificial gastric juice was prepared by diluting 1.0 g of NaCl, 1.6 g of pepsin, and 3.5 ml of concentrated HCl to 500 ml with ultrapure water and the pH was adjusted to 1.2 using concentrated HCl. For intestinal juice, 3.4 g of KH_2PO_4, 5 g of pancreatin, and 38.5 ml of 0.2 M NaOH were diluted to 500 ml and the pH was adjusted to 6.8 using 0.2 M NaOH.

Multi-element standard solutions were prepared using 1000 mg l^{-1} mono-elemental stock solution (Analytika, Prague, Czech Republic). For the total analysis, an internal standard solution was prepared with 1000 mg l^{-1} standard stock solutions of scandium (Sc), yttrium (Y), indium (In), rhenium (Re) and bismuth (Bi) (Analytika, Prague, Czech Republic). A multi-element standard solution (10 mg l^{-1}) (Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France) was used to prepare tuning solutions in 6% (v/v) nitric acid (Suprapur, 67%, VWR, Fontenay-sous-Bois, France). Nitric acid was used to digest the residue from the mini-column.

Table 1
Experimental conditions.

ICP-MS parameters	
Plasma gas flow rate	14.9 l min^{-1}
Auxiliary gas flow rate	0.80 l min^{-1}
Nebulizer gas flow rate	0.82 l min^{-1}
Plasma power	1450 W
Monitored signals	*m/z 27* (^{27}Al), *m/z 51* (^{51}V), *m/z* 55 (^{55}Mn), *m/z* 65 (^{65}Cu), *m/z* 64 (^{64}Zn), *m/z* 66 (^{66}Zn), *m/z* 77 (^{77}Se), *m/z* 111 (^{111}Cd), *m/z* 114 (^{114}Cd), *m/z* 202 (^{202}Hg), *m/z* 206 (^{206}Pb), *m/z* 207 (^{207}Pb), *m/z* 208 (^{208}Pb)
Dwell time	500 ms
Sample uptake	1 ml min^{-1}

2.3. Reference materials

Certified reference materials (CRMs) DORM-3 (Fish protein), DOLT-4 (Dogfish liver), SRM 1566b (Oyster tissue), and BCR 278R (Mussel tissue) were purchased from Promochem (Molsheim, France). They were all used as provided, without further grinding. The CRMs were analysed in the same way as for the seafood samples, in order to evaluate the total bioaccessibility of several elements. All results were corrected for moisture content.

2.4. Seafood samples

Freeze-dried, composite seafood samples from the second French Total Diet Study (TDS) (fish: saithe, salmon, smoked salmon, tuna and canned tuna; shellfish: mussel, oyster, scallop and shrimp) (Sirot et al., 2009) and from the Calipso study (shellfish: crab – common crab and spider crab – and periwinkle) (Leblanc et al., 2006) were analysed. The TDS samples, composed of up to 15 sub-samples, were prepared as consumed, whereas the Calipso samples, composed of up to five sub-samples, were not cooked.

2.5. Analytical process

The whole analytical process is summarized in Fig. 1. The proposed leaching method allowed determination of the total bioaccessible elements of interest, following which the remaining residue was digested and analysed in order to check for mass balance.

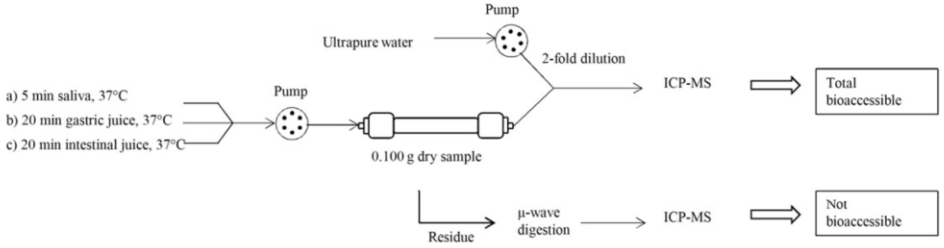


Fig. 1. Schematic diagram of the procedure for bioaccessibility assessment.

Table 2
Internal quality control for bioaccessibility results (mg kg^{-1}).

		Al	V	Mn	Cu	Zn	Cd	Hg	Pb
DORM-3	Reference value[a]	–	–	–	15.5 ± 63	51.3 ± 3.1	0.290 ± 0.020	0.382 ± 0.060	0.395 ± 0.050
(Fish protein)	Total Bioaccessible[b]	–	–	–	5.0 ± 0.5	16.9 ± 1.7	0.168 ± 0.024	0.226 ± 0.023	0.013 ± 0.001
(n = 4)	Residue[b]	–	–	–	7.5 ± 0.8	21.8 ± 2.2	0.058 ± 0.008	0.152 ± 0.015	0.301 ± 0.030
	Mass balance[b]	–	–	–	12.5 ± 1.3	38.7 ± 3.9	0.226 ± 0.032	0.378 ± 0.038	0.315 ± 0.031
	Z-score	–	–	–	−1.9	−2.5	−2.2	−0.1	−2.0
DOLT-4	Reference value[a]	–	–	–	31.2 ± 1.1	116 ± 6	24.3 ± 0.8	2.58 ± 0.22	0.16 ± 0.04
(Dogfish liver)	Total Bioaccessible[b]	–	–	–	10.1 ± 1.4	29 ± 4	2.8 ± 0.4	0.32 ± 0.04	0.01 ± 0.00
(n = 2)	Residue[b]	–	–	–	16.6 ± 2.3	71 ± 10	16.7 ± 2.4	2.08 ± 0.29	0.11 ± 0.02
	Mass balance[b]	–	–	–	26.6 ± 3.8	100 ± 14	19.6 ± 2.8	2.40 ± 0.34	0.12 ± 0.02
	Z-score	–	–	–	−1.5	−1.4	−2.0	−0.7	−2.8
SRM 1566b	Reference value[a]	197.2 ± 6.0	0.577 ± 0.023	18.5 ± 0.2	71.6 ± 1.6	1424 ± 46	2.48 ± 0.08	0.0371 ± 0.0013	0.308 ± 0.009
(Oyster tissue)	Total Bioaccessible[b]	0.4 ± 0.1	0.104 ± 0.012	3.6 ± 0.4	3.6 ± 0.4	352 ± 41	0.57 ± 0.07	–	0.025 ± 0.003
(n = 3)	Residue[b]	114.1 ± 19.8	0.578 ± 0.067	9.0 ± 1.0	52.0 ± 6.0	776 ± 90	1.55 ± 0.18	0.1741 ± 0.0201	0.272 ± 0.031
	Mass balance[b]	114.5 ± 19.8	0.682 ± 0.079	12.6 ± 1.5	55.6 ± 6.4	1128 ± 130	2.12 ± 0.24	0.1741 ± 0.0201	0.297 ± 0.034
	Z-score	−2.8	1.8	−3.2	−2.2	−2.1	−1.5	37	−0.4
BCR 278R	Reference value[a]	–	–	7.69 ± 023	9.45 ± 0.13	83.1 ± 1.7	0.348 ± 0.007	0.196 ± 0.009	2.00 ± 0.04
(Mussel tissue)	Total Bioaccessible[b]	–	–	4.37 ± 0.62	4.16 ± 0.59	68.7 ± 9.7	0.290 ± 0.041	0.042 ± 0.006	1.90 ± 0.27
(n = 2)	Residue[b]	–	–	2.33 ± 0.33	4.60 ± 0.65	19.4 ± 2.7	0.053 ± 0.008	0.179 ± 0.021	0.70 ± 0.10
	Mass balance[b]	–	–	6.70 ± 0.95	8.75 ± 1.24	88.1 ± 12.5	0.343 ± 0.049	0.221 ± 0.025	2.60 ± 0.37
	Z-score	–	–	−1.3	−0.7	0.6	−0.1	1.3	3.0

[a] Reference value ± confidence interval of the CRM.
[b] Mean value ± $V = k \times \frac{CV_R \times M}{100 \times \sqrt{n}}$ with $k = 2$; $CV_R = 10\%$; and M = mean value, $n = 2$, 3, or 4.

The bioaccessible concentrations for toxic and essential elements and the total bioaccessibility are shown in Tables 3 and 4 and in Figs. 3 and 4, respectively. For all elements, the potential influence of total concentration on bioaccessibility was examined (Fig. 5), but the results were only considered when the mass balance was within 70–130% of the theoretical value.

3.2.1. Aluminium

The amounts of Al varied from 22–38 mg kg^{-1} in scallop sample and from 61–172 mg kg^{-1} in mussel samples (Table 3). On average, the most contaminated species was mussel (mean level of 116 mg kg^{-1}), followed by shrimp, periwinkle, scallop and crab (79.0, 39.3, 28.4, 27.6 mg kg^{-1}, respectively). In fish samples, all values were below 3 times the LOQ, so the bioaccessibility of Al was only assessed for shellfish. The calculated mass balance was generally found to be within the confidence interval. As observed for the CRMs (ranging from 0% to 14% of the total Al) (Fig. 2), the estimated Al bioaccessibility in real samples was very low (less than 7% of the total Al), except in a crab sample (27%) (Fig. 3). To the authors' knowledge, no data has previously been reported for Al bioaccessibility from food, but Lopez, Cabrera, Lorenzo, and Lopez (2002) reported an absorbable fraction of Al of 1.15% and 1.80% for salmon cottage pie and hake, respectively. Fig. 5 shows that Al bioaccessibility was negatively correlated to total Al concentration and that this correlation was significant ($p < 0.05$).

3.2.2. Vanadium

The V concentrations ranged from 0.249 mg kg^{-1} in a salmon sample to 1.50 mg kg^{-1} in a mussel sample (Table 4). The highest mean total V concentrations were found in shellfish, particularly

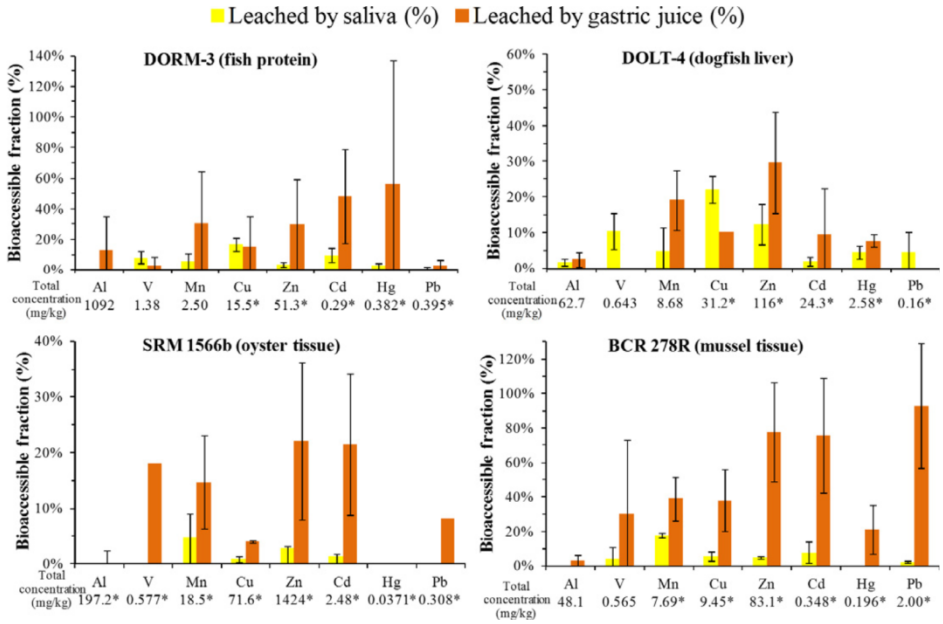


Fig. 2. Bioaccessibility results in 4 CRMs: DORM-3, DOLT-4, SRM 1566b, BCR 278R. Error bars denote the standard deviation of the results. *certified values.

Table 3
Bioaccessible and total concentrations for contaminants in fish and shellfish (mg kg^{-1}) (>3 × LOQ).

