

Article original

Validation du dosage des espèces de l'arsenic urinaire par HPLC-ICP-MS

Arsenic speciation analysis of human urine using HPLC-ICP-MS

Jean-Pierre Goullé^{1,2*}, Loïc Mahieu¹, Elodie Sausseureau¹, Michel Guerbet², Christian Lacroix¹

¹ Laboratoire de pharmacocinétique et de toxicologie Cliniques, Groupe Hospitalier du Havre, BP 24, 76083 Le Havre Cedex, France

² Laboratoire de Toxicologie, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 22 boulevard Gambetta, 76183 Rouen Cedex, France

Résumé – Objectif : Nous décrivons une technique de séparation et de dosage des espèces de l'arsenic dans les urines par chromatographie liquide haute performance (HPLC), reliée à un plasma à couplage inductif équipé d'un détecteur de masse (ICP-MS). **Méthodes :** L'appareil d'ICP-MS utilisé est un spectromètre X7CCT Thermo Elemental couplé à un ensemble d'HPLC Finnigan Spectra P1000XR. La séparation chromatographique est réalisée à l'aide d'une colonne échangeuse d'anions Hamilton PRP-X100 et d'un gradient de carbonate d'ammonium. **Résultats :** Les cinq principales formes d'arsenic : arsénobétaïne (AB), arsénite (As^{III}), diméthylarséniate (DMA^V), monométhylarséniate (MMA^V), arséniate (As^V) sont parfaitement séparées en 13,5 minutes. L'étalonnage en milieu aqueux ou urinaire conduit à des résultats identiques. La gamme de mesure est linéaire jusque 2000 µg/L d'arsenic (soit 20 000 µg/L pour une urine diluée au dixième). Le coefficient de régression obtenu est supérieur à 0,998 pour les 5 dérivés arséniés. Dans les urines diluées au dixième les limites de quantification exprimées en arsenic sont les suivantes : AB = 1,0 µg/L – As^{III} = 1,7 µg/L – DMA^V = 3,5 µg/L – MMA = 3,4 µg/L – As^V = 1,7 µg/L. La récupération des ajouts dans une urine de contrôle chargée avec 100 µg/L de chaque espèce est comprise entre 100,3 % (MMA) et 102,8 % (DMA). Pour les deux formes d'arsenic les plus toxiques, As^{III} et As^V, la répétabilité analytique et la fidélité intermédiaire sont inférieures à 10 %. En l'absence d'urines contenant des concentrations certifiées des 5 dérivés considérés, la somme de concentrations des 5 formes d'arsenic quantifiées a été calculée dans deux urines du commerce titrées en arsenic total. Pour les deux concentrations d'arsenic total (153 µg/L et 109 µg/L), la somme des concentrations mesurées des 5 espèces d'arsenic est respectivement de 154,6 µg/L et de 114,6 µg/L (n = 5). **Conclusion :** Nous avons appliqué cette méthode avec succès à des échantillons urinaires et à des poudres suspectes, elle permet de déterminer avec précision les différentes formes d'arsenic et leur concentration.

Mots clés : HPLC-ICP-MS, arsenic, spéciation

Abstract – Objective: Determination of arsenic species and total arsenic in urine by liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) are presented. **Methods:** The ICP-MS measurements were performed using a Thermo Elemental X7CCT series coupled to a Finnigan Spectro P1000XR HPLC. An anion exchange Hamilton PRP-X100 column and a gradient elution using ammonium carbonate, allowed the chromatographic separation of the main five arsenic species within 13.5 min: arsenobetaine (AB), arsenite (As^{III}), dimethylarseniate (DMA^V), monomethylarseniate (MMA^V), arseniate (As^V). **Results:** Aqueous or urinary calibration produced similar results. The method was linear up to 2000 µg/L total arsenic (i.e. 20 000 µg/L total arsenic for a ten fold urine dilution). Linear regression was higher than 0.998 for the 5 arsenic species. With ten fold urine dilution, the limits of quantitation were: AB = 1.0 µg/L – As^{III} = 1.7 µg/L – DMA^V = 3.5 µg/L – MMA = 3.4 µg/L – As^V = 1.7 µg/L. Standard addition in control urine charged with 100 µg/L of the species produced recoveries in the range 100.3% (MMA) and 102.8% (DMA). For As^{III} and As^V, the most toxic forms of arsenic, the intra-assay and inter-assay variation coefficient were below 10%. Due to the absence of certified reference material containing the 5 species, two commercial samples have been measured. The sum of the five species were 154.6 µg/L (n = 5), and 114.6 µg/L (n = 5), for 153 µg/L

* Correspondance : Jean-Pierre Goullé, Tél : 02 32 73 32 23, Fax : 02 32 73 32 38, jgoullé@ch-havre.fr

and 109 µg/L certified concentrations respectively. **Conclusion:** We have successfully applied this method to urine and suspect powders. This technique permits to accurately differentiate and quantitate toxic and non-toxic arsenic species.

