

Université de Montréal

**Mise au point d'une méthode d'analyse multiélémentaire de métaux
dans les tissus biologiques par spectrométrie de masse à plasma ICP**

par

Gaston Arseneault

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
en chimie

janvier, 99

©Gaston Arseneault, 1999



QD

3

U54

1999

V.006



Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Mise au point d'une méthode d'analyse multiélémentaire de métaux
dans les tissus biologiques par spectrométrie de masse à plasma ICP**

présenté par :

Gaston Arseneault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christian Reber..... membre du jury

Joseph Hubert..... directeur de recherche

Karen Waldron..... membre du jury

Mémoire accepté le :19-03-99.....

SOMMAIRE

La contamination des espèces végétales et animales et/ou terrestres par l'humain est certes devenue la majeure préoccupation des scientifiques concernés depuis quelques années déjà. Or, la quête d'information et de données sur la contamination est constante, de façon à développer des modèles statistiques réalistes. Donc la mise au point de méthodes d'analyses de différentes substances dans diverses matrices ne se démode pas. L'évolution en parallèle de la chimie analytique tend vers des appareils et des techniques de plus en plus performantes. La jonction des deux devient alors intéressante.

La méthode d'analyse proposée dans ce travail permet d'analyser quelques métaux (cadmium, cuivre, chrome, manganèse, nickel, plomb et zinc) dans des tissus biologiques. La préparation de l'échantillon consiste à une digestion de 100 mg de tissu sec avec un mélange d'acide nitrique et de peroxyde d'hydrogène à 105 °C. Cette s'est avérée la plus efficace selon les critères suivants : *i*) la récupération des ajouts, *ii*) la qualité des résultats obtenus, *iii*) la qualité de la dégradation de la matière organique, et *iv*) la performance analytique. Les digestats résultant sont tellement clairs qu'ils peuvent être injectés directement, sans centrifugation, dans l'instrument de mesure, le spectromètre de masse à plasma d'argon (ICP-MS). Les limites de détection obtenues avec la méthode mise au point sont de l'ordre de 0,03 µg/g de tissu sec pour Cd, Pb et Mn, de 0,04 µg/g pour Cr et de 0,5-0,6 µg/g pour Cu et Zn.

La qualité des résultats obtenus est assurée par la digestion et l'analyse de deux matériaux de référence certifiés : le foie de boeuf du NBS (aujourd'hui appelé NIST) 1577a et le foie de roussette DOLT-2 du Conseil National de Recherche Canada. Les moules semi-cultivées destinées à la consommation achetées dans un supermarché ont aussi servi à la mise au point de la méthode d'analyse.

Cette méthode d'analyse simple et efficace pourra servir à toute personne voulant faire l'analyse multiélémentaire de métaux dans des tissus biologiques et bénéficier des faibles limites de détection, de la bonne précision des autres avantages du spectromètre de masse à plasma ICP. Par exemple, que ce soit pour effectuer des mesures internes de façon occasionnelle ou routinière, ou encore pour l'élaboration d'un modèle statistique de contamination.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iii
TABLE DES MATIÈRES	iv
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vii
REMERCIEMENTS	ix
GLOSSAIRE	x
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Problématique environnementale et analytique.	1
1.2. Objectifs du projet.....	4
1.3. Spectrométrie de masse à plasma ICP.....	5
1.3.1. Historique du ICP-MS.....	5
1.3.2. Définition et propriétés d'un plasma ICP	5
1.3.3. Instrumentation.	6
1.3.3.1. Principe d'opération.....	6
1.3.3.2. Production d'un plasma ICP.....	7
1.3.3.3. Interface.....	9
1.3.3.4. Système de focalisation ionique.....	10
1.3.3.5. Analyseur de masse à filtre quadrupolaire.....	10
1.3.3.6. Détection.....	12
1.3.4. Introduction d'échantillons en spectrométrie de masse à plasma ICP.....	13
1.3.4.1. Introduction d'un gaz dans un plasma ICP.....	14
1.3.4.2. Injection d'un liquide dans un plasma ICP.....	14
1.3.4.2.1. Nébulisation pneumatique.....	15
1.3.4.2.2. Nébulisation ultrasonique.....	17
1.3.4.2.3. Chambres de nébulisation.....	18
1.3.4.2.4. Vaporisation électrothermique.....	20
1.3.5. Injection d'un solide dans un plasma ICP.....	21
1.4. Interférences.....	22
1.4.1. Interférences physiques.....	22
1.4.2. Interférences chimiques.....	23
1.4.3. Interférences spectrales.....	23
1.4.3.1. Interférences dues au fond spectral.....	24
1.4.3.2. Interférences isobariques.....	24
1.4.3.3. Oxydes, hydroxydes et ions doublement chargés.....	24
1.4.3.4. Effets de matrice.....	26

1.5.	Digestion de tissus biologiques.....	27
1.5.1.	Méthodes de digestion.....	27
1.5.2.	Efficacité de l'oxydation.....	30
1.5.3.	Produits de décomposition.....	32
1.6.	Définitions.....	32
1.6.1.	Précision.....	33
1.6.2.	Intervalle de confiance.....	33
1.6.3.	Blanc d'étalonnage.....	33
1.6.4.	Blanc chimique.....	33
1.6.5.	Limite de détection instrumentale.....	34
1.6.6.	Limite de détection d'une méthode d'analyse.....	34
1.6.7.	Pourcentage de récupération.....	35
2.	PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	36
2.1.	Eau purifiée.....	36
2.2.	Nettoyage des contenants.....	36
2.3.	Préparation des solutions étalons.....	36
2.4.	Traitement des moules.....	38
2.5.	Préparation des digestats.....	38
2.6.	Instrumentation.....	39
2.7.	Acquisition des données et calculs.....	42
3.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	43
3.1.	Choix des isotopes et étude des interférences spectrales possibles.....	43
3.2.	Optimisation de la digestion.....	47
3.2.1.	Soustraction du blanc chimique.....	52
3.2.2.	Centrifugation.....	55
3.3.	Performances analytiques.....	60
3.3.1.	Limites de détection et de quantification.....	60
3.3.2.	Répliquabilité et répétabilité de la digestion.....	64
3.3.3.	Rapidité de la digestion.....	71
3.4.	Étude de l'effet de la matrice.....	72
3.4.1.	Récupération des ajouts.....	72
3.4.2.	Ajouts dosés.....	76
3.4.3.	Comparaison de l'étalonnage interne aux ajouts dosés.....	80
4.	CONCLUSION.....	94
	BIBLIOGRAPHIE.....	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Performances analytiques des nébuliseurs les plus utilisés.....	17
Tableau II :	Solutions mères d'analyte à 1000 µg/mL.....	37
Tableau III :	Conditions d'opération du spectromètre de masse à plasma ICP pour l'analyse des digestats.....	41
Tableau IV :	Concentration de C, Ca, Cl, P, K, Na et S requise dans la matrice (mg/L) pour donner une concentration apparente en analyte non négligeable.....	45
Tableau V :	Teneur en éléments interférents dans le foie de boeuf certifié NBS1577a et les moules.....	46
Tableau VI :	Concentration (µg/g) équivalente à un blanc chimique pour une digestion par HNO ₃ seul et HNO ₃ + H ₂ O ₂ à 105 °C.....	53
Tableau VII :	Concentrations mesurées (µg/g) dans le foie de boeuf certifié NBS 1577a avec et sans soustraction du blanc chimique pour deux méthodes de digestion.....	54
Tableau VIII :	Concentrations obtenues (µg/g) pour le foie de boeuf certifié NBS 1577a avec ou sans centrifugation du digestat.....	57
Tableau IX :	Étude de récupération des analytes dans les moules et le foie de boeuf sans centrifugation des digestats obtenus par une digestion de 30 min avec HNO ₃ et de 20 min avec H ₂ O ₂	59
Tableau X :	LD _i (µg/g) et LD _m (µg/g) mesurées pour diverses procédures de digestion et limites de détection obtenues par d'autres auteurs.....	61

Tableau XI :	Limites de détection (LD_m) et de quantification (LQ) en $\mu\text{g/g}$ pour les métaux d'intérêt selon la digestion de 15 min avec HNO_3 et de 20 min avec H_2O_2	64
Tableau XII :	Mesures de réplicabilité et de répétabilité pour les moules pour deux méthodes de digestion.....	66
Tableau XIII :	Mesures de réplicabilité et de répétabilité pour le foie de boeuf certifié pour deux méthodes de digestion.....	68
Tableau XIV :	Mesures de réplicabilité et de répétabilité pour le foie de roussette certifié pour la digestion avec HNO_3 pendant 15 min et H_2O_2 pendant 20 min.....	70
Tableau XV :	Pourcentages de récupération des analytes ^a durant la digestion du foie de boeuf certifié NBS 1577a par trois procédures.....	73
Tableau XVI :	Pourcentages de récupération des analytes durant de la digestion de moules par trois procédures.....	75
Tableau XVII :	Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans le foie de boeuf certifié par ajouts dosés selon la procédure de Lauzon (a) et la procédure retenue (b).	79
Tableau XVIII :	Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans le foie de boeuf certifié NBS 1577a par étalonnage interne (EI) et par ajouts dosés (AD).....	82
Tableau XIX :	Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans le foie de roussette certifié DOLT-2 par étalonnage interne et ajouts dosés par digestion avec HNO_3 pendant 15 min + H_2O_2 pendant 20 min à 105 °C.....	89
Tableau XX :	Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans les moules par étalonnage interne (EI) et par ajouts dosés (AD).....	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Spectromètre de masse à plasma ICP.....	8
Figure 2 :	Nébuliseurs <i>a)</i> concentrique, <i>b)</i> à flots croisés et <i>c)</i> Babington à rainure en V.....	16
Figure 3 :	Chambres de nébulisation: <i>a)</i> cyclonique et <i>b)</i> type Scott.....	19
Figure 4 :	Spectromètre de masse à plasma ICP PlasmaQuad II de VG Elemental.....	40
Figure 5 :	Influence du temps de chauffage avec H ₂ O ₂ 30 % (p/p) sur l'efficacité de la digestion. Digestion préalable de 15 min avec HNO ₃ concentré.....	51
Figure 6 :	Schémas analytiques des méthodes des ajouts dosés selon la procédure de Lauzon (<i>a)</i>) et selon la procédure retenue (<i>b)</i>).....	78

*à Caroline, Diane, Albert,
Paul, Richard,
George et John O.*

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Joseph Hubert, pour m'avoir accepté dans son équipe de recherche. Je lui suis très reconnaissant pour les précieux conseils prodigués au niveau du développement de méthodes de travail et de rédaction.

Je remercie également les membres de l'équipe ancienne et actuelle du Dr Hubert, soit les Drs Robert Sing, Denis Boudreau et Yves Leblanc, ainsi que Khanh Chi Tran Buy, Jean-François Archambault, Claude Lauzon, Marie-Julie Lévesque, Caroline Guay-Adam, Cyril Clerk, Barbara Côté et Benoît Lavielle pour leur aide et le beau climat de travail.

Sur le plan technique, je garde des remerciements très spéciaux à l'endroit de Khanh Chi Tran Buy pour son aide durant de ce projet et spécialement sur le spectromètre de masse à plasma induit par radiofréquences. Robert Sing reçoit également ma gratitude à ce niveau.

Au niveau personnel, je désire remercier mon épouse Caroline Cormier, sans qui je n'aurais probablement pas été à l'université, ou du moins en maîtrise. Son encouragement et ses bons conseils m'ont été d'un grand réconfort.

Finalement, au niveau financier, la bourse du Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) a été grandement appréciée.

GLOSSAIRE

AD	ajouts dosés
atm	atmosphère
cps	compte d'ions par seconde
D	diamètre moyen des gouttelettes
EI	étalonnage interne
f	fréquence
IC	intervalle de confiance
ICP	"inductively coupled plasma"
ICP-AES	spectromètre/spectrométrie d'émission atomique à plasma ICP
ICP-MS	spectromètre/spectrométrie de masse à plasma ICP
LD	limite de détection
LD _i	limite de détection instrumentale
LD _m	limite de détection de la méthode d'analyse
LQ	limite de quantification
MO	micro-ondes
NBS	"National Bureau of Standards"
N _e	densité électronique
NIST	"National Institute of Standards"
PC	"pulse counting"
PJ	"peak jumping"
PTFE	polytétrafluoroéthylène
RF	radiofréquence
SIM	"single ion monitoring"
T	température
tpm	tours par minute
uma	unité de masse atomique

1. INTRODUCTION

1.1 Problématique environnementale et analytique

Tous les métaux étudiés dans ce travail sont disponibles naturellement, mais l'activité humaine a contribué grandement à changer leur distribution et à augmenter leur quantité en certains lieux suite à l'industrialisation.

Le chrome (Cr) est retrouvé à deux degrés d'oxydation principaux dans la nature, soit le Cr(III) et Cr(VI). Le Cr(IV) est le plus rare et il est très toxique. Le Cr(III) est un élément essentiel et peu toxique et assez abondant dans la nature. Son ingestion en fortes doses peut causer des problèmes pulmonaires [1]. La principale source de chrome est la chromite, un minéral. Ses usages sont surtout en métallurgie et dans la préparation de pigments dans les peintures [1].

Le manganèse (Mn) est essentiel pour l'humain. De couleur gris-blanchâtre, le Mn n'est pas retrouvé à l'état métallique dans la nature. On le retrouve principalement sous forme de carbonate et d'oxyde [1]. Les principales sources de pollution par Mn sont : les fumées, les poussières, l'industrie minière et métallurgique et les fonderies d'acier [2]. Près de 90 % du Mn est utilisé pour la production de l'acier ; on l'utilise aussi pour la fabrication d'engrais, de teintures et de peintures [2]. Du Mn ingéré, seulement 1 à 3 % est absorbé par le tractus intestinal et le temps de demi-vie de Mn dans l'organisme est d'environ 30 jours [1]. De longues expositions à de fortes doses peuvent provoquer une hypertonie musculaire, semblable à la maladie de Parkinson, et des troubles psychologiques du même ordre que la schizophrénie [1, 3].

Le nickel (Ni) est surtout utilisé pour la production d'acier, de dispositifs électroniques et de piles rechargeables nickel-cadmium [1]. Le Ni est considéré comme essentiel pour plusieurs espèces d'animaux, mais pour l'humain, sa nécessité n'a toujours pas été démontrée [1]. Le Ni absorbé par l'organisme humain représente 10 % du Ni ingéré [1].

Métal essentiel, le cuivre (Cu) est abondant dans la croûte terrestre. Il est étroitement lié au métabolisme du fer car il joue un rôle actif dans la synthèse de l'hémoglobine [4]. On l'utilise principalement dans la fabrication d'équipements électriques, d'alliages et de pesticides [1]. L'absorption du Cu chez l'humain est influencée par la quantité de Cu dans le corps. L'absorption représente en moyenne 57 % de la quantité ingérée. Le foie, le cerveau, les reins et les muscles sont les organes contenant le plus de Cu [1].

Autre métal essentiel, le zinc (Zn) est celui dont la demande quotidienne est la plus élevée (10-15 mg/j). Le sulfure de zinc (ZnS) est la principale source de Zn dans la croûte terrestre. Au niveau alimentaire, une carence en Zn amène un retard de croissance, une maturation sexuelle retardée et une hyperpigmentation [1]. Il est couramment employé dans la galvanisation, dans l'industrie des caoutchoucs, des peintures (pigments blancs) et des pesticides [1]. L'absorption du Zn par l'humain varie de quelques % à 90 %. La grande variabilité vient du fait que les métallothionéines jouent le rôle de régulateurs de la quantité de Zn dans le corps. Ces protéines sont responsables du transport des métaux dans l'organisme. La majeure partie du Zn est retrouvée dans les muscles (60 %) alors que 30 % se retrouve dans les os [1]. Des doses exagérées de Zn provoquent des nausées et des malaises abdominaux mais aucun dommage irréversible [4].

Le cadmium (Cd) est un métal volatil de la même famille que le Zn. Dans des réactions chimiques, le Cd se comporte sensiblement comme Zn [1]. On le retrouve dans les minerais de Zn dans un rapport 1 Cd:1000 Zn [1]. Il est surtout utilisé dans l'industrie du placage métallique, des peintures (CdS comme pigment) et de la fabrication des piles rechargeables Ni-Cd [5]. Chez l'humain, une ingestion de Cd importante (quelques dizaines de mg) provoque des nausées, vomissements, diarrhée, crampes, maux de tête et une salivation importante [5]. Le Cd s'accumule surtout dans le cortex rénal et apporte des changements menant à des maladies rénales [50]. Sur les os, le Cd peut amener le syndrome de Itai-Itai, découvert dans les années 1950 au Japon [5]. On a remarqué, dans la baie de Itai-Itai qui est fortement contaminée en Cd, que les femmes qui avaient accouché plusieurs fois présentaient une décalcification des os, des fractures multiples et de sévères déformations osseuses [5]. De 2 à 25 % du Cd provenant de la nourriture est accumulé par l'humain [5]. L'accumulation sérieuse et la toxicité marquée du Cd viennent de son affinité avec les groupements thiols (-SH) des protéines, dont la thionéine, synthétisée dans les reins [5].

Finalement, le plomb (Pb) ainsi que le Cd sont les métaux lourds les plus toxiques que nous avons analysés. Le Pb le plus rencontré est le Pb(II) [1]. L'usage principal du Pb est en électrochimie, avec les peintures, la tuyauterie et il servait d'agent anti-détonant dans l'essence avant les années 1970 [4]. À moins d'habiter près d'une industrie rejetant du Pb par la voie des airs, 80 à 85 % de l'entrée de Pb dans l'organisme vient de la nourriture [1]. La quantité de Pb ingérée qui est absorbée par l'humain est estimée à 10 % mais cette valeur augmente pour les enfants et les nouveaux-nés [1]. Le Pb absorbé est retrouvé dans deux compartiments. Les os absorbent 90 % du Pb absorbé et sa demi-vie est d'environ 20 ans. Dans le sang et les organes mous, la demi-vie est de 20 jours. En plus de l'accumulation du Pb, le transfert placentaire de la mère au fœtus a été démontré [1, 4]. Les problèmes associés à une forte ingestion de plomb sont graves. La résorption des os, la malformation des pigments rétiniens et l'empêchement de la glande thyroïde de capter l'iode en sont quelques-uns [6]. Des changements morphologiques et fonctionnels irréversibles aux reins, ainsi que des dommages aux systèmes nerveux central et périphérique ont été aussi observés [1]. Il a été démontré que Cd et Pb agissent en synergie chez les mammifères [6].

Les précédentes informations montrent qu'une concentration anormalement élevée de quelques uns de ces métaux est dangereuse pour la biote aquatique et terrestre. Tous les métaux choisis proviennent surtout de la contamination par les usines électrochimiques et les usines de peintures. Les populations d'espèces aquatiques à proximité de telles industries seront donc grandement affectées par les rejets et la connaissance du niveau de concentration dans ces organismes donne des renseignements sur l'ampleur et l'étendue de la contamination ainsi que sur la contamination potentielle des maillons supérieurs de la chaîne alimentaire.

Les organismes marins, dont les mollusques, plus particulièrement les moules, ont déjà été utilisés comme espèces indicatrices du niveau de pollution [2, 7]. Les moules sont de bons bioindicateurs car elles peuvent accumuler de grandes quantités de métaux. Elles accumulent les métaux dans leur chair à un degré variable selon l'espèce, le pH, la salinité et les caractéristiques géologiques du milieu [8].

Sur le plan analytique, la problématique se situe au niveau de la nature de l'échantillon et de la méthode instrumentale d'analyse utilisée. La forme physique de l'échantillon est importante (granulométrie, etc.) et sa composition peut produire des interférences ou effets de matrice lors de l'analyse. Le succès d'une méthode d'analyse chimique repose sur la capacité de contrôler et de réduire ces effets de matrice.

En ce qui concerne l'instrumentation utilisée, l'analyse d'échantillons biologiques représente un défi en soi, surtout au niveau de l'analyse multiélémentaire à de très faibles niveaux de concentrations et où les effets de matrice peuvent être sévères.

1.2. Objectifs du projet.

L'objectif de ce projet est de mettre au point une méthode d'analyse de métaux retrouvés à l'état de traces dans des organismes biologiques susceptibles d'être en contact avec ces métaux et de les absorber. Le défi est d'établir une méthode simple de digestion, exigeant des équipements peu coûteux et pouvant s'appliquer à plusieurs genres de tissus biologiques. Le temps requis pour la digestion, le traitement de l'échantillon en général et la quantité d'échantillon requise doivent être minimisés. La méthode d'analyse proposée est la spectrométrie de masse à plasma induit par radiofréquences (ICP-MS). Cette technique permet l'analyse multiélémentaire rapide et sensible des métaux traces.

Le principal tissu étudié est celui de mollusques : des moules semi-cultivées destinées à la consommation. Le traitement et la préparation des échantillons consiste à faire une digestion du tissu biologique afin de dissoudre les métaux et d'oxyder la matière organique de la matrice. Les réactifs nécessaires à la digestion, les quantités de chacun des réactifs et le temps de chauffage sont optimisés.

Les limites de détection et les résultats obtenus pour les méthodes de digestion proposées sont comparés entre eux et avec ceux de la littérature scientifique. La quantification des métaux traces est effectuée par étalonnage interne et par la méthode des ajouts dosés. La validité de la méthode de digestion proposée et l'exactitude des résultats obtenus sont évaluées par l'analyse de deux échantillons biologiques certifiés de sources différentes, donc de matrice différente.

