

Revue générale

La préparation des matrices biologiques pour l'analyse des métaux

Biological matrices preparation for determination of metals

Laurence Labat*

Hôtel Dieu, Service Pharmacie-Pharmacologie-Toxicologie, 1 place du Parvis Notre Dame, 75181 Paris Cedex 04, France

Résumé – Introduction : Depuis les années 1980, l'évolution des technologies dans nos laboratoires avec notamment l'arrivée de l'ICP-MS a permis une nette avancée dans le domaine de l'analyse des métaux et des métalloïdes. Ainsi, le dosage de ces éléments est devenu plus courant dans des matrices comme les cheveux ou les ongles à côté de celles depuis longtemps utilisées comme le sang ou les urines. Cependant à des niveaux de concentrations de plus en plus bas, l'influence d'éventuelles contaminations peut devenir un obstacle majeur et il conviendra à l'analyste d'être particulièrement exigeant sur les conditions de prélèvement, sur la conservation et sur le prétraitement des échantillons avant même d'envisager l'analyse. **Les différents types de matrice :** Les prélèvements sanguins et urinaires sont majoritairement utilisés pour le dosage des métaux. Pour le sang, on privilégiera les tubes en plastique ou ceux dits « spécifiques au dosage des métaux » avec l'utilisation d'un anticoagulant dans la majorité des cas. Dans les urines, on utilisera classiquement des flacons en polypropylène dans lesquels l'ajout d'acide nitrique permet d'assurer une conservation suffisante quelques semaines à +4 °C. Les cheveux et les ongles présentent des avantages indiscutables en termes de recueil et de conservation en plus de leur intérêt rétrospectif. Cependant, ces intérêts potentiels sont encore gênés de nos jours par les difficultés analytiques que posent ces matrices pour l'analyse des métaux. Après une étape essentielle de décontamination, une étape de minéralisation en milieu acide sera nécessaire. **Les différents modes de préparation :** À côté de la simple dilution facilement utilisée pour les matrices liquides, la minéralisation s'impose dans la majorité des cas pour les matrices solides. Cette étape de digestion essentielle limite les interférences liées aux matières organiques. Elle peut être réalisée par voie sèche ou par voie humide. Cette dernière, en utilisant un milieu acide, permet de limiter les pertes de certains métaux par volatilisation. On retrouve classiquement dans la littérature, la digestion par des acides seuls ou en mélange (HNO₃, H₂SO₄, HClO₄) en présence ou non d'un agent oxydant comme l'eau oxygénée. La minéralisation assistée par micro-ondes est actuellement largement décrite en utilisant des réacteurs fermés en téflon. Une méthode alternative utilisant une solution alcaline d'hydroxyde de tétraméthylammonium est également décrite. **La préparation d'échantillons en SAA :** En plus de la simple dilution ou de la minéralisation par voie humide souvent décrite, on préconise l'utilisation de modificateurs chimiques en SAA-ET permettant de stabiliser la température dans le four et de diminuer les interférences de la matrice, même en présence d'un effet Zeeman. **La préparation d'échantillons en ICP-MS :** Une dilution (1/5^e à 1/20^e) est nécessaire permettant de diminuer entre autres l'apport en sels. Un alcool aliphatique type butanol est ajouté dans cette dilution (1 à 2 %) permettant d'exalter le signal en augmentant le taux d'ionisation. Un tensioactif (type triton-X100) est ajouté favorisant la nébulisation. En ICP, on privilégiera l'étalonnage interne. **Conclusion :** Il est primordial d'être particulièrement vigilant à la préparation des échantillons pour l'analyse de métaux en tenant compte de la matrice utilisée, de la méthode d'analyse choisie et du type de métal à doser. L'ICP-MS a certainement révolutionné nos laboratoires dans l'analyse des métaux ; cependant il reste encore des améliorations à apporter dans la préparation des matrices biologiques pour l'analyse des métaux, notamment dans les applications sur les matrices alternatives.

Mots clés : Métaux, matrices biologiques, préparation des échantillons, SAA, ICP

Abstract – Introduction: Since the 1980s, technology evolution in our laboratories with the introduction of ICP-MS has allowed a real advance in metal and metalloid analysis. Therefore, determination of these elements is becoming more frequent in matrices such as hair or nails, besides blood or urine, which have been used for a long time. However, with lower concentrations, the influence of contamination can become a major obstacle and it will be advisable for the analyst to be particularly vigilant with sample conditions, conservation and pre-treatment of the specimens before analysis. **Different types of matrices:** Blood and urine samples are generally used for metal analysis. For blood, plastic

* Correspondance : Laurence Labat, Tel. (+33) 1 42 34 87 31, Fax : (+33) 1 42 34 88 95, laurence.labat@htd.aphp.fr

tubes or “specific tubes for metals” are used with an anticoagulant. For urine, polypropylene flasks are used and nitric acid is added to allow correct conservation for some weeks at +4 °C. Hair and nails present advantages, with easy collection and conservation, with retrospective characteristics in addition. However, these advantages are still hindered by the analytical difficulties of these matrices for metal determinations. After decontamination, a mineralisation step in acidic conditions seems useful. **Different preparative methods:** Simple dilution is easily used for liquid matrices and mineralisation is frequently used for solid matrices. This digestion step limits interferences of the matrices and can be realised in dry mode or damp mode. The latter uses acidic conditions to limit some metal volatilisation. In the literature, digestion used acids alone or in mixture (HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4) with or without an oxidative product such as H_2O_2 . Mineralisation assisted by microwaves is actually largely described with a closed reactor in teflon. An alternative method with a basic solution of tetra-methyl ammonium hydroxide is described. **Sample preparation in SAA:** With simple dilution or mineralisation in damp mode, chemical modifiers are often used in SAA-ET to stabilise the temperature in the furnace and to minimise interferences of the matrices even with the Zeeman effect. **Sample preparation in ICP-MS:** A dilution (1/5 to 1/20) is necessary to minimise salt contribution. An aliphatic alcohol such as butanol (1 to 2%) to increase the signal and increase ionisation status, a tensioactive agent (triton X-100) to optimise nebulisation, and an internal standard are usually added. **Conclusion:** It is particularly important to be vigilant in sample preparation for metal determinations and to take into consideration the types of matrices, the methods used and the nature of the metal. ICP-MS is certainly an innovative tool for analysis of metals in the laboratory, but improvements are still necessary in sample preparation, in particular for alternative matrices.