Key words: HPLC-ICP-MS, arsenic, speciation

Ce travail a été présenté au XVII^{ème} congrès de la SFTA à La Rochelle

Reçu le 7 juillet 2009, accepté après modifications le 1er octobre 2009

Publication en ligne le 17 décembre 2009

1 Introduction

L'homme est susceptible d'être exposé à des dérivés arsénisés variés, inorganiques ou organiques, qui présentent des propriétés chimiques et toxicologiques très différentes. La nature de cette exposition peut être alimentaire, professionnelle, médicale ou criminelle. L'origine professionnelle ou domestique est liée à des activités où l'arsenic et ses dérivés ont été et sont encore utilisés comme insecticides, herbicides, pigments (émaux, peinture, verre), mais également pour le tannage des peaux, la taxidermie, l'industrie des semi-conducteurs, la métallurgie [1]. En ce qui concerne l'origine criminelle, rappelons que l'anhydride arsénieux (As_2O_3) a été pendant une très longue période, le poison le plus utilisé à cette fin. Nous avons au cours des dernières années été confrontés à plusieurs cas d'intoxication par l'anhydride arsénieux dans un cadre judiciaire (homicides, tentatives d'empoisonnement) ou médical (suicide). Depuis peu, l'arsenic est à nouveau prescrit en thérapeutique, ainsi l'anhydride arsénieux est employé dans le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire [2]. Parmi les sources alimentaires, citons les produits de la mer, riches en dérivés organiques non toxiques, arsénobétaïne (AB) en particulier, mais surtout l'eau de boisson pouvant contenir de l'arsenic inorganique toxique. Ainsi, dans certaines régions du monde, l'eau traverse des couches géologiques riches en arsenic inorganique, susceptibles de contaminer l'eau de boisson. C'est le cas par exemple dans toute une partie du continent indien. La présence d'arsenic minéral à une concentration toxique dans l'eau est responsable d'arsenicisme chronique qui sévit surtout dans l'ouest du Bengale où plus de 60 % de la population habite dans des zones dont l'eau des puits forés récemment est polluée par l'arsenic contenu dans les nappes phréatiques [3]. Cette pollution affecte la santé de millions d'habitants et est responsable de centaines de milliers de décès dus à des cancers de la peau, de l'estomac, du poumon, du foie, du rein [4]. C'est la plus grande catastrophe écologique de tous les temps. Parmi les autres causes d'intoxication à l'arsenic inorganique figurent des remèdes ayurvédiques végétaux ainsi que des remèdes traditionnels chinois [5,6]. En raison de ces nombreuses sources d'exposition, il est important d'être en mesure de différencier l'arsenic inorganique, qui est un poison très violent, de l'arsenic organique très peu toxique.

L'arsenic est un métalloïde toxique et cancérigène. En raison de la grande toxicité de l'arsenic inorganique, toute élévation de l'arsenic urinaire total doit faire l'objet d'une spéciation. Cette analyse permet d'identifier le sel d'arsenic auquel le sujet est exposé, inorganique ou organique, de préciser sa nature et de réaliser la quantification des espèces. Ceci est particulièrement important qu'il s'agisse d'une exposition

alimentaire, environnementale, médicamenteuse, professionnelle ou criminelle. En pratique clinique, chez un malade présentant des troubles digestifs, cutanés ou neurologiques susceptibles d'évoquer un contact arsenical, en l'absence d'autre cause, il est indispensable d'éliminer une intoxication arsenicale. Dans un tel contexte, l'analyse des phanères peut s'avérer un complément extrêmement utile [7–10], les concentrations sanguines et urinaires pouvant être redevenues normales.

Rappelons que l'ingestion de 200 à 300 mg d'arsenic inorganique (As_2O_3) peut avoir une conséquence mortelle. Dans l'intoxication aiguë, la forme typique est dominée par une symptomatologie digestive intense (douleurs abdominales, vomissements et diarrhée parfois sanglants réalisant un tableau de « choléra arsenical ») [11]. Le délai d'apparition des troubles est variable, de 20 minutes dans la forme suraiguë jusqu'à 12 heures dans la forme aiguë. Les pertes liquidiennes et d'électrolytes peuvent être à l'origine de troubles hémodynamiques (hypotension) et électrolytiques (acidose métabolique). Ces perturbations hémodynamiques, ainsi que l'atteinte tissulaire, rénale et hépatique cytolytique directe de l'As, provoquent une hépatonéphrite. L'As est fréquemment responsable d'une cardiomyopathie avec troubles du rythme à conséquence parfois mortelle. Rhabdomyolyse et coagulopathie de consommation sont parfois constatées. L'intoxiqué présente une soif intense et une saveur alliagée de la bouche. Chez les survivants, la guérison lente s'accompagne de séquelles neurologiques. Il s'agit d'une polynévrite sensitivo-motrice incomplètement régressive. Deux mois après l'intoxication peuvent apparaître sur tous les ongles des bandes blanchâtres transversales (bandes de Mees), une dermatose palmo-plantaire et une chute des cheveux et des poils. La toxicité chronique est caractérisée par des lésions cutanées : mélanodermie, hyperkératose palmo-plantaire (maladie de Bowen), cancers cutanés, des effets neurologiques, des lésions muqueuses, une atteinte hépatique, des effets cardio-vasculaires, des troubles hématologiques, ainsi que des atteintes des phanères [11]. Une exposition répétée à de faibles quantités d'arsenic inorganique peut être également responsable d'une neuropathie périphérique. Le potentiel cancérigène de cet élément est connu depuis plus de cent ans, il affecte la peau, les poumons, la vessie mais peut aussi atteindre le rein, le foie et la prostate.

