

DÉTERMINATION DE L'ARSENIC TOTAL DANS LES ORGANISMES MARINS PAR SPECTROMÉTRIE DE FLUORESCENCE X À DISPERSION D'ÉNERGIE

A. El Moll and M. J. F. Leroy

Ecole Européenne de Chimie, Polymères et Matériaux de Strasbourg, Laboratoire de Chimie
Analytique et Minérale 25, rue Becquerel, 67008 Strasbourg, France
aelmoll@ifrance.com

(Received 16 May 2001 Accepted 25 February 2002)

RESUME

Cette étude présente la méthodologie analytique mise au point au laboratoire pour la quantification de l'arsenic total dans les organismes marins.

La méthode de la fluorescence X à dispersion d'énergie a été choisie afin de quantifier l'arsenic total dans le matériau de départ ainsi dans les solutions obtenues après extraction. La performance du protocole utilisé a été évaluée et la méthode a été validée par l'utilisation d'un matériau de référence et par comparaison avec une autre méthode de quantification.

Bien que cette technique soit peu décrite dans la littérature, elle présente le double avantages, de pouvoir être utilisée pour tous types d'échantillons qu'ils soient solides ou liquides, de ne nécessiter qu'une étape de prétraitement très simple, limitant ainsi la possibilité de pertes ou de contamination. La détermination est réalisée par la méthode des ajouts dosés directement sur la poudre de départ préparée par lyophilisation, broyage et tamisage de matériaux frais : Poissons (raie, plie, sole), crustacés (clams, vernies, escargot de mer), et mollusques (crevette, gambas).

La reproductibilité, la répétabilité et la linéarité de la méthode ont été ensuite prouvées pour les deux types d'échantillons (liquides et solides).

La validation interne de la méthode a été réalisée en vérifiant chaque étape de la chaîne complète d'analyse depuis la préparation de l'échantillon jusqu'à la détermination finale.

Mots clés: arsenic, organismes marins, EDXRF, ICP/AES

ABSTRACT

This study presents an analytical methodology developed for the quantitative analysis of total arsenic in marine organisms.

The method EDXRF has been chosen in order to determine total arsenic in the original materials and in the solutions obtained after extraction. The performance of the elaborated protocol has been evaluated and the method has been validated by the use of reference materials and by comparison with another method of quantification.

Although this technique is rarely described in the literature, it presents many advantages; it can be applied directly on all types of samples whether liquid or solid and only needs a simple pre-treatment stage, limiting the possibilities of loss or contamination.

The determination is realised by the "additions method" directly on the original powder prepared by lyophilisation, grinding and sifting of fresh materials: fishes (ray, plaice, sole), shellfish (sea snails, clams 1, clams 2) and molluscs (shrimps, gambas).

The reproducibility, the repeatability and linearity of the method developed have been proved for both types of samples (liquid or solid).

The internal validation has been finally performed by assessing the performance of each step of the analytical process from sample preparation to final quantification.

Keywords: arsenic, marine organisms, EDXRF, ICP/AES

INTRODUCTION

L'arsenic est présent dans les différents compartiments de l'environnement à des concentrations très variables allant de quelques-uns nanogrammes à plusieurs centaines de microgrammes par gramme. Les teneurs les plus élevées sont observées dans les organismes marins qui sont capables à la fois d'accumuler et de transformer cet élément.

La teneur totale dissoute dans les eaux océaniques semble peu variable, en particulier lorsqu'on est au dessus de la couche euphotique. Elle se situe le plus souvent entre 0,5 et 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Pour les eaux estuariennes et côtières, les variations enregistrées sont beaucoup plus importantes, elles sont en relation non seulement avec la variabilité des apports, mais aussi avec l'activité phytoplanctonique saisonnière. Dans les estuaires de la Loire et de la Gironde, le delta du Rhône, les teneurs en arsenic total dissous varient de 1 à 4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (Michel, 1993).

Dans les algues macroscopiques, les teneurs varient entre 3 et 200 $\mu\text{g.g}^{-1}$. L'accumulation sous forme d'arsénoribosides peut expliquer les concentrations particulièrement élevées que l'on retrouve dans les algues utilisées pour l'alimentation humaine (nori, wakame, spaghetti de mer, kombu).

Chez les crustacés, les concentrations varient de 10 à 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Chez les mollusques bivalves (moules, huîtres, coquilles Saint-Jacques), on observe des teneurs moyennes comprises entre 10 et 30 $\mu\text{g.g}^{-1}$.

Pour les poissons, la teneur en arsenic total est extrêmement variable et très dépendante de l'espèce considérée, de la taille des individus et de leur régime alimentaire. Les concentrations mesurées vont généralement de 5 à 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Les concentrations les plus faibles se retrouvent chez les espèces planctonophages telles que le bar, le maquereau et le hareng (5 à 20 $\mu\text{g.g}^{-1}$).

Des teneurs beaucoup plus importantes 100 à 250 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ont été notées chez des espèces en fin de chaîne alimentaire telles que le congre ou la roussette. Pour les poissons plats de fond (plie, sole, flet) les teneurs moyennes varient entre 10 et 60 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Il semble néanmoins que ces concentrations importantes d'arsenic dans les produits marins destinés à la consommation humaine ne posent pas un véritable problème car la majeure partie de l'arsenic (entre 80 et 90%) est sous forme organique non toxique (arsénobétaïne, arsénocholine, arsénosucres et arsénolipides) (Nriagu *et al.*, 1990; Cullen and Dodd, 1989; Beauchemin *et al.*, 1988).

La plupart des auteurs utilisent des techniques classiques telles que la spectrométrie d'émission atomique, d'absorption atomique à four en quartz ou d'absorption atomique à four en graphite pour déterminer la teneur totale en arsenic dans les échantillons naturels après mise en solution par minéralisation (Lopezgonzalvez *et al.*, 1995; Pergantis *et al.*, 1994; Cervera *et al.*, 1989). Bien que la spectrométrie de fluorescence X soit beaucoup plus rarement utilisée, elle présente un certain nombre d'avantages. Cette technique de détermination peut en effet être utilisée pour tous les types d'échantillons, qu'ils soient liquides ou solides et ne nécessite qu'une simple étape de prétraitement, limitant ainsi les possibilités de perte ou de contamination éventuelles (Bertin, 1975; Alberti *et al.*, 1995; Holak *et al.*, 1991; Cullen *et al.*, 1989; Alberti *et al.*, 1995; Thayer, 1984; Quevauviller *et al.*, 1995).