	Al					Cd					Pb					Hg				
	Total	Saliva	Gastric	Residue	Sum total		Saliva	Gastric	Residue	Sum	Total	Saliva	Gastric	Residue	Sum	Total	Saliva	Gastric	Residue	Sum
Mussel																				
	172	0.000	2.65	163	166	0.348	0.047	0.417	0.000	0.464	1.26	0.010	0.717	0.197	0.924	0.645	0.024	0.006	0.826	0.856
	77.3	0.838	2.10	72.2	75.1	0.484	0.111	0.326	0.000	0.437	0.840	0.025	0.460	0.113	0.598	nd	–	–	–	–
	70.6	0.003	1.80	74.2	76.0	0.299	0.029	0.314	0.000	0.343	0.660	0.000	0.587	0.000	0.587	0.307	0.000	0.012	0.381	0.392
	60.8	0.103	1.02	104	104	0.144	0.010	0.096	0.000	0.106	0.570	0.012	0.354	0.029	0.395	nd	–	–	–	–
	202	0.248	1.09	189	190	0.368	0.068	0.242	0.010	0.321	0.810	0.019	0.369	0.316	0.704	nd	–	–	–	–
Scallop																				
	22.0	0.668	0.350	19.7	20.7	0.733	0.036	0.519	0.018	0.573	0.190	0.050	0.078	0.061	0.189	nd	–	–	–	–
	25.2	0.320	1.30	30.5	32.1	0.945	0.032	0.549	0.275	0.856	0.240	0.068	0.000	0.102	0.169	nd	–	–	–	–
	38.0	0.404	0.000	27.5	27.9	0.715	0.046	0.116	0.431	0.593	0.290	0.028	0.000	0.326	0.354	nd	–	–	–	–
Crab																				
	16.0	0.006	0.139	18.1	18.3	7.47	0.518	6.17	0.000	6.69	0.220	0.001	0.166	0.054	0.222	0.284	0.006	0.222	0.084	0.312
	72.7	19.8	na	53.8	73.5	1.66	1.00	na	0.829	1.83	0.240	0.107	na	0.182	0.289	0.219	0.042	na	0.129	0.171
Periwinkle																				
	33.5	0.121	2.31	24.6	27.0	0.729	0.056	0.688	0.041	0.785	0.440	0.013	0.334	0.137	0.485	nd	–	–	–	–
	53.1	0.343	1.57	47.8	49.7	0.680	0.068	0.430	0.160	0.658	0.600	0.008	0.331	0.322	0.661	0.121	0.000	0.023	0.093	0.116
Shrimp																				
	88.2	0.000	2.57	61.5	64.0	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.240	0.000	0.018	0.260	0.278
	35.6	0.000	0.319	50.4	50.7	0.263	0.014	0.257	0.000	0.271	0.070	0.000	0.000	0.054	0.054	0.262	0.000	0.007	0.314	0.320
	104	0.000	0.321	83.1	83.4	nd	–	–	–	–	0.060	0.007	0.000	0.046	0.053	nd	–	–	–	–
	26.8	0.000	0.316	32.8	33.1	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.193	0.000	0.006	0.171	0.177
	99.9	0.000	2.02	134	136	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.059	0.000	0.011	0.050	0.060
	120	0.069	1.93	102	104	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.083	0.001	0.004	0.027	0.032
Saithe																				
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.148	0.000	0.137	0.026	0.163
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.569	0.000	0.032	0.484	0.516
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–
Salmon																				
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.120	0.004	0.025	0.111	0.140
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–
Smoked salmon																				
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–
Tuna																				
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	1.64	0.004	0.240	1.62	1.86
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.638	0.000	0.027	0.582	0.609
Canned Tuna																				
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.472	0.000	0.140	0.412	0.552
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.448	0.006	0.002	0.364	0.373

nd: total concentration below 3 times the LOQ; -:bioaccessibility not determined; na: not assessed.

Table 4
Bioaccessible and total concentrations for essential elements in fish and shellfish (mg kg^{-1}) (>3 × LOQ).

	V					Mn					Cu					Zn				
	Total	Saliva	Gastric	Residue	Sum	Total	Saliva	Gastric	Residue	Sum	Total	Saliva	Gastric	Residue	Sum	Total	Saliva	Gastric	Residue	Sum
Mussel																				
	1.33	0.218	0.000	0.631	0.849	13.7	4.33	7.39	2.79	14.5	5.33	0.838	2.63	1.01	4.48	135	10.6	92.0	3.51	106
	1.17	0.572	0.058	0.491	1.12	5.12	3.30	1.99	0.920	6.21	4.29	2.19	2.05	0.879	5.12	106	58.2	58.0	3.53	120
	1.01	0.299	0.569	0.590	1.46	10.3	2.43	3.95	1.89	8.26	4.82	1.20	2.94	0.145	4.29	171	17.4	109	11.1	138
	1.04	0.468	0.000	0.635	1.10	3.72	0.00	1.72	0.638	2.36	4.47	1.89	0.786	1.91	4.59	57.6	3.45	36.4	2.46	42.3
	1.50	0.303	0.336	0.844	1.48	8.63	3.04	2.83	1.91	7.78	5.03	1.57	1.51	1.91	5.00	101	26.9	50.4	11.1	88.3
Scallop																				
	0.254	0.104	0.000	0.079	0.183	26.2	22.8	10.3	1.48	34.6	1.75	0.381	0.542	1.06	1.98	75.1	20.3	36.9	4.07	61.3
	0.414	0.098	0.000	0.281	0.379	40.8	34.2	10.1	6.19	50.4	2.58	1.32	0.158	1.65	3.14	79.4	28.9	37.6	18.9	85.4
	0.348	0.163	0.000	0.305	0.468	48.8	40.5	4.40	26.0	70.9	1.97	0.442	0.000	1.76	2.20	77.9	24.3	8.73	59.0	92.1
Crab																				
	0.606	0.149	0.445	0.343	0.937	4.74	1.076	2.32	1.561	4.96	70.5	37.7	27.0	10.6	75.4	222	13.1	204	3.25	220
	0.832	1.10	na	0.395	1.49	4.92	2.563	na	3.309	5.87	100.3	85.2	na	23.3	108.5	147	82.9	na	79.2	162
Periwinkle																				
	0.756	0.214	0.657	0.443	1.31	20.7	0.00	15.4	3.07	18.5	30.1	9.6	12.5	11.7	33.8	61.8	6.94	60.1	8.39	75.4
	0.730	0.089	0.579	0.542	1.21	13.5	0.00	8.33	4.87	13.2	64.8	25.4	16.9	26.6	68.9	57.2	7.56	43.7	23.1	74.3
Shrimp																				
	0.310	0.013	0.000	0.286	0.300	1.94	0.177	1.62	0.590	2.39	28.9	2.61	9.61	14.2	26.4	56.5	3.11	45.1	2.77	51.0
	0.292	0.042	0.000	0.128	0.170	1.81	0.061	1.38	0.658	2.10	30.0	6.69	6.13	16.0	28.8	54.9	4.35	41.0	3.82	49.2
	0.311	0.080	0.000	0.062	0.141	1.87	0.120	1.10	0.996	2.22	21.9	2.14	3.54	18.6	24.3	38.3	3.20	24.7	6.50	34.4
	nd	–	–	–	–	2.60	0.000	1.75	0.659	2.41	28.2	10.5	6.78	10.1	27.4	71.2	5.11	47.1	6.77	59.0
	0.345	0.151	0.038	0.298	0.487	3.62	0.000	2.33	1.34	3.67	30.9	4.95	6.91	21.4	33.3	46.9	2.52	32.3	5.88	40.7
	0.400	0.152	0.000	0.343	0.495	2.41	0.240	1.03	0.965	2.23	24.7	3.53	3.81	21.6	28.9	40.5	4.11	28.0	8.34	40.5
Saithe																				
	nd	–	–	–	–	0.970	0.229	0.258	0.674	1.16	1.55	0.099	1.12	0.450	1.67	17.9	0.064	9.07	0.860	9.99
	0.472	0.041	0.521	0.099	0.660	0.550	0.000	0.139	0.544	0.683	2.65	0.00	1.90	0.00	1.90	19.2	0.038	14.1	0.046	14.2
	nd	–	–	–	–	0.332	0.000	0.000	0.231	0.231	2.13	0.096	0.824	1.23	2.15	21.7	0.091	13.0	6.68	19.8
Salmon																				
	0.276	0.008	0.107	0.307	0.422	0.249	0.078	0.000	0.268	0.346	0.905	0.150	0.409	0.381	0.940	8.66	0.050	5.75	2.56	8.36
	nd	–	–	–	–	0.212	0.000	0.000	0.292	0.292	0.825	0.000	0.205	0.443	0.649	8.21	0.040	3.25	3.03	6.32
	0.249	0.010	0.172	0.122	0.304	0.212	0.000	0.000	0.090	0.090	0.913	0.095	0.311	0.395	0.801	7.41	0.305	4.68	1.12	6.11
Smoked salmon																				
	nd	–	–	–	–	0.219	0.000	0.000	0.203	0.203	0.678	0.020	0.174	0.255	0.449	8.10	0.615	2.55	0.938	4.10
	nd	–	–	–	–	nd	–	–	–	–	0.743	0.046	0.202	0.558	0.806	8.95	0.419	4.85	3.61	8.87
Tuna																				
	nd	–	–	–	–	0.214	0.072	0.118	0.366	0.556	1.66	0.264	0.349	0.902	1.52	11.4	0.482	1.10	5.57	7.14
	nd	–	–	–	–	0.243	0.000	0.000	0.281	0.281	1.13	0.388	0.188	0.639	1.21	13.2	2.09	2.49	9.64	14.2
Canned Tuna																				
	0.276	0.013	0.000	0.300	0.313	0.234	0.071	0.000	0.263	0.334	0.881	0.319	0.275	0.322	0.915	11.2	0.966	9.16	1.22	11.4
	nd	–	–	–	–	0.226	0.095	0.000	0.335	0.431	1.00	0.256	0.000	0.725	0.981	14.8	2.99	3.93	4.87	11.8

nd: total concentration below 3 times the LOQ; –:bioaccessibility not determined; na: not assessed.

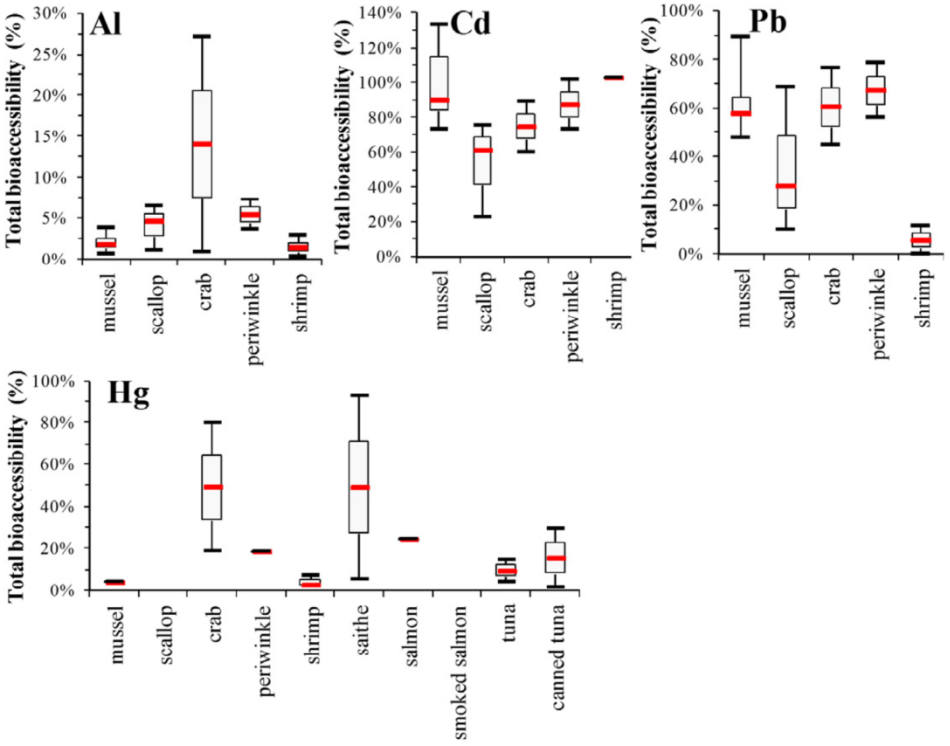


Fig. 3. Total bioaccessibility of contaminants in real samples. The box represents the concentrations in the population found between percentiles 25 and 75. The line dividing the box represents the value of the median. The whiskers below and above the box represent the minimum and maximum concentrations.