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel

Il s'agit d'un plasma à couplage inductif de type ThermoElectron X Series couplée à un spectromètre de masse,

Tableau I. Exemple de préparation de gamme d'étalonnage et d'échantillons urinaires.

	Concentration As ($\mu\text{g/L}$)	Solution de travail des 5 espèces (μL)	Urine (μL) non centrifugée	Eau (μL)
Étalon 1	1	20	–	3980
Étalon 2	5	100	–	3900
Étalon 3	10	200	–	3800
Étalon 4	20	400	–	3600
Échantillon	–	–	400	3600

modèle X7/CCT (ThermoElectron, Courtabœuf, France). L'appareil est équipé d'une torche en quartz de 1,5 mm, d'un nébuliseur concentré en verre borosilicaté de 1 mL (type Meinhard de Marque Glass Expansion – Référence Thermo-Elemental 1201318) avec un débit de gaz de nébulisation de 0,85 mL/min, d'une chambre simple de nébulisation à bille d'impact en quartz munie d'un refroidisseur à effet Peltier réglant sa température à 3 °C, et d'un passeur d'échantillons de type CETAC ASX-510. L'ensemble des acquisitions est enregistré à l'aide d'une station informatique dotée du logiciel d'analyse PlasmaLab version 2.0 sous Windows NT. Les paramètres instrumentaux sont les suivants : puissance de la torche 1200 W; débits d'argon : plasmagène 15 L/min, nébuliseur 0,95 L/min, auxiliaire 0,66 L/min; interface : cônes échantillonneur et écorceur en nickel de diamètres respectifs de 1 mm et de 0,4 mm; vide au niveau de l'interface : 1,9 mbar et du quadripôle : $1,6 \times 10^{-7}$ mbar. Cet équipement est couplé à un ensemble d'HPLC Finnigan Spectra SYSTEM P1000XR doté d'un dégazeur à membrane (Thermo Fischer Scientific). La séparation chromatographique est réalisée à l'aide d'une colonne d'échange anionique Hamilton PRP-X100 (250 \times 4,6 mm–5 μm) (Reno, NV), sous un débit de 1,5 mL/min. L'injection est pratiquée dans une boucle de 20 μL .

2.2 Réactifs

L'eau utilisée est purifiée extemporanément sur Milli-QPLUS 185 (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France). Les réactifs, de qualité « suprapur » et les différents dérivés arséniés (As^{III} , arsénite – As^{V} , arséniate – MMA^{V} , monométhylarséniate – DMA^{V} , diméthylarséniate – AB, arsénobétaïne), proviennent de chez Merck Chimie SAS (Fontenay-sous-Bois, France).

Des urines de contrôle titrées en arsenic total sont analysées : deux provenant de chez UTAK (Valencia, CA) et une de chez Sero (Billingstad, Norvège). En l'absence d'urines certifiées contenant les différentes formes, deux urines sont chargées avec 20 $\mu\text{g/L}$ (une des deux urines UTAK) et 100 $\mu\text{g/L}$ (Serorm) de chacune des 5 espèces d'arsenic.

Préparation des solutions mères à 100 mg/L d'arsenic :

- AB = arsénobétaïne ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{AsO}_2$) : 23,8 mg/100 mL ;
- As^{III} = métaarsénite de sodium (NaAsO_2) : 17,3 mg/100 mL ;
- DMA^{V} = acide cacodylique ($\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$) : 18,4 mg/100 mL ;

Tableau II. Séquence des tampons de carbonate d'ammonium pour assurer la séparation chromatographique des 5 dérivés arséniés (AB , As^{III} , DMA^{V} , As^{V} , MMA^{V}).

Temps (min)	Tampon de carbonate d'ammonium (%)	
	Débit = 1,5 mL/min	
	15 mmol/L	50 mmol/L
0	100	0
1,5	100	0
5,5	0	100
7,5	0	100
10,5	100	0
13,5	100	0

- MMA^{V} = méthylarsénate disodique ($\text{CH}_3\text{AsNa}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) : 38,6 mg/100 mL ;
- As^{V} = arséniate sodique dibasique ($\text{AsHN}_2\text{O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) : 41,6 mg/100 mL.