Les spectromètres de fluorescence X sont grossièrement classés suivant le type d'analyse: ils peuvent être dispersifs en longueur d'onde donc mono-élémentaires, ou dispersifs en énergie donc multi-élémentaires. C'est cette dernière technique de détermination que nous avons choisie car elle est particulièrement adaptée à l'utilisation de standards internes multiples dans la détermination par la méthode d'ajouts dosés que l'on décrira dans la suite.

MATERIEL ET METHODE

I - Principe de la spectrométrie de fluorescence X

Cette technique d'analyse consiste à irradier l'échantillon avec une source émettant des photons X de grande énergie (plusieurs dizaines de keV), ce qui donne naissance à un type de fluorescence particulier situé dans le domaine des rayons X. Le processus s'effectue en deux étapes:

La première correspond à une phase d'excitation au cours de laquelle les photons X incidents provoquent une ionisation interne des atomes qui se traduit, si l'énergie incidente est suffisante, par l'arrachement d'un électron profond.

La deuxième phase correspond à la stabilisation de l'atome ionisé. La lacune créée précédemment est comblée et il se produit une réorganisation des électrons qui ramène l'atome à son état fondamental.

La durée de vie de l'état excité est très faible, de l'ordre de 10^{-16} s.

Les transitions électroniques se font dans les couches les plus profondes, en tenant compte des règles de sélection. Ainsi, comme les sauts énergétiques sont très intenses, il y a émission radiative d'un photon de longueur d'onde λ très courte. Son énergie E s'exprime par

$$E = h c / \lambda = |E_2 - E_1|$$

où E_1 est l'énergie à l'état initial de l'électron éjecté, E_2 est l'énergie de l'électron qui prend la place libérée.

A chaque type d'atome correspond un ensemble de transitions spécifiques obéissant à des règles de sélection optiques. Les raies sont désignées par une suite de symboles. Ainsi $K\beta$ précise à la fois l'élément (As), la position de la lacune (couche K), la séparation entre les niveaux de départ et d'arrivée de l'électron migrant (α pour 1 β pour 2) (Bertin, 1975)

En général, les raies $K\beta$ sont six fois moins intenses que les raies $K\alpha$. Dans le Tableau 1 figurent quelques exemples d'énergies de raies $K\alpha$ et $K\beta$.

TABLEAU 1

Energies des Raies de Fluorescence X de Certains Eléments (KeV)

Elément	Raie $K\alpha$	Raie $K\beta$	Raie $L\alpha$	Raie $L\beta$
Arsenic	10,530	11,722	1,282	1,317
Plomb	-	-	10,549	12,611
Yttrium	14,932	16,734	-	-
Vanadium	4,949	5,426	-	-
Brome	11,907	13,290	1,480	1,526

II - Description du spectromètre de fluorescence X à dispersion d'énergie

L'appareil utilisé a été développé au laboratoire. Il est composé de trois parties principales:

1 - La source de rayons X (Figure 1): l'ionisation des couches profondes des atomes s'effectue par utilisation d'un tube à rayons X. Celui-ci est constitué d'une enceinte placée sous vide poussé (10^{-6} mm Hg) où des électrons sont émis par un filament chauffé. Les électrons sont ensuite accélérés par un champ électrique créé par une haute tension appliquée entre l'anode et la cathode (10 à 50 KeV), l'anode étant constituée de molybdène dans notre cas. La puissance maximale utilisable du tube X est de 1,2 kW.

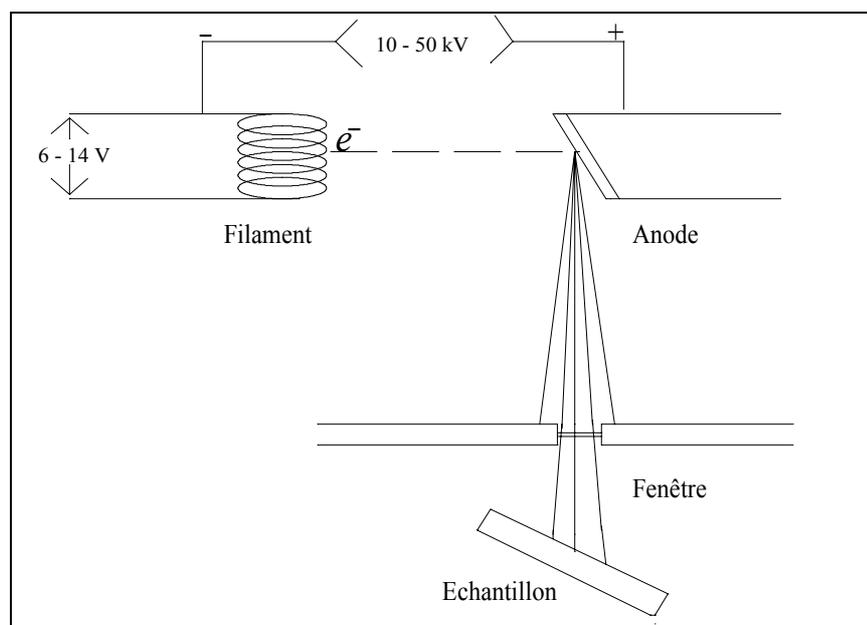


Figure 1. Schéma de principe d'un tube à rayons X et méthode d'excitation de l'échantillon.

2 - La chambre d'irradiation : cette chambre peut travailler sous vide et comporte un passeur d'échantillons à plusieurs positions pouvant recevoir des pastilles de 13 mm de diamètre ou des supports en polypropylène pour l'analyse d'échantillons liquides. L'échantillon est irradié directement sous une géométrie optimale. Le fond continu est réduit par des filtres. Un porte-filtre à huit positions est intercalé entre le tube et l'échantillon.

Dans cette étude, deux épaisseurs de filtre de molybdène (150 μm et 300 μm) ont été utilisées. Ensuite le faisceau de rayons X est canalisé dans un collimateur cylindrique. Enfin, pour éviter la pénétration directe du faisceau incident dans le détecteur, un autre collimateur est placé à l'entrée du détecteur et regarde l'échantillon sous un angle de quelques degrés: la partie mesurable de l'échantillon est ainsi un cercle de 5 mm de diamètre. Le plateau porte-échantillon est actionné par un moteur pas à pas piloté par ordinateur.

3 - Le détecteur : il est constitué d'un cristal semi-conducteur Si(Li) associé à un préamplificateur, les deux étant refroidis à l'azote liquide. Le cristal est protégé par un vide poussé de 10^{-6} mm de Hg et se situe derrière une fenêtre de béryllium de 7 μm d'épaisseur qui permet de détecter les éléments légers.

La Figure 2 donne un aperçu schématique du spectromètre utilisé.