1.3. Spectrométrie de masse à plasma ICP

1.3.1. Historique du ICP-MS

Les premiers à penser au couplage de la spectrométrie de masse à un plasma induit par radiofréquence furent les géochimistes qui analysaient les métaux dans les minéraux et les sédiments par spectrométrie d'émission atomique à plasma ICP (ICP-AES) dans les années 1970. D'abord parce qu'il leur était difficile de choisir une raie d'émission d'un analyte qui ne subissait pas d'interférence spectrale de la part d'une raie de calcium, d'aluminium ou de fer, ces éléments composant majoritairement la matrice géologique. Ensuite, parce que l'analyse des éléments de terre rare, les lanthanides, aux spectres d'émission semblables et complexes, connaissait un intérêt grandissant. Donc la venue d'une technique multiélémentaire permettant d'éviter ces inconvénients et de diminuer la concentration minimale détectable s'imposait [11]. Le premier appareil de recherche a été décrit en 1980 par Houk *et al.* [12]. Les premiers instruments commerciaux ont été vendus en 1983-84 [13].

Laitinen s'est servi des sept étapes de la vie des humains telles que Shakespeare les avait énumérées pour déterminer les sept étapes de la vie d'une technique analytique [14]. Horlick, en 1994, écrivait que la spectrométrie de masse à plasma ICP se trouve maintenant à la sixième étape, soit l'étape de réflexion [13]. Les trois questions qui se posent sont : *i)* quelle est la meilleure technique d'analyse élémentaire, *ii)* quelle est la meilleure source et *iii)* quel est le meilleur spectromètre [13] ?

1.3.2. Définition et propriétés d'un plasma

Le terme "plasma" fut introduit par Langmuir et Tonks en 1929 alors qu'ils voulaient caractériser la section d'un arc électrique dans un tube à décharge où la densité d'électrons et d'ions est importante [9]. De nos jours, cette définition s'applique à tout gaz chaud partiellement ionisé, riche en électrons et en ions. Bien que riche en espèces chargées, la charge globale d'un plasma est presque nulle.

Les plasmas utilisés en chimie analytique sont formés généralement dans des gaz atomiques, donc surtout de gaz rares, comme l'hélium (He), le néon (Ne) et l'argon (Ar). Pour des raisons de coût et de facilité de production du plasma, l'argon est le plus souvent utilisé.

On distingue trois types de plasmas analytiques, soit les plasmas induits par des micro-ondes, des radiofréquences (plasma ICP) ou encore par un courant continu. Pour les analyses chimiques, le plasma ICP est le plus utilisé comme source en spectrométrie pour des raisons de sensibilité et d'absence d'interférences [10].

1.3.3. Instrumentation

1.3.3.1. Principe d'opération

Dans un plasma induit par radiofréquence, il a été montré que la température d'excitation dans le canal central est de l'ordre de 7000-8000 K [11, 15].

La proportion d'ions dans un milieu (M^+/M) peut être calculée avec l'équation de Saha [11]:

$$\frac{M^+}{M} = \frac{1}{N_e} \frac{(2\pi m_e kT)^{3/2}}{h^3} \frac{Q^+}{Q} e^{-(E_i/kT)} \quad (1)$$

où N_e est la densité électronique en cm^{-3} , m_e la masse de l'électron, h et k sont les constantes de Planck et de Boltzmann, T est la température absolue, E_i l'énergie d'ionisation de l'élément M alors que Q^+ et Q sont les fonctions de partition pour l'ion et l'atome neutre respectivement. Houk [16] a calculé que dans un plasma ICP à $T = 7500$ K et avec $N_e = 1 \times 10^{15} \text{ cm}^{-3}$, 54 éléments du tableau périodique sont ionisés à 90 % et plus [16]. Mais l'équation (1) sous-tend que le plasma ICP est à l'état d'équilibre thermique. Le fait que les pourcentages d'ionisation mesurés soient supérieurs à ceux calculés avec l'équation de Saha signifie que le plasma n'est pas en équilibre thermique [15].

1.3.3.2. Production d'un plasma ICP

Le schéma d'un spectromètre de masse à plasma induit par radiofréquence apparaît à la figure 1.

Contrairement à l'émission atomique, la torche et le plasma en ICP-MS sont orientés horizontalement. Dans la torche à plasma, il y a trois débits de gaz circulant dans des tubes concentriques. D'abord, le gaz porteur de la solution (gaz de nébulisation), dont le débit est environ 1 L/min, entre dans le plasma après passage dans un tube de 1-2 mm de diamètre interne au centre de la torche. La torche possède un diamètre total d'environ 2 cm. En deuxième lieu, le gaz auxiliaire sert à positionner le plasma par rapport à la bobine d'induction, avec un débit allant de 0 à 1 L/min. Enfin, le gaz plasmagène circulant de façon tangentielle à 12-15 L/min sert à produire le plasma et à refroidir le mince espace entre les parois de la torche de quartz, qui fond à environ 2700 K et le plasma qui est à 7500 K.

Le plasma est amorcé par une bobine Tesla qui est située sur la torche à l'entrée du gaz plasmagène. Elle provoque l'ionisation de l'argon selon l'équation (2).



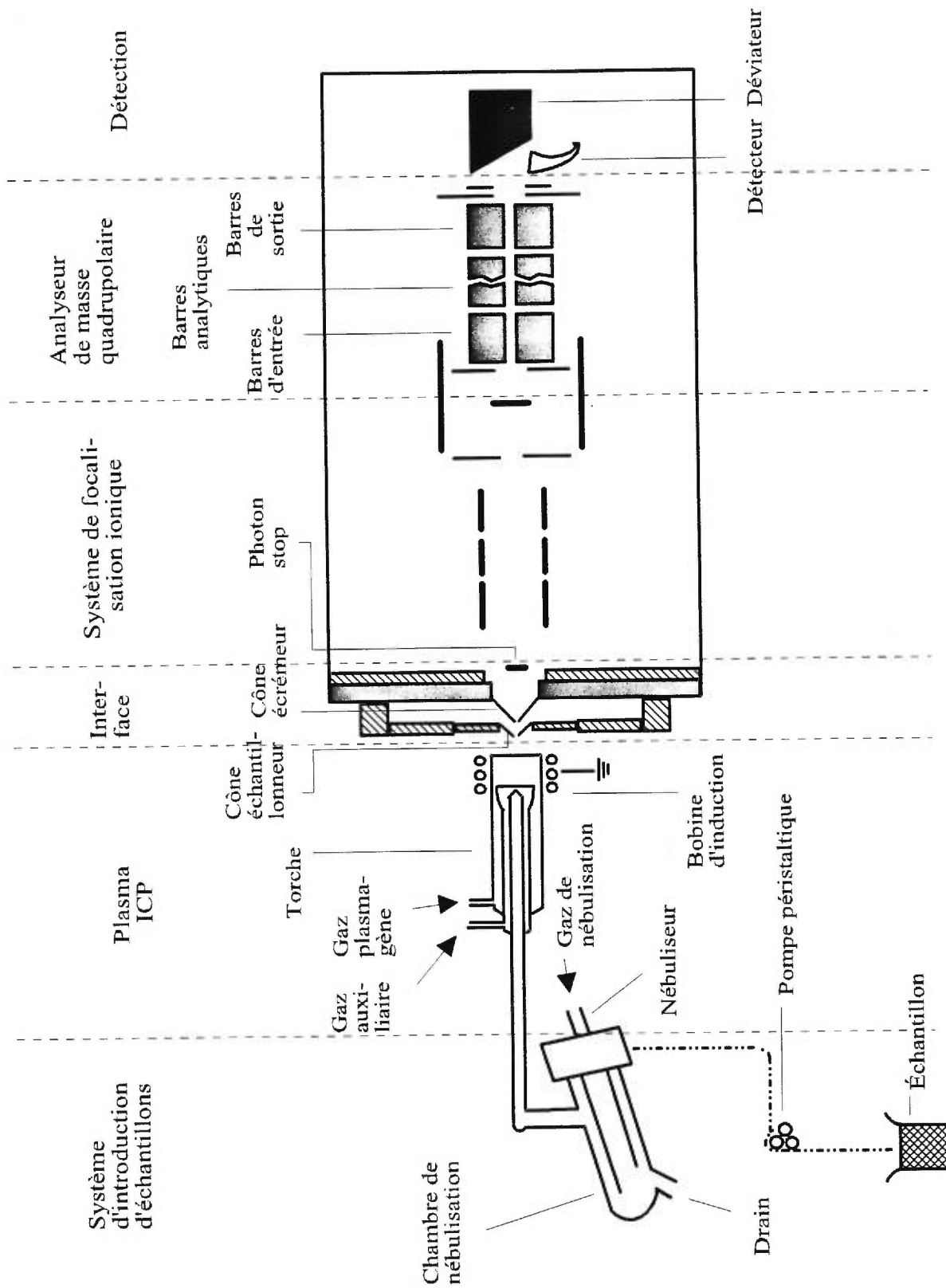


Figure 1 : Spectromètre de masse à plasma ICP.

Par la suite, le courant alternatif/radiofréquence à 27 ou 40 MHz circulant dans la bobine d'induction en cuivre, refroidie par l'eau, induit un champ magnétique. Ce champ impose aux ions d'Ar et à leurs électrons un mouvement de rotation perpendiculaire aux lignes de force électromagnétiques, donc parallèle à la bobine d'induction. Le fait que le courant soit alternatif entraîne les ions Ar^+ et surtout les électrons à osciller [10]. Alors, pendant les 2 à 3 ms qu'une espèce chimique passe dans le centre du plasma, elle est surtout frappée par les électrons en mouvement et gagne suffisamment d'énergie de différentes sources (thermique, collisionnelle, etc.) pour s'atomiser et s'ioniser efficacement (équation 3) [16]. Plusieurs modèles ont été proposés pour tenter de définir le mécanisme d'ionisation dans un plasma ICP [17]. Également, dans le plasma, les espèces moléculaires sont dissociées alors que les particules de sels sont volatilisées [11].



1.3.3.3. Interface

L'interface est l'espace séparant le plasma ICP à pression atmosphérique des lentilles ioniques placées sous vide poussé [16]. Elle est aussi appelée "chambre d'expansion". Le rôle des composantes de l'interface est d'extraire le plus d'ions du plasma de façon stable et reproductible sans toutefois trop perturber celui-ci [15].

Le plasma est aligné de sorte que le maximum d'ions traversent le premier cône, soit le cône d'échantillonnage, ou cône échantillonneur. Ce cône peut être en aluminium, cuivre, nickel ou platine. Le nickel offre le meilleur compromis entre le coût et la résistance à l'érosion [11]. L'orifice percée dans le cône d'échantillonnage mesure habituellement 0,5 à 1,0 mm [16].

La partie du plasma ayant traversé ce premier cône subit une expansion car la pression diminue de 101,3 à 0,2 kPa. Cette pression est obtenue grâce à une pompe mécanique. La densité et la température du plasma diminuent alors que la vitesse du gaz augmente et dépasse même la vitesse du son, d'où le nom d'expansion supersonique [17] pour l'expansion se produisant dans cette zone.

Houk *et al.* ont déterminé qu'il existe une zone dans la chambre d'expansion où la température est environ 1000 K et le temps de séjour des espèces formées (ions, électrons, particules neutres) est de 1-2 ms. Le nombre de collisions est estimé à 10^6 [12]. Des réactions de recombinaison, de neutralisation ou de transfert de charge se produisent, formant des espèces mono, di ou polyatomiques chargées pouvant atteindre le détecteur [12]. Les espèces neutres seront pompées par le système à vide.

Ensuite, une partie du jet supersonique venant du cône échantillonneur traverse le cône écrémeur ou écumoir. Ce deuxième cône, aussi fait de Ni habituellement, est la porte d'entrée vers le système de focalisation ionique. Le diamètre de son orifice est du même ordre de grandeur que celui du cône d'échantillonnage. Les deux cônes sont refroidis à l'eau [11, 16].

1.3.3.4. Système de focalisation ionique

Le rôle des lentilles ioniques est de collecter les ions positifs du jet supersonique et de focaliser ces ions vers l'entrée de l'analyseur de masse [12]. La pression dans le système des lentilles ioniques et dans l'analyseur de masse est maintenue très basse à environ 1×10^{-7} kPa dans chacune des deux sections avec des pompes turbomoléculaires (figure 1) [17].

Entre les lentilles ioniques se trouvent une ou des plaques rondes, des chicane d'arrêt des photons, situées au centre afin d'empêcher les photons émis par le plasma d'atteindre le détecteur [18]. Leur utilité sera discutée dans la section couvrant la détection.

1.3.3.5. Analyseur de masse à filtre quadrupolaire

L'analyseur de masse est un filtre quadrupolaire constitué de quatre barres en molybdène de 1,2 à 1,8 cm de diamètre et d'environ 20 cm de longueur [11]. Les deux paires de barres opposées ont un voltage de signe inverse. Le rôle du filtre quadrupolaire est de sélectionner les ions transmis au détecteur selon leur rapport masse/charge (m/z).

Les barres sont à une distance telle que le champ électrique au point central est proche du champ hyperbolique idéal [19].

La variation du potentiel dans un champ électrique comprenant un voltage V_p de radiofréquences (RF), de trajectoire ondulatoire, est caractérisée par une fonction de fréquence f et des extremums à $+V_p$ et $-V_p$. Dans un tel champ, il n'y a aucune séparation des ions car la résultante est nulle et impose aux ions une trajectoire linéaire dans le centre du filtre quadrupolaire. Les barres d'entrée et de sortie (figure 1) du filtre comportent un voltage RF uniquement.

Par contre, dans un champ électrique où un courant continu (U) et un voltage RF (V_p) sont appliqués, les extremums sont $+U$ et $-U$ et non $+V_p$ et $-V_p$. Il y aura donc déstabilisation et par conséquent une séparation possible des ions. On désigne généralement la composante du courant continu par a et celle du courant RF par q (équations 4 et 5).

$$a = \frac{8U}{(2\pi f)^2 r_0^2} \frac{z}{m} \quad (4)$$

$$2q = \frac{4V_p}{(2\pi f)^2 r_0^2} \frac{z}{m} \quad (5)$$

$$\frac{\partial^2 U}{\partial \beta^2} - U(a + 2q \cos \beta) = 0 \quad (6)$$

où m représente la masse de l'ion, r_0 est la moitié de la distance entre deux barres opposées et $\beta = \pi f t$, où t représente le temps.

L'équation (6) représente l'équation différentielle décrivant la trajectoire tridimensionnelle des ions sous l'effet des courants RF (q) et continu (a), comme c'est le cas dans le filtre de masse quadrupolaire [17]. Les deux solutions possibles pour résoudre cette équation différentielle (6) ont été déterminées par Mathieu. L'une produit une trajectoire ionique stable qui passe dans le centre du filtre quadrupolaire sans jamais percuter les parois des barres. L'autre trajectoire ionique est instable et dans celle-ci les ions heurtent les parois des barres et n'atteignent pas le détecteur.

En traçant la variation de a en fonction de q on obtient un triangle appelé "triangle de stabilité". En présence d'un voltage RF seulement ($a=0$), toute la base du triangle est dans le domaine de stabilité et aucune sélection de m/z n'est possible. Si le rapport courant continu/RF demeure constant ($a/q = 2U/V_p = \text{constant}$), on détermine ainsi une ligne de balayage de masse. Un mince domaine de stabilité de m/z est sélectionné et seulement les ions possédant ce rapport m/z iront au détecteur. En changeant les valeurs de a et de q mais en maintenant a/q toujours constant, il est possible d'obtenir un spectre de l'intensité (nombre d'ions par unité de temps) en fonction du rapport m/z .

Les ions positifs ou négatifs peuvent être analysés en changeant le signe de la dynode du détecteur et du déflecteur. L'analyse des ions négatifs est possible seulement pour les éléments ayant une électronégativité élevée comme le fluor, le chlore ou le soufre [15, 18]. Toutefois, cet aspect du ICP-MS est presque totalement inexploré [15].

L'analyseur de masse à filtre quadrupolaire peut opérer en trois principaux modes : mesure de la masse d'un seul ion (SIM pour "Single Ion Monitoring"), mesure de plusieurs masses en séquence par saut d'une masse à une autre (PJ pour "Peak Jumping") ou par balayage complet. Le mode balayage permet de balayer le domaine de masse de 0 à 200 uma en un temps inférieur à 20 ms [16, 19]. Le mode PJ est surtout utilisé pour les signaux transitoires dont la durée globale est de quelques secondes. Le filtre quadrupolaire permet ainsi de passer d'un isotope à un autre en quelques μs seulement [16, 19]. Le mode SIM permet de suivre un seul isotope très rapidement, soit en deça de 1 ms.

La résolution en masse permise par le filtre quadrupolaire entre deux pics est suffisante pour séparer les pics ayant une différence d'une unité de masse atomique (uma) pour tout le domaine de masse des éléments du tableau périodique [16, 18].

1.3.3.6. Détection

Le déflecteur, situé entre la sortie du filtre quadrupolaire et le détecteur, sert à dévier uniquement les ions positifs vers le détecteur. Ainsi, les photons ayant traversé le dispositif d'arrêt des photons n'atteignent pas le détecteur [16, 18]. Les photons sont

nuisibles car ils déclenchent une cascade d'électrons et augmentent l'intensité du fond spectral [12].

Le détecteur est une dynode continue de type "Channeltron" placée hors-axe par rapport aux lentilles ioniques et au quadripôle, toujours pour empêcher les photons de déclencher une cascade d'électrons. La détection se fait selon deux modes : en mode de comptage d'ions (PC pour "Pulse Counting") et en mode analogique. Le mode PC est utilisé pour des signaux inférieurs à $1-1,5 \times 10^6$ compte d'ions par secondes (cps). Dans ce mode, les impulsions d'ions atteignant le détecteur sont comptées individuellement. Pour les intensités de signaux supérieures à $1-1,5 \times 10^6$ cps, les impulsions d'ions sont trop intenses et nombreuses pour être comptées individuellement. Le détecteur passera alors au mode analogique. Afin de minimiser les pertes d'information, le détecteur mesure plutôt le courant ionique et produit l'impulsion suite à la conversion du courant ionique en voltage RF [19].

1.3.4. Introduction d'échantillons en spectrométrie de masse à plasma ICP

Browner et Boorn qualifiaient les systèmes d'introduction d'échantillons en spectrométrie atomique de "talon d'Achille" de ces instruments [20]. Bien que des progrès ont été effectués dans ce domaine, des systèmes plus performants sont encore nécessaires pour réduire l'écart entre l'efficacité de l'introduction d'échantillons et celle des composantes optiques et électroniques [20].

Les critères pour la sélection d'un système d'introduction adéquat sont [20] :

- le type d'échantillon analysé (gaz, solide, liquide, suspension, etc.).
- la précision et l'exactitude voulues.
- la quantité d'échantillon disponible pour l'analyse.
- le domaine de concentration des analytes à couvrir.

1.3.4.1. Introduction d'un gaz dans un plasma ICP.

L'analyse de gaz en spectrométrie de masse à plasma ICP est possible si l'analyte est transformable en gaz analysable.

L'injection de gaz dans un plasma offre les avantages suivants [20-23] :

- aucune limite sur la teneur en sels dissous de l'échantillon.
- efficacité potentielle de transport de 100 % comparativement à $\leq 5-10$ % avec l'introduction de liquides. Cela permet d'obtenir de meilleures limites de détection.
- atomisation et ionisation plus efficaces, car les processus de désolvatation et de vaporisation n'ont pas lieu dans le plasma.
- simplification de la matrice.

Parmi les techniques de transformation de l'analyte sous forme de gaz, on retrouve principalement la génération d'hydrures, la chromatographie en phase gazeuse et la vaporisation électrothermique [20]. La génération d'hydrures s'applique aux éléments formant aisément des hydrures volatils à partir d'une solution aqueuse acide, soit l'arsenic, le bismuth, germanium, plomb, sélénium, l'étain et le tellure. À cause des interférences spectrales sévères causées par la matrice pour l'analyse de ces éléments, on utilisera ce dispositif pour l'injection dans le plasma.

1.3.4.2. Injection d'un liquide dans un plasma ICP

La façon la plus répandue d'injecter un liquide dans un plasma ICP est d'en faire la nébulisation. La nébulisation consiste à transformer la solution en un aérosol qui sera acheminé au plasma. Avant d'aborder plus spécifiquement les composantes du système de nébulisation, définissons ce qu'est un aérosol. Un aérosol est constitué d'un gaz et de gouttelettes. Le gaz peut être en fait un mélange de gaz qui contient des vapeurs de solvant [22].

Un système de nébulisation comprend deux composantes : un nébuliseur et une chambre de nébulisation. Les nébuliseurs les plus utilisés en ICP-AES et ICP-MS sont les nébuliseurs pneumatiques et ultrasoniques [24]. Beaucoup de documentation est disponible sur ces dispositifs [17, 20-27].

1.3.4.2.1. Nébulisation pneumatique

Les nébuliseurs pneumatiques sont divisés en trois catégories : concentriques, à flots croisés et de type Babington [24]. Un exemple de chaque type apparaît à la figure 2.

Parmi les nébuliseurs concentriques, les nébuliseurs fabriqués par Meinhard sont sans doute les plus populaires. Divers types de nébuliseurs Meinhard sont disponibles selon la forme de la pointe du capillaire (type A, C et K) donc selon la tolérance aux sels dissous et aux particules [25]. Le diamètre moyen (D) des gouttelettes d'aérosol obtenues avec ce nébuliseur est donné par l'équation (7) issue des travaux de Nukiyama et Tanasawa [17]. On remarque que la qualité de l'aérosol dépend des propriétés physiques de la solution : viscosité (η en dynes/cm²), densité (ρ en g/cm³) et tension superficielle (σ en dynes/cm).

$$D(\mu m) = \frac{585}{c} \left(\frac{\sigma}{\rho}\right)^{0,5} + 597 \left(\frac{\eta}{(\rho\sigma)^{0,5}}\right)^{0,45} \left(\frac{1000Q_l}{Q_g}\right)^{1,5} \quad (7)$$

où c représente la vitesse linéaire relative du gaz par rapport au liquide (c_{g-c})(m/s), Q_l et Q_g sont les débits de la solution et de gaz respectivement (mL/min).