Une solution fille à 10 mg/L est obtenue par dilution au dixième dans l'eau de chaque solution mère. Ces deux solutions se conservent 1 an à –20 °C. Une solution de travail contenant soit 200 $\mu\text{g/L}$ de chaque dérivé est obtenue par dilution au cinquième, de chaque solution fille, elle est conservée une semaine à +4 °C. Un exemple de préparation des étalons et des échantillons urinaires non centrifugés est reporté tableau I. Le point le plus élevé de la gamme correspond à une urine dont la concentration est au maximum de 200 $\mu\text{g/L}$ pour chaque espèce, compte tenu de la dilution de l'échantillon au dixième. Deux tampons de carbonate d'ammonium sont préparés (tampon A = 15 mmol/L – tampon B = 50 mmol/L) pour l'analyse chromatographique selon une séquence indiquée tableau II.

3 Résultats

La séparation chromatographique des 5 formes considérées d'arsenic est optimale et totale en 13,5 minutes (figure 1). Les temps de rétention chromatographiques sont les suivants : AB = 1,9 min; As^{III} = 2,9 min; DMA^{V} = 4,4 min, MMA^{V} = 8,0 min; As^{V} = 10,4 min. La spécificité de l'analyse a été vérifiée en injectant séparément les 5 dérivés de l'arsenic (As^{III} , As^{V} , MMA^{V} , DMA^{V} , AB). La présence d'un pic chromatographique supplémentaire dont la masse est 75 a été constatée entre le pic de DMA et celui de MMA. Il s'agit vraisemblablement d'ArCl dont la masse est 75, comme celle de l'arsenic. L'étalonnage en milieu aqueux ou urinaire conduit à des résultats identiques. Le coefficient de régression obtenu est supérieur à 0,998 pour les 5 composés considérés pour l'intervalle de concentration de 1 à 20 000 $\mu\text{g/L}$ exprimé en arsenic, pour laquelle la linéarité a été mesurée et qui tient compte de la dilution de l'échantillon au dixième. Les limites de détection et de quantification sont respectivement calculés comme 3 et 10 fois l'écart-type du blanc divisées par la pente et en tenant compte de la dilution au dixième de l'échantillon urinaire. L'ensemble de ces résultats est regroupé tableau III.

Les concentrations mesurées pour les 5 formes d'arsenic dans les deux urines de contrôle d'une part ainsi que dans les ajouts dosés à 100 $\mu\text{g/L}$ de chaque dérivé effectués sur l'un des

Tableau III. Limites de détection (LOD) et limites de quantification (LOQ) pour chacun des 5 dérivés arséniés.

	AB	As ^{III}	DMA ^V	MMA ^V	As ^V
Résultats en µg/L					
$LOD = \frac{3 \times ET_{blanc}}{pente} \times 10$	0,3	0,5	1,1	1,0	0,5
$LOQ = \frac{10 \times ET_{blanc}}{pente} \times 10$	1,0	1,7	3,5	3,4	1,7
Gamme de mesure des urines (dilution 1:10)	1–20 000	1,7–20 000	3,5–20 000	3,4–20 000	1,7–20 000

Tableau IV. Dosage des 5 dérivés arséniés dans deux échantillons titrés en As total. Résultats obtenus avec des ajouts dosés à 20 µg/L et 100 µg/L. Exactitude, répétabilité et fidélité intermédiaire.

UTAK 12110 As total 109 µg/L	AB	As ^{III}	DMA ^V	MMA ^V	As ^V	As total
Moyenne µg/L (n = 5)	1,5	96,4	3,8	<LOQ	12,1	113,8 (104,4 %)
Répétabilité CV (%)	<25,4	<3,8	<15,7	–	<10	<3,4
Fidélité intermédiaire CV (%)	<28,1	<6,6	<15,9	–	<10,2	<5,7
UTAK 12111 As total 13 µg/L	AB	As ^{III}	DMA ^V	MMA ^V	As ^V	As total
Ajouts 20 µg/L (n = 5)	22,8	22,6	25,3	22,4	20,5	113,6 (100,5 %)
Répétabilité CV (%)	<3,5	<6,7	<5,5	<5,7	<4,9	<3,7
Fidélité intermédiaire CV (%)	<3,1	<6,1	<4,3	<6,3	<6,2	<3,8
Seronorm 0511545 As total 153 µg/L	AB	As ^{III}	DMA ^V	MMA ^V	As ^V	As total
Moyenne µg/L (n = 5)	63,8	21,9	3,5	<LOQ	65,3	154,4 (100,9 %)
Répétabilité CV (%)	<3,2	<3,7	<17,1	–	4,6	<3,1
Fidélité intermédiaire CV (%)	<3,4	<6,8	<14,8	–	<3,9	<2,7
Ajouts 100 µg/L (n = 5)	165,3	123,2	106,3	100,5	165,6	660,9
Récupération des ajouts (%)	101,5	101,3	102,8	100,5	100,3	101,3
Répétabilité CV (%)	<2,9	<3,6	<2,6	<3,4	<2,8	<2,8
Fidélité intermédiaire CV (%)	<3,3	<4,1	<2,6	<3,3	<2,5	<2,0