Key words: Metals, biological matrices, sample preparation, SAA, ICP

Reçu le 17 février 2010, accepté après modifications le 13 avril 2010

Publication en ligne le 4 août 2010

1 Introduction

Actuellement, plusieurs types d'instruments sont utilisés pour le dosage des métaux : le spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme (SAA), le spectrophotomètre d'absorption atomique avec four graphite ou électrothermique (SAA-ET), le spectrophotomètre d'absorption atomique avec génération d'hydrures (SAA-GH), le spectromètre d'émission au plasma d'argon (ICP) et le spectromètre d'émission en plasma induit couplé à un spectromètre de masse (ICPMS). L'évolution des technologies dans ce domaine depuis les années 1980 avec notamment l'apparition dans nos laboratoires de l'ICP-MS a permis une avancée nette de l'analyse des métaux et métalloïdes dans les matrices biologiques. Quand on se posait la question il y a encore une vingtaine d'année de la nature des milieux biologiques les plus adaptés pour mettre en évidence par exemple une carence ou une accumulation en éléments traces pour assurer un diagnostic ou un suivi, on répondait très classiquement sang (sang total, plasma ou sérum) ou urine. De façon plus exceptionnelle, on dosait les métaux dans le liquide céphalo-rachidien, le sperme, le lait, la salive ou les os. Actuellement, il devient d'usage plus courant de doser ces mêmes éléments dans d'autres types de matrices comme les cheveux ou même les ongles. Avec l'arrivée de l'ICP-MS, les publications sur ces nouvelles matrices se sont multipliées, montrant des résultats de qualité supérieure notamment en termes de sensibilité et de reproductibilité [1–5].

La sensibilité des techniques actuelles permet de doser l'ensemble des métaux à des concentrations de l'ordre de quelques ng/L dans les urines ou le sang par exemple ou de l'ordre de 1 pg/mg pour des matrices solides comme les cheveux [4]. Cependant, à ces niveaux de concentration, l'influence d'une éventuelle pollution devient un obstacle majeur et la littérature sur l'analyse des métaux dans les tissus et liquides biologiques comporte de nombreuses incohérences : souvent dues à des erreurs par excès provenant de contami-

nations de toutes origines, notamment atmosphériques, par les éléments communs contenus dans l'air ou dans les matériaux de construction. Ces erreurs sont d'autant plus importantes que les concentrations mesurées sont plus faibles. Il conviendra à l'analyste d'être particulièrement exigeant sur les conditions de prélèvements et sur la conservation avant même d'envisager un traitement et une analyse correcte de l'échantillon.

Cet article se limitera volontairement à la matrice biologique, écartant ainsi les nombreuses applications sur les sols, les aliments, les prélèvements atmosphériques... qui requièrent d'autres types de traitements. Il permet de montrer au lecteur qu'il conviendra d'être particulièrement vigilant à l'étape de la préparation des échantillons pour l'analyse des métaux en tenant compte de plusieurs critères comme la nature de la matrice, la zone de concentration étudiée ou le type d'instrument utilisé.

2 Les différents types de matrice, leur prélèvement, leur conservation

2.1 Le sang et les urines

Pour des raisons évidentes de praticabilité, d'intégrité et de standardisation, les prélèvements sanguins et urinaires représentent la majorité des analyses des métaux et métalloïdes.

Pour s'assurer de la qualité du prélèvement sanguin, différentes règles sont à respecter, connues pour certaines maintenant depuis longtemps. On sait qu'il existe un risque réel de contamination lors du prélèvement. On prendra ainsi des précautions particulières lors la désinfection cutanée (utilisation de mercure et d'antiseptiques mercuriels, de Dakin), lors de l'utilisation du matériel de prélèvement (aiguilles métalliques avec une utilisation privilégiée du cathéter en téflon) et lors du choix des types de tubes de prélèvements [6].

Le caoutchouc est à proscrire, car il peut entre autres véhiculer du zinc. Les tubes en verre ordinaire sont à proscrire et les matières plastiques sont souvent satisfaisantes après avoir fait l'objet de contrôles pour chaque élément considéré. D'une façon générale et dans la mesure du possible, on privilégiera l'emploi de tubes dits « spécifiques au dosage des éléments traces ».

L'inégale répartition des toxiques métalliques entre le plasma et les globules rouges amène à doser les métaux sur le sérum, le plasma, sur le sang total ou les globules rouges. Le plomb et le cadmium, à un moindre titre le zinc, sont fixés préférentiellement sur les érythrocytes, la répartition de l'aluminium étant au contraire essentiellement plasmatique. Le nickel et le cuivre se répartissent quant à eux de façon homogène. Dans la majorité des cas, l'emploi d'un anticoagulant s'impose : citrate de sodium, d'action limitée et présentant l'inconvénient d'être complexant ; héparinate de lithium, bien à l'exception du suivi de la lithiémie ; l'EDTA sodique ou les autres héparinates [6, 7].