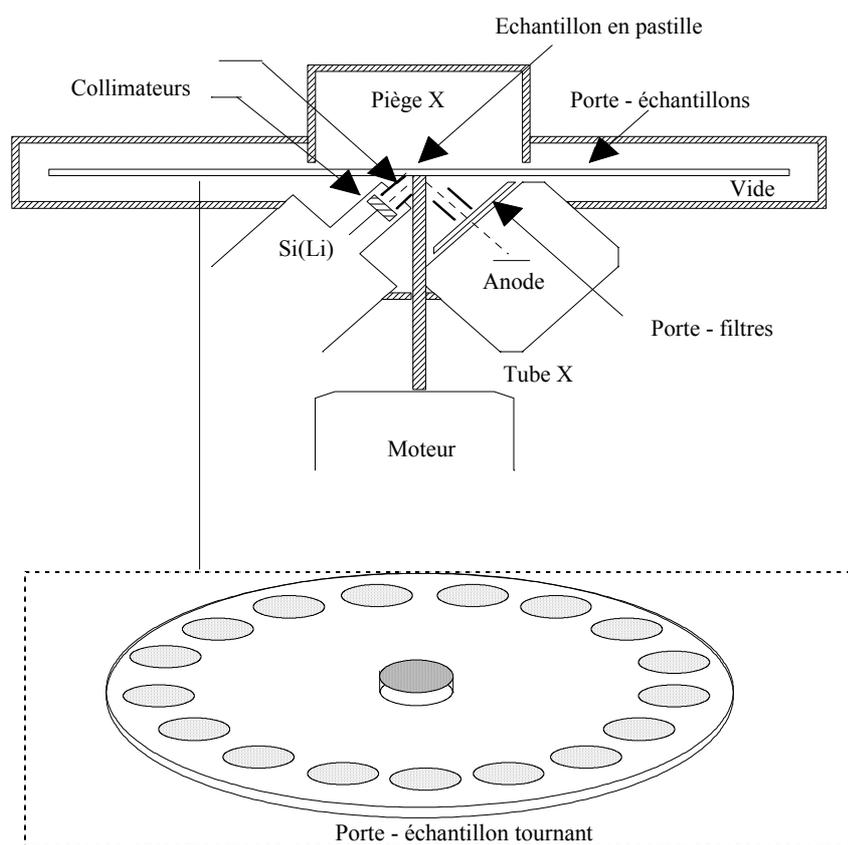


Figure 2. donne un aperçu schématique du spectromètre utilisé.

III - Mise en œuvre expérimentale

1- Préparation et caractérisation de l'échantillon

Le travail que nous avons réalisé porte sur deux types d'échantillons:

- des échantillons solides (poudres de poissons et de fruits de mer);
- des échantillons liquides obtenus par extraction des précédents.

A- Préparations des poudres

Préparation

Les poissons et fruits de mer (bivalves et crustacés) objet de cette étude ont été achetés au grande surface de Strasbourg, nettoyés sous un courant d'eau et coupés. Ils ont ensuite été lyophilisés, réduits en poudre à l'aide d'un broyeur domestique et tamisés sur un tamis de 250 μm . La poudre obtenue a été mise pendant quelques jours dans un dessiccateur

en présence de silicagel afin d'obtenir un échantillon sec. Les échantillons ainsi obtenus ont été conditionnés dans des bouteilles en verre brun à double fermeture et stockés à température ambiante. Une balle en Téflon, destinée à permettre l'homogénéisation de la poudre avant chaque utilisation, a été introduite dans chaque bouteille avant fermeture.

Mesure de taux d'humidité

La mesure du taux d'humidité a été réalisée à l'aide de plusieurs prises d'essai d'environ 200 mg de poudre pesées exactement. Le séchage se fait dans une étuve à 105°C pendant trois heures suivant l'un des protocoles préconisés par le Bureau Communautaire de Référence. L'échantillon est remis dans l'étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La perte en poids est calculée en pourcentage. Il faut noter que la correction par le taux d'humidité est absolument nécessaire dans l'étape de la quantification de l'arsenic. Le taux d'humidité des échantillons utilisés (raie, plie, sole, clams, escargot de mer, vernies, crevettes, et gambas) ne dépasse pas 8 %.

B- Préparation des extraits

L'extraction de l'arsenic présent dans les différentes poudres ainsi préparées est réalisée à l'aide d'un mélange eau/méthanol.

Environ 1 g d'échantillon pesé avec précision est mis en suspension dans 10 ml d'un mélange eau/méthanol (1:1), le système est agité pendant 15 minutes dans un bain à ultra-sons puis filtré sur un fritté de porosité 3. Le résidu est ré-extrait 4 fois suivant la même procédure. Les filtrats obtenus sont évaporés jusqu'à un volume d'environ 2 ml puis regroupés pour obtenir l'extrait final qui est transvasé et conditionné dans des bouteilles en polyéthylène conservées dans le réfrigérateur. L'extrait doit être ensuite analysé le plus rapidement possible car des moisissures commencent à apparaître dans les flacons après une ou deux semaines de stockage.

2 - Méthodes de quantification

Deux méthodes de quantification ont été utilisées lors de nos analyses par spectrométrie de fluorescence X:

A - Méthode de comparaison

La méthode de quantification par comparaison peut être mise en œuvre sur les solides grâce à l'utilisation de matériaux de références de matrices comparables. Les spectres entrant dans la comparaison doivent être normés sur le profil du molybdène (raie Compton $K\beta$). La comparaison du rapport des signaux ($K\alpha$ élément) / ($K\beta$ Compton Mo) entre le spectre du matériau étudié et celui du matériau de référence permet d'obtenir une valeur approchée de la concentration de l'élément dans l'échantillon.

Cette méthode a été utilisée pour estimer la teneur en arsenic de nos poudres de poissons et de fruits de mer de manière à pouvoir choisir la concentration de la solution étalon à utiliser par la suite dans la méthode (quantitative) des ajouts dosés (voir paragraphe suivant).

La méthode de comparaison s'est par ailleurs révélée être la seule possibilité de quantification de l'arsenic dans les résidus d'extraction étant donné la faible quantité de matière disponible.

B- Méthode des ajouts dosés

La procédure mise en œuvre est différente selon que l'échantillon est liquide ou solide.

a / Echantillon solide:

L'estimation de la teneur en arsenic obtenue par la méthode de comparaison permet de choisir la concentration de la solution étalon. Cette solution est préparée par dissolution d'arséniate de sodium ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 98,5 %, Prolabo) dans de l'eau ultrapure (résistivité 18 M Ω . cm) obtenue avec un système Milli-Q-RG (Millipore, France).