échantillons (Seronorm) ainsi que la répétabilité des concentrations mesurées sont reportés tableau IV. L'ajout de 20 µg/L de chaque espèce au second échantillon UTAK 12111 dont la concentration en arsenic total est de 13 µg/L conduit à une concentration totale de 113,6 µg/L soit une récupération de 100,5 % (AB = 22,8 µg/L – As^{III} = 22,6 µg/L, DMA^V = 25,3 µg/L, MMA^V = 22,4 µg/L, As^V = 20,5 µg/L) avec un coefficient de variation toujours inférieur à 6,7 % (n = 5) (tableau IV).

Pour les deux formes d'arsenic les plus toxiques, la répétabilité analytique (n = 5) est toujours inférieure à 10 % (concentration en As^{III} de 21,9 et 123,2 µg/L – CV < 6,7 % et concentration en As^V de 12,1 et 165,6 µg/L – CV < 10 %).

La fidélité intermédiaire est également toujours inférieure à 10 %. Les figures 1 et 2 montrent des chromatogrammes obtenus respectivement après consommation de produits de la mer et après mise en solution d'une poudre suspecte.

4 Discussion

Les méthodes de spéciation, de l'arsenic urinaire sont nombreuses. Nous avons utilisé pendant plusieurs années la technique de Le Bouil et coll. [12]. Elle fait appel à la solubilité en milieu alcalin par les solvants organiques des dérivés organiques de l'arsenic, contrairement aux composés inorganiques insolubles. Les urines sont traitées par le chloroforme

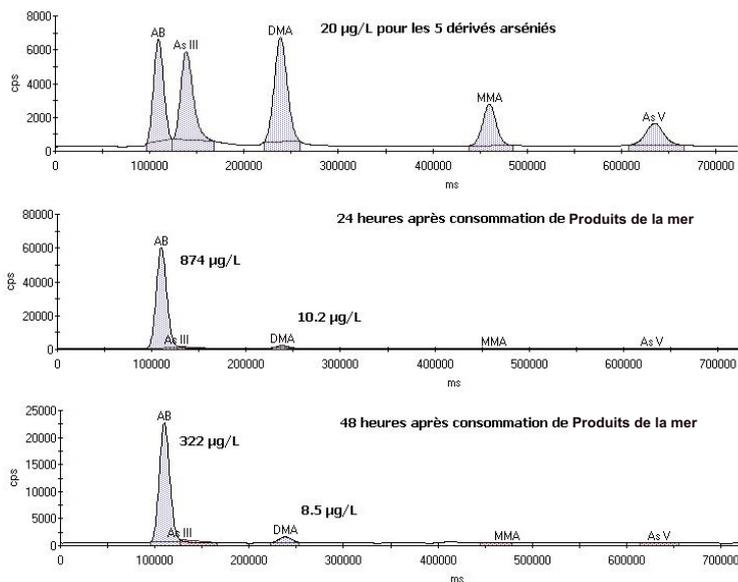


Fig. 1. Chromatogramme obtenu par HPLC-ICP-MS d'urines recueillies 24 et 48 heures après consommation de produits de la mer, comparé à un chromatogramme étalon contenant 20 µg/L des 5 dérivés arsénisés : arsénobétaïne (AB), arsénite (As^{III}), diméthylarséniate (DMA^V), monométhylarséniate (MMA^V), arséniate (As^V).