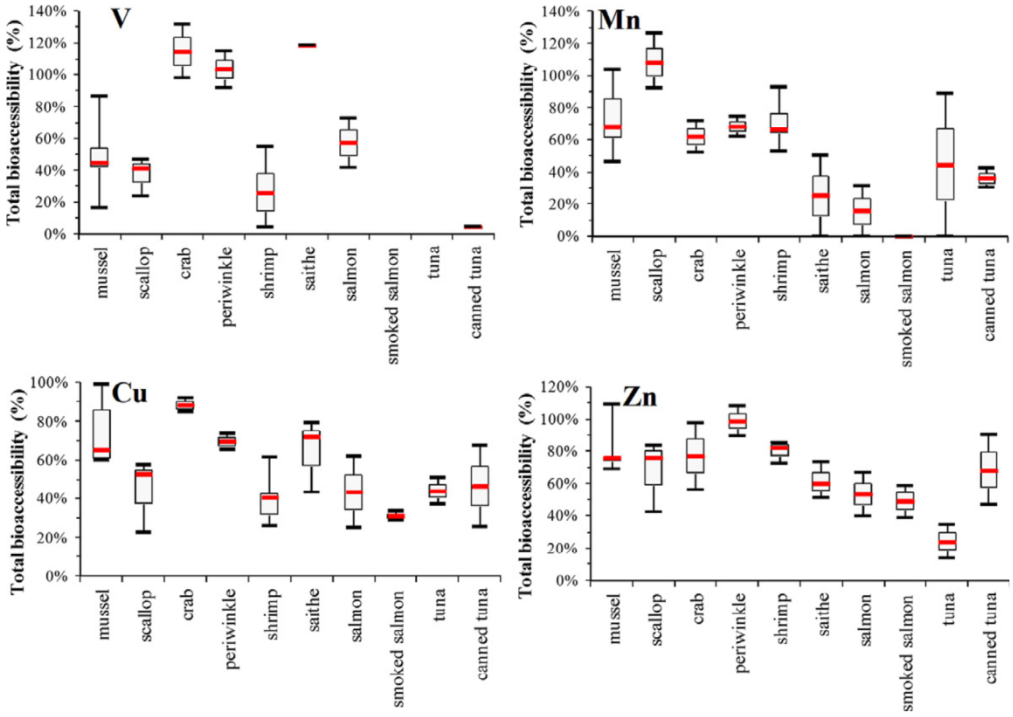


Fig. 4. Total bioaccessibility of essential elements in real samples. The box represents the concentrations in the population found between percentiles 25 and 75. The line dividing the box represents the value of the median. The whiskers below and above the box represent the minimum and maximum concentrations.

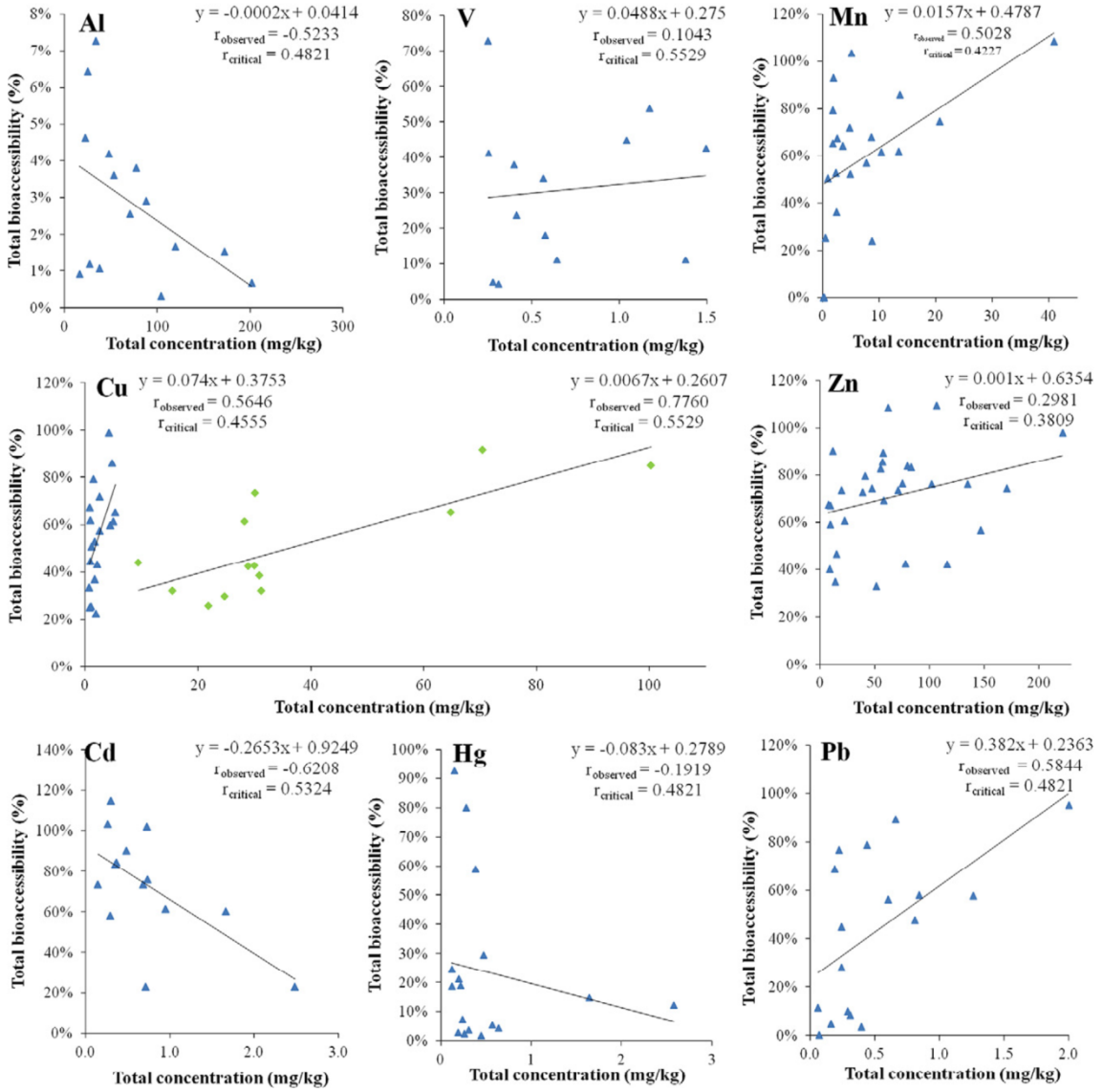


Fig. 5. Relationship between total concentration and bioaccessibility at the 95% confidence level.

in mussels and periwinkles (1.21 and 0.783 mg kg^{-1}, respectively). In fish, the total concentrations were below 3 times the LOQ for 2/3 of the samples. The bioaccessibility of V ranged from 11% to 34% in CRMs (Fig. 2) and was more variable in the samples studied (from 4% in shrimp samples to 132% in crab samples) (Fig. 4). However, the bioaccessibility in crab and periwinkle samples was probably overestimated regarding the mass balance. No significant correlation between bioaccessibility and total V concentrations was observed ($p < 0.05$). To the best of the authors' knowledge, the bioaccessibility of V has never been estimated before in food samples.

3.2.3. Manganese

The Mn concentrations ranged from 0.212 mg kg^{-1} in salmon to 48.8 mg kg^{-1} in scallop (Table 4). The highest mean total concentrations were found in shellfish (ranging from 2.35 mg kg^{-1} in shrimp to 38.6 mg kg^{-1} in scallop). In fish, the mean Mn level was less than 1 mg kg^{-1} (ranging from 0.219 in smoked salmon to 0.617 in saithe). The bioaccessibility of Mn was assessed for all samples except for one smoked salmon, for which the total content was below 3 times the LOQ. It should be noted that in salmon, smoked salmon, tuna and canned tuna, the total Mn content was close to 3 times the LOQ, so, in some cases, the calculated mass balance fell outside of the confidence interval. In shellfish, bioaccessibility was higher than 50% (Fig. 4). In common crab, periwinkle, and shrimp, Mn was mostly bioaccessible by gastric juice (more than 43% of the total Mn), whereas saliva released less than 10% of the total Mn. The same behaviour was observed in the CRMs (Fig. 2). In Mussel, the mean bioaccessibility of Mn in saliva (31%) did not differ much from the bioaccessibility in gastric juice (42%). These results are in good agreement with studies by Metian et al. (2009) and Navarro, Arana, Etxebarria, and Dean (2008) of Mn bioaccessibility in mussel (Table 5). Regarding Mn bioaccessibility in fish, Mn is less bioaccessible than in shellfish (mean of 27% vs. 76%) (Fig. 4), but no literature data is available for comparison. As seen in Fig. 5, the

Table 5
Bioaccessibility for Mn, Cu, Zn, Se, Cd, Hg, and Pb observed in literature for seafood products.

Sample	Digestion steps	Mn	Cu	Zn	Cd	Hg	Pb	Ref.
Mussel (raw)	Saliva, gastric, intestinal				68–79%			Houlbrèque et al. (2011)
Mussel (boiled)					42–70%			
TORT-2 (Lobster hepatopancreas)	Gastric, intestinal				21% (Static) 53% (TIM-1)	4% (Static) 21% (TIM-1)	19% (Static) 7% (TIM-1)	Torres-Escribano, Denis et al. (2011)
Seabass (raw)	Saliva, gastric, intestinal		81–84%	70–72%	85–93%			He et al. (2010)
Seabass (cooked∗)			54–71%	37–52%	36–86%			
Seabream (raw)			83–85%	67–73%	83–85%			
Seabream (cooked∗)			58–71%	28–51%	58–71%			
Swordfish (raw)	Gastric, intestinal					38–83%		Torres-Escribano et al. (2010)
Swordfish (raw)	Gastric, intestinal					59–87%		Torres-Escribano, Denis et al. (2011)
Swordfish (cooked)						35–49%		
Tope shark (raw)						43–69%		
Tope shark (cooked)						34–47%		
Bonito (raw)						17–23%		
Bonito (cooked)						12–17%		
Tuna (raw)						13–19%		
Tuna (cooked)						6–10%		
Caribou (raw)	Gastric, intestinal					25% Tongue 0.7% Kidney		Laird et al. (2009)
Beluga (raw)						41% Skin		
Bearded seal (boiled)						4.6% Intestine		
Ringed seal (raw)						19% Liver 1% Brain 66% Blood		
Walrus						15–48% Flesh		
Narwhal (raw)						0.5% Skin		
Arctic char (raw)						33–94% Flesh		
Mussel (raw)	Saliva, gastric, intestinal	79%		70%	72%			Metian et al. (2009)
Mussel (cooked)		82%		47%	34%			
King mackerel	Gastric, intestinal					68%		Shim et al. (2009)
Whelk (raw)	Saliva, gastric, intestinal		90% in Toto	73% in Toto	72% in Toto		52% in Toto	Amiard et al. (2008)
Oyster (raw)			61–97% in Toto 30% Digestive glands	59–82% in Toto 84% Digestive glands	62–84% in Toto 29% Digestive glands		19–34% in Toto 28% Digestive glands	
Mussel			63% in Toto 88% Digestive glands	34% in Toto 84% Digestive glands	36% in Toto 64% Digestive glands		44% in Toto 48% Digestive glands	
Clam			68% in Toto 24% Digestive glands	60% in Toto 44% Digestive glands	48% in Toto 44% Digestive glands		37% in Toto 31% Digestive glands	
Scallop			38% Muscle	60% Muscle	20% Muscle		29% Muscle	
Mussel (raw)	Gastric, intestinal	40% g25% i	25–30% g 30% i				15–25% g 10% i	Navarro et al. (2008)
Fish (tuna, swordfish, sardine) (raw)	Gastric, intestinal					<20%		Cabanero et al. (2007)
Hake (Fried)	Gastric, intestinal		87%	30%				Camara et al. (2005)
Hake filet (precooked)			87%	59%				
Oyster (raw)	Gastric∗(bioavailability)		26–80%	50–80%	44–75%			Bragigand et al. (2004)
Tuna (raw)	Gastric, intestinal					9%		Cabanero, Madrid, and Camara (2004)
Tuna (cooked)								
Swordfish (raw)						17%		
Sardine (raw)						13%		

∗boiled, steamed, fried or grilled; g gastric; i intestinal.

bioaccessibility of Mn was significantly ($p < 0.05$) and positively correlated with the total Mn concentration.

3.2.4. Copper

The highest total Cu concentrations were found in crab, periwinkle and shrimp (mean concentrations of 85.4, 47.4 and 27.4 mg kg^{-1}, respectively). In the other samples, the total Cu amounts did not exceed 5.33 mg kg^{-1} (lower content of 0.678 mg kg^{-1} in smoked salmon) (Table 4). In all cases, the mass balance fell within the confidence interval. The mean bioaccessibility of Cu varied from 31% of the total Cu in tuna to 88% in crab (Fig 4). These bioaccessibility values are quite similar to those obtained in the CRMs (15–42%), except for SRM 1566b (only 5% of the total Cu) (Fig. 2). In saithe, salmon and smoked salmon, Cu was mostly released by gastric juice (61%, 35% and 26% vs. 4%, 9% and 5% by saliva on average), whereas in the other samples, Cu was released to the same extent by both saliva and gastric juice (Table 4). These results are in good agreement with those of Navarro et al. (2008), Bragigand, Berthet, Amiard, and Rainbow (2004), and Amiard et al. (2008) who studied Cu bioaccessibility in shellfish, and of He, Ke, and Wang (2010), and Camara, Amaro, Barbea, and Clemente (2005) who reported bioaccessibility in fish (Table 5).

A significant and positive correlation ($p < 0.05$) between total bioaccessible Cu and total Cu concentration was observed for the

two concentration ranges (0.743–5.33 and 9.45–100 mg kg^{-1}) (Fig. 5), as observed by He et al. (2010) in seabass and seabream, whereas Amiard et al. (2008) found no correlation.

