

---

# **Optimisation de la méthode de spéciation du mercure dans les produits de la pêche par DID et GC-ICP-MS**

## **I. Introduction**

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

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

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

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

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

## II.1 Méthode de préparation d'échantillon

En amont de la séparation et de la détection des espèces mercurielles, une étape d'extraction pour la mise en solution des espèces du mercure contenues dans des matrices biologiques est cruciale. En effet, il est primordial de mettre au point une méthode de digestion douce n'impliquant pas de modifications ou de pertes des espèces initialement présentes dans l'échantillon.

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

### II.1.1 Extractions solide/liquide (SLE)

Le premier protocole de SLE (Tableau 6) utilisé pour l'analyse du MeHg a été développé en 1966 par Westöö (Westöö, 1968, Cano-Pavon et al., 1999). Ce protocole consistait en une extraction acide des analytes par HCl suivi d'une extraction par le benzène. L'analyte était ensuite hydroxylé par une solution d'hydroxyde d'ammonium saturée en sulfate de sodium. Pour une séparation des composés mercuriels par chromatographie en phase gazeuse (GC), le mélange aqueux était acidifié par du HCl concentré et les analytes étaient extraits une nouvelle fois par le benzène. La majorité des procédures analytiques développées par la suite pour l'extraction acide du MeHg est basée sur la méthode de Westöö et a des rendements d'extraction compris entre 50 et 80%, à l'exception des travaux de Taylor et al. (2008) qui obtient un rendement d'extraction du MeHg de 101% après extraction acide par HNO<sub>3</sub>. Ces taux de récupération généralement insuffisants s'expliquent par une hydrolyse partielle des tissus biologiques sous condition acide selon Lobinski et al. (1998).

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

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

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

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

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

### II.1.2 Extractions assistée par sonication (SAE)

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

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

Solvant (composition, volume)	Durée (min)	Prise d'essai (mg)	Matrices étudiées	Taux de récupération (%)	Références
TMAH (3 ml, 25% m/v)	60	20 - 100	TORT-1, TORT-2, DOLT-2, DORM-1	94 - 106 (MeHg)	Ebdon et al., 2002
TMAH (2 - 5 ml)	60 - 120	50 - 300	DOLT-2, TORT-1	-	Qvarnstrom et Frech, 2002
KOH/MeOH (20 ml, 25% m/v)	180	100 - 200	DORM-1, DORM-2	100	Cai et Bayona, 1995
KOH/MeOH (3 ml, 25% m/v)	180	20 - 100	TORT-1, TORT-2, DOLT-2, DORM-1	94 - 106 (MeHg)	Ebdon et al., 2002
KOH/MeOH (20 ml, 25% m/v) ou HCl (1 ml, 6M)	120, ou 5	50	CRM-7402a	-	Inagaki et al., 2008
KOH/MeOH (2 ml)	60	500	Poissons et produits de la mer	91 ± 19 (MeHg)	Kuballa et al., 2009
HCl (0,2 ml)	40	50	TORT-2, DOLT-2, BCR-463	90 (MeHg)	Tu et al., 2000
HCl (5 ml, 6M)	30	500	BCR-710, IAEA-350	-	Ipolyi et al., 2004
HCl (2 ml)	60	500	Poissons et produits de la mer	91 ± 19 (MeHg)	Kuballa et al., 2009
HCl (7M) ; protease type XIV (15 mg) + 2-mercaptoethanol (2.5% v/v)	5	50	CRM-463, moules, poissons zèbre	81-90	Lopez et al., 2010
HCl (10 ml, 0,10 % v/v) + L- cysteine (0,05% m/v) + 2- mercaptoethanol (0,10% v/v).	15	200	DOLT-3, Produits de la pêche	100	Batista et al., 2011
HAc (2 ml)	120	500	Poissons et produits de la mer	91 ± 19 (MeHg)	Kuballa et al., 2009
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,5 ml)	30	100 - 500	Poissons et produits de la mer	-	Wilken et Falter, 1998

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

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

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

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

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

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

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

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

La MAE consiste à utiliser les propriétés de certains composés (solvants caractérisés par une constante diélectrique plus faible que la matrice considérée et relativement transparents aux micro-ondes) capables de transformer l'énergie électromagnétique (captée sous forme de radiation de longueur d'onde entre 1 cm et 1 m) en chaleur. En effet, les molécules dipolaires et les ions vont aligner leur moment dipolaire avec le champ électrique des micro-ondes. Ce champ étant en perpétuel mouvement, les molécules tournent dans tous les sens et provoquent ainsi des collisions avec les molécules voisines. Ces agitations créent un dégagement d'énergie donc une augmentation de la température et de la pression dans les récipients de digestion. Les composés d'intérêts vont alors être solubilisés dans le solvant en un minimum de temps (Paré et al., 1994, Bélanger et Paré 2006).

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

### II.1.4 Méthodes alternatives

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

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

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

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

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

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

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

### II.1.5 Conclusion

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

## II.2 Méthode de séparation et de détection

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

### II.2.1 Séparation par chromatographie liquide haute performance

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

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

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

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

Afin de rendre les méthodes plus aisément comparables entre elles, les limites de détection absolues ont été préférées aux valeurs relatives, voire calculées afin d'éviter de faire intervenir les facteurs de dilution ou de concentration dus aux traitements de l'échantillon. Les temps de rétention sont donnés uniquement à titre indicatif, car très souvent repérés visuellement sur les figures ; ce

paramètre ne figurant quasiment jamais dans les résultats, il est impossible de savoir s'il s'agit d'un temps de rétention corrigé ou non.