Mis à part le faible coût, le nébuliseur concentrique a comme principal avantage de donner une distribution de diamètre de gouttelettes étroite et des gouttelettes fines, donc une bonne précision du signal analytique. Son inconvénient majeur est que son orifice peut s'obstruer si la solution contient des sels dissous en trop forte concentration ou des particules en suspension. Le tableau I montre les performances relatives de chacun des nébuliseurs discutés dans ce travail et confirme les affirmations précédentes.

Pour les nébuliseurs à flots croisés et Babington, il n'existe pas d'équations faisant le lien entre les propriétés physiques de la solution et D [17]. Disponibles en plusieurs designs, ces nébuliseurs sont utiles lorsque la solution à analyser contient beaucoup de sels dissous et/ou de particules en suspension. Ebdon et Cave ont montré que le nébuliseur Babington donne un signal plus bruyant que le nébuliseur concentrique pour une solution aqueuse acide "propre", mais donne un signal beaucoup plus stable en présence de 20 % (p/v) de NaCl, car la solution ne passe par aucun orifice restrictif [26]. La force majeure de ces nébuliseurs, comme l'indique le tableau I, réside dans l'analyse de solutions ou suspensions à matrice complexe.

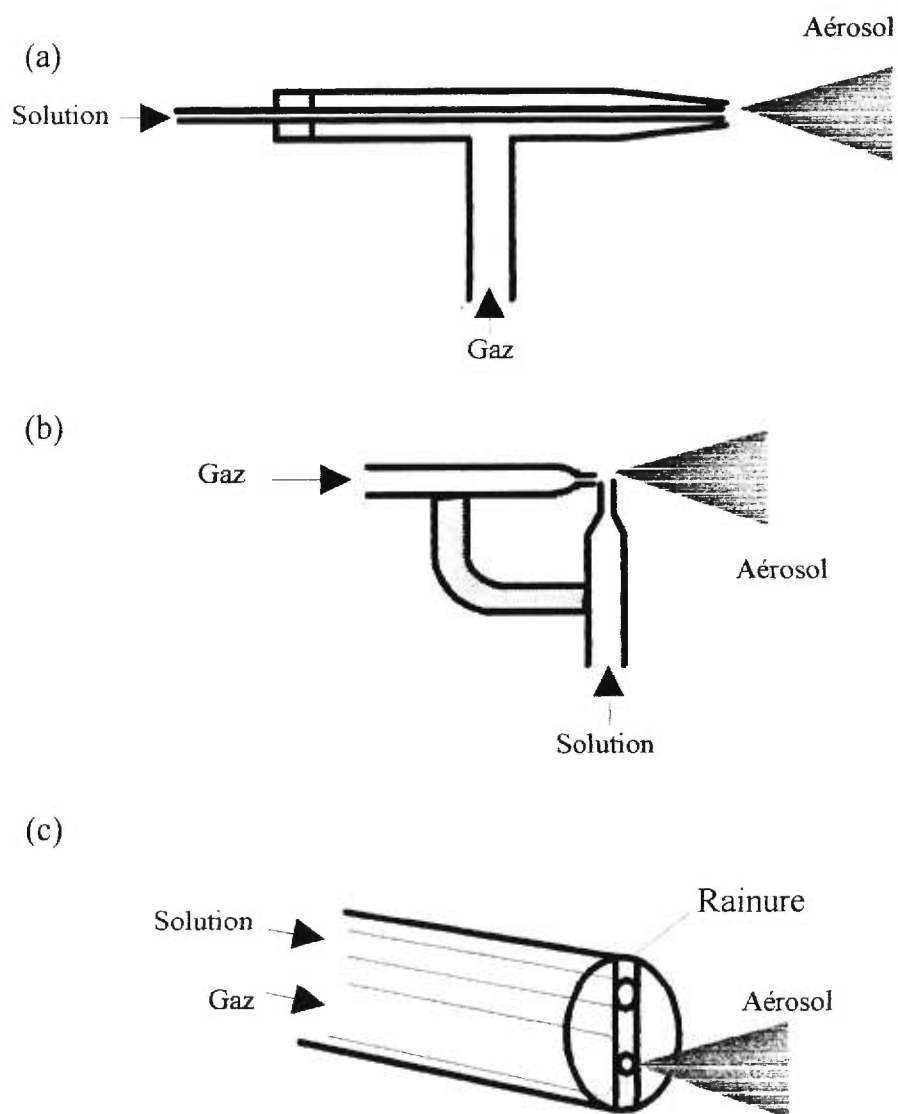


Figure 2 : Nébuliseurs *a)* concentrique, *b)* à flots croisés et *c)* Babington à rainure en V.

Tableau I : Performances analytiques des nébuliseurs les plus utilisés [27].

Paramètre	Concen- trique	Flots- croisés	Babington	Ultra- sonique
Diamètre des gouttelettes	XXX	XXX	XX	XXXXXX
Sensibilité	XXX	XXX	XXX	XXXX
Précision	XXX	XXX	XX	XX
Consommation d'échantillon	XX	XX	X	XXXXXX
Consommation de gaz	XX	XX	XX	XXXXXX
Tolérance aux sels dissous	XXX	XXX	XXXX	XXX
Tolérance aux particules	XX	XX	XXXXXX	X

X = médiocre, XXXXX = excellent

1.3.4.2.2. Nébulisation ultrasonique

Le nébuliseur ultrasonique est apparu en 1964 pour remplacer le nébuliseur pneumatique utilisé en absorption atomique à flamme [21]. Le nébuliseur ultrasonique fonctionne avec un cristal piézoélectrique qui vibre à une fréquence f entre 200 kHz à 10 MHz. Le liquide coulant sur la surface du cristal vibrant subit une rupture. L'aérosol produit est très dispersé et le diamètre moyen des gouttelettes D est donné par [17] :

$$D(\mu m) = \frac{(\pi\sigma)^{1/3}}{(4\rho f^2)^{1/3}} \quad (8)$$

où ρ , σ et f représentent la densité (g/cm^3), la tension superficielle (dynes/cm) et la fréquence (Hz) respectivement.

Contrairement à la nébulisation pneumatique concentrique, la valeur de D ne dépend pas d'un gaz de nébulisation (Q_g) pour un nébuliseur ultrasonique.

De façon générale, si la matrice n'est pas trop complexe, les limites de détection avec le nébuliseur ultrasonique sont dix fois meilleures qu'avec son homologue pneumatique. Ceci s'explique par une meilleure efficacité de transport et la meilleure quantité d'aérosol. La quantité d'aérosol atteignant le plasma est de l'ordre de 5 à 10 % avec le nébuliseur ultrasonique, alors que la proportion diminue à 1-2 % avec les nébuliseurs pneumatiques (tableau I).

1.3.4.2.3. Chambres de nébulisation

La chambre de nébulisation a comme première fonction d'empêcher les grosses gouttelettes, requérant beaucoup d'énergie pour être désolvatées, d'atteindre le plasma. Le fait de coupler une chambre de nébulisation à un nébuliseur modifie la distribution des gouttelettes en diamètre. À un point tel que pour les systèmes ayant une faible efficacité de transport (< 5 %) la chambre régit principalement les caractéristiques de l'aérosol atteignant le plasma [27]. Les plus connues sont les chambres cycloniques et de type Scott (figure 3).

Sharp a comparé les performances des chambres de nébulisation et constate que les deux chambres ont des performances très similaires. Les critères d'évaluation utilisés sont les suivants : efficacité de transport, temps de rinçage, tolérance aux sels et aux particules et l'enlèvement des gouttelettes de grand diamètre [27].

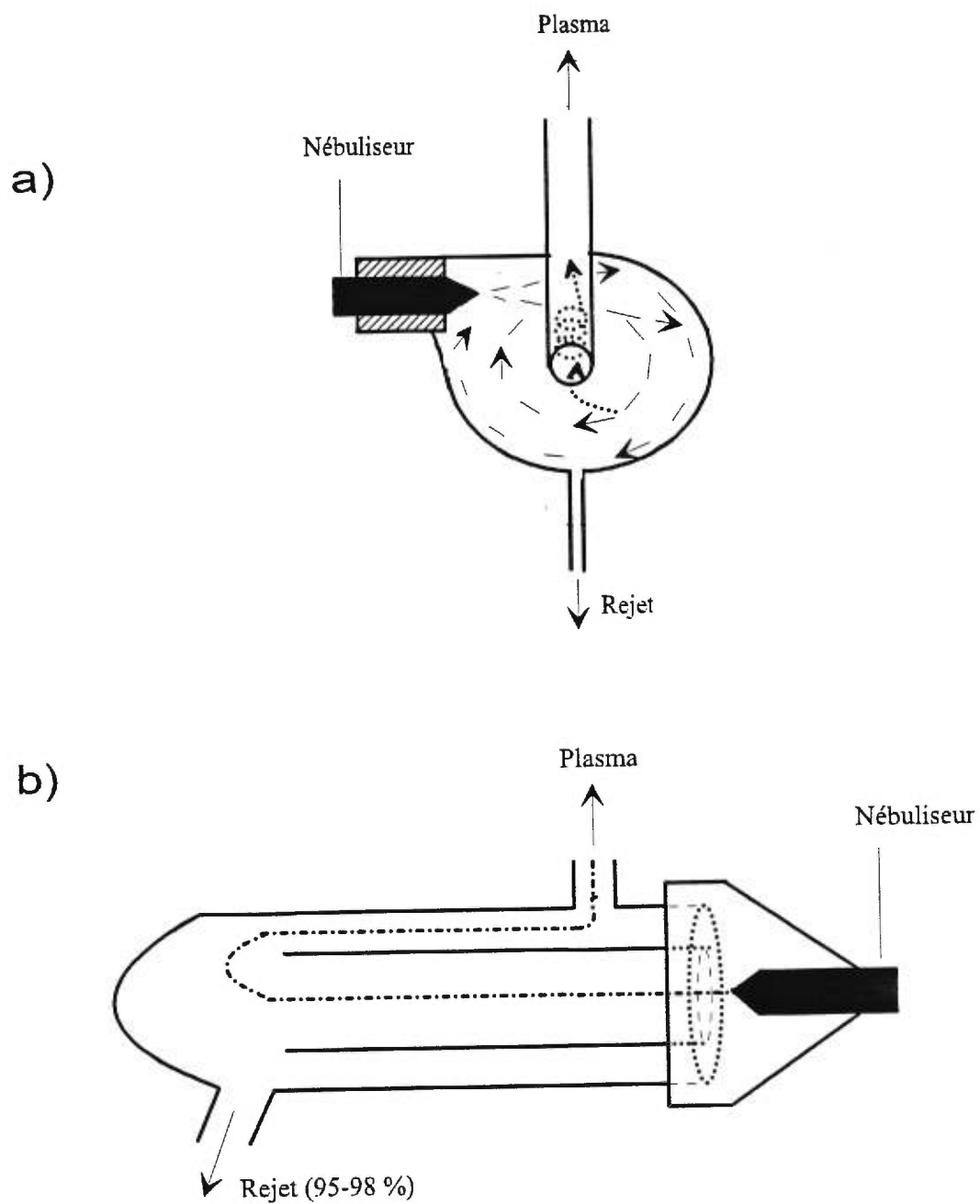


Figure 3 : Chambres de nébulisation: a) cyclonique et b) type Scott.

1.3.4.2.4. Vaporisation électrothermique

Selon Browner et Boorn, les modules de vaporisation électrothermique sont plus performants depuis qu'ils sont utilisés comme système d'introduction dans un plasma ICP que pour l'analyse par spectroscopie d'absorption atomique à four de graphite [20].

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse à plasma ICP à vaporisation électrothermique (ETV-ICP-MS) ressemble à celui d'un spectromètre d'absorption atomique à four de graphite. Quelques mg d'un solide ou μL d'un liquide sont introduits sur la surface de vaporisation. La surface de vaporisation la plus commune est un tube de graphite ou de tungstène, bien que des filaments, des tiges ou des cupules peuvent assurer cette fonction. Le chauffage de la surface de vaporisation peut s'effectuer en plusieurs étapes et on mettra à profit cette propriété pour séparer l'analyte de sa matrice. Généralement, un premier chauffage à environ $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ permet d'enlever l'eau et les impuretés volatiles (désolvatation). Ensuite la minéralisation ($300\text{-}800\text{ }^{\circ}\text{C}$) sert à vaporiser des constituants de la matrice. La vaporisation de l'analyte se produit à environ $1500\text{ à }2000\text{ }^{\circ}\text{C}$, dépendant de l'analyte, et génère un aérosol dans le tube. Cet aérosol hautement dispersé est acheminé au plasma par un léger courant d'argon (1 L/min) via un tube de transfert d'environ 1 m . Dans le plasma, les gouttelettes sont décomposées et les analytes sont atomisés et ionisés [17]. Le signal résultant est transitoire. L'optimisation de la méthode passe donc par une optimisation des étapes de chauffage qui donnera les profils de pics désirés.

Les mécanismes de transport des éléments vers le plasma sont moins complexes qu'avec la nébulisation. En ETV-ICP-MS, la perte en analyte peut provenir de deux sources seulement : *i*) la formation de carbures non volatils sur les parois de la surface de vaporisation si elle est faite de graphite, et *ii*) la perte par adsorption sur les parois du tube de transfert [17].

1.3.5. Injection d'un solide dans un plasma ICP

L'analyse directe de solides connaît un grand essor depuis quelques années car elle comporte plusieurs avantages potentiels considérables [17] :

- analyse de l'échantillon sous sa forme naturelle et originale
- minimisation de la contamination par des réactifs
- pertes d'analyte réduites par manipulation de l'échantillon
- réduction du temps de traitement de l'échantillon et donc des coûts de traitement
- possibilité d'améliorer les limites de détection
- possibilité d'analyser des microéchantillons
- optimisation séparée possible des étapes de vaporisation, atomisation et ionisation

L'analyse de solides s'étend à divers types d'échantillons : poudres, solides conducteurs et non conducteurs, solides homogènes ou hétérogènes [17].

Les techniques utilisées sont : l'insertion directe, la vaporisation électrothermique, l'ablation laser et l'analyse de suspensions aqueuses [17]. Cette dernière est présentement la plus précise et l'écart-type relatif obtenu est de l'ordre de 1 à 2 % avec un nébuliseur approprié [17].

Malgré ces nombreux avantages, l'analyse directe de solides en ICP-MS comporte des inconvénients importants. L'hétérogénéité de l'échantillon est la principale cause de la faible précision de ces techniques. L'étalonnage, effectué principalement avec des matériaux de référence certifiés, est parfois difficile. Dans le cas de l'ablation laser, la reproductibilité de l'impulsion est un autre paramètre à contrôler.

1.4. Interférences

En spectrométrie de masse à plasma ICP, on dénombre trois principales classes d'interférences : physiques, chimiques et spectrales.

1.4.1. Interférences physiques

Les interférences physiques sont principalement reliées au système d'introduction de l'échantillon. Prenons l'exemple de la nébulisation pneumatique. Ces interférences se manifestent suite à : *i*) une variation des propriétés physiques de la solution aspirée (viscosité, tension de surface et densité), *ii*) à l'obstruction partielle ou totale des cônes métalliques, ou *iii*) suite à la dégradation de ces cônes.

L'équation (7) montre qu'une variation des propriétés physiques de la solution aspirée entraîne une variation dans la quantité d'analyte se rendant au plasma donc une différence au niveau de l'intensité du signal analytique. D'où l'importance que les étalons soient préparés dans une matrice semblable à celle des échantillons.

La teneur en sels dissous des échantillons a aussi un impact important sur les résultats d'une analyse en ICP-MS. Douglas et Kerr ont démontré que la nébulisation continue d'une solution contenant plus de 0,2 % (p/v) de sels dissous amène des problèmes de condensation, puis déposition de ces sels vaporisés sur les cônes échantillonneur et écumeur [28]. Ceci a pour effet de diminuer graduellement la sensibilité suite à l'obstruction partielle de l'orifice des cônes. Pour y remédier, certains ont songé à l'injection à flot continu, qui fait une dilution en continu [29, 30] ou bien à une séparation des sels minéraux de la matrice contenant du sodium, du calcium et du magnésium sur une résine cationique [31-34]. Quelquefois, une dilution par un facteur de dix ou de vingt-cinq est suffisante, comme avec l'eau de mer [35], le sérum [36] ou l'urine [35] pour réduire, voire même éliminer ces effets.

La concentration d'acide dans la solution est importante car les cônes étant métalliques, une solution contenant plus de 5 % (v/v) d'acide peut engendrer leur dégradation et conséquemment hausser l'intensité du signal des métaux utilisés dans la fabrication des cônes [17].

L'effet mémoire est aussi un type d'interférence physique mais il n'est pas exclusif au ICP-MS. L'effet mémoire se produit lorsque des éléments volatils comme Pb, Cd, Hg et Li sont vaporisés dans la chambre de nébulisation. Ils peuvent adhérer aux parois de la chambre de nébulisation ou de la torche et leur désorption produira une hausse de signal non désirée [11]. Les moyens pour contrer cet effet sont de rincer abondamment le système d'introduction après chaque échantillon et d'utiliser de la verrerie décontaminée [11].

Pour tenter de minimiser les effets sur le signal analytique des problèmes d'obstruction des cônes et de variations de propriétés physiques énumérés plus haut, l'étalonnage interne est une bonne solution. Des travaux de Houk et Thompson [37] et de Vanhaecke *et al.* [38] ont montré qu'un étalon interne, pour être efficace, doit posséder une masse et un potentiel d'ionisation voisins de ceux de l'analyte. Dans le cas d'une analyse multiélémentaire, l'utilisation de plusieurs étalons internes est recommandée.

1.4.2. Interférences chimiques

Bien que l'environnement chimique d'un plasma ICP soit plus inerte que celui d'une flamme, la formation d'espèces moléculaires dérivées de l'analyte n'est pas exclue. Dans cette partie, seront décrits les types d'espèces formées alors que dans la prochaine section, il sera question des interférences qu'elles engendrent au niveau du spectre de masse.

L'injection d'un produit contenant un atome M dans un plasma ICP peut amener à l'interface du spectromètre (zone entre le plasma ICP et les lentilles ioniques) l'apparition d'espèces comme des ions doublement chargés (M^{2+}), des oxydes (MO^+), des hydroxydes (MOH^+), des hydrures (MH_x^+) ou autres. Cependant, les trois premiers produits sont les plus fréquents et leur formation dépend de la température du plasma.

1.4.3. Interférences spectrales

Les interférences spectrales se différencient des interférences chimiques du fait qu'elles concernent uniquement le résultat apparent, soit le spectre obtenu. On

distingue quatre types d'interférences spectrales en ICP-MS : les interférences dues au fond spectral, les interférences isobariques, les interférences dues aux oxydes/hydroxydes/ions doublement chargés et les interférences causées par les effets de matrice.

1.4.3.1. Interférences dues au fond spectral

Les interférences dues au fond spectral viennent de la présence d'espèces atomiques ou moléculaires quand de l'eau pure (le solvant) et de l'air sont introduits dans le plasma ICP [17]. On retrouve des espèces diverses mais surtout celles résultant de la combinaison de l'argon avec l'azote, l'oxygène ou avec d'autres espèces présentes dans l'air ou dans l'eau. Par exemple, l'analyse du sélénium est compliquée par la présence des dimères d'argon (Ar_2^+ , Ar_2H^+) qui donnent des pics intenses vers 78-80 uma. Un autre exemple est l'incapacité d'analyser le phosphore dans des conditions normales à cause de la formation d'espèces moléculaires comme $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ ou $^{14}\text{N}^{16}\text{OH}^+$.

1.4.3.2. Interférences isobariques

Les interférences isobariques proviennent de la superposition du signal de deux éléments à une même masse [17]. Par exemple, à la masse 58, le nickel a un isotope abondant (abondance naturelle de 67,78 %) qui peut être perturbé par la présence d'un isotope du fer (0,58 %) lorsque celui-ci est présent dans le même échantillon. Alors pour l'analyse de Ni dans une matrice riche en Fe (alliages ou minerais) la sélection d'un autre isotope du Ni est préférable, ou encore une correction mathématique peut être appliquée pour soustraire la partie du signal, à la masse concernée, provenant de l'élément interférent [17].

1.4.3.3 Oxydes, hydroxydes et ions doublement chargés

Les espèces doublement chargées, monoxydes et hydroxydes sont nuisibles car en plus d'affecter l'ion de masse M, elles interfèrent au niveau de la masse $(M/2)^+$, $(M+16)^+$ et $(M+17)^+$ respectivement. Le cérium est souvent utilisé comme indicateur de la présence des oxydes et d'hydroxydes car CeO est réfractaire et donc aisément formé (lien Ce-O = 795 kJ/mol) [71]. L'abondance des oxydes dépend de paramètres expérimentaux

comme le débit du gaz de nébulisation, la puissance du plasma, le diamètre de l'orifice du cône d'échantillonnage (très important), la distance entre les deux cônes, le gaz plasmagène, la qualité de l'aérosol (diamètre moyen des gouttelettes) et finalement de l'efficacité à enlever le solvant et l'oxygène [17]. Au niveau du gaz de nébulisation, Horlick et Vaughan expliquent qu'à de faibles débits, le plasma est plus chaud alors les espèces doublement chargées sont favorisées [39]. Par contre, à des débits plus importants, le refroidissement du plasma favorise la formation d'oxydes et d'hydroxydes au profit des ions bivalents.