3.2.5. Zinc

The highest Zn levels were found in shellfish (min 38.3 mg kg^{-1} in shrimp and max 222 mg kg^{-1} in crab) (Table 4). In fish, mean concentrations ranged from 8.09 mg kg^{-1} in salmon to 19.6 mg kg^{-1} in saithe. The calculated mass balance generally fell within the confidence interval. In all cases, Zn was more bioaccessible by gastric juice than by saliva (except for a scallop sample). High bioaccessibilities were observed for this element as seen in Fig. 4 (more than 67% of the total Zn in shellfish on average and between 24% and 68% in fish), and as observed in CRMs (25–83%). Other authors reported similar bioaccessibility in shellfish: Metian et al. (2009) in mussels, Amiard et al. (2008) in scallops, Bragigand et al. (2004) in oysters) and in fish He et al. (2010) in seabass and seabream, Camara et al. (2005) in hake) (Table 5). As shown in Fig. 5, the total Zn bioaccessibility was not significantly correlated ($p < 0.05$) with total Zn concentration.

3.2.6. Cadmium

Among the seafood studied, crab was the most contaminated species (7.47 mg kg^{-1} for common crab and 1.66 mg kg^{-1} for spider crab), followed by scallop (mean 0.798 mg kg^{-1}), periwinkle (mean 0.705 mg kg^{-1}), mussel (mean 0.329 mg kg^{-1}) and shrimp (0.263 mg kg^{-1}, only in one sample), whereas in fish samples, all values were below 3 times the LOQ, so no bioaccessibility values were compiled (Table 3). The mass balance was always within the confidence interval except for one mussel sample (133%). As shown in Fig 3, the mean bioaccessibility observed for Cd in shellfish was high for both the samples (ranging from 53% in scallop to 103% in shrimp), and also in CRMs (ranging from 12% in DOLT-4 to 84% in BCR 278R) (Fig. 2). These values are in good agreement with the literature (Metian et al. (2009) in mussels, Amiard et al. (2008) in gastropods, mussels and scallop, Houlbrèque et al. (2011) in mussel, and Bragigand et al. (2004) in oyster) (Table 5). The highest amount of bioaccessible Cd was released by gastric juice, as seen in the 4 CRMs (Fig. 2) and in real samples (Table 3) (saliva released only 1% to 10% of the total Cd in CRMs and 3% to 23% in real samples). Cd bioaccessibility decreased significantly ($p < 0.05$) with increasing total concentration (Fig. 5).

3.2.7. Mercury

The Hg levels ranged from 0.059 mg kg^{-1} in a shrimp sample to 1.64 mg kg^{-1} in a tuna sample. The concentrations were below 3 times the LOQ for 3 mussels, all scallops, 1 periwinkle, 1 shrimp, 1 saithe, 2 salmons and all smoked salmons, and except for 1 mussel sample (133%), the calculated mass balance always fell within the confidence interval (Table 3). As shown in Fig 3, there was a high variability of the mean bioaccessibility results among the different samples (from 4% of total Hg in shrimp and mussel to 50% in crab), and for a given matrix (19% and 80% in crab, 6% and 93% in saithe, 4% and 15% in tuna, and 2% and 30% in canned tuna). Nevertheless, for the higher bioaccessibility levels, Hg was released most by gastric juice (Table 3 and Fig. 2). These results are in good agreement with those of Torres-Escribano, Ruiz, Barrios, Velez, and Montoro (2011) and Cabanero, Madrid, and Camara (2007) in tuna, and Shim, Ferruzzi, Kim, Janle, and Santerre (2009) in king mackerel (Table 5). The higher bioaccessibility reported by different authors (Laird, Shade, Gantner, Chan, & Siciliano, 2009; Torres-Escribano et al., Torres-Escribano, Ruiz (2011)) in other fish species may explain the highest values found in saithe and in one crab. No correlation was found between bioaccessibility and total Hg concentration, as also reported by Torres-Escribano, Velez, and Montoro (2010).

3.2.8. Lead

The amounts of Pb were lower than 3 times the LOQ in all fish samples (Table 3). In shellfish, the highest mean Pb concentrations were found in mussels (0.828 mg kg^{-1}, with a maximum level of 1.26 mg kg^{-1}), followed by periwinkles (0.520 mg kg^{-1}), scallops (0.240 mg kg^{-1}), crab (0.230 mg kg^{-1}), and shrimps (0.065 mg kg^{-1}). The mass balance always fell within the confidence interval (Table 3). The mean percentage of bioaccessible Pb varied from 6% in shrimp to 67% in periwinkle (Fig. 3), and from 3% to 95% in CRMs (Fig. 2). In mussels, common crab, periwinkles and shrimps, less than 11% of the bioaccessible Pb was released by saliva, whereas in scallops, the bioaccessible fraction in saliva was greater than that in gastric juice. These results are much higher than those reported by Amiard et al. (2008) and Navarro et al. (2008) for mussel samples, but in good agreement with Amiard et al. (2008) for scallops and gastropods (mean of 35% and 67%, respectively) (Table 5). Regarding the relationship between Pb bioaccessibility and total concentration, a significant ($p < 0.05$) positive correlation was observed (Fig. 5).

4. Conclusion

The combination of a simple and rapid continuous leaching method with ICP-MS was used successfully to assess the maximum bioaccessibility of total trace elements in both CRMs and real seafood products. This on-line leaching procedure is suitable for the simultaneous determination of the bioaccessibility of a wide range of elements in seafood and other types of samples, even though clogging occurred with some matrices such as oyster and spider crab. Future experiments would thus benefit from two modifications. First, a more inert and adapted column should be used to avoid clogging problems and the release of certain elements associated with stainless steel columns, which may enable leaching with intestinal juice. Second, a collision cell would help reduce the interferences of some elements.

References

Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Charbonnier, L., Mesnil, A., Rainbow, P. S., & Wang, W. X. (2008). Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia. *Food and Chemical Toxicology, 46*(6), 2010–2022.

Bragigand, V., Berthet, B., Amiard, J. C., & Rainbow, P. S. (2004). Estimates of trace metal bioavailability to humans ingesting contaminated oysters. *Food and Chemical Toxicology, 42*(11), 1893–1902.

Cabanero, A. I., Madrid, Y., & Camara, C. (2004). Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: An in vitro digestion method. *Analytica Chimica Acta, 526*(1), 51–61.

Cabanero, A. I., Madrid, Y., & Camara, C. (2007). Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method. *Biological Trace Element Research, 119*(3), 195–211.

Camara, F., Amaro, M. A., Barbea, R., & Clemente, G. (2005). Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food Chemistry, 92*(3), 481–489.

Caussy, D. (2003). Case studies of the impact of understanding bioavailability: Arsenic. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 56*(1), 164–173.

Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., & Ruedel, H. (2003). Lessons from case studies of metals: Investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 56*(1), 45–51.

Chu, M., & Beauchemin, D. (2004). Simple method to assess the maximum bioaccessibility of elements from food using flow injection and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 19*(9), 1213–1216.

Dufailly, V., Guérin, T., Noël, L., Frémy, J. M., & Beauchemin, D. (2008). A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 23*(9), 1263–1268.

He, M., Ke, C. H., & Wang, W. X. (2010). Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(6), 3517–3523.

Houlbrèque, F., Hervé-Fernández, P., Teyssié, J. L., Oberhaënsli, F., Boisson, F., & Jeffree, R. (2011). Cooking makes cadmium contained in Chilean mussels less bioaccessible to humans. *Food Chemistry, 126*(3), 917–921.

Intawongse, M., & Dean, J. R. (2006). In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry, 25*(9), 876–886.

Judprasong, K., Ornthai, M., Siripinyanond, A., & Shiowatana, J. (2005). A continuous-flow dialysis system with inductively coupled plasma optical emission spectrometry for in vitro estimation of bioavailability. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 20*(11), 1191–1196.

Laird, B. D., Shade, C., Gantner, N., Chan, H. M., & Siciliano, S. D. (2009). Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration. *Science of the Total Environment, 407*(23), 6003–6008.

Laparra, J. M., Almela, C., Velez, D., Barbera, R., Farre, R., & Montoro, R. (2005). Arsenosugars in raw and cooked edible seaweed: Characterization and bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(18), 7344–7351.

Laparra, J. M., Velez, D., Barbera, R., Farre, R., & Montoro, R. (2005). Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice. Practical aspects for human health risk assessments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53*(22), 8829–8833.

Laparra, J. M., Velez, D., Montoro, R., Barbera, R., & Farre, R. (2003). Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(20), 6080–6085.

Leblanc, J. C., Sirot, V., Volatier, J. L., & Bemrah-Aouachria, N. (2006). CALIPSO – Fish and seafood consumption study and biomarker of exposure to trace elements, pollutants and omega 3: AFSSA.

Lopez, F. F., Cabrera, C., Lorenzo, M. L., & Lopez, M. C. (2002). Aluminum levels in convenience and fast foods: In vitro study of the absorbable fraction. *Science of the Total Environment, 300*(1–3), 69–79.

Metian, M., Charbonnier, L., Oberhaensli, F., Bustamante, P., Jeffree, R., Amiard, J. C., et al. (2009). Assessment of metal, metalloid, and radionuclide bioaccessibility from mussels to human consumers, using centrifugation and simulated digestion methods coupled with radiotracer techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 72*(5), 1499–1502.

Millour, S., Noël, L., Kadar, A., Chekri, R., Vastel, C., & Guérin, T. (2011). Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition and Analysis, 24*(1), 111–120.

Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Havenaar, R., Bernalier, A., Fonty, G., Marol-Bonnin, S., et al. (1999). A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Applied Microbiology and Biotechnology, 53*(1), 108–114.

Moreda-Pineiro, J., Moreda-Pineiro, A., Romaris-Hortas, V., Moscoso-Perez, C., Lopez-Mahia, P., Muniategui-Lorenzo, S., et al. (2011). In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry, 30*(2), 324–345.

Navarro, P., Arana, G., Etxebarria, N., & Dean, J. R. (2008). Evaluation of the physiologically based extraction test as an indicator of metal toxicity in mussel tissue. *Analytica Chimica Acta, 622*(1–2), 126–132.

Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., & Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 44*(3), 281–287.

Shim, S. M., Ferruzzi, M. G., Kim, Y. C., Janle, E. M., & Santerre, C. R. (2009). Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish. *Food Chemistry, 112*(1), 46–50.

Shiowatana, J., Kitthikhun, W., Sottimai, U., Promchan, J., & Kunajiraporn, K. (2006). Dynamic continuous-flow dialysis method to simulate intestinal digestion for in vitro estimation of mineral bioavailability of food. *Talanta, 68*(3), 549–557.

Sirot, V., Volatier, J. L., Calamassi-Tran, G., Dubuisson, C., Menard, C., Dufour, A., et al. (2009). Core food of the French food supply: Second total diet study. *Food Additives and Contaminants – Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 26*(5), 623–639.

Torres-Escribano, S., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Calatayud, M., Barrios, L., Velez, D., et al. (2011a). Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials Fucus sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Science of the Total Environment, 409*(3), 604–611.

Torres-Escribano, S., Ruiz, A., Barrios, L., Velez, D., & Montoro, R. (2011b). Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 91*(6), 981–986.

Torres-Escribano, S., Velez, D., & Montoro, R. (2010). Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 27*(3), 327–337.

Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van De Kamp, E., Rompelberg, C. J. M., & Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology, 43*(1), 31–40.

IV. Conclusions

Une méthode *in vitro* simple et rapide pour l'évaluation de la bioaccessibilité de l'arsenic a été développée comme alternative aux méthodes d'évaluation *in vivo* de la biodisponibilité, qui restent longues, coûteuses, et complexes à mettre en place. Cette méthode de lixiviation en ligne a permis tout d'abord d'estimer en temps réel la bioaccessibilité maximale de l'arsenic total dans les produits de la pêche. Puis, les lixiviats collectés ont été analysés pour leur contenu en espèces arséniées à l'aide de la méthode de spéciation décrite dans la deuxième partie. Ces travaux ont fait l'objet d'un article (Article II) publié dans le journal « Analytical & Bioanalytical Chemistry ». Enfin, grâce à la capacité multiélémentaire du détecteur utilisé, la bioaccessibilité totale d'autres éléments traces a également été estimée. Les résultats de ces travaux seront publiés prochainement dans le journal « Food Chemistry » (article accepté le 12 mars 2012).

Les résultats de ces essais sur quatre MRC et sur des échantillons réels de produits de la pêche ont montré que la bioaccessibilité de l'arsenic total varie entre 19 et 55 % dans les MRC et est supérieure à 52 % dans les échantillons réels, suggérant que l'arsenic présent est faiblement lié à la matrice. De plus, les résultats ont montré que la salive joue un rôle très important dans la libération de l'arsenic dans l'organisme lors de la digestion, et qu'elle devrait être plus souvent considérée lors des études de bioaccessibilité.