Pour les urines, on utilise classiquement des flacons en polystyrène transparent munis d'un bouchon à vis en polypropylène. En raison des variations nyctémérales d'un grand nombre d'éléments traces, il est parfois recommandé de recueillir les urines sur 24 heures. Ce recueil et la conservation posent évidemment des problèmes de pollution. De plus, la présence de sédiments et de sels rapidement insolubles comme les phosphates par exemple, imposent d'effectuer ce recueil dans un récipient contenant un acide de qualité suprapur [6]. Cette détermination sur un échantillon de 24 heures étant en pratique difficilement réalisable et peu réalisée, on lui substitue la détermination dans un recueil urinaire en une fois prélevé le matin de préférence, ou en fin et début de poste en santé au travail dans d'autres cas. Les résultats sont alors exprimés par gramme de créatinine.

Il est souvent utile de rappeler qu'une mauvaise conservation peut modifier la composition du milieu et donc l'interprétation d'un résultat. La mauvaise conservation du mercure dans les urines est décrite depuis longtemps. Sans précaution particulière, près de 100 % du mercure disparaît après une conservation à +4 °C pendant 21 jours en flacons en polyéthylène. Le mercure peut être stabilisé dans le prélèvement par acidification nitrique et addition d'un oxydant (dichromate) qui limite la formation de HgO par réduction. De plus les ions $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ très adsorbés sur les parois du contenant empêchent la fixation des ions Hg^{2+} . Pour la plupart des autres métaux dans les urines, l'acidification nitrique suffit à assurer une bonne conservation pendant quelques semaines à +4 °C [7].

À l'heure actuelle, on considère qu'un prélèvement correctement réalisé n'est pas contaminant pour l'analyse et que les contrôles de qualités sont assez bien développés pour la majorité des métaux dans le sang et les urines. On ne peut pas en dire autant pour les autres types de matrices, l'effort de standardisation étant moins réel avec pratiquement très peu de contrôles certifiés sur le marché.

En médico-légal, pour le sang de cadavre, en raison des difficultés à obtenir des prélèvements destinés aux examens des métaux, deux types de contenant sont fréquemment utilisés : des flacons ronds en verre ordinaire de 15 mL contenant du fluorure de sodium, classiquement utilisés pour l'al-

coolémie et des tubes en polyéthylène téréphtalate (PET) de 4 mL contenant du fluorure de sodium et de l'oxalate de potassium [8]. Goullé et coll. en 2007 évaluent les différents contenants sur une population de 54 sujets décédés et décrivent l'augmentation de certains métaux en fonction des contenants. Par exemple, les auteurs décrivent une augmentation du baryum et du gallium sur des tubes de 7 mL pour éléments traces, tubes en verre spécial contenant de l'héparinate de sodium [8].

En 2009, une étude très intéressante de Goullé et coll. décrit l'influence du matériel de prélèvement sur le dosage multiélémentaire dans le plasma et dans le sang total [9]. Des tubes en verre pour éléments traces de 7 mL contenant de l'héparinate de Na (Becton Dickinson Diagnostics) et des nouveaux tubes en polyéthylène téréphtalate (PET) pour éléments traces de 4 mL contenant de l'EDTA di-K (BD Diagnostics) sont comparés. La conclusion de cette étude montre qu'aucun contenant n'est idéal.

2.2 Les phanères et autres types de matrices

Le liquide céphalorachidien représente un milieu liquide aisément accessible en contact étroit avec le tissu nerveux. Les concentrations rencontrées sont souvent 10 à 50 fois plus faibles que les concentrations plasmatiques. Il reste peu utilisé.

La salive et la sueur représentent des milieux facilement accessibles, relativement peu étudiés et limités à quelques études servant à établir des relations entre des déficits en zinc et l'agueusie (déficit en goût) ou la dyslexie dans certains pays chauds [6]. En général, le protocole de recueil est simple et rapide. Le prélèvement de salive est réalisé le matin avant toute alimentation, après rinçage de la bouche avec de l'eau distillée. Puis un nouveau volume d'eau est placé pendant 10 min dans la bouche fermée et recueilli dans des tubes en polypropylène. Après centrifugation, les échantillons sont conservés à -20 °C avant analyse.

Par rapport aux autres types de prélèvements biologiques, les cheveux présentent des avantages indiscutables parmi lesquels peuvent être cités les facilités de recueil, de stockage et de conservation. Les concentrations métalliques sont souvent importantes, insensibles aux variations fugaces et il est possible d'obtenir une information rétrospective sur l'imprégnation métallique de l'organisme en raison de la pousse relativement lente des cheveux [1].

L'intérêt de l'utilisation de cette matrice dans l'analyse des métaux a longtemps été très critiqué et notamment dans les années 1980 [10]. Les publications concluant sur l'inutilité de ce type d'analyse tendent à disparaître avec de nouvelles études plus spécifiques montrant qu'un traitement adapté et choisi en fonction de l'élément à analyser est à l'origine de résultats tout à fait acceptables en termes de validation [1, 4]. Il est certain que l'arrivée sur le marché des méthodes d'analyses multiélémentaires en ICP-MS et des méthodes de spéciation par ICP-MS/HPLC ont facilité cet essor. Cependant, les intérêts potentiels d'une telle analyse sont encore actuellement gênés par les difficultés analytiques posées par cet examen, liées en particulier aux problèmes de préparation d'échantillons rencontrés pour certains métaux.

L'étape de décontamination s'avère primordiale quand on a notion des nombreux problèmes de contamination liés à

Tableau I. Procédures de lavage des cheveux pour l'analyse des métaux et métalloïdes d'après la littérature.

Référence	Protocole
IAEA [12]	- Acétone : 3 fois 10 min à température ambiante - Eau permutée : 3 fois 10 min - Acétone : 3 fois 10 min à température ambiante
[13]	- Éthyl ether/acétone (3 : 1, v/v) - Séchage à 85 °C à l'étuve pendant 1 h - EDTA 5 % pendant 1 h - Rinçage à l'eau - Séchage à 85 °C à l'étuve pendant 16 h
[4, 5]	- Acétone : 5 min - Eau au bain marie à 38 °C : 5 min - Acétone : 5 min

une pollution importante de double origine, contamination par l'air ambiant et contamination par les produits cosmétiques. Il n'existe pas encore de technique de lavage consensuelle pour garantir l'élimination totale de cette contamination ni garantir l'intégrité du stock métallique endogène. Il en résulte que, selon les métaux analysés, les coefficients de variation entre les différentes techniques de lavages peuvent encore être enregistrés avec des valeurs supérieures à 20 % pour certains éléments. D'autre part, il n'existe que peu de contrôles de qualité.