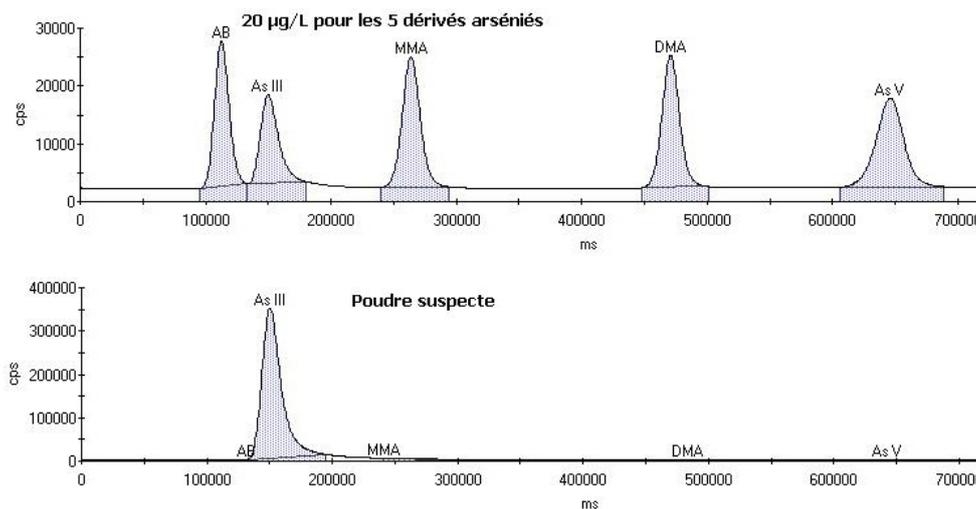


Fig. 2. Chromatogramme obtenu par HPLC-ICP-MS après mise en solution d'une poudre suspecte, comparé à un chromatogramme étalon contenant 20 µg/L des 5 dérivés arsénisés.

en présence de soude. Les sels minéraux d'arsenic, les plus toxiques, ne sont pas extraits dans ces conditions et sont quantifiés dans les urines par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique. Cette méthode est très intéressante par sa rapidité de mise en œuvre, mais il s'agit d'une spéciation globale qui ne permet pas de différencier précisément les dérivés arsénisés présents. Si elle est adaptée à de la pratique clinique quotidienne, elle ne répond pas au critère d'identification formelle indispensable en toxicologie judiciaire, ni aux exigences analytiques actuelles. Pour réaliser la spéciation des différentes

formes d'arsenic urinaires, de nombreuses méthodes sont proposées. Elles font toutes appel à une séparation chromatographique préalable au dosage de l'arsenic qui est ensuite réalisé par une technique classique.

La séparation des 5 principales formes d'arsenic (As^{III}, As^V, MMA^V, DMA^V, AB) est effectuée par HPLC à l'aide de différentes phases. Alors qu'As^V, MMA^V, DMA^V sont des anions à pH neutre avec des pKa respectifs de 2,3–3,6 et 6,2, As^{III} n'est pas électriquement chargé (pKa = 9,3). Dans ces conditions l'emploi d'une colonne anionique permet

de séparer dans l'ordre pK_a , As^{III} , DMA^V , MMA^V et As^V . C'est ce type de colonne que nous avons utilisée et qui est majoritairement citée dans la bibliographie concernant la spéciation de cet élément [13–15]. L'arsenocholine se trouvant sous forme de cation est éluée dans le front de solvant. Elle ne peut être analysée qu'avec une colonne cationique [16] ou avec un ensemble comportant les deux types de colonnes [17], ce qui augmente la durée de la chromatographie. Avec une chromatographie liquide de paire d'ions il est possible de réduire considérablement la durée de l'analyse, la séparation des espèces est réalisée en 3 minutes et semble bien adaptée à des dosages en série [18]. Après séparation chromatographique, les dérivés arséniés sont analysés par spectrométrie d'absorption atomique [19–21] ou par ICP-MS [13–18]. La génération d'hydrures a également été utilisée avec succès pour séparer As^{III} , As^V , MMA^V et DMA^V , le dosage de l'arsenic étant effectué par ICP-MS [22]. Selon ces auteurs, la méthode est plus sensible pour les dérivés toxiques de l'arsenic que le couplage HPLC-ICP-MS. Nous avons fait le choix d'un couplage HPLC-ICP-MS. La chromatographie est réalisée à l'aide d'une colonne anionique. L'optimisation des conditions chromatographiques nous permet d'obtenir une excellente séparation des 5 principaux dérivés arséniés dans un délai de 13,5 minutes ainsi que le montre la figure 1, ce qui est tout à fait acceptable, compte tenu de la nature des analyses. La sensibilité de la méthode est très bonne, les limites de quantification sont inférieures à 1,7 $\mu\text{g/L}$ pour les deux composés les plus toxiques (As^{III} , As^V) et inférieures à 3,8 $\mu\text{g/L}$ pour les trois autres dérivés. Ces performances sont comparables à celles obtenues par d'autres auteurs [13–15] et offrent une précision suffisante dans l'intervalle de mesure allant de 1,7 à 20 000 $\mu\text{g/L}$. Labat et coll. [23] obtiennent une limite de quantification un peu plus faible (0,8 $\mu\text{g/L}$) à partir de l'injection directe de 5 μL d'urines pures. Dans la technique que nous proposons, la récupération d'ajouts dosés à deux niveaux de concentrations (20 $\mu\text{g/L}$ et 100 $\mu\text{g/L}$) pour les 5 formes d'arsenic est excellente, elle aboutit à des coefficients de récupération compris entre 100,5 et 101,4 %. La répétabilité ainsi que la fidélité intermédiaire qui prennent en compte la somme des variations analytiques, chromatographique de l'HPLC, ainsi que celles liées au dosage par ICP-MS de l'arsenic contenu dans chacun des 5 pics chromatographiques correspondant aux différentes variétés, toujours inférieures à 10 % sont tout à fait satisfaisantes. En l'absence d'urine certifiée contenant différents dérivés arséniés, nous avons comme d'autres auteurs [24–26] mesuré sur deux urines titrées en arsenic total, les 5 principales formes d'arsenic. Nous constatons que la somme des concentrations des 5 composés arséniés ainsi quantifiées correspond exactement à la concentration d'arsenic total. L'erreur de mesure est de 0,7 % pour l'urine séronorm avec 154,1 $\mu\text{g/L}$ pour la somme de 5 espèces mesurées, alors que la concentration théorique en arsenic total est de 153 $\mu\text{g/L}$. Cette erreur de mesure est de 4,4 % pour l'urine UTAK avec une concentration totale d'arsenic pour les 5 dérivés quantifiés de 113,8 $\mu\text{g/L}$ la concentration cible étant de 109 $\mu\text{g/L}$. La stabilité des dérivés arséniés dans les urines recueillies récemment et dans les matériaux de contrôle urinaires a été évaluée par Chen et coll. [27], elle est de 6 mois à $-20\text{ }^\circ\text{C}$; mais elle est limitée à 4 semaines pour les solutions étalon aqueuses. Se-