Les analyses de spéciation des lixiviats de salive et de suc gastrique indiquent que la bioaccessibilité des espèces inorganiques varie selon de 7 à 66 % dans les mollusques et crustacés, et de 31 à 68 % dans les poissons. Les autres espèces organiques ont des bioaccessibilités supérieures ou égales à 64 % pour l'AsB et à 78 % pour le MA et le DMA. Étant donné que des surestimations en MA et DMA ont été observées sur certaines matrices, il pourrait être intéressant d'utiliser la technique ESI/MS-MS afin de mieux caractériser les espèces présentes dans ces lixiviats.

La procédure de lixiviation en ligne a également été utilisée de manière satisfaisante sur des MRC et des produits de la pêche pour la détermination de la bioaccessibilité totale d'autres éléments d'intérêt (éléments essentiels et éléments toxiques). Les résultats indiquent que la bioaccessibilité des différents éléments varie selon la matrice étudiée, en termes de pourcentage bioaccessible, mais également en fonction du réactif de digestion (salive ou suc gastrique). A titre d'exemple, les quatre éléments toxiques sont principalement libérés par le suc gastrique dans toutes les matrices étudiées (sauf l'araignée de mer pour laquelle il n'a pas été possible d'étudier la libération gastrique).

Les résultats ont ainsi montré que l'aluminium est très faiblement bioaccessible dans tous les échantillons analysés (< 7 % de l'Al total), sauf dans l'araignée de mer (27 %), à l'inverse du cadmium qui semble être très bioaccessible (> 53 % du Cd total présent et jusqu'à 100 % dans les moules et crevettes). Les bioaccessibilités du plomb et du mercure varient d'une matrice à l'autre (6 - 75 % pour le plomb et 4 - 80 % pour le mercure).

Le zinc et le cuivre sont très bioaccessibles dans toutes les matrices étudiées (> 56 %) sauf dans le thon (24 %), alors que la bioaccessibilité du manganèse est plus forte dans les mollusques et les crustacés (> 50 %) que dans les poissons (10 – 44 %). Enfin, celle du vanadium semble variable d'une matrice à l'autre (très faible dans la crevette, le thon et la coquille Saint-Jacques, très forte dans le crabe, le bigorneau, le colin et le saumon).

En perspectives, cette méthodologie pourrait être étendue à d'autres éléments en apportant quelques modifications, notamment au niveau de la mini-colonne (composition, longueur, diamètre,…), ou en associant la technique ICP-MS avec une cellule de collision/réaction pour faire face aux interférences spectrales sur certains éléments comme Se ou Fe. L'ICP-MS, permettant de déterminer simultanément tous les éléments d'intérêt dans une même matrice, peut être aussi un formidable outil pour étudier les interactions entre éléments au niveau de la bioaccessibilité et mettre en évidence l'influence par exemple d'un contaminant sur les autres éléments, et réciproquement. L'approche multiélémentaire nécessitera de toute façon d'adapter le protocole à l'objectif fixé, c'est-à-dire aux éléments d'intérêt mais également aux matrices étudiées.

Quatrième partie : Qualité en recherche

La charte des thèses réalisées au sein de l'Anses, qui se réfère à l'arrêté du 3 septembre 1998 et à la recommandation de la commission européenne du 11 mars 2005, définit les droits et devoirs des doctorants, de leurs directeurs de thèse, et de leurs responsables scientifiques. Selon un extrait de cette charte 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 qualité ont été réalisés au cours de cette thèse, dont les principales conclusions ont été synthétisées dans le rapport présenté ci-dessous :

RAPPORT QUALITE POUR LE MEMOIRE DE THESE DE A. LEUFROY

« PROJET SPAS2 »

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	1er août 2011 ; 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	Octobre 2008
Acronyme Thèse	SpAs2
Titre Thèse	Spéciation de l'arsenic dans les aliments d'origine animale. Exposition et bio-accessibilité
Direction de thèse	Pr D. Beauchemin (Queen's University of Canada) et T. Guérin (Anses, Unité CIME)
Chef de travaux 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 D. Beauchemin (Queen's University Canada), T. Guérin et L. Noel (Anses-Laboratoire de sécurité des aliments, Unité CIME)
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 travaux 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)

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).

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 fiches associées au MQ R sont utilisées de façon appropriée. Il existe une version dossier « papier » et une version dossier « électronique ». 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.

La description et l'évolution des hypothèses et des objectifs du projet existent dans le document de définition du projet mais elles devraient être également discutées par écrit tout au long du processus de la recherche.

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 et rédaction de protocoles d'analyse. 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, dérogation, anomalies).

Expérimentation et traçabilité

Deux essais de traçabilité ont été réalisés, sur deux phases du projet respectivement : application de la méthode développée pour la spéciation de l'arsenic et utilisation de cette méthode pour étudier la bioaccessibilité de l'arsenic et d'autres minéraux. Tous les éléments permettant de tracer les différentes phases des expérimentations ainsi que les matériels, méthodes et consommables utilisés par la doctorante ont été facilement retrouvés.

***En conclusion**, l'équipe de management de la qualité du Laboratoire de sécurité des aliments atteste que les travaux de thèse menés par A. Leufroy 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 23 Août 2011

H. Lelièvre

Responsable du service Qualité
Anses-Laboratoire de sécurité des aliments
et laboratoire de santé animale

Conclusions générales et perspectives

L'objectif principal de ces travaux était de valider une méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche, avant de l'utiliser pour collecter des données d'occurrence des différentes espèces présentes, puis d'estimer la bioaccessibilité de l'arsenic élémentaire et de ses espèces dans des échantillons représentatifs des habitudes de consommation de la population française.

La première partie de ce travail a porté sur une présentation générale de la problématique de l'arsenic au travers de généralités sur l'arsenic (propriétés, différentes formes, cycle géochimique, toxicologie et exposition), puis d'une étude bibliographique sur les techniques de spéciation de l'arsenic dans les matrices alimentaires (extraction et séparation des espèces) et sur les différentes approches existantes pour l'étude de sa bioaccessibilité. La méthode retenue est une technique de couplage entre la chromatographie échangeuse d'ions et une détection par ICP-MS après une extraction assistée par micro-ondes avec de l'eau. Pour l'estimation de la bioaccessibilité de l'arsenic total et des différentes espèces d'arsenic dans les produits de la pêche, une méthode dynamique de lixiviation en ligne a été retenue. Cette approche permet d'estimer la bioaccessibilité totale maximale de l'arsenic en temps réel ainsi que celle d'autres éléments d'intérêt. De plus, couplée à une méthode de spéciation de l'arsenic, elle permet d'estimer la bioaccessibilité des différentes espèces d'arsenic en plus de l'arsenic total.

La deuxième partie de ce travail a été consacrée à la validation de la méthode de spéciation de l'arsenic dans les produits la pêche et aux applications relatives à cette méthode. Les critères de performance analytiques (limites de détection et de quantification, linéarité, spécificité, justesse, fidélité, et reproductibilité interne) ont été évalués selon les normes en vigueur. La linéarité, les limites de quantification (de 0,02 à 0,08 mg/kg), la spécificité, la justesse, la reproductibilité interne (CV_R compris entre 9 % et 16 %) ont été considérés acceptables pour toutes les espèces, sauf pour le TMAO. De plus, des contrôles qualité externes ont montré que la méthode pouvait également être appliquée de façon satisfaisante à des échantillons de riz et de froment. Cette méthode a été accréditée fin 2011 par le COFRAC pour les six espèces As(III), MA, DMA, As(V), AsB et AsC. Elle a également été utilisée lors de l'exercice de certification d'un échantillon de riz organisé par l'IRMM.

Suite à ces travaux, la DGAL a ajouté en 2011 la recherche d'arsenic inorganique dans la chair de poisson au plan de surveillance des contaminants chimiques du milieu aquatique dans les produits de la pêche.

L'application de la méthode de spéciation sur les 65 échantillons de produits de la pêche de l'EAT 2 a permis de confirmer que l'Arsénobétaïne est l'espèce majoritaire dans ces échantillons et que le pourcentage d'Asi dans les poissons varie peu d'une matrice à l'autre et reste comprise entre 0,5 et 1,9% de l'arsenic total. En revanche, les pourcentages en Asi sont plus élevés et variables (entre 0,4 et 15,8%) dans les mollusques, notamment dans les moules et les huîtres.

La troisième partie de ce travail s'est intéressée à la mise au point d'une méthode permettant l'évaluation de la bioaccessibilité maximale de l'arsenic total et de ses différentes espèces dans les produits de la pêche, en combinant une technique de lixiviation en ligne avec une méthode de spéciation par HPLC/ICP-MS. Alors que l'étape de la salive est généralement négligée lors des études de simulation gastro-intestinale, les résultats ont montré l'importance de son rôle puisque plus de deux tiers de l'arsenic bioaccessible était libéré par la salive. Les analyses de spéciation des lixiviats de salive et de suc gastrique ont montré que la bioaccessibilité de l'arsenic inorganique semble dépendre du type de matrice étudié, alors que la bioaccessibilité des espèces organiques semble être beaucoup plus importante, quelles que soient les matrices.

En parallèle, la lixiviation en ligne a été étendue à la détermination de la bioaccessibilité d'autres éléments traces d'intérêt. Sur ce type de matrices, les résultats ont montré que parmi les contaminants, l'aluminium est très faiblement bioaccessible (< 7 % de l'Al total), comparé au cadmium (> 53 % du Cd total présent et jusqu'à 100 % dans les moules et crevettes), et que la bioaccessibilité du plomb et du mercure est très variable selon le type de matrice étudiée (6 - 75 % pour le plomb et 4 - 80 % pour le mercure). De plus, pour ces quatre éléments toxiques, c'est le suc gastrique qui participe le plus à leur libération durant la digestion. Parmi les éléments essentiels, le cuivre et le zinc sont très bioaccessibles dans toutes les matrices étudiées (> 56 %) sauf le thon (24 %), la bioaccessibilité du manganèse est plus forte dans les mollusques et les crustacés (> 50 %) que dans les poissons (10 – 44 %) et celle du vanadium est faible dans la crevette, le thon et la coquille Saint-Jacques et plus forte dans le crabe, le bigorneau, le colin, et le saumon.

En perspectives, il serait intéressant de coupler les données de contamination des différentes matrices analysées dans le cadre de l'EAT 2 avec les données de consommation, afin d'affiner l'évaluation de l'exposition de la population française à l'arsenic. Cette méthode de spéciation pourra également être utilisée lors des prochaines EAT. De plus, compte tenu des résultats des données d'occurrence recueillies sur ces échantillons, il serait judicieux d'inclure dans le prochain

plan de surveillance des contaminants chimiques en milieu aquatique dans les produits de la pêche la recherche de l'arsenic inorganique dans les mollusques et les crustacés.

Afin de pouvoir évaluer la bioaccessibilité sur d'autres éléments d'intérêt (le nickel, le chrome et le molybdène en particulier qui étaient relargués par la colonne en inox) et sur des matrices difficiles comme les huîtres, il faudrait optimiser les paramètres de bioaccessibilité (type de colonne, dimension et diamètre de colonne…), notamment à l'aide d'une colonne plus inerte. L'utilisation de la cellule de collision de l'ICP-MS permettrait également d'étudier d'autres éléments particulièrement sensibles aux interférences (fer, sélénium…).

D'autres techniques de détection comme l'ESI/MS-MS pourraient être envisagées afin de pouvoir confirmer l'identité structurale des espèces dans les matrices plus complexes qui contiennent des espèces inconnues et dans les lixiviats dans l'hypothèse de transformations des espèces dans les réactifs digestifs. De même, à l'instar de quelques études sur des produits de la pêche et du riz, (Amiard *et al.*, 2008; He *et al.*, 2010; Houlbrèque *et al.*, 2011; Torres-Escribano *et al.*, 2011b; Horner et Beauchemin 2012), il conviendrait d'étudier l'influence de la cuisson et du mode de préparation des aliments sur la bioaccessibilité des éléments étudiés dans le but d'obtenir une évaluation des risques plus précise.

Alors même que certaines catégories d'aliments représentent la source principale d'exposition à l'arsenic pour la population générale, aucune réglementation (en total ou en spéciation) n'existe actuellement au niveau européen, contrairement à d'autres contaminants comme le plomb, le cadmium et le mercure. Par conséquent, nous espérons que l'ensemble de ces travaux pourra contribuer à une future réglementation sur les teneurs maximales en arsenic inorganique dans certains groupes d'aliments comme le riz, les poissons et autres produits de la mer.