À l'heure actuelle, l'intérêt de cette analyse se retrouve plus en médecine légale, toxicologie aigüe ou dans le cadre de recherches toxicologiques en santé environnementale (arsenic dans des situations de contamination hydrique, consommation alimentaire de méthylmercure...) que dans des études de carences nutritionnelles à l'échelon individuel [1, 3, 11]. Goullé et coll. en 2005 quantifient 32 éléments simultanément dans les cheveux [4]. Après décontamination par de l'acétone et de l'eau tiède, ils minéralisent 25 mg de cheveux (possibilité d'analyse au minimum de 10 mg) par 250 µL d'acide nitrique suprapur à 70 °C pendant une heure. La solution est ensuite refroidie une heure à -20 °C. L'analyse étant réalisée en ICP-MS, une dilution classique est ensuite décrite avec une solution constituée de butanol, d'acide nitrique et de triton en présence de deux étalons internes (indium et rhodium) [4] (voir paragraphe ICP-MS).

De nombreuses procédures de lavage ont été proposées dans la littérature (voir tableau I). Elles comprennent l'utilisation d'eau désionisée, de solvants (acétone et tétrachlorure de carbone), détergent non ioniques, détergents ioniques comme le sodium laurylsulfate, des agents chélateurs comme l'EDTA. Ces méthodes utilisent des phases de rinçage avec de l'eau désionisée, des solutions chaudes, des acides dilués et de l'eau distillée froide ainsi que des bains aux ultrasons et des mélanges de ces différents produits [2]. Il semble que l'utilisation des agents détergents pendant l'étape de lavage réduise les concentrations des éléments d'une façon plus importante que pour les solvants organiques. Cependant, pour les métaux lourds, les étapes de lavage n'ont pas d'influence majeure en raison de leurs liaisons fortes avec les groupes disulfides dans les protéines de la kératine [1]. Ainsi, l'IAEA (*International Atomic Energy Agency*) recommande une procédure de lavage utilisant acétone-eau-eau-acétone (tableau I). L'utilisation de cette procédure montre qu'il n'y a pas de perte

des métaux lourds pendant le lavage à l'acétone. Après cette étape, les cheveux sont habituellement minéralisés avec de l'acide nitrique à 70 °C et une dilution en finale est réalisée [4]. La décomposition de la matière organique est particulièrement importante pour les dosages des métaux et métalloïdes dans les cheveux et un mélange acide nitrique et eau oxygénée ou acide nitrique seul en vase clos est alors suffisant. Une digestion acide en milieu ouvert n'est pas recommandée pour une analyse en ICP-MS en raison des contaminations par les particules de l'air ambiant et de la perte des éléments volatils. Dans certains cas, le traitement utilise un système comme celui de la méthode micro-ondes avec digestion en milieu acide nitrique (voir paragraphe micro-ondes).

Les ongles constituent également une matrice intéressante pour le suivi des métaux et métalloïdes. Étant moins soumis à la contamination extérieure, ils ont été utilisés dans le cadre d'expositions professionnelles. L'étape de préparation de l'échantillon est également importante. Les échantillons dans ce cas sont minéralisés en milieu acide avant l'analyse, en milieu ouvert ou en milieu fermé par la méthode assistée par micro-ondes.

Goullé et coll. [5] décrivent une décontamination par de l'acétone et de l'eau tiède puis une minéralisation d'un échantillon de 20 mg (minimum 10 mg) par de l'acide nitrique suprapur pendant une heure à 70 °C dans un tube bouché. Après refroidissement, la solution acide est diluée en présence de triton et de butanol pour une multi-analyse de 32 éléments en ICP-MS [5].

Cependant, d'autres auteurs décrivent une méthode alternative utilisant une solution alcaline d'hydroxyde de tétraméthyl ammonium (tetramethylammonium hydroxide, TMAH) [14]. Les ongles sont constitués par de la kératine et des molécules de cystéine reliées entre elles par des ponts disulfures responsables de la solidité de la structure. Ils sont résistants à l'action des acides mais les ponts disulfures peuvent être cassés par des solutions alcalines fragilisant les ongles. Ainsi, le TMAH peut être utilisé dans le prétraitement comme méthode alternative à la méthode micro-ondes. Batista et coll. utilisent cette méthode pour analyser six métaux (Cd, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn) dans les ongles en IC-PMS [14].

Plusieurs études rappellent également que l'analyse des ongles de pieds doit être privilégiée car ils sont moins sensibles à la contamination que les ongles de mains [15, 16].

Morton met en évidence des concentrations moyennes de mercure plus élevées dans les ongles des mains des dentistes (1,42 µg/g) que dans celles des témoins (0,24 µg/g) et dans les ongles des pieds de ces mêmes dentistes (0,43 µg/g) que dans ceux des témoins (0,18 µg/g).

Cette matrice représente aujourd'hui une matrice intéressante mais il manque cependant encore de matériaux certifiés et de contrôles de qualité [5].

Les os peuvent être analysés dans certaines situations particulières comme par exemple dans le domaine de l'archéologie pour le dosage du strontium visant à étudier le comportement alimentaire. Moins fréquemment, les dents on également servi de matrice à l'analyse du strontium [7]. Les os doivent être dégraissés à l'aide d'un mélange alcool-éther puis séchés ou lyophilisés, ensuite minéralisés par voie humide en présence d'acide nitrique additionné ou non de peroxyde d'hydrogène.