La poudre d'échantillon est bien mélangée par agitation pendant trois minutes. Six prises d'essai d'environ 100 mg pesées exactement à 0,1 mg près sur une balance de précision (Mettler AE 166) sont comprimées sous une pression de 10 tonnes à l'aide d'une presse (Graseby Sepcac) dans un moule à pastiller de 13 mm de diamètre. Les surfaces métalliques des pièces du moule sont soigneusement rincées à l'alcool éthylique avant chaque utilisation.

Trois pastilles d'environ 200 mg, et d'un diamètre de 16 mm (pastilles ajouts), sont fabriquées de la même façon. On dépose ensuite soigneusement une goutte de 100, 150 et 200 μl respectivement de la solution étalon d'arsenic sur chaque pastille de 200 mg. Il est important que la goutte déposée recouvre toute la surface de la pastille afin d'obtenir un séchage homogène. La concentration de la solution étalon doit être connue avec une bonne précision (erreur ne dépassant pas 1 %). On la choisit égale à environ trois fois la concentration estimée par la méthode de comparaison. Chaque pastille est séchée, rebroyée et divisée en deux pastilles de 100 mg. Le mortier est lavé et rincé à l'alcool éthylique après chaque usage pour enlever les dernières traces issues des manipulations précédentes. La Figure 3 présente la manière dont nous avons opéré l'ajout d'une goutte de la solution standard sur une pastille de 200 mg.

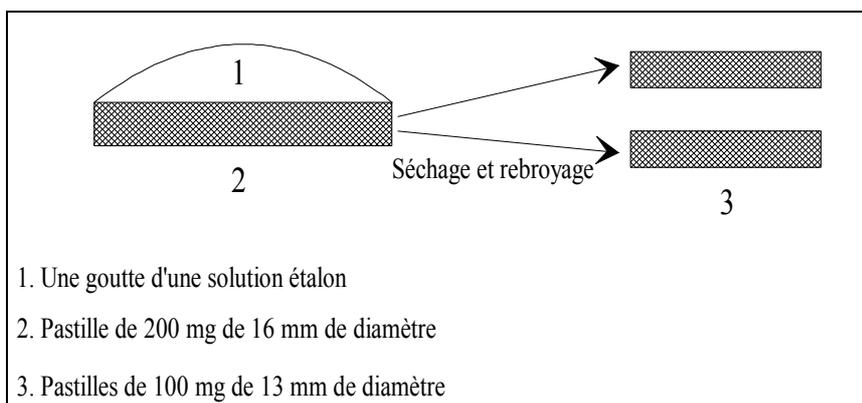


Figure 3 : Mise en œuvre de la méthode de détermination par ajouts dosés sur les solides.

L'ensemble de cette procédure conduit à l'obtention de 12 pastilles (6 pastilles pures et 6 pastilles ajouts) qui sont placées dans le porte-échantillon du spectromètre et analysées dans les conditions opératoires suivantes:

filtre de molybdène de 300 μm ,
Tension: 40 keV, intensité: 25 mA
Temps d'analyse: 2000s

Les courbes d'ajouts dosés [rapport des surfaces (raie $K\alpha$ de l'arsenic / (raie $K\alpha$ ou $K\beta$ étalon interne) en fonction de la concentration des ajouts] sont tracées en prenant quatre étalons internes différents: Mo, Br, Zn et Fe.

L'utilisation d'un étalon interne est indispensable du fait de la possibilité d'existence d'effets inter-éléments ou d'effets de matrice. Elle permet également de corriger les effets géométriques de position (ex. pastille mal placée), la surface ou la régularité de l'épaisseur de la pastille (ex. mauvais pastillage), la granulométrie et la densité (ex. homogénéité de la poudre).

Un logiciel de calcul permet d'obtenir, pour chaque étalon interne, le coefficient de corrélation de la droite d'ajouts, la concentration en arsenic, l'écart-type et l'intervalle de confiance correspondant. Ces valeurs nous permettent de déduire le meilleur étalon interne.

Le logiciel de calcul utilisé, Spectrace 1.34, est particulièrement adapté à la méthode des ajouts dosés avec standards internes multiples. Ce programme d'analyse permet de tracer et de visualiser les droites d'étalonnage qui correspondent à chaque élément. Il fournit aussi des données statistiques sur ces droites ainsi que la pente et l'intercept qui est la valeur cherchée.

L'avantage de ce programme d'analyse est qu'il réalise la deconvolution des pics interférents et recherche également la ligne de base sous les pics à l'intérieur d'une région d'intérêt en faisant la moyenne des impulsions du fond. pour réaliser la deconvolution et déterminer la surface du pic, le programme utilise un spectre de référence de l'élément pur préalablement établi et mis en mémoire. ainsi le recouvrement des raies $k\alpha$ de l'arsenic et β de plomb (même énergie 10,5 keV) est en particulier résolu convenablement.

La Figure 4 présente un récapitulatif du protocole d'analyse mis en œuvre.

b / Echantillon liquide :

Trois solutions étalons sont préparées, comme pour l'analyse des solides, à partir du sel d'arséniate $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 98 %. Les concentrations sont choisies dans la gamme 0- C_0 où C_0 est la concentration recherchée que l'on doit obtenir si tout l'arsenic est extrait de la poudre.

Quatre tubes en polycarbonate sont ensuite remplis par 100 μl de l'extrait et 100 μl d'eau ultra pure ou d'une des solutions étalons d'arsenic et 200 μl d'une solution aqueuse contenant du vanadium et de l'yttrium (100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ en V, 7,65 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ en Y) dans le polyéthylèneglycol 1% (m/v).