Bibliographie

Ackerman, A. H., P. A. Creed, et al. (2005). "Comparison of a chemical and enzymatic extraction of arsenic from rice and an assessment of the arsenic absorption from contaminated water by cooked rice." Environmental Science and Technology **39**(14): 5241-5246.

Ackley, K. L., C. B'Hymer, et al. (1999). "Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-MS." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **14**(5): 845-850.

AFNOR (1993). NF V03-110 Analyse des produits agricoles et alimentaires - Procédure de validation intralaboratoire d'une méthode alternative par rapport à une méthode de référence - Cas de méthodes d'analyse quantitatives. St Denis, France.

AFNOR (1996). FD V03-115 Analyse des produits agricoles et alimentaires - Guide pour l'utilisation des matériaux de référence. St Denis, France.

AFNOR (1999). XP T 90-210 Protocole d'évaluatioin d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence. St Denis, France, Agence Française de Normalisation.

AFNOR (2002). NF EN 13804 Produits alimentaires - Dosage des éléments traces - Critères de performance, généralités et préparation des échantillons. St Denis, France.

AFSSET (2006). Document de Référence pour la construction d'une valeur toxicologique de référence fondée sur des effets reprotoxiques, AFSSET (Agence Française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail)**:** 91.

Ali, I. and C. K. Jain (2004). "Advances in arsenic speciation techniques." International Journal of Environmental Analytical Chemistry **84**(12): 947-964.

Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet, et al. (2008). "Bioaccessibility of essential and non-essential metals in commercial shellfish from Western Europe and Asia." Food and Chemical Toxicology **46**(6): 2010-2022.

Ammann, A. (2011). "Arsenic Speciation Analysis by Ion Chromatography - A Critical Review of Principles and Applications." American Journal of Analytical Chemistry **2**(1): 27-45.

Argese, E., C. Bettiol, et al. (2005). "Distribution of arsenic compounds in Mytilus galloprovincialis of the Venice lagoon (Italy)." Science of the Total Environment **348**(1-3): 267-277.

Arkasuwan, C., A. Siripinyanond, et al. (2011). "Inductively coupled plasma mass spectrometry with a continuous-flow dialysis simulated gastrointestinal digestion for study of arsenic bioaccessibility in shrimp." International Journal of Mass Spectrometry.

ATDSR (2007). toxicological profile for arsenic.

B'Hymer, C. and J. A. Caruso (2004). "Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1045**(1-2): 1-13.

Beauchemin, D., K. W. M. Siu, et al. (1989). "Determination of arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **4**(3).

Bragigand, V., B. Berthet, et al. (2004). "Estimates of trace metal bioavailability to humans ingesting contaminated oysters." Food and Chemical Toxicology **42**(11): 1893-1902.

Brisbin, J. A., C. B'Hymer, et al. (2002). "A gradient anion exchange chromatographic method for the speciation of arsenic in lobster tissue extracts." Talanta **58**(1): 133-145.

Brisbin, J. A. and J. A. Caruso (2002). "Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry." Analyst **127**(7): 921-929.

Cabanero, A. I., Y. Madrid, et al. (2004). "Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: An in vitro digestion method." Analytica Chimica Acta **526**(1): 51-61.

Cabanero, A. I., Y. Madrid, et al. (2007). "Mercury-selenium species ratio in representative fish samples and their bioaccessibility by an in vitro digestion method." Biological Trace Element Research **119**(3): 195-211.

Camara, F., M. A. Amaro, et al. (2005). "Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods." Food Chemistry **92**(3): 481-489.

Cao, X., C. Hao, et al. (2009). "Sequential extraction combined with HPLC-ICP-MS for As speciation in dry seafood products." Food Chemistry **113**(2): 720-726.

Carmalt, C. J. and N. C. Norman (1998). Arsenic, Antimony and Bismuth: some general properties and aspects of periodicity. Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth. N. C. Norman, Thomson Science.

Caroli, S., F. La Torre, et al. (1994). "On-line speciation of arsenical compounds in fish and mussel extracts by HPLC-ICP-MS." Environmental Science and Pollution Research **1**(4): 205-208.

Caruso, J. A., D. T. Heitkemper, et al. (2001). "An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple samples." Analyst **126**(2): 136-140.

Caussy, D. (2003). "Case studies of the impact of understanding bioavailability: Arsenic." Ecotoxicology and Environmental Safety **56**(1): 164-173.

Caussy, D., M. Gochfeld, et al. (2003). "Lessons from case studies of metals: Investigating exposure, bioavailability, and risk." Ecotoxicology and Environmental Safety **56**(1): 45-51.

Cava-Montesinos, P., K. Nilles, et al. (2005). "Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in fish." Talanta **66**(4): 895-901.

Chen, Z., K. F. Akter, et al. (2008). "The separation of arsenic species in soils and plant tissues by anion-exchange chromatography with inductively coupled mass spectrometry using various mobile phases." Microchemical Journal **89**(1): 20-28.

Chu, M. and D. Beauchemin (2004). "Simple method to assess the maximum bio-accessibility of elements from food using flow injection and inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **19**(9): 1213-1216.

Ciardullo, S., F. Aureli, et al. (2010). "Arsenic speciation in freshwater fish: Focus on extraction and mass balance." Talanta **81**(1-2): 213-221.

CITEPA (2011). Emissions dans l'air en France métropolitaine - Subtsances relatives à la contamination par les métaux lourds.

Cullen, W. R. and K. J. Reimer (1989). "Arsenic speciation in the environment." Chemical Reviews **89**(4): 713-764.

Dahl, L., M. Molin, et al. (2010). "Stability of arsenic compounds in seafood samples during processing and storage by freezing." Food Chemistry **123**(3): 720-727.

Davis, A., M. V. Ruby, et al. (1992). "Bioavailability of arsenic and lead in soils from the butte, montana, mining district." Environmental Science and Technology **26**(3): 461-468.

Devesa, V., A. Martinez, et al. (2001). "Effect of cooking temperatures on chemical changes in species of organic arsenic in seafood." Journal of Agricultural and Food Chemistry **49**(5): 2272-2276.

Devesa, V., M. A. Suner, et al. (2005). "Organoarsenical species contents in cooked seafood." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(22): 8813-8819.

Dietz, C., J. Sanz, et al. (2007). "Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation." Journal of Chromatography A **1153**(1-2): 114-129.

Dopp, E., L. M. Hartmann, et al. (2004). "Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells." Toxicology and Applied Pharmacology **201**(2): 156-165.

Dufailly, V. (2008). Spéciation de l'arsenic dans les produits de la pêche par couplage HPLC-ICP-MS après extraction assistée par micro-ondes (MAE). Contribution à l'évaluation des risques par l'estimation de sa bioaccessibilité, AgroParisTech.

Dufailly, V., T. Guerin, et al. (2008a). "A simple method for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in seafood using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **23**(9): 1263-1268.

Dufailly, V., M. Nicolas, et al. (2011). "Validation of a method for arsenic speciation in food by ion chromatography-inductively coupled plasma/mass spectrometry after ultrasonic-assisted enzymatic extraction." Journal of AOAC International **94**(3): 947-958.

Dufailly, V., L. Noel, et al. (2007). "Optimisation by experimental design of an IEC/ICP-MS speciation method for arsenic in seafood following microwave assisted extraction." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **22**(9): 1168-1173.

Dufailly, V., L. Noël, et al. (2008b). "Optimisation and critical evaluation of a collision cell technology ICP-MS system for the determination of arsenic in foodstuffs of animal origin." Analytica Chimica Acta **611**(2): 134-142.

Edmonds, J. S. and K. A. Francesconi (1993). "Arsenic in seafoods: Human health aspects and regulations." Marine Pollution Bulletin **26**(12): 665-674.

EFSA (2009). Scientific Opinion on Arsenic in Food EFSA Journal. **7:** 1351.

Falk, K. and H. Emons (2000). "Speciation of arsenic compounds by ion-exchange HPLC-ICP-MS with different nebulizers." Journal of analytical atomic spectrometry **15**(6): 643-649.

Fattorini, D. and F. Regoli (2004). "Arsenic speciation in tissues of the mediterranean polychaete Sabella spallanzanii." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(8): 1881-1887.

Feldmann, J., K. John, et al. (2000). "Arsenic metabolism in seaweed-eating sheep from Northern Scotland." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **368**(1): 116-121.

Fitzpatrick, S., L. Ebdon, et al. (2002). "Separation and detection of arsenic and selenium species in environmental samples by HPLC-ICP-MS." International Journal of Environmental Analytical Chemistry **82**(11-12): 835-841.

Foster, S., W. Maher, et al. (2007). "A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues." Talanta **71**(2): 537-549.

Francesconi, K. A., J. S. Edmonds, et al. (1989). "Accumulation of arsenic in yelloweye mullet (Aldrichetta forsteri) following oral administration of organoarsenic compounds and arsenate." Science of the Total Environment **79**(1): 59-67.

Francesconi, K. A. and D. Kuehnelt (2004). "Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003." Analyst **129**(5): 373-395.

Freeman, G. B., R. A. Schoof, et al. (1995). "Bioavailability of arsenic in soil and house dust impacted by smelter activities following oral administration in cynomolgus monkeys." Fundamental and Applied Toxicology **28**(2): 215-222.

Gallagher, P. A., S. Murray, et al. (2002). "An evaluation of sample dispersion media used with accelerated solvent extraction for the extraction and recovery of arsenicals from LFB and DORM-2." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **17**(6): 581-586.

Gallagher, P. A., J. A. Shoemaker, et al. (2001). "Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection." Analytical and Bioanalytical Chemistry **369**(1): 71-80.

Geng, W., R. Komine, et al. (2009). "Arsenic speciation in marine product samples: Comparison of extraction-HPLC method and digestion-cryogenic trap method." Talanta **79**(2): 369-375.

Goessler, W., D. Kuehnelt, et al. (1998). "Arsenobetaine and other arsenic compounds in the National Research Council of Canada Certified Reference Materials DORM 1 and DORM 2." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **13**(3): 183-187.

Gomez-Ariza, J. L., D. Sachez-Rodas, et al. (2000). "Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS." Analyst **125**(3): 401-407.

Gong, Z., X. Lu, et al. (2002). "Arsenic speciation analysis." Talanta **58**(1): 77-96.

Greene, R. and E. Crecelius (2006). "Total and inorganic arsenic in mid-atlantic marine fish and shellfish and implications for fish advisories." Integrated Environmental Assessment and Management **2**(4): 344-354.

Guerin, T., A. Astruc, et al. (1999). "Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: A review of the main separation techniques." Talanta **50**(1): 1-24.

Guérin, T., R. Chekri, et al. (2011). "Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the French market." Food Chemistry **127**(3): 934-942.

Hanaoka, K., W. Goessler, et al. (2001). "Formation of toxic arsenical in roasted muscles of marine animals." Applied Organometallic Chemistry **15**(1): 61-66.

He, M., C. H. Ke, et al. (2010). "Effects of cooking and subcellular distribution on the bioaccessibility of trace elements in two marine fish species." Journal of Agricultural and Food Chemistry **58**(6): 3517-3523.

Heitkemper, D. T., N. P. Vela, et al. (2001). "Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **16**(4): 299-306.

Hirata, S. and H. Toshimitsu (2005). "Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS." Analytical and Bioanalytical Chemistry **383**(3): 454-460.

Hirata, S. and H. Toshimitsu (2007). "Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS." Applied Organometallic Chemistry **21**(6): 447-454.

Hirata, S., H. Toshimitsu, et al. (2006). "Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS." Analytical Sciences **22**(1): 39-43.

Horner, N. S. and D. Beauchemin (2012). "A simple method using on-line continuous leaching and ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of bio-accessible arsenic in rice." Analytica Chimica Acta **717**(0): 1-6.

Houlbrèque, F., P. Hervé-Fernández, et al. (2011). "Cooking makes cadmium contained in Chilean mussels less bioaccessible to humans." Food Chemistry **126**(3): 917-921.

Hsieh, M. W., C. L. Liu, et al. (2010). "Speciation analysis of arsenic and selenium compounds by CE-dynamic reaction cell-ICP-MS." Electrophoresis **31**(13): 2272-2278.

Hsiung, T.-M. and C.-W. Huang (2006). "Quantitation of Toxic Arsenic Species and Arsenobetaine in Pacific Oysters Using an Off-line Process with Hydride Generationâ^'Atomic Absorption Spectroscopy." Journal of Agricultural and Food Chemistry **54**(7): 2470-2478.

Huang, J. H., G. Ilgen, et al. (2008). "Sample pre-treatment to eliminate cationic methylated arsenic for determining arsenite on an anion-exchange column by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." Analytica Chimica Acta **611**(1): 48-55.

Hughes, M. F. (2002). "Arsenic toxicity and potential mechanisms of action." Toxicology Letters **133**(1): 1-16.