Pour enlever le solvant, le moyen le moins coûteux demeure le refroidissement de la chambre de nébulisation avec de l'eau refroidie. Date et Gray mentionnent qu'à une température de 15 °C on stabilise la formation d'oxydes et on diminue leur formation de façon significative à partir de 7 °C ou moins [11]. Zhu et Browner montrent que le rapport BaO^+/Ba^+ passe de 0,05 à 0,92 % quand la température de la chambre de nébulisation passe de 5 à 35 °C [40].

En diminuant la température de la chambre de nébulisation de 35 à 0 °C on augmente alors la sensibilité pour l'analyse de M d'un facteur 3 à 7 [41]. À partir de 8 °C et moins, la hausse de sensibilité est peu significative. Les travaux de Hutton et Eaton ont permis de démontrer qu'une fois le solvant enlevé, le plasma est plus chaud et possède plus d'énergie pour l'atomisation et l'ionisation, énergie qui servait auparavant à évaporer le solvant [41].

Il existe d'autres moyens efficaces pour empêcher la vapeur d'eau d'atteindre le plasma, comme : des systèmes de désolvatation cryogénique [42, 43], une séparation à travers une membrane en polyimide située entre la chambre de nébulisation et la torche [44], ou bien un tube d'extension de 2 à 5 mm chauffé à 400 °C toujours placée entre la torche et la chambre de nébulisation [45].

Une autre approche pour la réduction de la formation d'oxydes est l'usage d'un plasma mixte Ar-N₂. Ce genre de plasma réduit la quantité de O⁺ libres par la formation de NO⁺ tout en conservant la sensibilité pour les analytes. L'ajout de N₂ peut même être fait au niveau du gaz de nébulisation pour réduire encore plus la quantité d'oxydes formés [17].

Les ions doublement chargés sont plutôt rares et ils sont présents de façon significative (M^{2+}/M^+ environ 2 %) seulement chez les éléments ayant un second potentiel d'ionisation inférieur à celui de l'argon (15,8 eV), comme le barium (10 eV), le strontium (11 eV) et quelques lanthanides [40]. Les proportions mesurées sont plus faibles que celles prévues par l'équation de Saha (équation 1) [40]. Finalement, les hydroxydes posent peu de problèmes puisque leur signal ne représente qu'une mince fraction de celui des monoxydes correspondants.

1.4.3.4. Effets de matrice

Les effets de matrice sont certes les interférences les plus importantes car elles peuvent rendre le fond spectral très complexe. En ICP-MS, le choix de l'acide de dilution s'arrête généralement à l'acide nitrique puisque les interférences spectrales qu'il cause sont moins nombreuses qu'avec l'acide chlorhydrique ou sulfurique [17, 46].

Au niveau des sels dissous présents dans la matrice, la présence des ions $^{40,42-44,46,48}\text{Ca}^{16-18}\text{O}^+$ et CaOH^+ interfère au niveau des éléments de transition (Fe, Ni, Cu), ce qui complique leur analyse dans les échantillons biologiques où le calcium est souvent abondant.

Les types d'interférences spectrales impliquant la superposition des signaux à une même masse peuvent être éliminés avec un spectromètre de masse à double focalisation ionique [47, 48]. Par exemple, Reed *et al.* ont réussi à séparer $^{51}\text{V}^+$ (50,994 uma) de $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ (50,954 uma) dans une matrice de 1 % HCl. Toujours avec les masses exactes, ils séparent $^{56}\text{Fe}^+$ (55,934993 uma) de $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ (55,957299 uma) [48]. De plus, l'intensité du signal du fond spectral passe de 10-40 cps en spectrométrie de masse à plasma ICP avec un filtre quadropolaire à des dixièmes de cps en avec un appareil à double focalisation.

La présence d'un ou de quelques éléments à fortes concentrations (interfèrent) peut avoir un impact sur le signal d'un analyte donné, celui-ci généralement retrouvé à l'état de trace. Il est pertinent de noter que les effets de matrice dépendent de la masse, un interfèrent donné ayant plus d'impact sur un élément léger que sur un élément plus lourd,

et pour un analyte donné, un élément interférent lourd a plus d'influence qu'un interférent léger [37]. Cela s'explique par l'effet charge d'espace [17, 49]. Les ions plus légers et de faible énergie cinétique seront plus défocalisés que les plus lourds car ils seront davantage affectés par la répulsion électrostatique des gros ions présents à fortes concentrations. De plus, l'effet de charge d'espace sera plus important pour les gros ions que pour les petits ions. [49]. En plus, l'effet d'un interférent ne dépend pas du rapport des quantités interférent/analyte mais bien de la quantité absolue d'interférent dans le milieu [50]. L'effet de charge d'espace amène ces problèmes pour les petits ions et entraîne une sensibilité diminuée, voire une suppression de signal et des rapports isotopiques favorisant l'isotope de haute masse [51].

Plusieurs approches sont possibles pour réduire ces interférences reliées à la masse [49] : la dilution isotopique, la méthode des ajouts dosés, l'étalonnage interne, la dilution de l'échantillon, la diminution de la sensibilité en dérégulant la focalisation ionique et l'injection à flot segmenté. Tanner *et al.* ont mis au point un spectromètre de masse à plasma induit par radiofréquence avec trois étages de pompage à vide. Ce montage réduit le flux ionique dans le système de focalisation ionique et donc l'effet de charge d'espace et, pour cet appareil, la sensibilité reste la même que pour un appareil disponible commercialement [51].

1.5. Digestion de tissus biologiques

1.5.1. Méthodes de digestion

Fresenius et Babo furent les premiers, il y a environ 150 ans, à développer une méthode pour décomposer les tissus d'origine animale afin d'en mesurer la teneur en métaux [52]. De nos jours, les méthodes les plus courantes de décomposition de tissus biologiques sont : la digestion aux micro-ondes, la digestion sur une plaque chauffante et la calcination du tissu sec seul ou dans un acide.

La calcination du tissu sec peut se faire de deux façons. Il est possible de faire la calcination dans un contenant fermé mis dans un four. Le four est maintenu à haute température (450-700 °C) et de l'oxygène de l'air ou de l'oxygène pur circule comme oxydant, et ce, durant de nombreuses heures (10-36 h). L'autre façon est de mettre le

tissu sec en présence d'un plasma d'oxygène à basse pression [53]. L'ajout d'agents divers peut faciliter la décomposition [53].

La calcination peut également être faite dans un acide. Le tissu et l'oxydant sont déposés dans une bombe à digestion, insérée à son tour dans un four. Les températures de digestion peuvent être élevées, comme dans le cas de la calcination à sec (environ 300 °C) [54]. La pression dans le four (externe à la bombe) est fixée à une valeur plus élevée que la pression dans la bombe pendant la digestion [54] et cela permet de réduire les risques d'explosion.

L'utilisation de l'énergie micro-ondes pour la dégradation de la matière organique fut introduite avec les travaux de Abu-Samra *et al.* en 1975 [55]. Ce genre de digestion s'effectue dans un four micro-ondes modifié pour évacuer les vapeurs d'acide. Les contenants utilisés sont soit de type ouvert ou fermé. Les contenants ouverts ont l'avantage de maintenir un reflux d'acide pendant la digestion, mais il peut également y avoir perte d'analyte par volatilisation. Certains types de contenants fermés contiennent une valve d'évacuation s'activant lorsque la pression interne excède 5 à 6 atm [56]. Dans les deux cas, le matériau de fabrication des contenants est le Téflon PFA, constitué de polytétrafluoroéthylène ayant une chaîne latérale alkoxyfluorée. Il est utilisé parce qu'il résiste à presque tous les acides, sauf H₂SO₄ concentré et l'acide ortho-phosphorique. Il possède également un point de fusion élevé (306 °C) et une bonne stabilité thermique et chimique [56]. Depuis quelques années, des méthodes de digestion par micro-ondes et d'injection en continu ("on-line") ou à flot segmenté ont fait leur apparition [57-61]. Le digestat sortant de l'appareil est directement injecté dans l'instrument de mesure [59]. Les premiers à faire ce type de couplage furent Burguera *et al.*, en 1986, pour l'analyse de métaux dans le sang par spectroscopie d'absorption atomique [61]. Les performances relatives des modèles de fours micro-ondes disponibles commercialement ont été évaluées [58].

La décomposition sur la plaque chauffante consiste simplement à dégrader la matière organique en chauffant le tissu dans un excès d'acide, le tout dans un contenant ouvert ou semi-ouvert, sur une plaque chauffante (ou dans un bain quelconque).

Tout d'abord, avant de discuter des performances de chaque méthode, il est bon de s'interroger sur les critères qui caractérisent la méthode idéale. De Boer et Maessen mentionnent que la quantité d'échantillon utilisé, le temps alloué à chaque échantillon, la

difficulté de la méthode et le risque de contamination sont à considérer [62]. À ceci peut s'ajouter l'efficacité de la décomposition. Une digestion peu efficace laisse des particules en suspension, non souhaitables pour l'introduction en ICP-MS avec un nébuliseur concentrique ou ultrasonique. La précision et l'exactitude des résultats obtenus à un niveau de concentration donné sont également importants. Asp et Lund ajoutent à la liste des critères une faible consommation de réactifs, une faible dilution et la simplicité (coût) de l'équipement requis [53]. Le facteur temps est aussi extrêmement important. Étant donné que les techniques d'analyse modernes peuvent produire abondamment d'information en peu de temps, la préparation de l'échantillon devient le facteur limitant, d'où la nécessité de minimiser le temps consacré à cette étape [59, 63].

Plusieurs études comparatives ont été entreprises afin de déterminer la méthode idéale [53, 62, 64-67]. McCarthy et Ellis comparent la digestion aux micro-ondes, à celle à la plaque chauffante et à la calcination à sec d'organismes marins analysés par spectrométrie d'absorption atomique à flamme [64]. La faible récupération des ajouts obtenus par calcination (54-72 %) font qu'elle est jugée inefficace pour tous les éléments étudiés. La perte d'analyte et le temps requis pour la préparation sont les causes principales d'abandon de cette technique. Ceci a été démontré par plusieurs auteurs, dont Dahlquist et Knoll qui analysent le foie de boeuf par spectrométrie d'émission atomique à plasma ICP [68]. McCarthy et Ellis concluent que la digestion aux micro-ondes est comparable à la méthode de la plaque chauffante selon les critères évalués [64].

Jassie et Kingston mentionnent que le chauffage sur une plaque chauffante est : *i)* plus susceptible à la contamination venant de l'extérieur ainsi qu'à la perte d'analyte par volatilisation et *ii)* la température d'opération est limitée au point d'ébullition de l'acide [56]. Dans un contenant fermé allant dans un four aux micro-ondes, la hausse de pression générée par le dégagement de vapeur d'eau, d'acide et de CO₂ augmente le point d'ébullition de l'acide, améliorant ainsi son pouvoir de décomposition. Par exemple, il est possible d'effectuer une digestion à 180 °C et à 5 atm avec HNO₃ concentré, alors que cet acide bout à 120 °C à 1 atm [56]. Des courbes de température et de pression en fonction du temps de digestion et de la puissance avec HNO₃ seul, ou pour quelques mélanges d'acides, sont disponibles dans la littérature [69]. La contamination extérieure est mise en doute par De Boer et Maessen qui affirment que la principale source de contamination provienne des réactifs ajoutés [62].

Un autre argument favorisant l'utilisation de la digestion aux micro-ondes est la possibilité de son automatisation. Celle-ci peut être effectuée uniquement sous contrôle informatisé alors que la digestion sur la plaque chauffante exige une présence et une surveillance continue de l'analyste.

Mis à part le faible coût de l'équipement, la méthode de la plaque chauffante possède un avantage très important par rapport aux micro-ondes. Cet avantage se situe au niveau de l'efficacité de l'oxydation, qui fera l'objet de la prochaine section.

1.5.2. Efficacité de l'oxydation

L'efficacité d'une oxydation peut être quantifiée selon deux approches. La première consiste à déterminer le taux d'hydrolyse des protéines par la mesure de la concentration des acides aminés dans les digestats. Cette approche a été préconisée par Kingston et Jassie [69]. Selon Sturgeon *et al.*, cela ne représente pas le pourcentage réel de l'oxydation de la matière organique [67]. Ils proposent plutôt de mesurer la quantité de carbone résiduel en solution dans les digestats.

Au niveau du pourcentage d'oxydation de la matière organique, Sturgeon *et al.* montraient que la digestion sur la plaque chauffante est plus efficace que par les micro-ondes [67]. Leur digestion aux micro-ondes d'hépatopancreas de homard certifié (TORT-1) laissait 25 à 35 % de carbone résiduel en solution alors que la digestion sur la plaque laissait 12 % de carbone. Même une digestion aux micro-ondes en deux étapes n'était pas aussi efficace. La meilleure oxydation fut obtenue avec une combinaison micro-ondes et plaque chauffante donnant 9 % de carbone résiduel dans les digestats [67].

Friel *et al.* effectuent leurs analyses sur un spectromètre de masse à plasma ICP [70]. Ils font suivre leur digestion d'huîtres et de foie de boeuf aux micro-ondes par une digestion de 30 minutes avec un mélange de HNO₃ et de peroxyde d'hydrogène à 50 % (p/p) dans un bécher ouvert sur une plaque chauffante. Cette dernière étape assure une oxydation efficace et permet de volatiliser les chlorures en solution, sous forme d'HCl, car ils peuvent causer des interférences spectrales sévères en ICP-MS pour ⁷⁵As, ⁵¹V et ⁵²Cr [70].

Pour la plupart des méthodes de décomposition de tissus biologiques énumérées à la section précédente et des méthodes d'analyse, les acides utilisés seuls, ou en combinaison, sont H_2SO_4 , HCl et HNO_3 . L'acide perchlorique est très efficace pour décomposer la matière organique mais on l'évite le plus possible à cause des risques d'explosion. Au niveau de la forme d'acide à utiliser, Asp et Lund ont démontré que la digestion du foie de boeuf par HNO_3 est plus efficace lorsque l'acide est utilisé sous sa forme concentrée plutôt que diluée [53]. Par surcroît, une courte digestion à température élevée est préférable à un long chauffage à basse température [53].

Hélas, en spectrométrie de masse à plasma ICP, à cause des interférences spectrales, les réactifs se limitent généralement à HNO_3 et H_2O_2 pour les éléments de transition. Il a été montré que l'ajout de H_2O_2 augmente l'efficacité de l'oxydation. L'excès d'oxygène, disponible grâce à H_2O_2 , mène à des digestats moins turbides, plus clairs et peu colorés, comparativement à la digestion avec HNO_3 seul [57, 71]. La digestion avec le mélange HNO_3 - H_2O_2 est même plus efficace que la paire HNO_3 - HClO_4 [67]. Deux concentrations de peroxyde d'hydrogène sont commercialement disponibles pour les digestions, soit 30 ou 50 % (p/p) en solution aqueuse. Selon Sturgeon *et al.*, l'utilisation de H_2O_2 50 % (p/p) combiné à HNO_3 n'augmente pas de façon significative la destruction de la matière organique comparativement à H_2O_2 30 % (p/p) et HNO_3 [66]. Le premier est donc déconseillé car il contient des impuretés métalliques en plus forte concentration [66].

L'efficacité de la décomposition de la matrice n'est pas un critère primordial lorsque les métaux sont analysés par spectrométrie d'absorption atomique à flamme, à four de graphite ou par émission atomique à plasma. Seule l'extraction des métaux de la matrice est primordiale [72]. Edmonds *et al.* mentionnent que la digestion de tissus biologiques avec HNO_3 seul est suffisante pour des techniques d'analyses comme celles énumérées plus haut [71]. Par contre, lorsqu'on fait appel à des techniques analytiques plus sensibles à la limpidité des solutions, comme le ICP-MS, la qualité de la décomposition devient un facteur aussi déterminant que la dissolution des métaux. Or, l'ajout de H_2O_2 permet de réduire de façon significative la quantité de carbone résiduel des digestats d'échantillons contenant beaucoup de matière grasse et de protéines. Le peroxyde d'hydrogène permet aussi de ne pas rendre la matrice trop complexe (et donc le fond spectral), comme le fait l'ajout d'un autre acide par exemple [71].

1.5.3. Produits de décomposition

Déjà en 1915, Mörner savait que lorsque des peptides sont chauffés dans l'acide nitrique, des acides organiques comme l'acide picrique, succinique, oxalique, benzoïque, terephthalique et nitrobenzoïque sont formés [73-77]. Plus récemment, vers le début des années 1980, les premiers à s'interroger sur les produits de décomposition du foie de boeuf par HNO_3 aux micro-ondes furent des chercheurs qui travaillaient en volt-ampérométrie [78-80]. Lors de l'analyse des digestats, ils obtenaient des signaux indésirables, car cette technique est sensible aux composés organiques électroattracteurs ou électrodonneurs (ligands). Plus précisément, Jackwerth et Gomiscek montrent que le principal résidu de la digestion d'un tissu par HNO_3 est un mélange de composés organiques possédant un groupement nitro [79]. Kingston *et al.* démontrent plus tard que les impuretés visibles en volt-ampérométrie sont les isomères *ortho*-, *méta*- et *para*- de l'acide nitrobenzoïque, classés par ordre croissant d'abondance [81].

Le groupe de Würfels fit une étude plus approfondie des résidus de digestion du foie de boeuf certifié par HNO_3 à 180 °C aux micro-ondes [82, 83]. Après avoir chauffé le digestat dans un contenant ouvert à 130 °C, ils montrent par résonance magnétique nucléaire la présence de résidus formés exclusivement à partir d'acides aminés. Le tryptophane donne un mélange de produits aromatiques, la phénylalanine donne les isomères de l'acide nitrobenzoïque, l'histidine résulte en l'acide 4-imidazolecarboxylique et finalement, l'acide linoléique de la matière grasse dissoute produit l'acide cyclopropane-1,2-dicarboxylique [82].

1.6. Définitions

Afin de faciliter la comparaison avec les résultats de la littérature, nous avons évalué plusieurs grandeurs dont nous donnons les définitions aux pages suivantes.

1.6.1. Précision

La précision (%) d'une analyse est exprimée par l'écart-type relatif sur une mesure, obtenu en divisant l'écart-type s_x par la moyenne ($100s_x/\bar{X}$). L'écart-type s_x est calculé selon la formule suivante :

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{(n-1)}} \quad (9)$$

où n est le nombre de mesures, X_i les valeurs à inclure dans la moyenne et \bar{X} la moyenne [84].

1.6.2. Intervalle de confiance

L'intervalle de confiance (IC) d'une valeur moyenne, calculé avec l'équation (10), tient compte du pourcentage avec lequel on certifie que la valeur vraie se situe dans ce domaine.

$$IC = \bar{X} \pm \frac{t \cdot s_x}{\sqrt{n}} \quad (10)$$

où dans ce travail t est le facteur de Student pour un niveau de confiance de 95 % ($P = 0,05$) à $n-1$ degrés de liberté [84].

1.6.3. Blanc d'étalonnage

Le blanc d'étalonnage est un blanc utilisé pour établir la droite d'étalonnage. Il a une concentration en analyte de zéro et il est une solution de 2 % (v/v) HNO_3 préparé par dilution avec de l'eau purifiée d'acide nitrique de haute pureté.

1.6.4. Blanc chimique

Le blanc chimique est un échantillon sans analyte, donc sans tissu biologique dans le cas qui nous intéresse, qui subit le même traitement qu'un échantillon avec analyte. Les mêmes réactifs lui sont ajoutés et les mêmes traitements physiques lui sont appliqués.

1.6.5. Limite de détection instrumentale

La limite de détection instrumentale (LD_i) est la plus petite quantité d'un analyte donné quantifiable avec un niveau de confiance connu [10]. L'équation (11) indique comment la calculer.

$$LD_i = 3 \cdot s_{b\acute{e}} \quad (11)$$

Elle est déterminée à partir de l'écart-type sur la concentration équivalente à un blanc d'étalonnage ($s_{b\acute{e}}$) pour dix mesures dès le début d'une série de mesures.

1.6.6. Limite de détection d'une méthode d'analyse

Lorsqu'on compare des méthodes analytiques appliquées à des échantillons avec une matrice complexe, l'équation suivante (12), inspirée de la méthode 200,8 de l'EPA, est utilisée pour décrire la limite de détection d'une méthode analytique (LD_m) [85] :

$$LD_m = t \cdot s_{bce} \quad (12)$$

Dans nos travaux, le facteur t de Student dans l'équation (12) est exprimé pour un niveau de confiance de 95 % pour $n-1$ degrés de liberté, puis s_{bce} est l'écart-type sur la concentration équivalente à un blanc chimique dopé obtenu pour une série de 10 mesures. Le blanc chimique est dopé avant la digestion de façon à obtenir une concentration excédant environ dix fois LD_i [85].

1.6.7. Pourcentage de récupération

Le pourcentage de récupération d'un analyte d'une méthode reflète la capacité de récupérer la même quantité d'analyte lors de l'analyse qu'à celle ajoutée au début du traitement. L'équation (13) indique comment ce paramètre est calculé.

$$\% \text{ récupération} = \frac{[\text{éch. dopé}(\mu\text{g} / \text{g}) - \text{éch. original}(\mu\text{g} / \text{g})]}{\text{Ajout}(\mu\text{g} / \text{g})} \times 100 \quad (13)$$

Ce paramètre devient donc un indicateur de la "force" de l'interaction de l'analyte avec la matrice.

2. PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1. Eau purifiée

En tout temps durant ces travaux de l'eau purifiée a été utilisée. La purification consiste dans un premier temps en la distillation. L'eau distillée est ensuite passée à travers une première cartouche d'échange d'ions. Elle est ensuite pompée vers un système de purification Millipore de 18 M Ω (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Ce système de purification contient des résines échangeuses d'ions, une cartouche de charbon activé et finalement, une membrane ayant des pores de 0,22 μm de diamètre.

2.2. Nettoyage des contenants

Tous les contenants et la verrerie utilisés pour ce travail sont décontaminés par trempage pendant au moins 24 heures dans une solution d'acide nitrique grade A.C.S. (Produits Chimiques ACP, Montréal, Qué, CAN) 20 % (v/v) suivi d'un rinçage à l'eau purifiée et d'un séchage dans une hotte à flot laminaire.

2.3. Préparation des solutions étalons

Les solutions étalons sont préparées par dilution de solutions mères monoélémentaires à 1000 $\mu\text{g/mL}$ (tableau II) provenant de Spex Industries (Edison, NJ, USA), de Leco Instruments Ltd (Mississauga, Ont, CAN) ou de SCP Science (St-Laurent, Qué, CAN).

Les solutions étalons fraîchement préparées avant chaque série de mesures contiennent 2 % (v/v) de HNO₃ 69,0-70,0 % grade "Instra-analyzed" de chez J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Tableau II : Solutions mères étalons d'analyte à 1000 µg/mL.

Élément	Matière première	Matrice	Impuretés (mg/L)	Provenance
Cr	Cr(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	2 % HNO ₃	Ni (5-7)	Spex Industries
Mn	Mn(CH ₃ CO ₂) ₂ · 4H ₂ O	2 % HNO ₃	Cu (1)	Spex Industries
Ni	Poudre de Ni	2 % HNO ₃	n.d.	Spex Industries
Cu	Granules de Cu	2 % HNO ₃	Pb (1-2)	Spex Industries
Zn	Poudre de Zn	2 % HNO ₃	n.d.	Spex Industries
Y	Y ₂ O ₃ 99,999 %	4 % HNO ₃	-----	SCP Science
Cd	Granules de Cd	2 % HNO ₃	n.d.	Spex Industries
In	Granules d'In	2 % HNO ₃	n.d.	Spex Industries
Lu	Lu ₂ O ₃ 99,99 %	2 % HNO ₃	tous < 0,01	LECO Instr. Ltd.
Pb	Pb(NO ₃) ₂	2 % HNO ₃	-----	Spex Industries

----- : impuretés autres que les éléments de ce tableau.

n.d. : non détectable.

2.4. Traitement des moules

La coquille des moules est d'abord brossée afin d'enlever le sable et les algues. Le liquide intérieur de même que les tissus sont déposés dans un contenant à lyophilisation puis gelés à l'azote liquide. La lyophilisation est un procédé de séchage sous vide et à froid permettant d'enlever l'eau des moules en 24 à 36 heures avec une congélation préalable.

Les moules séchées sont ensuite broyées avec un mortier et un pilon de verre et tamisées à 1 mm (16 mesh, Gilson, Worthington, OH, USA). Le tissu sec a été rassemblé et homogénéisé. Ces moules sont alors prêtes à être utilisées et sont conservées au réfrigérateur à 4 °C dans des pots en verre décontaminés.

2.5. Préparation des digestats

La digestion des tissus biologiques se fait selon les étapes suivantes : on pèse exactement environ 0,1 g de tissu sec dans une éprouvette conique de 50 mL graduée en polypropylène de 30 x 115 mm (Falcon no. 2098, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). On ajoute ensuite 1 mL d'acide nitrique concentré et l'éprouvette est chauffée dans un bain d'huile minérale lourde à 105-110 °C. Le bain peut contenir 14 tubes à la fois. Les tubes sont chauffés pendant 15 minutes à cette température en remuant les éprouvettes au moins une fois pour aider à la digestion, comme le font Halls *et al.* [72]. Celles-ci sont ensuite refroidies quelques instants après les avoir sorti du bain. On ajoute ensuite 1 mL de H₂O₂ 30 % (p/p) (Produits Chimiques ACP, Montréal, Qué, CAN) et on laisse réagir quelques instants. Les éprouvettes sont ensuite remises à chauffer pendant 20 minutes à 105-110 °C, après quoi elles sont retirées du bain pour les laisser refroidir. Le résidu de la digestion est transféré quantitativement dans une fiole jaugée de 25 mL en prenant soin de bien rincer le tube à digestion plusieurs fois avec de l'eau purifiée. Avant la mise à la jauge, on ajoute 250 µL d'une solution d'Y et de Lu à 2,5 µg/mL de façon à ce que la concentration des étalons internes soit de 25 µg/L dans les digestats. On transfère ensuite environ 5 mL du digestat dans une éprouvette en polypropylène de 17 x 100 mm (Fisherbrand, Fisher Scientific, Montréal, Qué, CAN) pour l'analyse par spectrométrie de masse à plasma ICP.

Un blanc chimique est aussi préparé pour chaque essai, de même qu'un blanc chimique dopé pour mesurer la limite de détection de la méthode.

2.6. Instrumentation

Les analyses sont effectuées avec un spectromètre de masse à source à plasma ICP modèle VG PlasmaQuad II (VG Elemental, Winsford, UK). Un schéma plus détaillé de l'appareil apparaît à la figure 4. L'argon 99,998 % vient de chez Cryo-Gaz (Montréal, Qué, CAN). L'instrument est muni d'une pompe péristaltique Gilson Milipuls 3 (Worthington, OH, USA) et d'un échantillonneur automatique Gilson modèle 222 (Worthington, OH, USA). Le nébuliseur utilisé est de type Babington à rainure en polytétrafluoroéthylène (PTFE). Les meilleures conditions d'opération pour l'analyse des digestats sont énumérées au tableau III, tel que découvert grossièrement par Lauzon [87] et défini par nos travaux.

Avant l'analyse des digestats, les conditions opératoires sont fixées avec l'aspiration d'une solution de Be, Mg, Co, In, Ce, Pb et U à 10 µg/mL (ICPMS-100, Spex Industries, Edison, NJ, USA) diluée à 10 µg/L. Les différents débits de gaz, les potentiels des lentilles ioniques et la position spatiale du plasma sont ajustés de façon à ce que le signal pour l'ion ^{115}In soit maximal. La stabilité à court terme du signal analytique avant l'analyse est assurée par l'obtention d'un écart-type relatif inférieur à 2 % pour les signaux des éléments énumérés ci-haut mesurés sur une série de dix mesures.

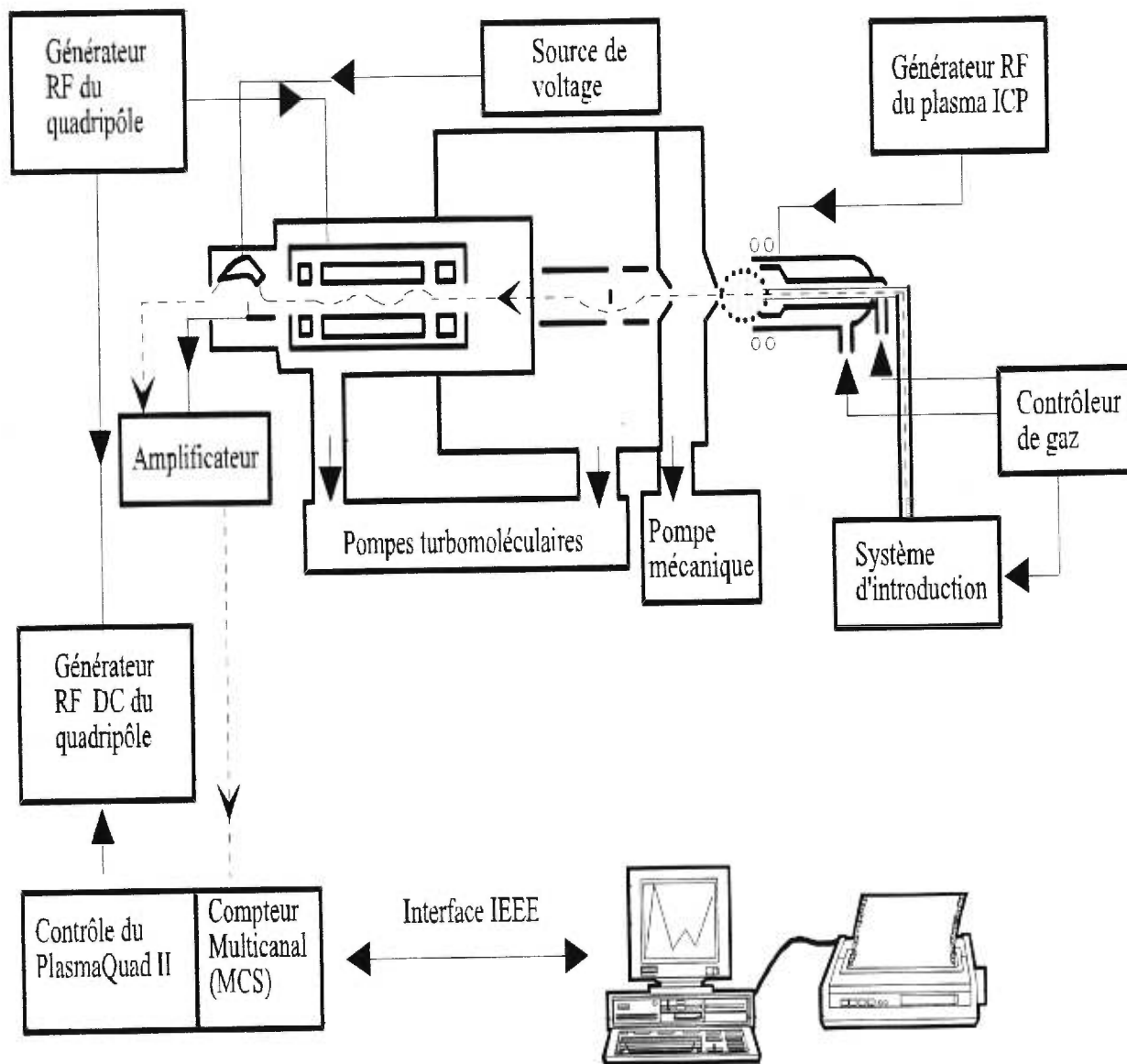


Figure 4 : Spectromètre de masse à plasma ICP PlasmaQuad II de VG Elemental [19].

Tableau III : Conditions d'opération du spectromètre de masse à plasma ICP pour l'analyse des digestats.

<i>Conditions du plasma</i>	
Puissance (W)	1350
Puissance réfléchie (W)	0
Gaz plasmagène (L/min)	13,5 (argon)
Gaz auxiliaire (L/min)	1,05 (argon)
Gaz de nébulisation (L/min)	0,96 (argon)
Nébuliseur	Babington en PTFE
Chambre de nébulisation	Type Scott refroidie à l'eau à 8 °C
<i>Conditions dans l'interface ICP-MS</i>	
Distance entre la bobine d'induction et le cône échantillonneur (mm)	10
Matériaux de fabrication des cônes	Nickel
Diamètre des trous des cônes (mm)	1,0 (échantillonneur) 0,7 (écrémeur)
Pression chambre d'expansion (kPa)	0,18
<i>Spectromètre de masse</i>	
Pression à l'étage 2 (kPa)	$0,0 \times 10^{-4}$
Pression dans l'analyseur (kPa)	$1,0 \times 10^{-7}$
Résolution (uma)	0,8
<i>Acquisition des données</i>	
Mode d'acquisition	Balayage
Temps de prélèvement de la solution avant l'acquisition (s)	75
Nombre de canaux par uma	20
Temps d'intégration (ms/canal)	10,24
Temps d'acquisition par mesure (s)	42
Nombre de balayages effectués	53
Temps de rinçage après les étalons (s)	60
Temps de rinçage après les échantillons (s)	90
Nombre de mesures par solution	3

2.7. Acquisition des données et calculs

La procédure d'acquisition des données s'effectue dans l'ordre suivant : mesure des solutions étalons, des blancs chimiques, puis des digestats. Les étalons sont réaspirés après chaque série de dix échantillons afin de minimiser l'effet de la variation de sensibilité, même si deux étalons internes sont présents. Ces étalons internes sont les ions $^{89}\text{Y}^+$ et $^{175}\text{Lu}^+$. De plus, un blanc d'étalonnage est aspiré entre chaque série de trois ou quatre digestats pour rincer le système d'introduction d'échantillons et réduire les effets de mémoire.

Au niveau des calculs, la correction des intensités par l'étalon interne se fait par intrapolation, qui signifie que pour les éléments de masse intermédiaire à celles des deux étalons internes, ^{111}Cd et ^{114}Cd par exemple, l'intensité du signal de l'étalon interne à ces masses est corrigée par intrapolation des signaux des étalons [19]. Pour les droites d'étalonnage, le logiciel de VG calcule les régressions linéaires en tenant compte d'un poids statistique égal à l'inverse de l'écart-type relatif [19]. Les calculs de la méthode des ajouts dosés sont effectués manuellement en traçant l'intensité corrigée par l'étalon interne en fonction de l'ajout d'analyte en $\mu\text{g/g}$. Les régressions linéaires sont calculées avec le poids statistique basé sur l'inverse de la variance. Des essais ont démontré que les deux méthodes de calcul du poids statistique donnent des résultats similaires.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette partie débute d'abord avec une étude approfondie des interférences spectrales possibles qui pourraient influencer la mesure du signal dans les matrices biologiques, donc la concentration mesurée en métaux. Ensuite, une optimisation de la digestion est montrée, notamment au niveau du traitement de l'échantillon et du traitement des données. Les performances analytiques des digestions testées sont évaluées et analysées. Enfin, une étude de l'effet de la matrice est réalisée. L'effet de la matrice sur la récupération des ajouts sera mesuré, pour terminer avec une comparaison des résultats obtenus par étalonnage interne et ajouts dosés, en plus d'une comparaison avec la valeur de référence pour les matériaux de référence certifiés.

3.1. Choix des isotopes et étude des interférences spectrales possibles

Afin de réduire la quantité de données à traiter, il est préférable de se limiter à la mesure d'un seul isotope par élément, surtout lors de l'analyse de routine. Le choix des isotopes peut être fait avec l'aide des données des tableaux IV et V. Le tableau IV montre les résultats obtenus par Vanhoe, Goossens, Moens et Dams [86]. Les valeurs indiquent la concentration requise dans la matrice pour l'élément susceptible de former des espèces moléculaires interférentes. Des concentrations apparentes de l'ordre de 0,5 à 1 µg/L sont importantes pour les éléments les moins concentrés comme Ni, Mn et Cr. Les valeurs entre parenthèses indiquent la concentration apparente en analyte exprimée en µg/g de tissu sec. Au tableau V figurent les concentrations en éléments interférents dans les tissus de même que dans les digestats de foie de boeuf et de moules. Cela suppose que ces éléments, présents dans le tissu, se retrouvent quantitativement dans les digestats, ce qui n'est peut-être pas le cas. Certains éléments peuvent être oxydés (C et S) ou transformés en une forme plus volatile en milieu fortement oxydant. Il n'en reste pas moins qu'il est important de réaliser une analyse détaillée des interférences spectrales possibles car celles-ci sont difficilement contournables par voie chimique.

En faisant une analyse sommaire des tableaux IV et V, on note que la présence de 11 mg/L de chlorures nous permet d'éliminer l'utilisation de l'isotope de masse 53 du chrome pour l'analyse de cet élément dans le foie de boeuf, puisque seulement 10 mg/L de Cl amène une concentration apparente plus élevée que celle présente dans ce tissu.

On estime que 23 mg/L de Cl^- seraient présents dans les digestats de moules sachant que NaCl est présent à 1,25 % (p/p) environ dans les mollusques [64]. La quantité de Cl^- est probablement plus grande puisqu'elle doit tenir compte de la contribution possible de KCl et d'autres sels minéraux chlorés. Les espèces à base de S devraient peu affecter le signal de Cr car les digestats en contiendront beaucoup moins que 500 mg/L. L'interfèrent le plus redoutable pour Cr est le carbone. Les digestats contenant plus de 50 mg/L de C donneront une contribution au signal allant de plus de 10 % jusqu'à une valeur supérieure à 100 %, menant à une concentration erronée. Si ce n'était de l'interférence des chlorures sur le ^{53}Cr et de sa faible abondance (9,51 %), on utiliserait cet isotope plutôt que le ^{52}Cr , car le carbone présent dans la matrice affecte de façon significative les résultats du ^{52}Cr .

Élément monoisotopique, le Mn ne devrait théoriquement pas être affecté par la présence des 40 mg de K/L dans les digestats de foie de boeuf, car le domaine critique est situé plutôt vers 100 mg/L avant que la contribution de KO^+ ne soit plus négligeable, soit de l'ordre de 0,08 $\mu\text{g/g}$. Par rapport au foie de boeuf, cette concentration est tout de même insignifiante (0,8 %). Au niveau des chlorures présents dans la matrice, l'interférence de ClO^+ se fait sentir à 1000 mg de Cl/L, niveau de concentration beaucoup plus élevé que celui attendu, donc aucun problème est anticipé pour l'analyse de Mn dans ces matrices animales.

L'isotope le plus abondant du nickel, le ^{58}Ni (68,27 %), ne figure pas au tableau IV car il subit de l'interférence de la part du ^{58}Fe (0,29 %), généralement très abondant, surtout dans les tissus hépatiques (270 $\mu\text{g/g}$ dans le foie de boeuf et 1100 $\mu\text{g/g}$ dans le foie de roussette). Donc la quantification se fait habituellement en utilisant l'isotope 60 ou 62. Pour l'isotope de masse 60 de Ni, seules les espèces à base de Ca et de C peuvent affecter les résultats. Une concentration de 0,2 μg de Ni/g de tissu peut être mesurée en la présence de 1000 mg/L de C et 100 mg/L de Ca. Comme le cas de Ni est un peu spécial, il sera discuté plus en profondeur dans la section portant sur la discussion des résultats obtenus par les diverses méthodes d'étalonnage.

Tableau IV : Concentration de C, Ca, Cl, P, K, Na et S requise dans la matrice (mg/L) pour donner une concentration apparente en analyte non négligeable [86]. La concentration apparente en µg/g apparaît entre parenthèses.

Analyte	Abondance relative (%)	Espèces interférentes ¹	C	Ca	Cl	P	Na	K	S
Cr 52	83,79	ArC ⁺ , ClOH ⁺ , Cl ¹⁷ O ⁺ , ³⁶ SO ⁺	50 (0,03)		100 (0,04)				500 (0,04)
Cr 53	9,50	Ar ¹³ C ⁺ , ³⁷ ClO ⁺	100 (0,2)		10 (0,25)				
Mn 55	100	³⁷ Cl ¹⁸ O ⁺ , KO ⁺			1000 (0,02)			100 (0,08)	
Ni 60	26,10	CO ₃ ⁺ , ⁴⁴ CaO ⁺ , ⁴³ CaOH ⁺	1000 (0,2)	100 (0,2)					
Cu 63	69,17	PO ₂ ⁺ , ArNa ⁺				10 (0,2)	100 (0,7)		
Cu 65	30,82	PO ¹⁸ O ⁺ , SO ₂ H ⁺ , ³³ SO ₂ ⁺				500 (0,3)			10 (0,5)
Zn 64	48,63	⁴⁸ CaO ⁺ , PO ₂ H ⁺ , SO ₂ ⁺ , S ₂ ⁺		1000 (0,2)		50 (0,4)			5 (1)
Zn 66	27,90	³⁴ SO ₂ ⁺ , ³³ SO ₂ H ⁺ , SO ¹⁸ O ⁺							50 (1)

1 : Lorsque la masse de l'isotope n'est pas spécifiée, il s'agit de l'isotope le plus abondant de l'élément (¹H, ¹⁶O, ³¹P, ³²S, ³⁵Cl, ³⁹K, ⁴⁰Ca et ⁴⁰Ar).

Tableau V : Teneur en éléments interférents dans le foie de boeuf certifié NBS 1577a et les moules.

Interférent	Foie de boeuf ^a		Moules	
	Tissu sec (mg/g)	Digestat (mg/L)	Tissu sec (mg/g)	Digestat (mg/L)
Ca	0,12	0,48	0,60	2,4
Cl	2,8	11	> 5,6 ^b	>23 ^b
Mg	0,60	2,4	0,25	1,0
P	11	44	3,3	13
K	10	40	n.d.	n.d.
Na	2,4	9,6	3,7 ^b	15 ^b
S	7,8	32	n.d.	n.d.

a : certificat d'analyse du foie de boeuf certifié.

b : référence [64].

n.d. : valeurs non disponibles.

Pour Cu, l'effet de la présence de P (venant des enzymes) sera plus marqué pour l'isotope 63 que pour l'isotope 65, car seulement 10 mg de phosphore/L ont sensiblement le même effet sur ⁶³Cu que 500 mg de phosphore/L ont sur ⁶⁵Cu. Les concentrations apparentes mentionnées (0,2 et 0,3 µg/g) sont néanmoins négligeables par rapport aux concentrations généralement présentes dans les tissus biologiques. Toutefois, les digestats, contenant près de 50 mg/L de P, auront une surestimation de la concentration mesurée avec ⁶³Cu de l'ordre de 1 µg/g, ce qui devient important dans quelques cas. Principalement pour cette raison, l'isotope 65 est choisi pour la quantification. Les interférences possibles sur Cu, dues à la présence de S, se limitent au ⁶⁵Cu, où les 32 mg/L de S peuvent donner un signal correspondant à 0,5 µg/g, en supposant que tout le S est retrouvé quantitativement dans le digestat. On sait que le S peut s'oxyder en SO₂ et se volatiliser. Enfin, le Na devrait peu interférer sur ⁶³Cu car les concentrations attendues dans les digestats sont dix fois inférieures à la valeur critique de 100 mg/L.