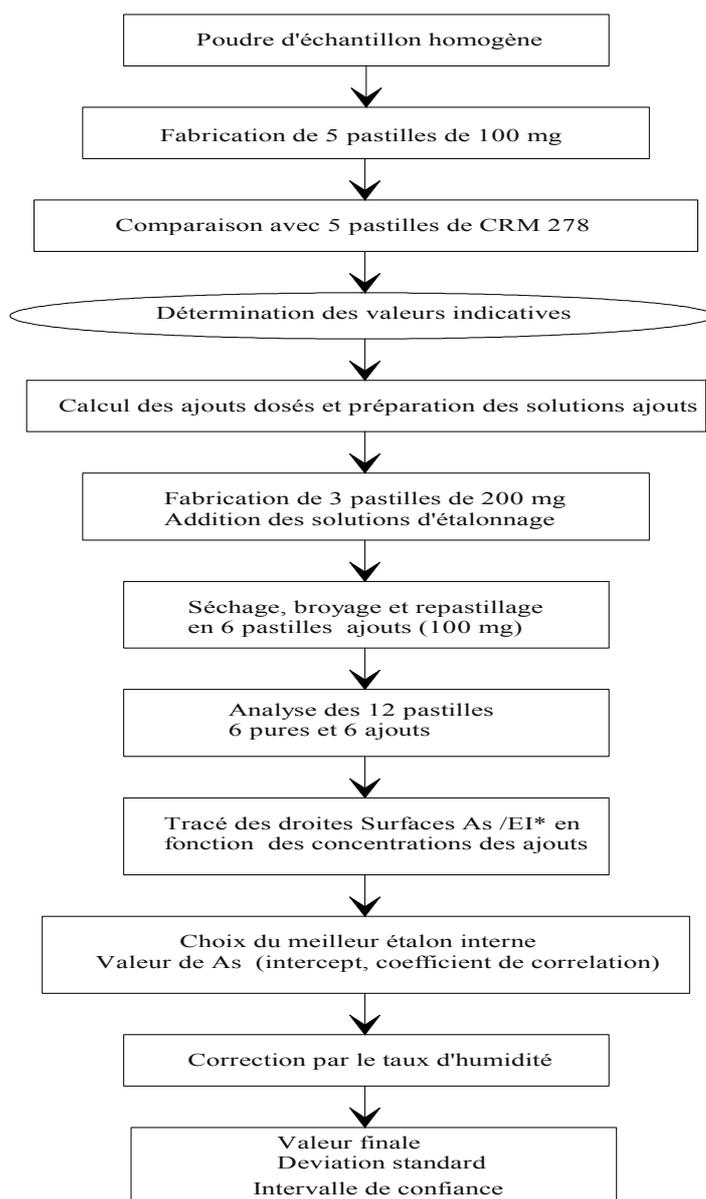


Figure 4. Démarche expérimentale adoptée dans la détermination totale de l'arsenic dans les poudres (*EI / étalon interne).

L'yttrium et le vanadium servent d'étalons internes pour corriger les erreurs possibles liées au mauvais centrage des gouttes. Le polyéthylène glycol est ajouté pour limiter la migration irrégulière des éléments dans la goutte lors du séchage.

Toutes les quantités introduites sont pesées avec précision. Trois gouttes de 10 µl de chaque solution sont déposées sur le plateau sur des feuilles de polypropylène de 8 µm d'épaisseur tendues entre deux anneaux concentriques et placées sur le porte-échantillon. La série des 12 dépôts est séchée à température ambiante à l'abri des poussières et analysée dans les mêmes conditions que les solides mais avec un filtre de molybdène de 150 µm d'épaisseur.

La méthode de calcul utilisée est identique à celle qui a été décrite pour les solides, les étalons internes étant dans ce cas l'yttrium et le vanadium.

RESULTATS ET DISCUSSION

La validation interne de la méthode consiste à évaluer ses performances selon deux types de critères : les critères primaires (répétabilité, reproductibilité, exactitude et limite de détection) et les critères secondaires (linéarité, limite de quantification, sélectivité, et sensibilité).

Cette étape est souvent réalisée par utilisation d'un matériau de référence, certifié par des organismes tels que : SMT (Standards, Measurement and Testing Programme, Belgique).

Les performances de la méthode ont été évaluées en utilisant un matériau de référence dont la matrice est similaire à celle de nos échantillons, dont l'homogénéité a été prouvée et dont la teneur en arsenic est certifiée (valeur certifiée $5,91 \pm 0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Il s'agit d'une poudre de tissus de moules, CRM 278, commercialisée par le Bureau Communautaire de Référence de Burexelles.

I - Validation du protocole d'analyse de l'arsenic par Spectrométrie de Fluorescence X dans la poudre de poissons et de fruits de mer.

A - Evaluation des performances de la méthode

1 - Linéarité

Une solution étalon mère de concentration en arsenic de $967,0 \pm 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a été préparée par pesée à partir du sel d'arsenic $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (98,5 %, Prolabo) et d'eau ultrapure (18 MΩ.cm). Trois solutions étalons ont ensuite été réalisées par dilutions non successives de la solution mère. Ces solutions ont été utilisées dans les ajouts sur les pastilles selon le protocole décrit au paragraphe A.

Les courbes (surface $K\alpha$ As) / (surface $K\beta$ étalon interne) en fonction de la concentration en arsenic (Figure 5) montre que, dans une gamme de concentration de 0 à $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, la réponse du détecteur est une fonction linéaire de la concentration en arsenic si les étalons internes sont Mo, Br ou Fe. Le coefficient de corrélation obtenu après régression

linéaire des courbes est de 0,998 lorsque l'étalon interne est le molybdène, de 0,997 lorsque l'étalon interne est le brome ou le fer. La valeur extrêmement faible ($r = 0,8$) obtenue avec le zinc, nous a conduit à abandonner cet étalon dans la suite de notre étude.

Figure 5. Etude de la linéarité de la méthode sur un échantillon de référence (CRM 278).

2 - Reproductibilité et répétabilité

La répétabilité et la reproductibilité de la mesure ont été évaluées à partir de l'analyse d'une même pastille de 100 mg fabriquée suivant le protocole décrit dans la première partie. L'analyse a été réalisée dans les conditions données au paragraphe 2 en prenant le molybdène et le brome comme étalons internes.

La répétabilité de la mesure a été évaluée en effectuant cinq mesures consécutives sur cette pastille sans modifier les conditions opératoires. La reproductibilité a quant à elle été évaluée à partir de cinq mesures réalisées sur la même pastille en changeant sa position sur le plateau porte-échantillon.

Les résultats, exprimés à l'aide des coefficients de variation, sont regroupés dans le Tableau 2.

TABLEAU 2
Etude de la Reproductibilité et de la Répétabilité de la Mesure

CRM 278	C.V (%)		
	As / Mo	As / Br	As / Fe
Répétabilité	4,87	5,58	5,93
Reproductibilité	5,95	6,67	5,71

Les valeurs sont élevées, ce qui peut s'expliquer par un problème de déconvolution lié à la présence de plomb ($2 \mu\text{g.g}^{-1}$). On peut également constater que la reproductibilité et la répétabilité sont meilleures lorsque le molybdène est utilisé comme étalon interne.

3 – Exactitude

Les droites d'ajouts tracées lors de l'étude de linéarité permettent, à partir de l'intercept, de déterminer la concentration en arsenic du CRM 278. La valeur trouvée par spectrométrie de fluorescence X est $6,12 \pm 0,15 \mu\text{g.g}^{-1}$ ($r = 0,998$) en prenant le molybdène, de $6,31 \pm 0,35 \mu\text{g.g}^{-1}$ ($r = 0,997$) en prenant le brome et $6,24 \pm 0,36 \mu\text{g.g}^{-1}$ ($r = 0,997$) en prenant le fer comme étalon interne.