Les dents sont nettoyées à l'eau désionisée au bain à ultrasons préalablement à la préparation de l'échantillon pour analyse [7].

3 Les différents modes de préparations d'échantillons

3.1 La dilution

Une simple dilution peut se montrer suffisante pour l'analyse des métaux dans les matrices biologiques liquides. Pour le plasma et le sérum, une dilution au 1/5^e ou au 1/10^e en milieu neutre ou acide (acide nitrique ou sulfurique dilué) est nécessaire pour diminuer la viscosité. La présence de triton assure en général une meilleure homogénéité de la solution.

Pour le dosage du fer dans les urines, l'échantillon peut être introduit directement dans le four graphite en SAA-ET et une simple dilution du sérum suffit à une analyse en SAA-ET ou en SAA flamme. Il sera préférable cependant de déprotéiniser l'échantillon par de l'HCl à 90 °C ou d'utiliser de l'acide trichloroacétique [7]. Cette méthode, recommandée par la SFBC comme méthode de référence, présente multiples intérêts permettant la rupture des liaisons protéiques, la précipitation des protéines, la réduction de Fe^{III} en Fe^{II} et l'élimination du cuivre. En revanche, elle est délicate et difficilement automatisable et reste donc peu utilisée par les biologistes.

Une simple dilution en présence d'un modificateur chimique est également possible pour l'analyse de nombreux métaux en SAA. Le dosage du vanadium par exemple, dans le sang ou dans le plasma, en présence d'un modificateur chimique sans minéralisation préalable par voie directe en SAA-ET, est facilement envisageable [7]. Cependant, cette méthode n'est applicable que dans le cadre d'expositions en santé au travail, et pour des concentrations plus faibles une préconcentration avec minéralisation ou extraction reste nécessaire.

En revanche, pour le dosage d'autres métaux comme le cadmium dans le sang par exemple, une méthode directe sans déprotéinisation ou sans extraction sera déconseillée même en présence d'un effet Zeeman en SAA-ET.

Citons en dernier exemple le dosage des différentes formes de l'arsenic dans les urines réalisé en chromatographie liquide haute performance couplée à l'ICP-MS [17]. Cette technique de spéciation qui permet de séparer les formes organiques et inorganiques toxiques des formes organiques non toxiques d'origine alimentaire est réalisée après injection directe d'un volume d'urine de 5 ou 10 µL ou après une simple dilution dans la phase mobile.

Ces exemples montrent que ce mode de préparation, bien que très pratique, ne peut pas s'appliquer dans toutes les situations et qu'une procédure de minéralisation lors du traitement de l'échantillon sera indiquée lorsqu'on cherche à optimiser la sensibilité de la méthode de dosage. Actuellement, les procédures de minéralisation décrites ci-dessous restent celles utilisées plus fréquemment (Section 3.3. La minéralisation)

3.2 La chélation-extraction

Une étape d'extraction est nécessaire dans certains cas, comme par exemple pour le dosage en SAA-ET de l'arsenic total « non alimentaire » ou d'intérêt toxicologique dans les urines. L'extraction dans ce cas permet d'isoler les formes organiques et inorganiques d'intérêt toxicologique. C'est une méthode simple et rapide qui consiste en milieu acide en présence d'iodure de potassium à réduire les espèces arsénées sous formes correspondantes de complexes d'iodures d'arsines. Ces dernières sont extraites par le toluène puis reprises en milieu aqueux avant d'être dosées en SAA-ET [18]. Seul l'arsenic minéral et ses métabolites méthylés sont extraits, et l'arsenic alimentaire principalement sous les formes d'arséno-bétaine ou d'arsénocholine est éliminé.

3.3 La minéralisation

La plupart des méthodes permettant l'analyse des éléments traces dans des matrices biologiques utilisent la SAA ou l'ICP qui nécessitent des étapes de digestion/dissolution. En effet, les étapes de décomposition de l'échantillon et de transformation en une phase liquide homogène avant l'analyse sont nécessaires [19]. Ainsi, la préparation d'échantillon reste l'étape essentielle de ces méthodes et l'efficacité de la méthode de digestion est particulièrement importante pour obtenir des résultats précis et reproductibles.

La minéralisation paraît s'imposer dans de nombreux cas, surtout pour des échantillons solides. Elle permet de limiter ou de faire disparaître les interférences liées aux matières organiques et de réaliser en outre une concentration qui améliore la sensibilité des mesures. Il paraît en effet évident qu'une prise d'essai liquide ou solide, riche en matière organique, pourra être ainsi fortement concentrée lors de la reprise par un volume réduit d'un solvant convenable.

Elle peut être réalisée par voie sèche ou par voie humide mais cette dernière s'impose permettant par l'utilisation de milieux acides, la limitation des pertes par volatilisation comme dans le cas du dosage de l'arsenic ou du sélénium. La minéralisation par voie humide est le processus le plus utilisé actuellement, qui se prête bien à l'analyse en série. Il est ainsi aisé d'opérer à température contrôlée, simultanément sur de nombreux échantillons placés dans un thermostat.

La minéralisation peut entraîner des pertes par volatilisation, absorption, adsorption, ou transformation. Cependant, c'est fréquemment la contamination (réactifs, matériels utilisés, air ambiant...) qui risque de gêner la détermination et oblige l'analyste à évaluer cette contamination par un blanc représentatif.

Les méthodes de mise en solution sont nombreuses et classiquement, on décrit deux types de méthodes de digestion fondées sur le principe de la fusion (voie sèche) ou de la digestion par les acides (voie humide).

- **Digestion par voie sèche** : elle reste peu utilisée. Par cette voie, les échantillons solides sont mélangés à différents types de réactifs et chauffés à hautes températures (supérieures à 600 °C). L'acide nitrique ou un autre acide est ensuite ajouté pour permettre l'analyse de l'échantillon.