lon ces auteurs, la matrice « urine » semble jouer un rôle important de stabilisation des différents composés. Ainsi, même si elle présente certains inconvénients [28], la séparation et la quantification des différentes espèces de l'arsenic urinaire grâce au couplage HPLC-ICP-MS doté d'excellentes performances, nous semble être la méthode de choix. Elle offre la meilleure résolution et les temps d'analyse les plus courts. De plus, cette technique peut être facilement appliquée à l'analyse de poudres suspectes, mais également à d'autres milieux biologiques comme le plasma ou le sang [2, 29], ou à des matrices alternatives, cheveux ou ongles [30–33].

5 Conclusion

L'arsenic est connu depuis les temps les plus anciens comme « le poison des rois et le roi des poisons ». Bien que son usage à des fins criminelles soit tombé en désuétude depuis le milieu du siècle dernier, ce poison est encore utilisé de nos jours à ces fins ou dans un but suicidaire. De plus, il existe des sources potentielles d'exposition alimentaire, professionnelle, domestique ou médicale. Ainsi, si tout laboratoire de toxicologie doit être en mesure de réaliser des dosages d'arsenic, la spéciation peut être réservée à quelques laboratoires spécialisés.

Conflit d'intérêt. Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêt.

Références

- Garnier R. *Eléments*. In: Bismuth C. *Toxicologie Clinique*. Paris : Flammarion 2000 : 555–699.
- Fukai Y, Hirata M, Ueno M, Ichikawa N, Kobayashi H, Saitoh H. Clinical pharmacokinetic study of arsenic trioxide in an acute promyelocytic leukemia (APL) patient: Speciation of arsenic metabolites in serum and urine. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29: 1022–1027.
- Samanta G, Sharma R, Roychowdhury T, Chakraborti D. Arsenic and other elements in hair, nails, and skin-scales of arsenic victims in West Bengal, India. *Sci Total Environ*. 2004; 326: 33–47.
- Anwar HM, Akai J, Mostofa KMG, Safiullah S, Tareq SM. Arsenic poisoning in groundwater health risk and geochemical sources in Bangladesh. *Environ Int*. 2002; 27: 597–604.
- Saper RB, Kales SN, Paquin J, Burns MJ, Eisenberg DM, Davis RB, Philipps RS. Heavy metal content of Ayurvedic herbal medicine products. *JAMA*. 2004; 292: 2868–2873.
- Sun HW, Qiao FX, Suo R, Li LX, Liang SX. The determination and characteristics of trace arsenic (III) total arsenic, antimony (III) and total antimony in water. *Anal Chim Acta*. 2004; 505: 255.
- Goullé JP, Mahieu L, Bonneau L, Lainé G, Bouige D, Lacroix C. Validation d'une technique de dosage multiélémentaire des métaux et métalloïdes dans les cheveux par EPI-SM. Valeurs de référence chez 45 témoins. *Ann Toxicol Anal*. 2005; 17: 97–103.
- Goullé JP, Mahieu L, Sausseureau E, Bouige D, Groenwont S, Lacroix C. Validation d'une technique de dosage multiélémentaire des métaux et métalloïdes dans les ongles