On voit que l'écart à la valeur certifiée ($5,91 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$) est plus faible lorsqu'on utilise le molybdène. C'est donc cet étalon qu'on a décidé d'utiliser pour l'analyse de nos échantillons.

4 – Sensibilité

Pour donner une idée de la sensibilité de l'appareil utilisé, on a calculé le rapport signal/grandeur mesurée dans les conditions décrites précédemment. La mesure de la raie $K\alpha$ de l'arsenic donne 109 coups par μg avec un temps d'analyse de 2000 secondes.

5 - Limite de détection, limite de quantification

Il a été montré (Bertin, 1975) que la limite de détection peut être calculée, en spectrométrie de fluorescence X, à partir de l'expression suivante :

$$\text{Limite de Détection} = 3C\sqrt{N_b} / N_p \cdot \sqrt{t}$$

N_b : surface du bruit de fond de la raie $K\alpha$ de l'élément dans un échantillon quelconque

N_p : surface du pic net (sans bruit de fond)

C: concentration en arsenic dans l'échantillon

t : temps d'accumulation (en kilo secondes)

La limite de quantification, L.Q, est directement liée à la limite de détermination (L.Q = 10/3 L.D) (Quevauviller et al., 1995) . Les valeurs obtenues pour ces deux grandeurs sont respectivement :

$\begin{aligned} \text{L.D} &= 0,34 \mu\text{g.g}^{-1} \\ \text{L.Q} &= 1,11 \mu\text{g.g}^{-1} \end{aligned}$
--

Cette limite de quantification est suffisamment basse pour l'analyse de la plupart des poissons et fruits de mer.

B – Analyse par fluorescence X à dispersion d'énergie en utilisant quatre étalons internes différents

Les courbes d'ajouts dosés (rapport des surfaces raie $K\alpha$ de l'arsenic / raie $K\alpha$ ou $K\beta$ étalon interne en fonction de la concentration des ajouts) ont été tracées en prenant quatre étalons internes différents: Mo, Br, Zn et Fe.

On constate que le Mo donne de meilleurs valeurs de coefficient de corrélation.

Le Tableau 3 représente les résultats obtenus par la méthode de dosage de l'arsenic par EDXRF dans les huit échantillons.

II - Validation du protocole d'analyse de l'arsenic par Spectrométrie de Fluorescence X dans les extraits de poissons et de fruits de mer.

La validation de la méthode développée pour l'analyse des extraits a été réalisée selon la même démarche que celle adoptée pour l'analyse des poudres, mais l'évaluation interne a été effectuée sur des échantillons réels puisqu'il n'existe pas de matériau de référence disponible dans le commerce.

Par ailleurs, les résultats obtenus par EDXRF ont été comparés à ceux obtenus par une autre méthode de quantification telle que la spectrométrie d'émission atomique à plasma induit par haute fréquence (ICP/AES).

A - Evaluation des performances de la méthode

1 - Linéarité par étalonnage avec des solutions étalons d'As(V)

La linéarité de la méthode a été étudiée sur un extrait de chacun des échantillons en effectuant des ajouts d'As(V) dans une gamme de concentration en arsenic allant de 0 à 20 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Une solution étalon mère de concentration en arsenic de $967,0 \pm 0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ a été préparée par pesée à partir du sel d'arsenic $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (98,5 %, Prolabo) et d'eau ultrapure (18 M Ω .cm). Trois solutions étalons ont ensuite été réalisées par dilutions non successives de la solution mère. Ces solutions ont été utilisées pour les ajouts sur les extraits.

TABLEAU 3
Résultats par la Méthode de Dosage de l'Arsenic par EDXRF dans Huit Echantillons

Echantillon	As /E.I	Intercept	Déviati Standard	Pente	Coefficient de corrélation	Valeur Moyenne ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
raie	As/Mo	86.9791	2.181	916.288	0.9992	96.0 \pm 4.3
	As/Br	93.0253	1.356	47.803	0.9993	
	As/Zn	76.0503	3.97	15.06	0.996	
	As/Fe	95.4991	7.46	3.18065	0.9365	
plie	As/Mo	48.1373	1.147	855.578	0.9993	54.0 \pm 2.4
	As/Br	52.8384	0.756	28.207	0.9984	
	As/Zn	50.8612	1.83	15.206	0.9992	
	As/Fe	41.2455	3.22	1.988	0.9637	
sole	As/Mo	24.6015	0.966	978.788	0.9992	25.5 \pm 0.3
	As/Br	26.8495	0.844	34.511	0.9984	
	As/Zn	24.2405	2.29	15.595	0.9991	
	As/Fe	24.3052	4.62	2.9717	0.9766	
escargot de mer	As/Mo	45.8037	1.185	1127.3015	0.9996	48.5 \pm 0.2
	As/Br	49.6220	4.52	135.0127	0.9973	
	As/Zn	45.543	1.57	51.0938	0.9997	
	As/Fe	53.836	3.96	13.1014	0.9726	
clams	As/Mo	23.9647	1.10	1186.965	0.9970	25.0 \pm 0.3
	As/Br	24.2317	0.272	193.968	0.9995	
	As/Zn	24.6408	0.94	32.081	0.9971	
	As/Fe	25.737	1.611	21.969	0.9836	
vermies	As/Mo	37.211	2.02	1305.966	0.9927	36.6 \pm 0.9
	As/Br	35.925	1.668	290.924	0.9992	
	As/Zn	33.985	2.28	26.8890	0.9974	
	As/Fe	27.9522	1.82	78.9821	0.9722	
crevette	As/Mo	3.6060	0.92	937.533	0.9970	3.8 \pm 0.1
	As/Sr	3.5477	0.879	297.524	0.9974	
	As/Zn	3.5917	0.877	29.1168	0.9974	
	As/Fe	3.4286	-	42.6336	0.9929	
gambas	As/Mo	1.2332	0.353	891.465	0.9965	1.2 \pm 0.1
	As/Br	1.2428	0.359	45.604	0.9951	
	As/Zn	1.1367	0.338	33.78	0.9977	
	As/Sr	1.1500	0.34	56.2854	0.9970	

Figure 6. Etude de la linéarité de la méthode sur un extrait de l'escargot de mer.

La Figure 6 montre la courbe (surface $K\alpha$ As) / (surface $K\beta$ étalon interne) en fonction de la concentration en arsenic obtenue pour l'escargot de mer.

Le coefficient de corrélation calculé après régression linéaire est de 0,9990 lorsque l'étalon interne est le V, de 0,9986 lorsque l'étalon interne est le Y.