Cette méthode présente les inconvénients de conserver une quantité de particules non dissoutes qui augmente le bruit de fond, et d'entraîner la perte des métaux volatils.

- **Digestion par voie humide par solubilisation par l'acide sulfurique (H_2SO_4) ou par les mélanges d'acides nitroperchloriques (HNO_3 , $HClO_4$) en présence d'agents oxydants comme l'eau oxygénée.**

La minéralisation par voie humide impose l'utilisation de réactifs de qualité ultrapure (acides minéraux concentrés) afin d'observer des valeurs de blancs aussi faibles que possible.

Ces deux méthodes, la seconde étant prédominante, présentent les inconvénients d'être consommatrices de temps. Ainsi, une nouvelle alternative est actuellement largement utilisée :

- **Calcination (minéralisation assistée par micro-ondes) :** dès l'arrivée de cette méthode, de nombreuses applications ont été décrites dans la littérature à partir du début des années 1970 [20]. Les méthodes de digestion par micro-ondes sont classées selon leur mode opérationnel. On décrit le mode « en réacteur ouvert » favorable à la contamination extérieure et à la perte de métaux volatils ou le mode « en réacteur fermé » sous pression plus rapide et plus efficace.

La méthode de minéralisation assistée par micro-ondes peut être optimisée en faisant varier quelques paramètres comme le volume, la nature ou la concentration des acides et de l'agent oxydant ou en faisant varier les paramètres physiques des micro-ondes comme la pression, la température ou le temps de chauffage [21]. Cependant, cette méthode n'est pas applicable à de grands nombres d'échantillons car un nombre peu important de réacteurs est placé dans chaque cycle. D'autre part, il est important d'alterner ces cycles avec des cycles de nettoyage indispensables pour éviter la contamination par effet mémoire. On privilégiera pour cette méthode de minéralisation les réacteurs en téflon.

On prendra comme exemple celui de l'analyse des cheveux. Après des étapes de lavage primordiales, une minéralisation assistée par méthode micro-ondes est fréquemment décrite dans la littérature [4]. Dans l'étude de Goullé et coll., les cheveux sont introduits dans des réacteurs de minéralisation en téflon (volume <10 mL) puis de l'acide nitrique suprapur (400 μ L) et de l'eau oxygénée stabilisée suprapur (200 μ L, 10 volumes à 3 %) sont ajoutés [4]. La qualité des solvants est essentielle dans cette étape de minéralisation et les réacteurs de minéralisation doivent avoir été préalablement décontaminés. En vase clos, les réacteurs sont placés dans l'étuve à une température pouvant varier entre 80 °C et 110 °C pendant une à deux heures. Les tubes sont ensuite laissés à refroidir pendant au moins deux heures à température ambiante ou placés à -20 °C. Les réacteurs sont ouverts sous hotte pour transférer le minéralisat dans des tubes en polypropylène (10 mL) décontaminés. L'échantillon est ensuite dilué dans de l'eau permutée [4].

Enfin, il était difficile de parler de la technique micro-ondes couplée à l'analyse en ICP-MS pour l'analyse des métaux dans les matrices biologiques sans citer les derniers travaux de P. Charlier et J. Poupon publiés en 2010 sur l'analyse médico-légale des reliques de Jeanne d'Arc [22]. Dans cette

étude, les échantillons pesés précisément (fémur, vertèbres, tissus...) sont placés dans une solution d'acide (acide nitrique à 65 %) dans des réacteurs en téflon de 100 mL dans un système micro-ondes type CEM MDS 2000. Après solubilisation complète, de l'eau ultrapure (résistivité supérieure à 18 MV) est ajoutée pour obtenir des concentrations finales de l'ordre de 1 à 5 g/L. Dans cette étude exceptionnelle, l'analyse des métaux participe à l'analyse multidisciplinaire permettant de dire que le contenu des bouteilles de Chinon présentés comme les reliques de Jeanne d'Arc ne sont pas authentiques.

Récemment, Batista et coll. décrivent une solution alternative à la technique de minéralisation assistée par micro-ondes par l'utilisation d'une solution alcaline [19]. Le tétraméthylammonium hydroxyde (TMAH) est utilisé pour favoriser les coupures hydrolytiques, la méthylation des esters, amides et éthers et les coupures des ponts disulfures présents dans les protéines. Batista et coll. mettent en avant cette technique pour sa simplicité [19]. Les échantillons biologiques tissulaires (75 mg) sont solubilisés en milieu alcalin (1 mL de TMAH, 50 % v/v) à température ambiante pendant 12 h. Une dilution est ensuite réalisée (acide nitrique, triton X-100) et conservée à -20 °C pendant 72 heures avant l'analyse. Une technique très longue, qui permet d'obtenir de meilleurs résultats en terme de sensibilité avec une amélioration de la limite de détection en comparaison à celles obtenues en technique de minéralisation assistée par micro-ondes pour certains éléments comme l'arsenic.

4 La préparation d'échantillons en SAA

L'utilisation de la SAA permet l'analyse des métaux dans de nombreux types de matrices de nature liquide ou solide (sang, urine, cheveux, salive...). Les différents exemples précédemment décrits montrent que sans extraction de la matrice biologique et très souvent par simple dilution, on peut minimiser les effets de la matrice dus aux protéines, sels et autres constituants dans la majorité des cas. Pour les matrices solides, une étape de minéralisation est cependant nécessaire.

L'utilisation de modificateurs chimiques reste très classique dans l'analyse en SAA-ET. Ils permettent de minimiser l'influence des interférences dues à la matrice. Et dans certains cas, une dilution appropriée en présence de modificateurs permet d'éviter la méthode des ajouts. L'utilisation de modificateurs est recommandée pour favoriser une stabilisation de la température dans le four. Ils permettent d'augmenter la température de pyrolyse et ainsi de réduire les effets de matrice. En plus, cette procédure stabilise l'analyse dans la plateforme du four et améliore la séparation des signaux de l'analyte et du bruit de fond.