Pour le Zn, la quantification est faite avec l'isotope 66, bien qu'il soit environ deux fois moins sensible, car il est susceptible de subir moins d'interférences spectrales de la part de Ca, P et S. On s'attend à ce que Ca ait peu d'effet sur ^{64}Zn car la concentration attendue dans les digestats est négligeable par rapport aux 1000 mg/L mentionnés au tableau IV. Les 44 mg/L de P peuvent donner une concentration apparente en ^{64}Zn d'environ 0,4 $\mu\text{g/g}$, ce qui demeure peu important par rapport aux valeurs attendues dans les différents tissus (80 à plus de 100 $\mu\text{g/g}$). L'interférence majeure vient de S et elle est plus sévère à la masse 64 qu'à la masse 66. Une concentration apparente de 1 $\mu\text{g/g}$ en Zn peut être obtenue avec 5 mg/L de S pour ^{64}Zn et 50 mg/L pour ^{66}Zn . Pour 50 mg/L de soufre, une concentration apparente de 8 $\mu\text{g/g}$ peut être obtenue avec ^{64}Zn , une contribution qui devient significative. La somme de ces petites contributions peut rendre difficile l'analyse de Zn par l'isotope 64. On peut facilement imaginer l'effet désastreux qu'aurait l'utilisation du H_2SO_4 pour faire la digestion.

Les éléments plus lourds comme Cd et Pb subissent peu d'interférences spectrales dues à la matrice [17]. Seuls les lanthanides subissent des interférences spectrales sévères à cause des oxydes de lanthanides de masses inférieures.

3.2. Optimisation de la digestion

La digestion avec HNO_3 seulement se déroule de façon semblable à la méthode expliquée à la section 2.5 (page 36), sauf qu'un seul chauffage de 30 min est effectué dans 2 mL de HNO_3 en utilisant 100 mg de tissus secs. Étant donné la turbidité des digestats, une centrifugation à 5000 rpm pendant 10 min avant l'analyse par ICP-MS est nécessaire. Pour cette méthode, les temps de chauffage, le type de vaisselle à utiliser, la masse de tissus et d'autres paramètres ont été optimisés par C. Lauzon [87]. Lauzon a également fait la digestion de tissus certifiés avec un mélange $\text{HNO}_3\text{-HCl-H}_2\text{SO}_4$. Les résultats furent désastreux car les interférences spectrales étaient excessivement sévères pour tous les éléments de transition analysés dans ce travail et une dégradation importante des cônes en nickel a été observée [87]. Les étalons internes utilisés par Lauzon étaient le ^{89}Y et le ^{45}Sc . Or, il se trouve que la solution de scandium de 1000 mg/L contenait du Y (10-15 mg/L) de sorte que la concentration de Y finale était de 0,5 $\mu\text{g/L}$ sans même avoir ajouté de Y. De plus, les masses 44 et 45 sont très encombrées par les espèces CO_2^+ et $^{13}\text{CO}_2^+$. Les étalons internes ont donc été

remplacés par ^{89}Y pour les éléments de transition et ^{175}Lu pour Pb. Le Cd est quantifié en faisant une intrapolation entre les deux étalons internes. Friel *et al.* mentionnent que cette façon de procéder donne une correction efficace en cas de dérive ou d'effets dus à la matrice [70].

La présence de nombreuses particules en suspension dans ces digestats nous a incité à trouver une méthode de digestion donnant des digestats plus clairs, qui peuvent être directement injectés dans le plasma ICP. Comme mentionné à la page 30, pour les éléments de transition, les réactifs utilisables pour la digestion se limitent généralement à HNO_3 et H_2O_2 pour l'analyse des digestats de tissus biologiques par spectrométrie de masse à plasma ICP.

La quantité de chaque réactif (HNO_3 et H_2O_2) a été fixée en considérant que la méthode avec HNO_3 seul nécessite 2 mL de HNO_3 pour un chauffage de 30 min, donc un chauffage de 15 min avec 1 mL de HNO_3 est possible. D'autant plus que des mesures de pH avec une électrode combinée montrent que lorsque du peroxyde d'hydrogène est ajouté à la digestion, le pH des digestats est plus faible. Ce qui laisse croire que lorsque HNO_3 et H_2O_2 sont en contact avec la matière organique, H_2O_2 réagit préférentiellement, expliquant ainsi la hausse d'acidité observée. La combinaison HNO_3 - H_2O_2 donnant des digestats ayant un pH le plus près de celui d'un étalon contenant 2 % (v/v) de HNO_3 est celle où il y avait 1 mL de HNO_3 et 1 mL de H_2O_2 dans un volume final de 25 mL.

Différents temps de chauffage ont été testés afin de déterminer la meilleure combinaison offrant des résultats exacts avec un court temps de digestion. Comme l'ont fait Halls *et al.*, des graphiques illustrant la variation de la concentration mesurée pour un élément donné en fonction de la durée du chauffage sont construits [72]. Ces auteurs utilisent de tels graphiques pour établir le temps optimum pour digérer le foie de boeuf par HNO_3 concentré en vue de l'analyse par émission atomique à plasma ICP. Il est ainsi possible de mesurer le temps nécessaire à un élément pour se libérer de la matrice ou encore le temps qu'il demeure en solution avant de s'évaporer sous une forme quelconque.

La figure 5 montre les courbes de variation de la concentration en Zn, Cd, Pb, Mn et Cu en fonction du temps pour la digestion de moules broyées. Les moules sont utilisées ici uniquement pour des raisons de disponibilité et de coût des échantillons. Un

chauffage préalable de 0,1 g de tissus secs pendant 15 min avec HNO_3 à 105 °C est fait. La digestion se poursuit avec l'ajout de 1 mL de H_2O_2 30 % (p/p) et par un chauffage pendant un temps variant entre 10 et 40 min. L'incertitude sur les courbes de la figure 5 représente l'écart-type.

On observe que pour Cu et Mn, la concentration mesurée demeure relativement stable en fonction du temps de chauffage avec H_2O_2 . Par contre, pour Zn, Cd et Pb, la stabilité survient après au moins 15 à 20 min de chauffage avec H_2O_2 . Néanmoins, dans l'ensemble, les courbes montrées à la figure 5 ne sont pas aussi prononcées que celles obtenues par Halls *et al.* [72]. La raison est sans doute que la digestion préalable de 15 min avec HNO_3 est suffisante pour libérer, totalement ou en partie, la plupart des métaux, ou du moins, les métaux étudiés. Alors, on peut supposer que le rôle de H_2O_2 est principalement d'améliorer la destruction de la matière organique.

Ceci nous amène à discuter de l'efficacité de la dégradation de la matière organique. Nous avons déjà discuté dans l'introduction de l'importance en spectrométrie de masse à plasma ICP d'injecter des solutions claires, dans lesquelles les métaux sont libérés de la matrice. Il a été aussi fait mention de l'augmentation de la destruction de la matrice biologique lors de l'ajout de H_2O_2 comme oxydant à HNO_3 . La différence est observable au niveau de l'aspect visuel des digestats. Les digestats qui ont été traités pendant 5 min avec H_2O_2 contiennent des particules non-digérées flottant à la surface, en plus d'avoir une coloration jaune plus intense que les solutions issues de la digestion durant 20 min ou plus en présence de H_2O_2 30 % (p/p). Par contre, lors de la digestion de tissus biologiques avec HNO_3 concentré seulement, que ce soit sur plaque chauffante ou par des micro-ondes, les digestats contiennent un certain nombre de particules en suspension et parfois même de la matière grasse flottant sur la solution. Ce fait a été constaté dans nos travaux de même que par d'autres auteurs [71, 72 et 87]. De telles solutions sont injectables directement dans un spectromètre d'émission atomique à plasma ICP mais il est peu conseillé de faire de même avec un ICP-MS.

Pour l'ICP-MS, la présence de particules en suspension est très néfaste. En plus de provoquer une hausse du bruit sur le signal lorsque le nébuliseur utilisé n'est pas approprié, ce qui n'est pas le cas dans le présent travail, elles peuvent également provoquer une suppression du signal. Cet effet a été observé notamment par Ridout,

Jones et Williams [88], qui ont analysé le pancréas de homard certifié TORT-1 par spectrométrie de masse à plasma ICP. Ils observent que leurs digestats, contenant environ 6500 $\mu\text{g/mL}$ de solides dissous, donnent des résultats inférieurs aux valeurs certifiées pour Mn, Cu, Zn et Cd. Ils ont pensé que l'effet de charge d'espace était responsable. Cet effet serait causé par la présence d'une grande quantité de Na ou K. Or, l'analyse des digestats dilués dix fois donne des résultats en accord avec les valeurs certifiées, menant à la conclusion que ce sont bien les solides dissous qui sont responsables de la suppression du signal et non l'effet de charge d'espace. Ils en viennent à cette conclusion car l'effet de charge d'espace dépend de la quantité absolue d'interfèrent dans le milieu et non du rapport interférent/analyte (page 26). Enfin, Barnes *et al.* ont remarqué que les particules en suspension venant d'une digestion incomplète entraînent une erreur systématique sur le signal [89].

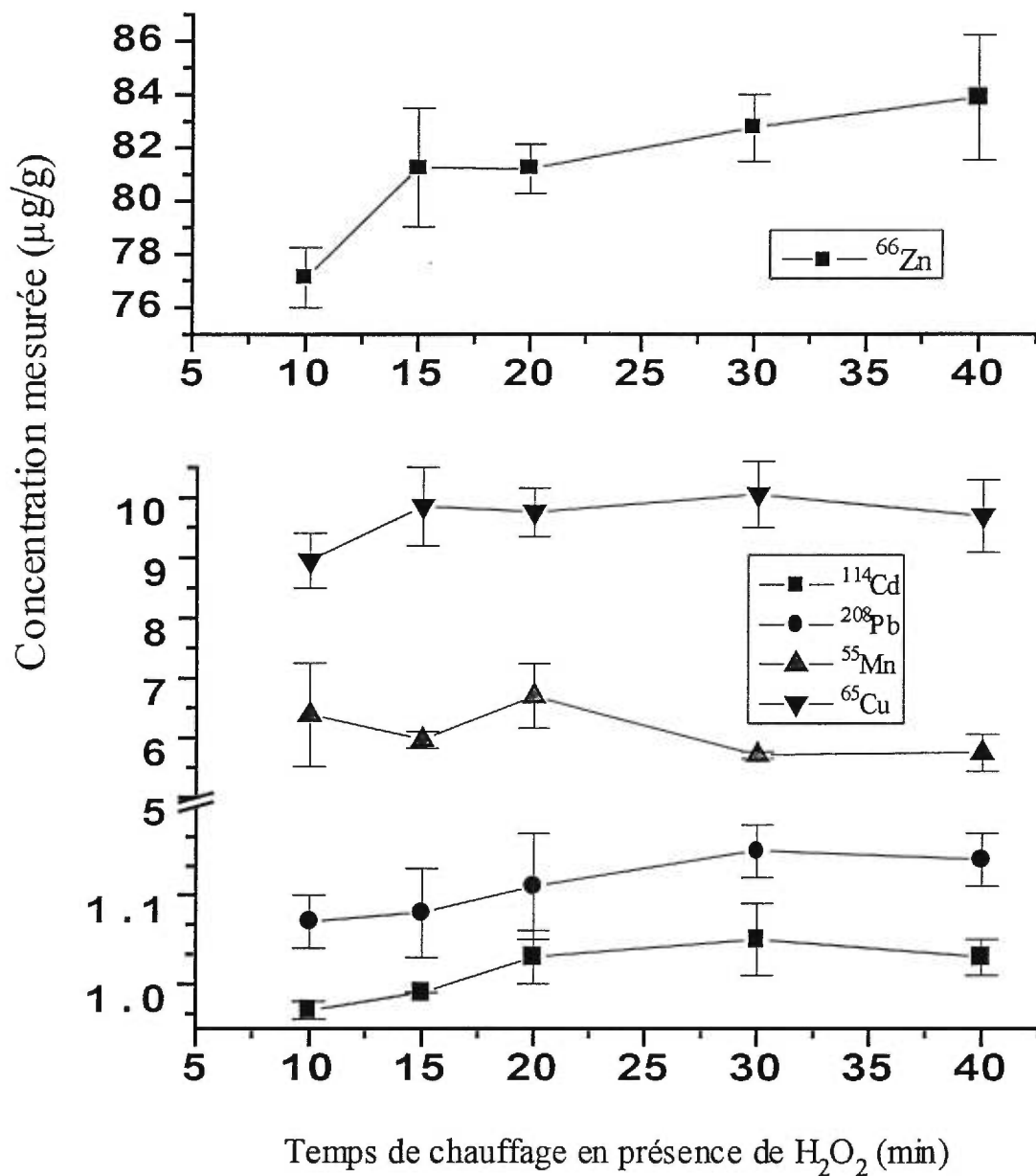


Figure 5 : Influence du temps de chauffage avec H_2O_2 30 % (p/p) sur l'efficacité de la digestion. Digestion préalable de 15 min avec HNO_3 concentré. Les barres d'erreur représentent \pm l'écart-type sur la mesure.

Friel *et al.* ont aussi observé une baisse de sensibilité catastrophique en ICP-MS après l'aspiration de digestats dont l'oxydation avait été insuffisante [70]. Le seul moyen de retrouver la sensibilité de départ fut de sortir les lentilles ioniques de l'instrument et de les nettoyer.

Dans le présent travail, l'addition de H_2O_2 comme oxydant permet d'obtenir des digestats plus clairs (jaune pâle), sans matières grasses, ni particules visibles à l'oeil nu après quelques minutes de chauffage. L'intensité de la couleur jaune d'un digestat est un bon indice de destruction de matière organique [71]. Les digestats de moules sont les plus clairs. Ceux de foie de boeuf et de foie de roussette sont d'une coloration jaune plus foncée, laissant supposer que la matrice est plus difficile à dégrader et que la teneur en fer, présent sous forme oxydée Fe^{3+} est élevée. Selon les renseignements de la littérature [48], l'efficacité de dégradation de la matrice animale se situerait aux environs de 90 %. Friel *et al.* n'ont d'ailleurs plus observé de baisse de sensibilité après avoir utilisé du H_2O_2 comme second réactif pour leur digestion de tissus animaux [70].

3.2.1. Soustraction du blanc chimique

Dans tout type d'analyse chimique, la préparation d'un blanc chimique est impérative pour vérifier la qualité d'une série d'analyses. La distinction entre le blanc d'étalonnage et le blanc chimique a été établie dans la section 1.7 .

La présente section vise à montrer l'apport des concentrations des réactifs utilisés au signal mesuré à une valeur m/z donnée. Mais avant de se lancer dans une analyse quantitative, on doit savoir à quel niveau de concentration en analytes se situe le blanc chimique pour savoir si une correction du signal de l'échantillon devait être effectuée avec celui du blanc chimique.

Le tableau VI contient, d'une part, la concentration en métaux dans un blanc chimique, calculée à partir des données d'analyse du lot de réactifs. D'autre part, apparaissent les concentrations obtenues pour des blancs chimiques préparés avec HNO_3 et $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. À titre comparatif, la limite de détection instrumentale est donnée.

Tableau VI : Concentration ($\mu\text{g/g}$) équivalente à un blanc chimique pour une digestion par HNO_3 seul et $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ à 105°C .

Élément	HNO_3 , 30 min		HNO_3 , 15 min + H_2O_2 , 20 min		LD_i
	Mesurée	Calculée	Mesurée	Calculée	
^{52}Cr	0,1	0,08	0,08	0,1	0,01
^{60}Ni	0,1	< 0,6	0,02	< 0,08	0,01
^{114}Cd	0,01	< 0,02	0,02	< 0,02	0,003
^{208}Pb	0,07	0,01	0,01	n.d.	0,003
Mn	0,01	< 0,02	0,02	< 0,02	0,01
^{65}Cu	0,3	< 0,02	0,1	< 0,02	0,05
^{66}Zn	0,3	< 0,02	0,5	0,02	0,04

n.d. : non déterminé

Premièrement, on constate que la concentration de Cr mesurée dans un blanc chimique obtenu par chacune des deux méthodes de digestions seul est similaire à la concentration attendue en Cr, calculée à partir de la pureté des réactifs.

Pour Pb, Cu et Zn, avec les deux méthodes de digestion, la concentration mesurée excède la concentration calculée. Contrairement au cas de Cr, même si les valeurs mesurées excèdent les valeurs calculées, les concentrations mesurées demeurent tout de même sous la limite de détection de la méthode d'analyse pour ces trois éléments, sauf pour Pb avec HNO_3 seul..La différence d'avec Cr, c'est que les concentrations sont sous la LD_m , à part pour Pb par HNO_3 seul. Ceci fera l'objet d'une prochaine interrogation. Finalement, les cas de Cd et Mn ne sont pas problématiques car les valeurs mesurées sont inférieures ou égales aux valeurs calculées.

Tableau VII : Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans le foie de boeuf certifié NBS 1577a avec et sans soustraction du blanc chimique pour deux méthodes de digestion.

Analyte	30 min HNO_3		15 min HNO_3 + 20 min H_2O_2	
	Avec	Sans	Avec	Sans
^{52}Cr	$1,3 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$0,83 \pm 0,06$	$0,90 \pm 0,06$
^{60}Ni	$< \text{LD}_m$	$0,2 \pm 0,1$	$< \text{LD}_m$	$0,19 \pm 0,08$
^{114}Cd	$0,22 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,01$
^{208}Pb	$0,33 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,09$	$0,33 \pm 0,03$	$0,35 \pm 0,04$
^{55}Mn	$9,2 \pm 0,6$	$9,2 \pm 0,5$	$9,6 \pm 0,2$	$9,6 \pm 0,2$
^{65}Cu	209 ± 10	209 ± 10	175 ± 2	177 ± 2
^{66}Zn	109 ± 4	109 ± 4	125 ± 2	126 ± 2

Moyenne de 5 mesures \pm IC à 95 %.

Reste maintenant à savoir si le blanc chimique contribue réellement de façon importante au signal, donc à la concentration mesurée. À cet égard, le tableau VII montre les données obtenues pour le foie de boeuf certifié préparé selon les deux mêmes méthodes de digestion qu'au tableau VI. La comparaison s'effectue entre la concentration moyenne de 5 échantillons mesurés avec et sans soustraction du signal, à la valeur m/z d'intérêt, d'un blanc chimique correspondant à cette série de digestions.

Pour tous les métaux étudiés à l'exception de Ni, la correction du blanc chimique n'a aucun effet significatif sur la concentration mesurée. Cette affirmation est aussi vraie pour les deux méthodes de digestion apparaissant au tableau VII. La différence est

considérée comme non significative à nos yeux quand la variation est inférieure à l'intervalle de confiance à 95 %. Pour Ni, la soustraction du blanc chimique au signal mesuré à $m/z = 60$ amenait une concentration inférieure à la LD_m .

Somme toute, avec la digestion de 30 min avec HNO_3 le calcul devrait inclure la soustraction du blanc chimique pour Pb lorsqu'on suspecte une contamination. Pour la digestion de 15 min avec HNO_3 et 20 min avec H_2O_2 , la soustraction du blanc chimique s'avère inutile pour les éléments analysés dans ce travail. Ceci permet d'accélérer les processus de calculs, et d'alléger le maniement des données. Durant tous ces travaux, la soustraction du blanc chimique a cependant été effectuée en parallèle et les résultats obtenus abondent dans le même sens que ceux donnés au tableau VII et ajoutent ainsi plus de rigueur à la conclusion énoncée ci-haut.

3.2.2. Centrifugation

Comme nous l'avons déjà dit, la préparation de l'échantillon est l'étape cruciale d'une analyse chimique et détermine souvent le temps d'analyse [59]. Toute réduction du nombre d'étapes de traitements devrait réduire le temps d'analyse. Dans notre cas, la centrifugation est une étape qui permet de séparer les particules en suspension du liquide surnageant. Nous avons également mentionné que l'ajout de H_2O_2 comme réactif augmente considérablement la clarté des digestats et, dans ce cas, nous pouvons nous demander si la centrifugation est encore nécessaire. Cette étape, qui requiert plusieurs minutes, augmente les risques de contamination et augmente le temps passé à nettoyer les contenants.

Le fait d'omettre la centrifugation implique que les particules présentes dans la solution sont aspirées et acheminées au plasma. L'introduction de ces particules dans le plasma ICP peut perturber la désolvation, la décomposition des particules, l'atomisation et l'ionisation des métaux liés à des protéines. En introduisant plus de particules dans le plasma, on pourrait donc s'attendre à une hausse du bruit sur le signal, donc une dégradation de la précision et une détérioration de la qualité des résultats analytiques. Le tableau VIII donne les concentrations mesurées pour le foie de boeuf certifié avec et sans centrifugation des digestats. Les valeurs entre parenthèses représentent la précision exprimée en pourcentage de la concentration moyenne et sert

donc de mesure indirecte du bruit sur les résultats obtenus. Les résultats obtenus avec une autre méthode de digestion sont montrés afin d'illustrer l'étendue de l'effet de l'étape de centrifugation.