- par EPI-SM. Valeurs usuelles chez 130 sujets volontaires. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19: 125–134.
9. Goullé JP, Saussereau E, Mahieu L, Bouige D, Groenwont S, Guerbet M, Lacroix C. Application of inductively coupled plasma mass spectrometry multielement analysis in fingernail and toenail as a biomarker of metal exposure. *J Anal Toxicol.* 2009; 33: 92–98.
 10. Goullé JP, Mahieu L, Saussereau E, Groenwont S, Guerbet M, Lacroix C. Comparaison des concentrations de 34 métaux et éléments minéraux dans les ongles des mains et de pieds chez 50 sujets volontaires sains. *Ann Toxicol Anal.* 2008; 20: 107–111.
 11. Goullé JP. In : *Toxicologie et pharmacologie médico-légales.* Kintz P. Coordinateur, Elsevier, 1998: 189–232.
 12. Le Bouil A, Notelet S, Cailleux A, Turcant A, Allain P. Dosage de l'arsenic urinaire après séparation de l'arsénobétaïne. *Toxicorama.* 1997; 9: 171–176.
 13. Mandal BK, Ogra Y, Anzai K, Suzuki KT. Speciation of arsenic in biological samples. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004; 198: 307–318.
 14. Morton J, Mason H. Speciation of arsenic compounds in urine from occupationally unexposed and exposed persons in the U.K. Using a routine LC-ICP-MS method. *J Anal Toxicol.* 2006; 30: 293–301.
 15. Heitland P, Köster HD. Fast determination of arsenic species and total arsenic in urine by HPLC-ICP-MS: Concentration ranges for unexposed german inhabitants and clinical case studies. *J Anal Toxicol.* 2008; 32: 308–314.
 16. Hata A, Endo Y, Nakajima Y, Ikebe M, Ogawa M, Fujitani N, Endo G. HPLC-ICP-MS speciation analysis of arsenic in urine of japanese subjects without occupational exposure. *J Occup Health.* 2007; 49: 217–223.
 17. Milstein LS, Essader A, Pellizzari ED, Fernando RA, Raymer JH, Levine KE, Akinbo O. Development and application of a robust speciation method for determination of six arsenic compounds present in human urine. *Environ Health Perspect.* 2003; 111: 293–296.
 18. Pearson GF, Greenway GM, Brima EI, Haris PI. Rapid arsenic speciation using ion pair LC-ICPMS with a monolithic silica column reveals increased urinary DMA excretion after ingestion of rice. *J Anal At Spectrom.* 2007; 22: 361–369.
 19. Slejkovec Z, Falnoga I, Goessier W, Van Elteren JT, Raml R, Podgornik H, Cernelc P. Analytical artefacts in the speciation of arsenic in clinical samples. *Anal Chim Acta.* 2008; 607: 83–91.
 20. Hernandez-Zavala A, Matousek T, Drobna Z, Paul DS, Walton F, Adair BM, Jiri D, Thomas DJ, Styblo M. Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer). *J Anal At Spectrom.* 2008; 23: 342–351.
 21. Xu Y, Wang Y, Zheng Q, Li B, Li X, Jin Y, Lv X, Qu G, Sun G. Clinical manifestations and arsenic methylation after a rare subacute arsenic poisoning accident. *Toxicol Sci.* 2008; 103: 278–284.
 22. Xie R, Johnson W, Spayd S, Hall GS, Buckley B. Determination of total toxic arsenic species in human urine using hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Anal At Spectrom.* 2007; 22: 553–560.
 23. Labat L, Dhorne C, Klinzig F, Dehon B, Lhermitte M. ICP-MS et toxicologie professionnelle. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19: 23–29.
 24. Sloth JJ, Larsen EH, Julshamn K. Selective arsenic speciation analysis of human urine reference materials using gradient elution ion-exchange HPLC-ICP-MS. *J Anal At Spectrom.* 2004; 19: 973–978.
 25. Todorov TI, Ejnink JW, Mullick FG, Centeno JA. Arsenic speciation in urine and blood reference materials. *Microchim Acta.* 2005; 151: 263–268.
 26. Xie R, Johnson W, Spayd S, Hall GS, Buckley B. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2006; 578: 186–194.
 27. Chen YC, Amarasiriwardena CJ, Hsueh YM, Christiani DC. Stability of arsenic species and insoluble arsenic in human urine. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 2002; 11: 1427–1433.
 28. Le Bouil A. Speciation de l'arsenic par couplage LC-ICP-MS : avantages et inconvénients en biologie médicale. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19: 81–86.
 29. Higashikawa Y, Kazui Y, Suzuki S, Ohtsuru O. Arsenic speciation of arsine-exposed blood samples by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and as-adduct, a possible indicator of AsH₃ exposure. *J Anal Toxicol.* 2008; 32: 344–348.
 30. Mandal BK, Ogra Y, Suzuki KT. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass-spectrometry. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003. 189: 73-83.
 31. Yáñez J, Fierro V, Mansilla H, Figueroa L, Cornejo L, Barnes RM. Arsenic speciation in human hair: a new perspective for epidemiological assessment in chronic arsenicism. *J Environ Monit.* 2005; 7: 1335–1341.
 32. Raab A, Feldmann J. Arsenic speciation in hair extracts. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 381: 332–338.
 33. Kintz P, Ginot M, Marques N, Cirimele V. Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. *Forensic Sci Int.* 2007; 170: 204–206.