Le dihydrogène phosphate est utilisé comme modificateur chimique pour le plomb et le nickel car introduit dans la solution, il permet d'éviter les pertes des analytes avant l'atomisation. Un mélange de palladium et de magnésium sous forme de nitrates est recommandé de façon universelle comme modificateur pour le dosage du chrome et du cadmium [23] (tableau II).

D'autre part, pour certains éléments la détermination par SAA-ET est source de difficultés non négligeables et les

Tableau II. Exemple de modificateurs chimiques de matrices utilisés en SAA-ET.

Élément	Modificateurs chimiques
Cadmium	Dihydrogénophosphate d'ammonium ou nitrate d'ammonium
Vanadium	Citrate de sodium ou phosphate d'ammonium
Argent	Phosphate d'ammonium
Bore	Sels de calcium en présence d'acide ascorbique
Chrome	Nitrates de palladium et magnésium ou ruthenium [23]
Cuivre	Nitrates de palladium et magnésium ou ruthenium [23]
Arsenic	Nitrate de nickel
Antimoine	Nitrate de nickel
Aluminium	Nitrate de magnésium
Béryllium	Nitrate de magnésium

faibles teneurs urinaires, la matrice très chargée en sels minéraux, nécessitent souvent le recours à un appareillage muni d'une correction de fond par effet Zeeman. À côté de ces modificateurs chimiques, l'utilisation d'une correction par cet effet est recommandée pour atténuer les absorbances dus à la matrice et en général les meilleurs résultats pour la plupart des éléments dans les différentes matrices biologiques sont obtenus par des méthodes utilisant de façon concomitante les modificateurs chimiques et l'effet Zeeman en SAA-ET [24].

Pour certains éléments comme le mercure, le sélénium ou l'arsenic, on peut utiliser la SAA à génération d'hydrures (SAA-GH). Par exemple, pour l'analyse de l'arsenic dans le sang ou les urines, on minéralise l'échantillon avec un mélange contenant de l'acide nitrique, de l'acide sulfurique et de l'acide perchlorique, tous de qualité suprapur. Après la minéralisation et l'évaporation totale qui permet d'éliminer les acides, on ajoute en milieu acide (HCl) de l'iodure de potassium et de l'acide ascorbique pour transformer As^V en As^{III}. Cette solution sera ensuite injectée dans un gaz porteur (ex : HCl à 10 %) en présence de borohydrure de Na (NaBH₄) entrant la formation d'hydrures d'arsenic [7].

5 La préparation d'échantillons en ICP-MS

La sensibilité et les limites de détection accessibles aujourd'hui en ICP-MS permettent la détermination des éléments traces dans des fourchettes de concentrations allant de 0,1 à 100 µg/L et des ultra traces à des concentrations inférieures à 0,1 µg/L. Une attention particulière sera à apporter à la maîtrise des contaminations, depuis le prélèvement jusqu'à son analyse (voir paragraphe sur les matrices sang et urine). Le prétraitement de l'échantillon et l'analyse seront à faire en salle propre.

Les interférences non spectroscopiques fréquemment rencontrées en ICP-MS sont en partie liées aux effets relatifs dus aux caractéristiques des échantillons : viscosité, concentration en acide, concentration en solides dissous, qui peuvent affecter la nébulisation et le transport de l'aérosol. Il est ainsi préférable de limiter la concentration en sels à 0,1 % environ. Inversement, un ajout modéré de l'ordre de 1 à 2 % d'un alcool

Tableau III. Exemples de préparations d'échantillons pour une analyse en ICP-MS [17].

Élément	Matrice	Description préparation échantillon
Plomb	Sang	500 µL sang (anticoagulant) 0,05 µg strontium (E.I) Dilution 1/10 ^e dans diluant (0,1 % triton, 0,2 % butanol-1, 1 % HNO ₃)
Mercure	Urine	500 µL urine Dilution 1/10 ^e dans un diluant (1 % HNO ₃)
Chrome	Sang	500 µL sang (anticoagulant) Dilution 1/20 ^e dans diluant (0,05 % triton, 2 % butanol-1, 0,05 % EDTA, 1 % NH ₃)
Arsenic (spéciation en HPLC-ICPMS)	Urine	Pas de préparation d'échantillon Injection directe de 5 µL

aliphatique de 1 à 4 carbones peut exalter le signal des éléments par augmentation du taux d'ionisation et accroissement de l'efficacité de la nébulisation.

De façon générale, la résolution des interférences non spectroscopiques peut être envisagée par l'utilisation d'un étalon interne de masse et de potentiel d'ionisation similaires à ceux de l'analyte à doser.

La préparation proprement dite des échantillons biologiques pour une analyse en ICP-MS nécessite une dilution de façon à respecter les conditions de salinité et les niveaux de concentrations en analytes compatibles avec la technique. À partir d'un volume d'échantillon de quelques centaines de microlitres, le facteur de dilution classiquement appliqué en ICP-MS varie de 1/5^e à 1/10^e pour des matrices peu chargées comme les urines ou le plasma et jusqu'à 1/20^e pour le sang total.

On peut envisager différents types de préparation d'échantillons :

- une simple dilution en milieu acide (acide nitrique à 1 ou 2 %) ou en milieu basique (ammoniacale à 0,5 %) ; l'ammoniacale favorise l'hémolyse et la dissolution des protéines et peut minimiser la formation des interférences polyatomiques type argon-chlore par capture des ions chlorures, relativement abondants dans les matrices biologiques [25] ;
- une dilution en présence d'un chélateur (EDTA à 0,1 g/L) pour maintenir les éléments volatils dans la solution et éviter un effet mémoire ; d'un alcool (n-butanol) pour améliorer l'ionisation de certains éléments [26] ; d'un tensioactif (triton X-100) pour favoriser la nébulisation et empêcher l'adhésion de l'échantillon aux parois du nébuliseur ; et d'un ou plusieurs étalons internes. Ces différents constituants seront utilisés en proportions variables selon les éléments à doser et selon les matrices (tableau III) [17] ;
- ou pour les matrices plus ou moins solides, une minéralisation par voie humide en utilisant des acides seuls ou en

mélange assistée ou non par la méthode micro-ondes, avant d'envisager une dilution précédemment décrite.