IARC (2004). "Arsenic in drinking water." IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans **84**: 39-294.

INERIS (2010). I N E R I S - Fiche de donnees toxicologiques et environnementales des substances chimiques: Arsenic et ses dérivés inorganiques**:** 124.

Intawongse, M. and J. R. Dean (2006). "In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples." TrAC - Trends in Analytical Chemistry **25**(9): 876-886.

INVS (2002). Exposition chronique à l'arsenic hydrique et risques pour la santé, Bilan des données épidémiologiques, Evaluation quantitative des risques sanitaires en Auvergne, Institut National de Veille Sanitaire.

Jackson, B. P., P. M. Bertsch, et al. (2003). "Trace element speciation in poultry litter." Journal of Environmental Quality **32**(2): 535-540.

Jacotot, B. and J. C. L. Parco (1999). Nutrition et alimentation, Masson.

Juhasz, A. L., E. Smith, et al. (2008). "Effect of soil ageing on in vivo arsenic bioavailability in two dissimilar soils." Chemosphere **71**(11): 2180-2186.

Juhasz, A. L., E. Smith, et al. (2007). "Comparison of in vivo and in vitro methodologies for the assessment of arsenic bioavailability in contaminated soils." Chemosphere **69**(6): 961-966.

Kannamkumarath, S. S., K. Wróbel, et al. (2004). "Speciation of Arsenic in Different Types of Nuts by Ion Chromatography - Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **52**(6): 1458-1463.

Karthikeyan, S. and S. Hirata (2004). "Ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry determination of arsenic species in marine samples." Applied Organometallic Chemistry **18**(7): 323-330.

Karthikeyan, S., S. Hirata, et al. (2004). "Determination of arsenic species by microwave-assisted extraction followed by ion-pair chromatography-ICPMS: Analysis of reference materials and fish tissues." International Journal of Environmental Analytical Chemistry **84**(8): 573-582.

Karthikeyan, S., K. Honda, et al. (2003). "Speciation of arsenic in marine algae and commercial shrimp using ion chromatography with ICP-MS detection." Atomic Spectroscopy **24**(3): 79-88.

Khokiattiwong, S., N. Kornkanitnan, et al. (2009). "Arsenic compounds in tropical marine ecosystems: Similarities between mangrove forest and coral reef." Environmental Chemistry **6**(3): 226-234.

Kirby, J. and W. Maher (2002). "Measurement of water-soluble arsenic species in freeze-dried marine animal tissues by microwave-assisted extraction and HPLC-ICP-MS." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **17**(8): 838-843.

Kirby, J., W. Maher, et al. (2002). "Arsenic concentrations and speciation in a temperate mangrove ecosystem, NSW, Australia." Applied Organometallic Chemistry **16**(4): 192-201.

Koch, I., K. McPherson, et al. (2007). "Arsenic bioaccessibility and speciation in clams and seaweed from a contaminated marine environment." Marine Pollution Bulletin **54**(5): 586-594.

Kohlmeyer, U., S. Jakubik, et al. (2005). "Determination of arsenic species in fish oil after acid digestion." Microchimica Acta **151**(3-4): 249-255.

Kohlmeyer, U., E. Jantzen, et al. (2003). "Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin." Analytical and Bioanalytical Chemistry **377**(1): 6-13.

Kohlmeyer, U., J. Kuballa, et al. (2002). "Simultaneous separation of 17 inorganic and organic arsenic compounds in marine biota by means of high-performance liquid chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry." Rapid Communications in Mass Spectrometry **16**(10): 965-974.

Kubota, R., T. Kunito, et al. (2002). "Chemical speciation of arsenic in the livers of higher trophic marine animals." Marine Pollution Bulletin **45**(1-12): 218-223.

Kuehnelt, D., K. J. Irgolic, et al. (2001). "Comparison of three methods for the extraction of arsenic compounds from the NRCC standard reference material DORM-2 and the brown alga Hijiki fuziforme." Applied Organometallic Chemistry **15**(6): 445-456.

Lai, V. W. M., W. R. Cullen, et al. (2001). "Arsenic speciation in sea scallop gonads." Applied Organometallic Chemistry **15**(6): 533-538.

Laird, B. D., C. Shade, et al. (2009). "Bioaccessibility of mercury from traditional northern country foods measured using an in vitro gastrointestinal model is independent of mercury concentration." Science of the Total Environment **407**(23): 6003-6008.

Laparra, J. M., D. Velez, et al. (2007). "Bioaccessibility and transport by Caco-2 cells of organoarsenical species present in seafood." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(14): 5892-5897.

Laparra, J. M., D. Velez, et al. (2003). "Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method." Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**(20): 6080-6085.

Laperche, V., F. Bodénan, et al. (2003). Guide méthodologique de l'arsenic, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BRGM/RP-52066-FR, BRGM/RP-52066-FR**:** 90.

Larsen, E. H., J. Engman, et al. (2005). "Determination of inorganic arsenic in white fish using microwave-assisted alkaline alcoholic sample dissolution and HPLC-ICP-MS." Analytical and Bioanalytical Chemistry **381**(2): 339-346.

Le, X. C., X. Lu, et al. (2004). "Arsenic Speciation." Analytical Chemistry **76**(1): 26A-33A.

Leblanc, J.-C., T. Guérin, et al. (2005). "Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study." Food Additives and Contaminants **22**(7): 624-641.

Leermakers, M., W. Baeyens, et al. (2006). "Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation." TrAC - Trends in Analytical Chemistry **25**(1): 1-10.

Leufroy, A., L. Noël, et al. (2011). "Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and occurrence data." Talanta **83**(3): 770-779.

Li, W., C. Wei, et al. (2003). "A survey of arsenic species in Chinese seafood." Food and Chemical Toxicology **41**(8): 1103-1110.

Lin, H. T., S. W. Chen, et al. (2008). "Arsenic speciation in fish on the market." Journal of Food and Drug Analysis **16**(4): 70-75.

Lindemann, T., A. Prange, et al. (2000). "Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **368**(2-3): 214-220.

Liu, C. W., C. P. Liang, et al. (2006). "Assessing the human health risks from exposure of inorganic arsenic through oyster (Crassostrea gigas) consumption in Taiwan." Science of the Total Environment **361**(1-3): 57-66.

Liu, C. W., C. P. Liang, et al. (2007). "Bioaccumulation of arsenic compounds in aquacultural clams (Meretrix lusoria) and assessment of potential carcinogenic risks to human health by ingestion." Chemosphere **69**(1): 128-134.

Londesborough, S., J. Mattusch, et al. (1999). "Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **363**(5-6): 577-581.

Mandal, B. K. and K. T. Suzuki (2002). "Arsenic round the world: A review." Talanta **58**(1): 201-235.

Mato-Fernandez, M. J., J. R. Otero-Rey, et al. (2007). "Arsenic extraction in marine biological materials using pressurised liquid extraction." Talanta **71**(2): 515-520.

Matos Reyes, M. N., M. L. Cervera, et al. (2007). "Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hydride generation atomic fluorescence spectrometry." Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy **62**(9): 1078-1082.

Mattusch, J. and R. Wennrich (1998). "Determination of anionic, neutral, and cationic species of arsenic by ion chromatography with ICPMS detection in environmental samples." Analytical Chemistry **70**(17): 3649-3655.

McKiernan, J. W., J. T. Creed, et al. (1999). "A comparison of automated and traditional methods for the extraction of arsenicals from fish." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **14**(4): 607-613.

McSheehy, S. and Z. Mester (2004). "Arsenic speciation in marine certified reference materials Part 1. Identification of water-soluble arsenic species using multidimensional liquid chromatography combined with inductively coupled plasma, electrospray and electrospray high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry with mass spectrometric detection." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **19**(3): 373-380.

McSheehy, S., P. Pohl, et al. (2001). "Investigation of arsenic speciation in oyster test reference material by multidimensional HPLC-ICP-MS and electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS-MS)." Analyst **126**(7): 1055-1062.

Meermann, B., M. Bartel, et al. (2008). "Capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometric and electrospray time of flight mass spectrometric detection for the determination of arsenic species in fish samples." Electrophoresis **29**(12): 2731-2737.

Metian, M., L. Charbonnier, et al. (2009). "Assessment of metal, metalloid, and radionuclide bioaccessibility from mussels to human consumers, using centrifugation and simulated digestion methods coupled with radiotracer techniques." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(5): 1499-1502.

Miller, D. D., B. R. Schricker, et al. (1981). "An in vitro method for estimation of iron availability from meals." American Journal of Clinical Nutrition **34**(10): 2248-2256.

Millour, S., L. Noel, et al. (2010). "Internal quality controls applied in inductively coupled plasma mass spectrometry multi-elemental analysis in the second French Total Diet Study." Accreditation and Quality Assurance **15**(9): 503-513.

Millour, S., L. Noël, et al. (2011a). "Strontium, silver, tin, iron, tellurium, gallium, germanium, barium and vanadium levels in foodstuffs from the Second French Total Diet Study." Journal of Food Composition and Analysis **sous presse**.

Millour, S., L. Noël, et al. (2011b). "Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation." Journal of Food Composition and Analysis **24**(1): 111-120.

Millour, S., L. Noël, et al. (2011c). "Pb, Hg, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French total diet study." Food Chemistry **126**(4): 1787-1799.

Miyashita, S., M. Shimoya, et al. (2009). "Rapid determination of arsenic species in freshwater organisms from the arsenic-rich Hayakawa River in Japan using HPLC-ICP-MS." Chemosphere **75**(8): 1065-1073.

Mizuta, N., M. Mizuta, et al. (1956). "An outbreak of acute arsenic poisoning caused by arsenic contaminated soy-sauce (Shoyu): A clinical report of 220 cases." Bull. Yamaguchi Med. School **4**: 131-150.

Molénat, N., M. Holeman, et al. (2000). "Arsenic as a pollutant of the environment: Origins, repartition, biotransformations and ecotoxicity." L'arsenic, polluant de l'environnement : Origines, distribution, biotransformations(6): 12-23.

Monasterio, R. P., J. A. Londonio, et al. (2011). "Organic Solvent-Free Reversed-Phase Ion-Pairing Liquid Chromatography Coupled to Atomic Fluorescence Spectrometry for Organoarsenic Species Determination in Several Matrices." Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(8): 3566-3574.

Moreda-Pineiro, A., J. Moreda-Pineiro, et al. (2011). "Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis - High performance liquid chromatographyâ€“inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials." Journal of Chromatography A **1218**(39): 6970-6980.

Moreda-Pineiro, A., E. Pena-Vasquez, et al. (2008). "Matrix solid-phase dispersion as a sample pretreatment for the speciation of arsenic in seafood products." Analytical Chemistry **80**(23): 9272-9278.

Morita, Y., T. Kobayashi, et al. (2007). "Study on simultaneous speciation of arsenic and antimony by HPLC-ICP-MS." Talanta **73**(1): 81-86.

Mukhopadhyay, R., B. P. Rosen, et al. (2002). "Microbial arsenic: From geocycles to genes and enzymes." FEMS Microbiology Reviews **26**(3): 311-325.

Munoz, O., D. Velez, et al. (1999). "Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As(III) + As(v)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry." Analyst **124**(4): 601-607.

Nakazato, T., T. Taniguchi, et al. (2000). "Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hydride generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrices." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **15**(12): 1546-1552.

Nam, S.-H., H.-J. Oh, et al. (2010). "A study on the extraction and quantitation of total arsenic and arsenic species in seafood by HPLC-ICP-MS." Microchemical Journal **95**(1): 20-24.

Nam, S. H., J. Cheng, et al. (2006). "Preliminary results of extraction, separation and quantitation of arsenic species in food and dietary supplements by HPLC-ICP-MS." Bulletin of the Korean Chemical Society **27**(6): 903-908.

Narukawa, T., K. Inagaki, et al. (2008). "The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS." Talanta **77**(1): 427-432.

Navarro, P., G. Arana, et al. (2008). "Evaluation of the physiologically based extraction test as an indicator of metal toxicity in mussel tissue." Analytica Chimica Acta **622**(1-2): 126-132.

Navratilova, J., G. Raber, et al. (2011). "Arsenic cycling in marine systems: degradation of arsenosugars to arsenate in decomposing algae, and preliminary evidence for the formation of recalcitrant arsenic

" Environmental Chemistry **8**: 44-51.

Ng, J. C., S. M. Kratzmann, et al. (1998). "Speciation and absolute bioavailability: Risk assessment of arsenic-contaminated sites in a residential suburb in Canberra." Analyst **123**(5): 889-892.

Nischwitz, V. and S. A. Pergantis (2005). "Liquid chromatography online with selected reaction monitoring electrospray mass spectrometry for the determination of organoarsenic species in crude extracts of marine reference materials." Analytical Chemistry **77**(17): 5551-5563.