Au niveau de la précision, le tableau VIII montre que pour les éléments moins concentrés comme Cd et Pb, la précision est affectée par l'absence de centrifugation. Lorsque la digestion est faite selon la méthode 15 min HNO₃ + 10 min H₂O₂, la précision augmente de 3 à 4 % pour Cd et Pb en absence de centrifugation. La digestion proposée (15 min avec HNO₃ et 20 min H₂O₂) amène une dégradation de 3 % de la précision pour Cd et une valeur stable pour Pb, toujours en absence de centrifugation. Les résultats obtenus pour le manganèse indiquent que peu importe la méthode de digestion utilisée, la précision s'améliore de 1 % en évitant la centrifugation. Pour Cu, on observe une légère dégradation par la digestion de 15 min avec HNO₃ suivi de 10 min avec H₂O₂, alors que pour la méthode proposée, il n'y a pas de changement. Pour Zn, il n'y a pas de changement avec la méthode proposée, alors qu'un léger gain de 1 % est observé pour l'autre méthode.

De façon générale, le fait de ne pas centrifuger les digestats avant l'analyse n'augmente pas de façon systématique le bruit sur le signal pour tous les éléments. Par ailleurs, il n'existe pas de relation simple entre le gain ou la perte de précision et la masse de l'élément analysée. La variation aléatoire du bruit sur le signal des analytes certifie que l'hypothèse formulée précédemment, voulant que le bruit sur le signal augmente systématiquement en évitant la centrifugation des digestats, ne s'applique point. Les digestats obtenus en utilisant la combinaison HNO₃ + H₂O₂ contiennent probablement des particules de dimension suffisamment petite, qui sont désolvatées et dégradées efficacement. Si des particules étaient présentes, le nébuliseur Babington à rainure en V utilisé dans ce travail permettrait la nébulisation de la solution aussi efficacement qu'une solution sans particules.

Tableau VIII : Concentrations obtenues ($\mu\text{g/g}$) pour le foie de boeuf certifié NBS1577a avec ou sans centrifugation du digestat. Les valeurs entre parenthèses représentent la précision exprimée en pourcentage de la concentration pour $n=5$.

Isotope	Méthode 15+10 ^a		Méthode 15+20 ^b		Valeur Certifiée ^c
	Centrifugation		Centrifugation		
	Avec	Sans	Avec	Sans	
¹¹⁴ Cd	0,34 ± 0,01 (2)	0,34 ± 0,03 (6)	0,30 ± 0,01 (4)	0,29 ± 0,03 (7)	0,27 ± 0,04
²⁰⁸ Pb	0,36 ± 0,08 ^d (14)	0,36 ± 0,08 ^d (17)	0,35 ± 0,04 (8)	0,29 ± 0,03 (7)	0,34 ± 0,08
⁵⁵ Mn	9,6 ± 0,4 (4)	9,9 ± 0,4 (3)	9,6 ± 0,2 (2)	10,0 ± 0,2 (1)	10,3 ± 1,0
⁶⁵ Cu	166 ± 7 (3)	180 ± 8 (4)	177 ± 2 (1)	184 ± 2 (1)	193 ± 10
⁶⁶ Zn	129 ± 6 (4)	131 ± 4 (3)	126 ± 2 (1)	125 ± 2 (1)	130 ± 10

a : Digestion 15 min avec HNO₃ + 10 min avec H₂O₂. Moyenne ± IC à 95 % ($n=5$).

b : Digestion 15 min avec HNO₃ + 20 min avec H₂O₂. Moyenne ± IC à 95 % ($n=5$).

c : Moyenne ± IC à 95 % ($n=6$ à 12).

d : $n = 4$.

Le tableau VIII permet également d'étudier l'effet de la centrifugation sur l'exactitude des résultats analytiques, car nous avons vu que les particules en suspension peuvent amener une erreur systématique. La comparaison entre les résultats obtenus pour le foie de boeuf, avec ou sans centrifugation des digestats, est faite avec le recouvrement des intervalles de confiance par rapport à la valeur certifiée. Pour Cd, Pb, Mn et Zn, les deux digestions testées donnent des résultats concluants et exacts peu importe si le digestat est centrifugé ou non. Pour Cu, un gain d'exactitude notable est obtenu quand les digestats sont aspirés directement sans traitement supplémentaire, et ce pour les deux types de digestion. En enlevant la centrifugation, des valeurs supérieures de 4 % (HNO₃ 15 min + H₂O₂ 20 min) et de 8 % (HNO₃ 15 min + H₂O₂ 20 min) permettent d'obtenir des résultats en accord avec les valeurs de référence pour Cu. En résumé, on déduit qu'un gain appréciable d'exactitude est obtenu pour Cu. Pour les autres métaux, la digestion de 15 min avec HNO₃ et de 20 min avec H₂O₂ offre des résultats dont le recouvrement des intervalles de confiance avec la valeur de référence est possible. Les résultats obtenus sans centrifugation ne sont pas systématiquement plus élevés ou plus faibles comme l'ont observés Barnes *et al.*, signifiant qu'il n'y a pas ou peu de particules en suspension ou que les étalons internes permettent une correction efficace du signal.

Il est aussi pertinent d'examiner l'effet de la centrifugation sur le pourcentage de récupération des ajouts des analytes dans les deux principaux tissus étudiés. On suppose que le fait de ne pas centrifuger devrait augmenter les pourcentages de récupération des ajouts. Les ions métalliques fortement adsorbés aux particules en suspension n'étant point analysés lorsqu'il y a centrifugation des digestats. Le tableau IX contient les données relatives à l'étude de la récupération de l'ajout d'analytes en présence ou en absence de centrifugation. Cette section se veut uniquement une comparaison des valeurs de récupération obtenues avec et sans l'étape de centrifugation et non une analyse des valeurs elle-mêmes. Les calculs des pourcentages de récupération ont été effectués en utilisant l'équation (13). La concentration de l'échantillon original provient de la mesure de cinq digestats différents non dopés pour les moules et de trois pour le foie de boeuf. Les données du tableau IX montrent les pourcentages de récupération pour cinq digestats dopés de moules et trois digestats dopés de foie de boeuf. La moyenne des pourcentages des récupération est accompagnée de l'écart-type sur la moyenne (s_x/\sqrt{n}) qui représente mieux l'incertitude sur ces valeurs à notre avis.

Tableau IX : Étude de récupération des analytes dans les moules et le foie de boeuf sans centrifugation des digestats obtenus par une digestion de 30 min avec HNO₃ et de 20 min avec H₂O₂.

Isotope	Moules		Foie de boeuf	
	Centrifugation		Centrifugation	
	Avec	Sans	Avec	Sans
⁶⁰ Ni	90 ± 1	92 ± 2	92 ± 6	95 ± 4
¹¹⁴ Cd	87 ± 2	87 ± 2	101 ± 3	101 ± 2
²⁰⁸ Pb	89 ± 2	96 ± 1	89 ± 5	92,4 ± 0,8
⁵⁵ Mn	105 ± 1	102 ± 1	93,5 ± 0,2	102 ± 2
⁶⁵ Cu	100 ± 2	96 ± 2	94 ± 4	97 ± 3
⁶⁶ Zn	74 ± 2	72 ± 4	85 ± 4	81 ± 5

Moyenne ± écart-type sur la moyenne (s_x/\sqrt{n}), où $n = 5$ pour les moules et $n = 3$ pour le foie de boeuf.

La récupération du Cd ne semble pas affectée par l'injection directe des digestats dans le plasma ICP car elle demeure stable à 87 % dans les moules et 101 % dans le foie de boeuf. Un gain notable de récupération pour Pb de 7 % et 4 % dans les moules et le foie de boeuf respectivement est remarqué en absence de centrifugation. Pour Mn, l'analyse directe des digestats semble apporter une amélioration considérable, plus marquée pour le foie de boeuf. Pour Cu, les pourcentages de récupération demeurent assez stables en absence de la centrifugation, résultant à des valeurs de récupération supérieures à 96 ± 2 % pour les deux tissus. Enfin, pour Zn, une variation peu significative par rapport aux incertitudes est observée.

En résumé, cette étude démontre que l'étape de centrifugation n'est plus une nécessité pour l'analyse des métaux dans les tissus biologiques lorsque la digestion est effectuée par une combinaison $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. Les digestats analysés directement par spectrométrie de masse à plasma ICP ne causent aucune interférence physique, assurant ainsi une nébulisation normale. L'exactitude des résultats analytiques aussi est préservée et parfois même améliorée (Cu). Finalement, la récupération des ajouts montre un gain notable pour quelques éléments et aucune variation pour d'autres.

3.3. Performances analytiques

3.3.1. Limites de détection et de quantification

Dans la section 1.7, nous avons expliqué la différence entre la limite de détection instrumentale (LD_i) et la limite de détection d'une méthode d'analyse (LD_m). Dans une multitude d'articles, les auteurs donnent les limites de détection de leur méthode de digestion comme étant trois fois la valeur de l'écart-type de la concentration équivalente au blanc d'étalonnage, ce dernier étant mesuré dix fois. Or, cette façon de calculer la limite de détection ne représente ni plus ni moins que la concentration minimale détectable pour un appareil donné à une journée donnée. Dans ce travail, pour caractériser une méthode de digestion impliquant divers réactifs, l'utilisation de la limite de détection de la méthode (LD_m) telle que définie par Martin et Long semble plus appropriée [85]. Elle représente globalement la concentration minimale détectable déterminée par la variabilité du signal de l'appareil, en plus de la variabilité due à la contribution des réactifs obtenues par l'analyse d'un blanc chimique dopé avant la digestion. Selon Long et Martin, la quantité ajoutée au blanc chimique, avant le chauffage, doit être telle que la concentration finale soit deux à cinq fois la LD_i [85].

Le tableau X montre les LD obtenues par Friel *et al.* [70], Crews *et al.* [90] et par Ridout, Jones et Williams [88]. On retrouve aussi des valeurs typiques de LD_i représentatives d'une série d'analyse, de même que les LD_m mesurées pour des méthodes de digestion, dont la méthode décrite dans la partie expérimentale (15 min avec $\text{HNO}_3 + 20$ min avec H_2O_2 à 105 °C).

Tableau X : LD_i (µg/g) et LD_m (µg/g) mesurées pour diverses procédures de digestion et limites de détection obtenues par d'autres auteurs (µg/g).

Isotope	LD _i	Réf.	[70]	Réf.	[90]	Réf.	[88]	LD _m	LD _m			LD _m		
								HNO ₃	HNO ₃ + H ₂ O ₂			HNO ₃ + H ₂ O ₂		
								30 min	10+10 min	10+20* min	10+30 min	15+10 min	15+20 min	15+30 min
⁵² Cr	0,01		0,11 ^a		0,02		0,11	0,04	0,05	0,03	0,02	0,03	0,04	0,04
⁶⁰ Ni	0,01		0,15		0,02		3,2	0,03	0,06	0,08	0,05	0,06	0,08	0,1
¹¹⁴ Cd	0,003		0,17 ^d		0,1 ^d		0,6	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
²⁰⁸ Pb	0,003		---		0,02		0,3	0,03	0,04	0,06	0,02	0,03	0,03	0,04
⁵⁵ Mn	0,01		0,12		0,02		0,3	0,06	0,09	0,08	0,06	0,1	0,03	0,1
⁶⁵ Cu	0,05		0,21		0,09		0,23 ^b	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7
⁶⁶ Zn	0,04		0,22		0,01		0,6 ^c	0,3	0,5	0,6	0,4	0,7	0,6	1,0

* 10 + 20 = Digestion de 10 min avec HNO₃ suivie d'une digestion de 20 min avec H₂O₂.

a : ⁵³Cr. b : ⁶³Cu. c : ⁶⁴Zn. d : ¹¹¹Cd.

Dans un premier temps, on constate que la LD_i typique, que nous avons obtenu, se situe dans le même ordre de grandeur que les valeurs obtenues par d'autres équipes de chercheurs dans des conditions similaires et est inférieure à $0,1 \mu\text{g/g}$. Pour Cr, Ni, Cd, Pb, Mn et Cu, la LD_i mesurée est meilleure que celle obtenue par les auteurs cités. Pour Zn, seule l'équipe de Crews *et al.* [90] obtient une meilleure limite de détection que celle obtenue dans nos travaux, soit $0,01 \mu\text{g/g}$ comparativement à $0,04 \mu\text{g/g}$.

Maintenant, le plus intéressant est de comparer les LD_m obtenues pour quelques procédures de digestion testées, et de noter de combien elles s'éloignent des LD_i . Pour Cr, on obtient des valeurs typiques de LD_m de $0,04 \mu\text{g/g}$, soit environ deux fois la valeur de la LD_i . Aucune procédure de digestion semble donner de meilleurs résultats que les autres. Pour Ni, la contribution des réactifs permet de détecter avec confiance environ $0,1 \mu\text{g}$ de Ni/g de tissu sec, soit une hausse d'une décade de la LD_i . De bonnes limites de détection pour ^{114}Cd sont généralement faciles à obtenir et plusieurs auteurs utilisent cet isotope pour quantifier Cd dans la matière biologique. Certains auteurs cités au tableau X utilisent plutôt l'isotope ^{111}Cd . Le ^{114}Cd a été choisi pour des raisons de sensibilité. Encore une fois, les trois catégories de digestion donnent une LD_m semblable, de l'ordre de $0,03 \mu\text{g/g}$, soit une hausse d'approximativement dix fois de la LD_i mesurée. Pour Pb, encore une fois, peu de variation est observée entre les procédures de digestion. La LD_m de $0,02\text{-}0,03 \mu\text{g/g}$ mesurée représente sensiblement dix fois la LD_i . Pour Mn, la digestion de 15 min avec HNO_3 et 20 min avec H_2O_2 est la meilleure de toutes avec une LD_m de $0,05 \mu\text{g/g}$, soit dans le même ordre de grandeur que la LD_i obtenue par d'autres chercheurs. Une LD_m de $0,5 \mu\text{g}$ de Cu/g est mesurée pour la majorité des types de digestions, correspondant à un facteur de multiplication de la LD_i de dix. Enfin, pour Zn, les résultats vont dans le même sens que ceux de Cu, à l'exception que la LD_m se situe plutôt à 15 fois la LD_i . Une explication pour les hautes LD_m obtenues pour Cu et Zn est que lors du dopage, les concentrations obtenues dépassent la LD_i de plus de 5 fois comme le suggèrent Long et Martin [85], car la solution de dopage servait aussi à la droite d'étalonnage. Les concentrations étant plus élevées, l'écart-type absolu est aussi plus élevé. Néanmoins, Cu et Zn sont des métaux essentiels à tout organisme biologique et pour cette raison on les retrouve à des concentrations importantes, pouvant aller jusqu'à des centaines de $\mu\text{g/g}$. Une précision adéquate peut alors être obtenue même avec des LD_m de l'ordre de quelques $\mu\text{g/g}$, car quand la concentration mesurée s'éloigne de la limite de détection, la précision relative s'améliore de façon logarithmique.

En bref, la LD_m varie très peu d'une procédure de digestion à l'autre pour un élément donné. Ce qui montre que le temps de chauffage affecte peu le bruit sur le signal des analytes à basse concentration. Pour les méthodes utilisant HNO_3 et H_2O_2 , l'ajout d'un deuxième réactif à l'acide nitrique ne semble donc pas perturber la nébulisation, et ce malgré un changement des propriétés physiques de la solution (variation de pH, tension de surface, viscosité et densité). Un autre fait à remarquer est que pour tous les éléments, la LD_m est environ dix fois supérieure à la LD_i et semblable aux valeurs obtenues par d'autres groupes analysant ces métaux dans les matrices biologiques.

La limite de quantification (LQ) représente la concentration minimale qui peut être quantifiée à l'aide d'une méthode d'analyse avec une fiabilité connue [84]. Habituellement, la LQ d'une méthode analytique est donnée comme étant dix fois l'écart-type de la concentration d'un blanc d'étalonnage mesurée dix fois. De façon analogue, dans ce travail, la LQ est calculée selon l'équation (14), où s_{bce} est l'écart-type sur la concentration équivalente au blanc chimique enrichi mesuré 10 fois.

$$LQ=10 \cdot s_{bce} \quad (14)$$

Les valeurs de LQ de la méthode de digestion retenue apparaissent au tableau XI.

Il faut noter qu'un analyte est quantifiable même si sa concentration se situe entre la limite de détection et la limite de quantification. Dans ce cas, les résultats doivent toutefois être interprétés avec précaution.

Pour Cu et Zn, la LQ de 2 $\mu\text{g/g}$ paraît élevée, mais tel que mentionné précédemment, ces deux métaux se retrouvent à des quantités importantes dans les tissus biologiques animaux ou humains. La LQ de 0,1 $\mu\text{g/g}$ de tissu sec pour Cd et Pb est plus critique car ces éléments peuvent être facilement présents à ce niveau de concentration. L'élément le plus problématique est le Ni avec une LD_m de 0,1 $\mu\text{g/g}$ et une LQ à 0,4 $\mu\text{g/g}$. La concentration en Ni des tissus analysés dans ce travail se situe entre ces deux valeurs. Bien entendu, la précision en sera affectée. Ceci fera l'objet de discussions dans la section suivante.

Tableau XI : Limites de détection (LD_m) et de quantification (LQ) en $\mu\text{g/g}$ pour les métaux d'intérêts selon la digestion de 15 min avec HNO_3 et 20 min avec H_2O_2 .

Élément	LD_m	LQ
^{52}Cr	0,04	0,2
^{60}Ni	0,08	0,3
^{114}Cd	0,03	0,1
^{208}Pb	0,03	0,1
^{55}Mn	0,03	0,1
^{65}Cu	0,5	2
^{66}Zn	0,6	2

3.3.2. Réplicabilité et répétabilité de la digestion

La performance d'une méthode d'analyse n'est pas uniquement dictée par la plus faible concentration détectable ou quantifiable, encore faut-il que les résultats soient exacts et précis. L'exactitude des concentrations obtenues a été discutée dans la section portant sur les résultats obtenus par les différentes procédures de digestion étudiées. La présente partie offre plutôt une comparaison de la réplicabilité et de la répétabilité entre la méthode de digestion de départ, soit la digestion avec HNO_3 concentré seulement durant 30 min, et la méthode de digestion proposée (chauffage de 15 min avec HNO_3 et 15 min avec l'ajout de H_2O_2 à $105\text{ }^\circ\text{C}$). Cette comparaison est effectuée pour chacune des trois matrices étudiées : les moules (tableau XII), le foie de boeuf (tableau XIII) et le foie de roussette (tableau XIV).

La réplicabilité se définit comme étant l'accord obtenu entre des résultats successifs obtenus sur un même échantillon soumis à l'analyse dans le même laboratoire, par le même analyste sur le même appareil le même jour [91]. La répétabilité est plutôt l'accord obtenu sur le même échantillon soumis à l'analyse dans le même laboratoire mais à des journées, par des analystes ou des appareils différents [91]. Dans le cas présent, la variable retenue est la journée d'analyse. Dans les tableaux qui suivront, la répétabilité est l'écart-type relatif obtenu pour la moyenne des résultats des deux jours différents. La répétabilité offre une vue plus globale de la précision d'une méthode d'analyse. Dans les tableaux de cette section, les valeurs entre parenthèses sont les valeurs de réplicabilité, c'est-à-dire la précision exprimée en pourcentage de la concentration pour cinq mesures. Une discussion sur la réplicabilité en fonction de la LD_m sera aussi faite.

Les moules, comme mentionné dans la section d'optimisation de la digestion, ont une matrice relativement facile à dégrader. On peut donc s'attendre à une bonne capacité de reproduire les résultats de façon journalière. Pour Ni, les performances sont similaires pour les deux méthodes, tant au niveau de la précision sur 5 échantillons (environ 6 %) que sur la répétabilité (3 %). La procédure impliquant HNO_3 et H_2O_2 donne une précision journalière généralement inférieure à 2,5 % pour Cd, Mn et Zn, meilleure que celle obtenue avec HNO_3 (supérieure à 3 %, tableau XII). Pour Cu, bien que la précision journalière soit semblable pour les deux digestions, celle avec HNO_3 et H_2O_2 permet de reproduire le même résultat à des journées différentes à 1 % près tandis que par HNO_3 seul, l'écart peut s'élever à 45 %. Dans l'ensemble, pour cette digestion, la capacité d'obtenir le même résultat à une journée différente est également bonne. En effet, on reproduit les résultats à 5 % ou mieux pour Ni, Mn, Cu et Zn. Les éléments les moins concentrés, Cd et Pb, donnent une répétabilité satisfaisante de 6 et 7 % respectivement.

Tableau XII : Mesures de réplicabilité et de répétabilité pour les digestats de moules pour deux méthodes de digestion. Les valeurs entre parenthèses représentent la réplicabilité (% précision pour $n=5$) à la concentration mesurée ($\mu\text{g/g}$), relativement à la LD_m .

Élément	HNO_3 15 min + H_2O_2 20 min			HNO_3 30 min			x LD_m^*
	Jour 1	Jour 2	Répétabilité (%)	Jour 1	Jour 2	Répétabilité (%)	
^{60}Ni	1,44 (1)	1,51 (6)	3	1,7 (8)	1,80 (6)	3	≈ 60
^{114}Cd	1,16 (2)	1,07 (2)	6	1,10 (3)	0,95 (7)	10	≈ 35
^{208}Pb	1,38 (6)	1,25 (3)	7	1,4 (12)	1,18 (2,5)	12	≈ 45
Mn	5,90 (2,5)	5,50 (2,5)	5	6,7 (4)	6,6 (4,5)	1	≈ 200
^{65}Cu	5,40 (7)	5,47 (2)	1	7,7 (8)	4,0 (5)	45	≈ 12
^{66}Zn	83 (2)	82,2 (0,7)	0,7	85 (3,5)	72 (8)	12	≈ 140

* : limite de détection de la digestion de 15 min avec HNO_3 et 20 min avec H_2O_2 .