6 Conclusion

Il est primordial d'être particulièrement vigilant à la préparation des échantillons pour l'analyse de métaux en tenant compte de la matrice utilisée, de la méthode d'analyse choisie et du type de métal à doser. Les différents exemples de la littérature précédemment cités montrent qu'il faut parfois développer dans des conditions particulières une méthode spécifique à un élément, pour un dosage dans une matrice particulière. L'ICP-MS a certainement révolutionné nos laboratoires dans l'analyse des métaux ; cependant il reste encore des améliorations à apporter dans la préparation des milieux biologiques, notamment dans les applications sur les matrices alternatives.

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

Références

- Goullé JP. Metals. In: Kintz P. (Ed). Analytical and practical aspects of drug testing in hair. Boca Raton: Taylor and Francis, CRC Press 2006: 343-370.
- Raghupathy L, Harada M, Ohno H, Naganuma A, Imura N, Doi R. Methods of removing external metal contamination from hair samples for environmental monitoring. *Sci Total Environ.* 1988; 77: 141-151.
- Cespon-Romero RM, Yebra-Biurru MC. Flow injection determination of lead and cadmium in hair samples from workers exposed to welding fumes. *Anal Chim Acta.* 2007; 600: 221-225.
- 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 ICP-MS. 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 ICP-MS. Valeurs usuelles chez 130 sujets volontaires. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19: 125-134.
- Chappuis P, Poupon J. Les différents prélèvements utilisables pour l'analyse des métaux en biologie. In: Les oligoéléments en médecine et biologie. Paris: Lavoisier 1991: 157-175.
- Pineau A, Guillard O. Techniques d'analyses des oligoéléments chez l'homme. Paris: Lavoisier 2001.
- Goullé JP, Mahieu L, Maignant V, Bouige D, Sausseureau E, Lacroix C. Valeurs usuelles des métaux et métalloïdes dans le sang total et les urines par ICP-MS chez cinquante-quatre sujets décédés. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19 (1): 43-52.
- Goullé JP, Mahieu L, Sausseureau E, Bouige D, Guerbet M, Lacroix C. Dosage multiélémentaire dans le plasma et le sang total par ICP-MS: influence du matériel de prélèvement. *Ann Toxicol Anal.* 2008; 20: 97-102.
- Barret S. Commercial hair analysis. Science or scam? *JAMA.* 1985; 254: 1041-1045.
- Zolfaghari G, Esmaili-Sari A, Ghasempouri SM, Faghihzadeh S. Evaluation of environmental and occupational exposure to mercury among Iranian dentists. *Sci Total Environ.* 2007; 381: 59-62.
- Ryabukhin Y. Activation analysis of hair as Na indicator of contamination of man by environmental trace elements pollutants, IAEA/RL/50, Vienna 1978: 132.
- Senofonte, Violante N, Caroli S. Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys. *J Trace Elem Med Biol.* 2000; 14: 6-13.
- Batista B, Rodrigues J, Nunes J, Tormen L, Curtius A, Barbosa F. Simultaneous determination of Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in nail samples by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature: comparison with ETAAS. *Talanta* 2008; 76: 575-579.
- Barbosa F, Tanus-Santos J, Gerlach R, Parsons P. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect.* 2005; 12: 1669-1674.
- Morton J, Mason H, Ritchie K, White M. Comparison of hair, nails and urine for biological monitoring of low level inorganic mercury exposure in dental workers. *Biomarkers.* 2004; 9: 47-55.
- Labat L, Dhorne C, Klinzig F, Dehon B, Lhermitte M. ICPMS et toxicologie professionnelle. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19 (1): 22-30.
- Fillol C, Dor F, Labat L, Boltz P, Le Bouard J, Mantey K, Mannschott C, Puskarczyk E, Viller F, Momas I, Seta N. Urinary arsenic concentrations and speciation in residents living in an area with naturally contaminated soils. *Sci Total Environ.* 2009; 408: 1190-1194.
- Batista B, Rodrigues J, Nunes J, De Oliveira Souza V, Barbosa F. Exploiting dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS) for sequential determination of trace elements in blood using a dilute-and-shoot procedure. *Anal Chim Acta.* 2009; 639: 13-18.
- Millosb J, Costas-Rodríguez M, Lavilla I, Bendichoa C. Multiple small volume microwave-assisted digestions using conventional equipment for multielemental analysis of human breast biopsies by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 2009; 77: 1490-1496.
- Al-Harashsheha M, Kingmanb S, Somerfieldb C, Ababnehc F. Microwave-assisted total digestion of sulphide ores for multielement analysis. *Anal Chim Acta.* 2009; 638: 101-105.
- Charlier P, Poupon J, Eb A, et al. The relics of Joan of Arc: a forensic multidisciplinary analysis. *Forensic Sci Int.* 2010; 194: e9-e15.
- Lelis K, Magalhães C, Rocha C, Silva J. Direct determination of Cr and Cu in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using ruthenium as permanent modifier (R1). *Anal Bioanal Chem.* 2002; 374: 1301-1305.
- Olmedo P, Pla A, Hernández AF, López-Guarnido O, Rodrigo L, Gil F. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2010; 659: 60-67.
- Moesch C. Utilisation de l'ICP-MS en biologie clinique. *Ann Toxicol Anal.* 2007; 19(1): 11-22.
- Allain P, Jaunault L, Mauras Y, Mermet JM, Delaporte T. Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem.* 1991; 63: 1497-1498.