TABLEAU 4

Coefficients de Corrélation Obtenus pour Chaque Echantillon

sole	0,9983	0,9981
clams	0,9963	0,9989
escargot de mer	0,9990	0,9986
vernies	0,9951	0,9975
crevettes	0,9982	0,9989
gambas	0,9962	0,9953

Ceci montre que la réponse du détecteur est une fonction linéaire de la concentration en arsenic dans le domaine de concentration étudié.

2 - Linéarité par étalonnage avec des solutions étalons d'arsénobétaïne

Afin de vérifier que la réponse de l'appareil ne dépend pas de l'étalon utilisé, on a réalisé la même expérience en remplaçant la solution d'As(V) par une solution d'arsénobétaïne de même concentration. La pente des deux droites d'ajouts obtenues ainsi que les coefficients de corrélation correspondants figurent dans le Tableau 5.

TABLEAU 5

Variation du Coefficient de Corrélation et de la Pente de la Droite d'Ajouts en Fonction de la Nature de la Solution Etalon

Composé étalon	Pente	Coefficient de corrélation
As (V)	14,67	0,9990
arsénobétaïne	15,0	0,9992

Compte tenu des erreurs commises, on peut considérer que les pentes trouvées ne sont pas significativement différentes.

Le coefficient de corrélation est par ailleurs excellent. La méthode des ajouts peut donc être réalisée indifféremment avec des étalons d'As(V) ou d'arsénobétaïne. Rappelons que la solution étalon d'arsénobétaïne est non disponible dans le commerce et elle a été synthétisée au laboratoire avec une pureté supérieure à 99,5 %.

3 – Reproductibilité

La reproductibilité de la mesure a été évaluée en effectuant l'analyse de cinq dépôts différents d'une même solution. Les résultats sont résumés dans le Tableau 6.

TABLEAU 6

Etude de la Reproductibilité de la Mesure

Echantillon	C.V. (%)	
	As /V	As /Y
raie	2,19	1,79
plie	0,60	0,23
sole	3,59	4,66
clams	2,87	2,80
escargot de mer	1,80	0,76
vernies	6,51	3,26

Les valeurs obtenues pour les crevettes et le gambas sont élevées. On a ensuite évalué la reproductibilité de la méthode sur un seul échantillon pour lequel un même extrait a été analysé cinq fois par la méthode des ajouts dosés. Le Tableau 7 donne les valeurs obtenues pour cinq analyses de l'escargot de mer.

TABLEAU 7

Reproductibilité de la Méthode

Echantillon (n = 5)	Moyenne	Ecart type	C.V. (%)
escargot de mer	46,0	1,4	3,0

Les résultats présentés dans le Tableau 7 montrent la bonne reproductibilité de la méthode. Les écart-types présentés dans ce tableau prennent en compte non seulement l'incertitude liée à l'extraction mais également celle qui provient de la détermination.

4 – Sensibilité

La sensibilité de l'appareil calculée pour un échantillon liquide est 15270 coups par μg avec un temps d'analyse de 1000 secondes dans les mêmes conditions décrites précédemment.

5 - Limite de détection - limite de quantification

La limite de détection et la limite de quantification sont calculées suivant les mêmes formules présentées dans le paragraphe 5.

Les valeurs obtenues pour ces deux grandeurs sont respectivement :

$$\begin{aligned} \text{L.D} &= 0,03 \mu\text{g.ml}^{-1} \\ \text{L.Q} &= 0,1 \mu\text{g.ml}^{-1} \end{aligned}$$

B - Comparaison avec une deuxième procédure d'analyse

1 - Description de la deuxième procédure

Afin de poursuivre la vérification de la validité de la méthode, on a mis au point une autre procédure d'analyse qui consiste à déterminer la teneur en arsenic par spectrométrie d'émission atomique à plasma induit par haute fréquence (ICP/AES).

Plusieurs sources d'erreurs peuvent à priori être introduites dans l'étape de détermination finale (mauvais contrôle de la courbe d'étalonnage, présence d'interférences et /ou d'effets de matrice, recouvrement des pics, absence de correction de la ligne de bas).

2 – Appareillage et conditions opératoires

Le spectromètre d'émission atomique utilisé est un appareil JY 24 de JOBIN YVON® les caractéristiques du spectromètre d'émission atomique utilisé sont :

Générateur : 40,68 MHz, puissance maximale 1500 watts.

Torche ICP : Torche démontable en quartz, équipée d'un gaineur de gaz .

Système d'introduction de l'échantillon : Pompe péristaltique (Perkin-Elmer) qui assure le transport de la solution au nébuliseur, Nébuliseur de type Meinhard, chambre de nébulisation de type Scott.

Débit d'argon : Gaz plasmagène 12 l./min, Gaz de gainage 0.2 l./min, Gaz de nébulisation 0.3 l./min.

Longueur d'onde de détection : 193,7 nm.

Débit d'introduction de l'échantillon : 1 ml./min

C - Comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes.

Détermination par spectrométrie d'émission atomique (ICP/AES)

La détermination de l'arsenic total dans les extraits est effectuée par étalonnage direct par la spectrométrie d'émission atomique suivant les conditions opératoires décrites dans la première partie.

La détermination de l'arsenic total dans un extrait de raie a donc été effectuée par EDXRF et par ICP/AES. L'analyse par ces deux techniques a permis de comparer entre les deux méthodes de détermination. On obtient $91,9 \pm 1,2$ ($\mu\text{g.g}^{-1}$) en utilisant l'EDXRF et $92,5 \pm 1,7$ ($\mu\text{g.g}^{-1}$) en utilisant l'ICP/AES.

La méthode de détermination par EDXRF donc donne des valeurs parfaitement comparables a celles obtenues par spectrométrie d'émission atomique.

D - Evaluation de l'étape de l'extraction

Afin d'apprécier l'aspect quantitatif de la méthode d'extraction, on a déterminé pour chaque type d'échantillon, la quantité totale d'arsenic et le taux de récupération en calculant le pourcentage du rapport As extrait/ As total dans la poudre. La comparaison de la valeur obtenue par la somme de la concentration dans le résidu et dans l'extrait avec celle trouvée dans la poudre d'origine montre bien qu'il n'y a pas de perte au cours de la mise en solution (Tableau 8).

Le bilan de masse établi et présenté dans le Tableau 8 montre que le taux de récupération de l'arsenic se situe entre 85 et 99% pour tous les échantillons. Excepté les bivalves (clams et vernies) où les pourcentages d'extraction sont respectivement de 75% et 60 %. Ceci est vraisemblablement dû à la présence d'espèces liposolubles (arsénolipides) dans les matériaux étudiés, donc non extractibles dans le mélange eau/méthanol (1 :1) ou d'arsénosucres dont les concentrations sont trop faibles pour être détectées. (Larsen *et al.*, 1995).