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

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

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

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

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

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

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

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

## II.2.4 Séparation par chromatographie en phase gazeuse

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

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

La dérivation des espèces mercurielles par butylation par le chlorure de magnésium butylé (BuMgCl) ou par génération d'hydrure par le borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) ont été fréquemment utilisées par le passé. La dérivation par BuMgCl n'est que très peu utilisée à présent car la procédure de préparation d'échantillon est longue. En effet, cette dérivation ne peut se faire qu'en milieu anhydre, il faut donc procéder à plusieurs transferts de phase, ce qui impacte sur les taux de récupération (50% en moyenne) (Quevauviller, 1996, Emteborg et al., 1999, Garcia Fernandez et al., 2000, Snell et Quétel, 2005). La dérivation par le  $\text{NaBH}_4$  est la moins coûteuse et la plus rapide par rapport à l'ensemble des autres techniques de dérivation (Tseng et al., 1997 et 1998). Cependant, le  $\text{NaBH}_4$  est peu utilisé en couplage GC-ICP-MS, méthode d'analyse la plus utilisée en spéciation du Hg, car les composés mercuriels hydrurés ont une stabilité thermique limitée (la température du plasma est trop élevée). De plus, les hydrures sont prompts aux interférences avec les autres métaux lourds et le  $\text{NaBH}_4$  à une efficacité limitée sur les échantillons réels.

Les réactifs alkylés sont actuellement les réactifs de dérivation les plus utilisés car la dérivation a lieu en milieu aqueux, milieu naturel de la majeure partie des échantillons biologiques (Lobinski et Adams, 1997, Tseng et al., 1997). Le tétraéthylborate de sodium ( $\text{NaBEt}_4$ ) est le réactif le plus populaire car très commercialisé et donc bon marché (Wasik et al., 1998, Slaets et al., 1999,

Martin-Doimeadios et al., 2002, Krystek et Ritsema, 2004, Point et al., 2007, Kuballa et al., 2009). Néanmoins, il manque de spécificité car le iHg et l'ethylmercure (EtHg) ont la même forme éthylée (Et<sub>2</sub>Hg). Il permet donc d'analyser uniquement le MeHg. Enfin, sa pureté est parfois insatisfaisante ; la présence d'impuretés métalliques a été observée dans certains lots (Garcia Fernandez et al., 2000, Leermakers et al., 2005). Le tétrapropylborate de sodium (NaBPr<sub>4</sub>) est de plus en plus sélectionné car il est plus pur, aussi efficace que NaBEt<sub>4</sub> et il permet d'analyser toutes les espèces mercurielles (Yang et al., 2003b, Monperrus et al., 2004 et 2008, Arleny et al., 2007, Carrasco et al., 2009). Par contre, étant moins abordable à l'achat, il est donc le plus souvent synthétisé en laboratoire. Comme pour le NaBEt<sub>4</sub>, le pH de dérivation doit être compris entre 4,5 et 5 sinon la dérivation n'est pas efficace et dans le cas du NaBPr<sub>4</sub>, le réactif peut se décomposer totalement ou partiellement (Huang, 2005). Enfin, le tétraphénylborate de sodium (NaBPh<sub>4</sub>) est le troisième réactif alkylé le plus utilisé (Abuin et al., 2000, Grinberg et al., 2003, Davis et al., 2004, Inagaki et al., 2008, Chung et Chang, 2010). Certains le préféreront aux autres réactifs alkylés car il est le plus stable en solution aqueuse et donc une préparation journalière de la solution de dérivation n'est pas nécessaire. Le NaBPh<sub>4</sub> est moins cher que le NaBEt<sub>4</sub> et le NaBPr<sub>4</sub> et le pH de dérivation peut s'étendre de 4 à 10. De plus, les importants temps de rétention des composés phénylés offrent une séparation plus nette entre le pic de solvant et les espèces phénylées. En contrepartie, la séparation des différentes espèces est plus longue. Ce réactif est le moins utilisé car il est généralement peu connu.

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

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

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

Le tableau 12 présente les principales études publiées depuis 1996.

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

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

\*LDa en pg Hg

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

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

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

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

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

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

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

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

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

\*LDa en pg Hg

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

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

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

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

### II.2.7 Conclusion

Au vu des difficultés que représente l'introduction d'un échantillon liquide carboné dans un détecteur ICP-MS et comme les composés mercuriels sont relativement volatils, une séparation par GC semble plus avantageuse. Le couplage GC-ICP-MS est moins simple à mettre en place (intervention d'une ligne de transfert thermostatée) que le couplage HPLC-ICP-MS (connexion directe par un câble PEEK) mais l'échantillon est introduit dans sa totalité et sous forme de gaz. Cet avantage non négligeable permet d'atteindre des LDA de l'ordre du fg. Notre choix se portera donc sur un couplage GC-ICP-MS équipé d'une colonne MXT et sur l'utilisation d'un réactif alkylé, de préférence le NaBPr<sub>4</sub>, comme agent de dérivation car il offre le meilleur compromis en termes d'efficacité et rapidité. Ce couplage a été préférentiellement choisi parmi les autres couplages présentés car il présente les meilleures performances analytiques mais aussi parce qu'il permet une analyse par dilution isotopique afin d'améliorer la justesse et la fiabilité des résultats.

## II.3 La dilution isotopique

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

### II.3.1 Principe

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

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

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

### II.3.2 Modes de calcul

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

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

$$c_s = c_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \times R_s} \right) \quad (1)$$

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

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

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

### II.3.3 Avantages et inconvénient

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

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

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

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

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

### **II.3.4 Conclusion**

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