Noël, L., R. Chekri, et al. (2012). "Li, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se and Mo levels in foodstuffs from the Second French TDS." Food Chemistry **132**(3): 1502-1513.

Noel, L., V. Dufailly, et al. (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." Journal of AOAC International **88**(6): 1811-1821.

Ohno, K., T. Yanase, et al. (2007). "Arsenic intake via water and food by a population living in an arsenic-affected area of Bangladesh." Science of the Total Environment **381**(1-3): 68-76.

Oomen, A. G., C. J. M. Rompelberg, et al. (2003). "Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **44**(3): 281-287.

Pardo-Martinez, M., P. Vinas, et al. (2001). "Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods." Analytica Chimica Acta **441**(1): 29-36.

Pare, J. R. J., J. M. R. Belanger, et al. (1994). "Microwave-assisted process (MAP®): A new tool for the analytical laboratory." TrAC - Trends in Analytical Chemistry **13**(4): 176-184.

Pizarro, I., M. Gomez, et al. (2003a). "Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies." Analytica Chimica Acta **495**(1-2): 85-98.

Pizarro, I., M. Gomez, et al. (2003b). "Evaluation of stability of arsenic species in rice." Analytical and Bioanalytical Chemistry **376**(1): 102-109.

Quaghebeur, M., Z. Rengel, et al. (2003). "Arsenic speciation in terrestrial plant material using microwave-assisted extraction, ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **18**(2): 128-134.

Raber, G., K. A. Francesconi, et al. (2000). "Determination of 'arsenosugars' in algae with anion-exchange chromatography and an inductively coupled plasma mass spectrometer as element-specific detector." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **367**(2): 181-188.

Raber, G., R. Raml, et al. (2010). "Quantitative speciation of arsenic compounds when using organic solvent gradients in HPLC-ICPMS." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **25**(4): 570-576.

Rattanachongkiat, S., G. E. Millward, et al. (2004). "Determination of arsenic species in fish, crustacean and sediment samples from Thailand using high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)." Journal of Environmental Monitoring **6**(4): 254-261.

Reyes, L. H., J. L. G. Mar, et al. (2009). "Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." Talanta **78**(3): 983-990.

Rodriguez, I. B., G. Raber, et al. (2009). "Arsenic speciation in fish sauce samples determined by HPLC coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry." Food Chemistry **112**(4): 1084-1087.

Rosal, C. G., G. M. Momplaisir, et al. (2005). "Roxarsone and transformation products in chicken manure: Determination by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry." Electrophoresis **26**(7-8): 1606-1614.

Ruby, M. V., A. Davis, et al. (1996). "Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test." Environmental Science and Technology **30**(2): 422-430.

Sánchez-Rodas, D., J. Luis Gómez-Ariza, et al. (2006). "Development of a rapid extraction procedure for speciation of arsenic in chicken meat." Analytical and Bioanalytical Chemistry **385**(7): 1172-1177.

Sanz, E., R. Munoz-Olivas, et al. (2005a). "Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples." Journal of Chromatography A **1097**(1-2): 1-8.

Sanz, E., R. Munoz-Olivas, et al. (2005b). "A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe." Analytica Chimica Acta **535**(1-2): 227-235.

Schaeffer, R., K. A. Francesconi, et al. (2006). "Arsenic speciation in freshwater organisms from the river Danube in Hungary." Talanta **69**(4): 856-865.

Schoof, R. A. and J. W. Yager (2007). "Variation of total and speciated arsenic in commonly consumed fish and seafood." Human and Ecological Risk Assessment **13**(5): 946-965.

Serafimovski, I., I. B. Karadjova, et al. (2006). "Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry." Microchemical Journal **83**(2): 55-60.

Shah, A. Q., T. G. Kazi, et al. (2010). "Determination of inorganic arsenic species (As3+ and As5+) in muscle tissues of fish species by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS)." Food Chemistry **119**(2): 840-844.

Shim, S. M., M. G. Ferruzzi, et al. (2009). "Impact of phytochemical-rich foods on bioaccessibility of mercury from fish." Food Chemistry **112**(1): 46-50.

Signes-Pastor, A. J., K. Mitra, et al. (2008). "Arsenic speciation in food and estimation of the dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of West Bengal, India." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(20): 9469-9474.

Simon, S., H. Tran, et al. (2004). "Simultaneous determination of twelve inorganic and organic arsenic compounds by liquid chromatography-ultraviolet irradiation-hydride generation atomic fluorescence spectrometry." Journal of Chromatography A **1024**(1-2): 105-113.

Sirot, V., T. Guerin, et al. (2009a). "Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France." Science of the Total Environment **407**(6): 1875-1885.

Sirot, V., J. L. Volatier, et al. (2009b). "Core food of the French food supply: Second Total Diet Study." Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment **26**(5): 623-639.

Sloth, J. J. and K. Julshamn (2008). "Survey of total and inorganic arsenic content in blue mussels (Mytilus edulis L.) from Norwegian fiords: Revelation of unusual high levels of inorganic arsenic." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(4): 1269-1273.

Sloth, J. J., E. H. Larsen, et al. (2003). "Determination of organoarsenic species in marine samples using gradient elution cation exchange HPLC-ICP-MS." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **18**(5): 452-459.

Sloth, J. J., E. H. Larsen, et al. (2005). "Survey of inorganic arsenic in marine animals and marine certified reference materials by anion exchange high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(15): 6011-6018.

Smith, E., A. L. Juhasz, et al. (2008). "Arsenic uptake and speciation in rice plants grown under greenhouse conditions with arsenic contaminated irrigation water." Science of the Total Environment **392**(2-3): 277-283.

Soeroes, C., W. Goessler, et al. (2005). "Thio arsenosugars in freshwater mussels from the Danube in Hungary." Journal of Environmental Monitoring **7**(7): 688-692.

Sun, G. X., P. N. Williams, et al. (2009). "Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments." Environment International **35**(3): 473-475.

Suner, M. A., V. Devesa, et al. (2002). "Organoarsenical species contents in fresh and processed seafood products." Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**(4): 924-932.

Suner, M. A., V. Devesa, et al. (2001). "Application of column switching in high-performance liquid chromatography with on-line thermo-oxidation and detection by HG-AAS and HG-AFS for the analysis of organoarsenical species in seafood samples." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **16**(4): 390-397.

Torres-Escribano, S., S. Denis, et al. (2011a). "Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials Fucus sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2)." Science of the Total Environment **409**(3): 604-611.

Torres-Escribano, S., A. Ruiz, et al. (2011b). "Influence of mercury bioaccessibility on exposure assessment associated with consumption of cooked predatory fish in Spain." Journal of the Science of Food and Agriculture **91**(6): 981-986.

Torres-Escribano, S., D. Velez, et al. (2010). "Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish." Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment **27**(3): 327-337.

Tseng, W. P. (1977). "Effects and dose response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic." Environmental Health Perspectives **Vol.19**: 109-119.

Tseng, W. P., H. M. Chu, et al. (1968). "Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan." Journal of the National Cancer Institute **40**(3): 453-463.

Urgast, D. S., G. C. Adams, et al. (2010). "Arsenic concentration and speciation of the marine hyperaccumulator whelk Buccinum undatum collected in coastal waters of Northern Britain." Journal of Environmental Monitoring **12**(5): 1126-1132.

Vela, N. P., D. T. Heitkemper, et al. (2001). "Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry." Analyst **126**(7): 1011-1017.

Versantvoort, C. H. M., A. G. Oomen, et al. (2005). "Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food." Food and Chemical Toxicology **43**(1): 31-40.

Wahlen, R., S. McSheehy, et al. (2004). "Arsenic speciation in marine certified reference materials Part 2. the quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **19**(7): 876-882.

Wang, R. Y., Y. L. Hsu, et al. (2007). "Speciation analysis of arsenic and selenium compounds in environmental and biological samples by ion chromatography-inductively coupled plasma dynamic reaction cell mass spectrometer." Analytica Chimica Acta **590**(2): 239-244.

Williams, G., J. M. West, et al. (2009). "Arsenic speciation in the freshwater crayfish, Cherax destructor Clark." Science of the Total Environment **407**(8): 2650-2658.

Williams, P. N., A. H. Price, et al. (2005). "Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure." Environmental Science and Technology **39**(15): 5531-5540.

Wrobel, K., B. Parker, et al. (2002). "Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC-ICP-MS: Analysis of reference materials, fish tissues and urine." Talanta **58**(5): 899-907.

Yamamoto, S., Y. Konishi, et al. (1995). "Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens." Cancer Research **55**(6): 1271-1276.

Yang, G., J. Xu, et al. (2009). "Speciation analysis of arsenic in Mya arenaria Linnaeus and Shrimp with capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry." Talanta **78**(2): 471-476.

Yeh, C. F. and S. J. Jiang (2005). "Speciation of arsenic compounds in fish and oyster tissues by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry." Electrophoresis **26**(7-8): 1615-1621.

Zheng, J. and H. Hintelmann (2004). "Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish." Journal of Analytical Atomic Spectrometry **19**(1): 191-195.

Arsenic is an element present in all compartments of the environment, and seafood constitutes a major source of exposure to arsenic through human consumption. Although there is currently no legislation on arsenic in food in France, government agencies generally assess the safety of food items based solely on the total concentration of the element, without taking into account its different species or their bioaccessibility. Therefore, the development of speciation analysis methods is particularly relevant in the context of risk assessment.

The first part of this thesis focuses on the properties of arsenic, its occurrence in the different compartments of the environment and its toxicity, and a literature review of existing analytical methods to study the speciation of arsenic in food matrices, especially seafood products (extraction and separation / detection). Different approaches for evaluating its bioaccessibility and that of other trace metals of interest are also presented.

The second part of this work concerns the validation of a speciation analysis method for major arsenic species in seafood (As (III), MA, DMA, As (V), AsB, TMAO, AsC) by coupling ion exchange chromatography (IEC) with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after microwave-assisted extraction (MAE). Evaluation of the analytical performance of the method, internal and external quality controls in place and applications of the method, particularly occurrence data of arsenic species in seafood most consumed by the French population are presented and discussed.

In the third part, the maximum bioaccessibility of arsenic and other elements of interest is assessed using a continuous leaching method (involving the real-time measurement by ICP-MS of the fraction released by the different artificial digestive fluids). By coupling this leaching method with the above validated speciation analysis method, the bioaccessibility of different arsenic species is also assessed.

Keywords: : arsenic ; spéciation ; bioaccessibility ; seafood ; ICP-MS ; IEC ; MAE ; method validation

L'arsenic est un élément présent dans tous les compartiments de l'environnement, et les produits de la pêche représentent une source majeure d'exposition à l'arsenic par le biais de l'alimentation. Même s'il n'existe pas à ce jour de législation sur les teneurs en arsenic dans les aliments en France, les agences gouvernementales évaluent généralement les risques liés à la présence d'arsenic dans les produits de la pêche en se basant essentiellement sur la concentration totale de l'élément, sans tenir compte des différentes espèces présentes ni de leur bioaccessibilité. Par conséquent, le développement de méthodes d'analyse de spéciation revêt un intérêt particulier dans le cadre de l'évaluation des risques.

La première partie de ce mémoire présente des informations générales sur les propriétés de l'arsenic, son occurrence dans les différents compartiments de l'environnement et sa toxicité, ainsi qu'une étude bibliographique des méthodes analytiques existantes pour étudier la spéciation de l'arsenic dans les matrices alimentaires, en particulier les produits de la pêche (extraction et séparation/détection). Les différentes approches pour l'évaluation de sa bioaccessibilité et de celle d'autres éléments traces métalliques d'intérêt sont également présentées.

La deuxième partie de ces travaux porte sur la validation d'une méthode d'analyse de spéciation des principales espèces d'arsenic dans les produits la pêche (As(III), MA, DMA, As(V), AsB, TMAO, AsC) par couplage entre la chromatographie d'échange d'ions (IEC) et la spectrométrie de masse à plasma induit (ICP-MS) après extraction assistée par micro-ondes (MAE). L'évaluation des performances analytiques de la méthode, les contrôles qualités internes et externes mis en place et les différentes applications, en particulier les données d'occurrence des différentes espèces d'arsenic dans les produits de la pêche les plus consommés par la population française sont présentés et discutés.

Dans la troisième partie, la bioaccessibilité maximale de l'arsenic et d'autres éléments d'intérêt est estimée à l'aide d'une méthode de lixiviation en ligne (impliquant la mesure en temps réel par ICP-MS de la fraction libérée par les différents fluides digestifs artificiels). La combinaison de ce procédé avec la méthode d'analyse de spéciation validée permet ainsi d'estimer la bioaccessibilité des différentes espèces d'arsenic.

Mots clés : arsenic ; spéciation ; bioaccessibilité ; produits de la pêche ; ICP-MS ; IEC ; MAE ; validation