TABLEAU 8
Evaluation du Taux de Récupération de l'Arsenic par Extraction
(concentrations en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Echantillon	Arsenic total dans la poudre	Arsenic total dans l'extrait	Arsenic total dans le résidu	Taux de récupération (%)
raie	93,1 ± 2,1	92,1 ± 2,1	0,8	99,1
Plie	54,1 ± 2,0	52,1 ± 1,3	1,0	97,8
sole	25,7 ± 1,0	21,3 ± 0,7	0,9	82,1
escargot de mer	48,6 ± 1,4	47,8 ± 1,1	0,9	98,2
clams	24,7 ± 1,1	17,1 ± 0,5	5,8	69,2
vernies	40,2 ± 1,7	21,7 ± 1,6	12,9	54,1
crevettes	3,8 ± 1,0	1,2 ± 1,0	3,5	32,1
gambas	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,6	0,5	133

Ces résultats sont en accord avec différents travaux récents. (Sean *et al.*, 1994; Elmoll *et al.*, 1996; Elmoll *et al.*, 1998). Le taux de récupération est supérieur à 100% dans le cas des gambas, ce qui peut s'expliquer facilement par les erreurs de détermination (quantification au niveau de la limite de détection de l'arsenic).

CONCLUSION

L'arsenic total dans huit échantillons, sous forme de poudre, de poissons et de fruits de mer, ainsi que les solutions obtenues après extraction a été quantifié par la spectrométrie de fluorescence X à dispersion d'énergie (EDXRF) en utilisant la méthode d'ajouts dosés.

Les performances du protocole élaboré ont été évaluées et la méthode a été validée par utilisation d'un matériau de référence tel que le CRM 278 (tissus de moules), présentant une matrice similaire à l'échantillon à analyser et dont les teneurs en arsenic sont garanties par un organisme tel que le BCR. Les résultats obtenus par fluorescence X montre la fiabilité de la technique de détermination sur les poudres.

Afin de poursuivre l'évaluation de la méthode d'une manière interne, on a comparé les résultats avec une deuxième procédure d'analyse telle que la détermination de l'arsenic dans l'extrait par spectrométrie d'émission atomique, ICP/AES. Les valeurs obtenues conduit à des résultats similaires.

La détermination de l'arsenic total dans un échantillon que ce soit liquide ou solide prouve que les résultats obtenus sont très satisfaisants. Par ailleurs, le bilan en masse effectué par comparaison entre l'arsenic présent initialement dans la poudre d'origine et la somme de la concentration dans le résidu et dans l'extrait, prouve qu'il n'y a pas de perte, ceci peut confirmer la validité de la méthode.

REMERCIEMENTS

Le Laboratoire de Chimie Analytique et Minérale tient à remercier le programme Measurements and testing programme (ancien Bureau Communautaire de Référence) de la Commission des Communautés Européenne pour son soutien financier.

REFERENCES

- Alberti, J., Rubio, R., Rauret, G. 1995. Arsenic speciation in marine biological materials by LC-UV-HG-ICP/OES. *Fres. J. Anal. Chem.*, 351: 415-419.
- Alberti, J., Rubio, R., Rauret, G. 1995. Extraction method for arsenic speciation in marine organisms. *Fres. J. Anal. Chem.*, 351: 420-425.
- Beauchemin, D., Bednas, M.E., Berman, S.S., McLaren, J.W., Siu, K.W.M., Sturgeon, R.E. 1988. Identification and quantification of arsenic species in a dogfish muscle reference material for trace elements. *Anal. Chem.*, 60: 2209-2212.
- Bertin, E.P. 1975. Principle and practice of X-ray spectrometry analysis. 2e Ed, New York, Pelum Press.
- Cervera, M.L., Navaro, A., Montoro, R., Catala, R. 1989. Determination of arsenic in tomato products by dry ashing hydride generation atomic absorption spectrometry. *Atom. Spectrosc.*, 10(5): 154-159.
- Cullen, W.R., Dodd, M. 1989. Arsenic speciation in clams of British Columbia. *Appl. Organomet. Chem.*, 3(1): 79-88.
- Cullen, W.R., Reimer, K.J. 1989. Arsenic Speciation in the Environment. *Chem. Rev.*, 89: 713-764.
- El Moll, A., Heimburger, R., Lagarde, F., Leroy, M.J.F., Maier, E. 1996. Arsenic speciation in marine organisms : from the analytical methodology to the constitution of reference materials, *Fres. J. Anal. Chem.*, 354: 550-556.
- El Moll, A., Leroy, M.J.F. 1995. *Spéciation d'éléments traces : mise en œuvre, intérêts, spectra analyse*, (185): 32-36.
- Holak, W., Specchio, J. 1991. Determination of total arsenic, As(III) and As(V) in foods by atomic absorption spectrometry. *Atom. Spectrosc.*, 12 (4): 105-108.
- Larsen, E.H. 1995. Speciation of dimethylarsinyl-riboside derivatives (arsenosugars) in marine reference materials by HPLC-ICP-MS. *Fres. J. Anal. Chem.*, 352: 382-388.
- Lopezgonzalez, M.A., Gomez, M.M., Camara, C., Palacios, M.A. 1995. Determination of toxic arsenic species in urine by microwave assisted mineralization and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Mikrochim. Acta*, 120 (1-4): 301-308.
- Michel, P. 1993. L'arsenic en milieu marin, biogéochimie et écotoxicologie. *Repères ocean n° 4*, Ifremer.
- Nriagu, J.O., Simmons, M.S. 1990. *Food contamination from environmental sources*. John Wiley & Sons, Chap. 23, 121-139.
- Pergantis, S.A., Cullen, W.R., Wade, A.P. 1994. Simplex optimization of conditions for the determination of arsenic in environmental samples by using electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 41(2): 205-209.
- Quevauviller, Ph., Maier, E.A., Griepink, B. (Eds) 1995. *Quality Assurance for Environmental Analysis, Method Evaluation Within the Measurements and Testing Programme (BCR)*. Elsevier, Amsterdam.
- Sean, X - C., Cullen, W. R., Reimer, K. J. 1994. Speciation of arsenic compounds in some marine organisms. *Environmental Science Technology*, 28: 1598-1604.

- Taylor, J.K. (Ed) 1987. *Quality Assurance of Chemical Measurements*. Lewis Publishers, Chelsea.
- Thayer, J.S. (Ed.) 1984. *Organometallic compounds and living organisms*. Academic Press, New York.