La procédure avec HNO_3 pendant 30 min offre une précision plus variable dépendant des journées, en faisant référence à Cd, Pb et Zn par exemple. De plus, les valeurs de réplicabilité sont toutes situées, sans exception, au-dessus de 2,5 %, allant même jusqu'à 12 % pour Pb. On observe aussi que le résultat final montre une variation importante de façon journalière avec la digestion par HNO_3 . La répétabilité est de 10 % pour Cd et 12 % pour Zn et Pb. La répétabilité de Mn est meilleure d'environ cinq fois pour cette procédure que pour la digestion proposée, alors que Ni montre aucune variation par rapport à la digestion avec HNO_3 et H_2O_2 . De façon globale, la digestion avec HNO_3 et H_2O_2 donne une meilleure réplicabilité et une meilleure répétabilité des résultats analytiques pour les moules.

En examinant une autre matrice animale, le foie de boeuf, le tableau XIII montre que les éléments peuvent être classés en trois catégories selon leur ordre de grandeur de concentration : *i*) soit Ni, Pb et Cd, *ii*) Mn, et *iii*) Cu et Zn.

Dans le premier groupe, le comportement de Ni est très différent des autres métaux. Cet élément est très difficile à analyser et des variabilités énormes surviennent. Au niveau de la précision, deux journées différentes donnent des valeurs identiques à 25 % et 9 % près pour la digestion avec $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. Ceci est tout de même meilleur que 48 et 65 % de précision observée par la digestion avec HNO_3 seul pendant 30 min. C'est aussi meilleur que le 50 % obtenu par Friel *et al.* par ICP-MS également [70], pour un tissu de foie de boeuf à un niveau de concentration quatre fois plus élevé. Les deux méthodes de digestion ont néanmoins un point en commun : la faible répétabilité. Elle est d'environ 65 % pour les deux méthodes de digestion. Ce qui montre encore une fois la difficulté d'analyser ce métal à de faibles concentrations dans des matrices animales. La concentration mesurée est trois fois supérieure à la LD_m et inférieure à la limite de quantification.

Tableau XIII : Mesures de réplicabilité et de répétabilité pour le foie de boeuf certifié pour deux méthodes de digestion. Les valeurs entre parenthèses représentent la réplicabilité (% précision pour $n=5$) à la concentration mesurée ($\mu\text{g/g}$).

Élément	HNO ₃ 15 min + H ₂ O ₂ 20 min		HNO ₃ 30 min		x LD _m [*]
	Jour 1	Jour 2	Jour 1	Jour 2	
⁶⁰ Ni	0,08 (25)	0,22 (9)	0,2 (48)	0,57 (65)	≈ 3
¹¹⁴ Cd	0,29 (7)	0,30 (7)	0,24 (8)	0,30 (7)	≈ 10
²⁰⁸ Pb	0,29 (7)	0,32 (9)	0,4 (17)	0,40 (5)	≈ 10
Mn	10,0 (1)	9,9 (1)	9,25 (5)	11,7 (0,9)	≈ 330
⁶⁵ Cu	184 (1)	188 (2)	209 (4)	186 (3,5)	≈ 370
⁶⁶ Zn	125 (2)	128 (2)	109 (3)	104 (3)	≈ 130

* : limite de détection de la digestion de 15 min avec HNO₃ et de 20 min avec H₂O₂.

Pour Cd et Pb, on obtient une valeur de la précision élevée car la concentration mesurée est seulement deux à trois fois la LQ et environ dix fois la LD_m . Des valeurs de réplicabilité assez constantes situées entre 7 et 9 % sont obtenues pour la digestion proposée (15 min HNO_3 + 20 min H_2O_2) pour Cd et Pb. Cependant, avec la digestion par HNO_3 , la précision varie de 5 à 17 % pour Pb d'une journée à l'autre, mais varie moins pour Cd. Au niveau de la répétabilité, on éprouve des problèmes pour Cd avec HNO_3 seulement car le résultat varie de 16 % entre deux journées d'analyses. La meilleure digestion pour ces métaux du point de vue de la répétabilité et de la réplicabilité est par HNO_3 pendant 15 min et par H_2O_2 pendant 20 min à 105 °C.

Pour Mn, la précision et la répétabilité de 1 % obtenues par la méthode de digestion impliquant HNO_3 et H_2O_2 est excellente. Par contre, lorsque la digestion est effectuée avec HNO_3 seulement, une précision journalière plus variable de 5 et 0,9 % peut être obtenue, alors qu'entre deux journées, le résultat peut varier de 17 %, ce qui est fortement à éviter. Ceci est évidemment fonction du fait que la concentration mesurée excède près de 330 fois la limite de détection de la méthode d'analyse.

Enfin, la digestion avec HNO_3 et H_2O_2 permet d'obtenir une précision d'environ 1-2 % pour Cu et Zn, comparativement à 3-4 % avec HNO_3 seul. Au niveau de la répétabilité, la valeur de 2 % pour Cu et Zn obtenues par la digestion avec HNO_3 et H_2O_2 surpasse aisément les valeurs de 8 % et 3 % obtenues avec HNO_3 seulement. Des valeurs de précision de cet ordre (1-2 %) étaient à prévoir car la limite de détection de la méthode de digestion est de près de 130 fois inférieure pour Zn et 370 fois pour Cu. Les résultats sont excellents pour Zn et sont de meilleure qualité que ceux déjà très bons obtenus par Halls *et al.* au niveau de la précision et les digestats sont assez clairs pour être injectés directement dans le spectromètre [72].

En conclusion, pour le foie de boeuf, au niveau de la précision pour une série de mesures, la digestion avec la paire HNO_3 - H_2O_2 est la meilleure méthode. À des journées différentes, pour des digestats différents, cette digestion demeure le meilleur choix. Une meilleure reproduction des résultats est possible pour certains métaux (Mn, Cu, Zn et Cd). Le Ni reste difficile à analyser car il se situe à peine à trois fois la LD_m .

Tableau XIV : Mesures de réplicabilité et de répétabilité pour le foie de roussette certifié pour la digestion avec HNO₃ pendant 15 min et H₂O₂ pendant 20 min. Les valeurs entre parenthèses repr/sentent la réplicabilité (% précision ; n=5) à la concentration mesurée (µg/g).

Élément	Jour 1	Jour 2	Répétabilité (%)	x LD _m
⁶⁰ Ni	0,07 (86)	0,23 (13)	75	≈ 3
¹¹⁴ Cd	18,0 (2)	19,6 (3)	6	≈ 600
²⁰⁸ Pb	0,22 (18)	0,21 (14)	3	≈ 7
Mn	5,5 (3)	6,1 (3)	7	≈ 150
⁶⁵ Cu	26 (8)	27 (5)	1	≈ 50
⁶⁶ Zn	87 (3)	92 (3)	4	≈ 150

Le tableau XIV montre les données pour le foie de roussette certifié DOLT-2 traité par la méthode de digestion optimisée. Ce tissu n'échappe pas aux problèmes reliés à l'analyse de Ni à ce niveau de concentration (0,22 µg/g), situé entre la LD_m et la LQ. Seuls les résultats d'une journée sont satisfaisants et la précision obtenue est alors de 13 %. Contrairement aux autres tissus, le Cd est beaucoup plus concentré (≈ 19 µg/g) dans le foie. La précision de 2-3 % est satisfaisante mais la répétabilité de 6 % est un peu élevée compte tenu que la LD_m est à moins de 600 fois la teneur en Cd. La concentration du Pb est au même niveau que la LQ et est à peine à sept fois la valeur de la LD_m, ce qui explique les précisions de 18 et 14 %. La répétabilité de 3 % montre cependant qu'il est aisé de reproduire les résultats d'une journée à l'autre pour cet

élément. Pour Mn, sa concentration est mesurable de façon assez précise dans ce tissu, soit environ 3 % pour cinq mesures, et 7 % pour deux journées différentes. Le Cu possède une réplicabilité assez élevée de 5 et 8 % pour cinq mesures compte tenu que les digestats de foie de roussette contiennent 50 fois plus de Cu que la LD_M. La même valeur peut cependant être obtenue pour Cu à 1 % près à deux jours différents. Le plus concentré des éléments analysés dans ce tissu, le Zn, offre une réplicabilité de 3 % et une répétabilité de 4 %, ce qui paraît satisfaisant. Ces valeurs sont tout de même plus élevées que celles obtenues avec Zn dans les moules, retrouvé au même niveau de concentration.

On peut résumer les tableaux XII, XIII XIV en soulignant que la digestion effectuée par HNO₃ et H₂O₂, tel que proposé dans la partie expérimentale, donne des résultats plus précis, mais surtout plus fidèles entre deux journées différentes que la digestion par HNO₃ seulement, ce qui est également très important pour des analyses de routine.

3.3.3. Rapidité de la digestion

Comme il a été mentionné dans l'introduction, des appareils effectuant une digestion en continu par des micro-ondes sont apparus ces dernières années. On serait porté de croire que ces instruments, aussi innovateurs soient-ils, surpassent la digestion sur la plaque chauffante telle qu'on la connaît depuis plus d'un siècle.

En ce qui concerne la rapidité de la digestion, le système de digestion en continu utilisé par Sturgeon *et al.* permet l'injection de 6 à 8 échantillons/h [57]. Il faut noter que les échantillons injectés doivent obligatoirement être sous forme de suspensions acides de 0,5 % ou 1 % (p/v). Or, la digestion sur la plaque chauffante avec un support de fabrication très simple, que nous avons mis au point, permet de digérer 14 échantillons ou plus simultanément. Un temps total de 65 à 75 minutes est requis par la méthode de digestion proposée, allant de la pesée du tissu sec jusqu'au transfert du dernier digestat dans une éprouvette pour l'analyse par spectrométrie de masse à plasma ICP.

Au niveau de l'efficacité de la digestion, comme les appareils de digestion micro-ondes en continu opèrent en mode dynamique, on peut s'attendre à des restrictions visant la température et la pression d'opération, deux paramètres affectant directement

l'efficacité de la digestion [40]. L'efficacité de l'oxydation mesurée par la quantité de carbone résiduel se situe entre 27 et 64 % pour les diverses concentrations de HNO_3 et les différentes combinaisons de HNO_3 et de H_2O_2 testées. Cela signifie que 73 à 36 % du carbone présent originalement dans le tissu sec est toujours présent et n'a pas été oxydé [40]. Ces valeurs se comparent peu au 90 % qu'il est possible d'obtenir avec la plaque chauffante ou un four aux micro-ondes conventionnel. De plus, le système de digestion en continu bloque une fois sur deux lors de l'injection de suspensions faites avec un tissu qui n'est pas broyé aussi finement que les matériaux de référence certifiés [57]. Une pré-digestion de 3 h avec HNO_3 à 70 °C est alors nécessaire afin d'éviter le blocage des conduits dans l'appareil de digestion [57]. Les moules, broyées et tamisées à 1 mm, sont traitées de la même façon que les tissus certifiés dont la granulométrie est plus fine.

Un avantage valable de la digestion par des micro-ondes est sa facilité d'être automatisée. Les équipements pour automatiser la digestion à la plaque chauffante se font plus rares et forcent donc l'analyste à fabriquer des installations.

3.4. Étude de l'effet de la matrice

3.4.1. Récupération des ajouts

Comme mentionné précédemment, l'étude de la récupération est importante, car elle permet de mesurer la capacité de récupérer une quantité d'analyte ajoutée à un échantillon. Avant de présenter les résultats, mentionnons que dans les deux matrices étudiées, l'ajout correspond approximativement à la concentration originalement présente dans l'échantillon ($\pm 25\%$). Cette procédure permet de s'assurer que les valeurs de récupération ne soient affectées par un ajout trop grand ou petit.

Les pourcentages de récupération des métaux dans le foie de boeuf certifié sont présentés au tableau XV pour la méthode de digestion avec HNO_3 durant 30 min, puis avec HNO_3 et H_2O_2 selon deux combinaisons de temps de chauffage. Les résultats du tableau XV sont une moyenne des résultats obtenus pour trois échantillons dopés par rapport à trois échantillons non dopés.

Tableau XV : Pourcentages de récupération des analytes^a après la digestion du foie de boeuf certifié NBS 1577a par trois procédures.

Isotope	A	B	C
	HNO ₃ 30 min	HNO ₃ +H ₂ O ₂ 10 min+ 20 min	HNO ₃ +H ₂ O ₂ 15 min+ 20 min
⁶⁰ Ni	74 ± 9	n.d.	95 ± 4
¹¹⁴ Cd	103 ± 1	98 ± 3	101 ± 2
²⁰⁸ Pb	93 ± 6	84 ± 2	92,4 ± 0,8 (n=2)
⁵⁵ Mn	92 ± 3	90 ± 3	102 ± 2
⁶⁵ Cu	96 ± 6	85 ± 2	97 ± 3
⁶⁶ Zn	78 ± 7	93 ± 2	85 ± 4 (n=2)

a : moyenne ± écart-type sur la moyenne (\bar{s}_x) de 3 mesures lorsque non spécifié.

n.d. : non disponible.

Présent à une faible concentration, située près de la limite de détection, soit environ 0,2 µg/g, les récupérations pour le Ni ne sont pas très bonnes pour les protocoles A et B. La procédure proposée C donne les résultats les plus satisfaisants, soit 95 ± 4 % du Ni récupéré.

Pour Cd, la récupération est totale peu importe la digestion effectuée. Les procédures A, B et C donnent des pourcentages de récupération de l'ordre de 103 ± 1, 98 ± 3 et 101 ± 2 % respectivement. Il semble, à la lumière de ces résultats, que le Cd soit totalement libéré de la matrice, du moins, à ce niveau de concentration.

De concentration similaire au Cd, le Pb démontre une récupération incomplète de l'ajout. La procédure avec HNO₃ seul offre une récupération très variable de 93 ± 6 %. La procédure B permet de récupérer seulement 84 ± 2 % du Pb ajouté. La digestion C donne les résultats les plus concluants avec $92,4 \pm 0,8$ %. Dans le dernier cas, on remarque qu'une valeur a été rejetée. À titre d'information, dans le présent ouvrage, une donnée est rejetée si et seulement si elle satisfait les conditions du test Q pour un pourcentage de confiance de rejet de 95 %. La récupération du Pb dans le foie de boeuf de $92,4 \pm 0,8$ % se rapproche du 94 % obtenu par Capar [8].

Pour Mn, seul élément dans cet ordre de grandeur de concentration (10 µg/g), la digestion selon la procédure C démontre une récupération totale de l'ajout, soit 102 ± 2 %, ce qui n'est pas le cas pour les deux autres méthodes.

Pour Cu, la procédure B ne permet pas de récupérer plus de 85 % de l'ajout. Avec HNO₃ seul et avec la digestion C, la récupération est quasi complète avec 96 ± 6 % et 97 ± 3 % respectivement.

Étonnement, pour Zn, la récupération n'est pas très bonne. La digestion proposée C permet de récupérer 85 ± 4 % du Zn ajouté. Nous ne pouvons comparer ces résultats, puisqu'aucun cas semblable n'est mentionné dans la littérature. Il apparaît évident tout de même qu'une interférence isobarique ne peut être responsable de cet effet, auquel cas elle devrait augmenter le signal et la récupération apparente excèderait alors 100 %. Peut-être une suppression du signal serait à l'origine d'une telle perte car un digestat de foie de bœuf dopé possède une concentration de Zn de 1,2 à 1,3 mg/L. Les faibles pourcentages de récupération seront discutés dans la section traitant de l'étude critique des résultats.

Pour ce qui est des moules, de composition différente du foie de boeuf, surtout au niveau des matières grasses (2-3 % au lieu de ≈ 20 %), les résultats de l'étude de récupération sont donnés au tableau XVI.

Tout d'abord, les données très variables pour Ni témoignent de la difficulté à l'analyser même si le niveau de concentration est légèrement supérieur au foie de boeuf. Même avec cette variabilité des pourcentages de récupération, la procédure proposée C offre les meilleurs résultats.

Tableau XVI : Pourcentages de récupération des analytes après la digestion de moules par trois procédures.

Isotope	A ^a	B ^b	C ^c
	HNO ₃ 30 min	HNO ₃ +H ₂ O ₂ 10 min+ 20 min	HNO ₃ +H ₂ O ₂ 15 min+ 20 min
⁶⁰ Ni	111 ± 6	71 ± 4 (n=3)	92 ± 2
¹¹⁴ Cd	92 ± 3	91 ± 1	87 ± 2
²⁰⁸ Pb	85 ± 5	90 ± 3	96 ± 1
⁵⁵ Mn	115 ± 2	102 ± 2	102 ± 1
⁶⁵ Cu	95 ± 1 (n=2)	113 ± 4 (n=3)	96 ± 2
⁶⁶ Zn	82 ± 1	93 ± 2	72 ± 2

a : moyenne ± écart-type sur la moyenne (\bar{s}_x) de 3 mesures si non spécifié.

b : moyenne ± écart-type sur la moyenne (\bar{s}_x) de 5 mesures si non spécifié.

c : moyenne ± écart-type sur la moyenne (\bar{s}_x) de 4 mesures si non spécifié.

Pour Cd, la récupération se situe vers 90 % pour toutes les digestions effectuées. Vu que pour Zn nous avons éprouvé de tels problèmes de faible récupération, l'hypothèse d'une origine chimique à ces résultats paraît logique également, car il a été mentionné dans l'introduction que Cd et Zn se comportent de façon chimiquement semblable. Chose certaine, l'effet de charge d'espace peut difficilement être en cause car bien que Zn soit présent à 1,3 mg/L dans un digestat dopé, il serait peu probable qu'une suppression de signal se produise sélectivement pour des éléments de masse et 66 et 114.

Pour Pb, la digestion avec H₂O₂ permet une meilleure récupération. Des deux méthodes impliquant HNO₃ et H₂O₂, la digestion de 15 min avec HNO₃ et 20 min avec

l'ajout de H_2O_2 est la plus concluante avec $96 \pm 1 \%$. Cet élément n'est pas reconnu pour donner des problèmes lors de l'analyse. On a également souvent tendance à regrouper Cd et Pb car ils sont souvent présents à des concentrations similaires. On rapporte dans la littérature, pour des mollusques, des valeurs de l'ordre de 94,8 et 95,6 % pour Pb et Cd respectivement [8].

Ensuite, pour Mn, les procédures B et C, soit celles utilisant H_2O_2 permettent de récupérer totalement l'ajout effectué à l'échantillon de départ, avec des valeurs de 102 %. La digestion avec HNO_3 donne un surplus de 15 % de Mn, soit une surestimation de la solution de l'ajout ou une sousévaluation de la concentration des cinq échantillons non dopés.

La récupération de Cu ne représente pas de problème pour les mollusques car elle se chiffre à 95 ± 1 et $96 \pm 2 \%$ pour les procédures A et C. D'ailleurs, Capar [8] obtient une récupération de 96,5 % pour les hauts niveaux de concentration.

Comme c'est le cas dans le foie de boeuf certifié, le Zn montre certains problèmes pour la récupération des ajouts. Les digestions B et C, avec H_2O_2 , donnent des pourcentages de récupération passant de 93 ± 2 à 72 ± 2 .

3.4.2. Ajouts dosés

La méthode des ajouts dosés est utilisée pour quantifier un élément en permettant de réduire ou d'éliminer les effets de matrice [10]. Mais elle est fastidieuse à mettre en oeuvre et n'est pas recommandée pour l'analyse de routine. Elle nécessite plus de temps de préparation et plus de mesures [70]. Dans la mise au point d'une méthode d'analyse, la comparaison des résultats obtenus par étalonnage direct ou interne avec les ajouts dosés sert à déterminer l'étendue des effets de matrice.

La méthode des ajouts dosés sert habituellement de méthode de référence. Dans le cas présent, elle représentait plutôt un problème. Des essais ont démontré que l'approche préconisée par Lauzon donne des résultats souffrant d'un manque d'exactitude [87]. Les concentrations mesurées par cette méthode étaient en discordance complète avec les

valeurs certifiées, alors que l'étalonnage interne donnait des résultats satisfaisants. Une étude à ce sujet a donc été entreprise.

La méthode des ajouts dosés peut être appliquée de maintes façons. La procédure suivie par Lauzon est illustrée à la section *a* de la figure 6. La droite des ajouts dosés est construite à l'aide de la mesure sur trois solutions préparées de manière indépendante et la droite comprend trois points incluant l'ajout zéro. La méthode *b* à la figure 6 illustre la procédure que nous avons utilisée. Les points de la droite d'ajouts dosés ont été obtenus à partir de la même solution. De ce digestat principal de 25 mL, on prélève quatre aliquots de 5 mL répartis dans quatre ballons de 10 mL, auquel sont ajoutés un certain volume de la solution de dopage. La dilution au trait de jauge est faite avec une solution 2 % (v/v) de HNO₃ de haute pureté diluée dans de l'eau purifiée. Le tableau XVII montre les résultats obtenus pour le foie de boeuf certifié selon les deux procédures.

La figure 6 *a* permet de déduire que la courbe des ajouts dosés qui en découle comporte un facteur d'incertitude supplémentaire d'une grande importance du fait que les mesures ont été faites sur des solutions différentes. Tandis que dans la section *b*, la procédure proposée consomme moins de tissus sec, soit 0,2 g pour quatre points sur la droite, comparativement à 0,1 g par point avec la procédure *a* (donc 0,3 g au total). Les facteurs d'incertitude sur les calculs selon la procédure *b* en sont réduits à l'instrument de mesure, à l'incertitude reliée à la régression linéaire avec poids statistique, de même qu'à la qualité de la performance des pipettes, de la balance analytique et des ballons jaugés. La performance des pipettes et de la balance sont évaluées régulièrement alors que le dernier facteur ne pose généralement aucun problème.

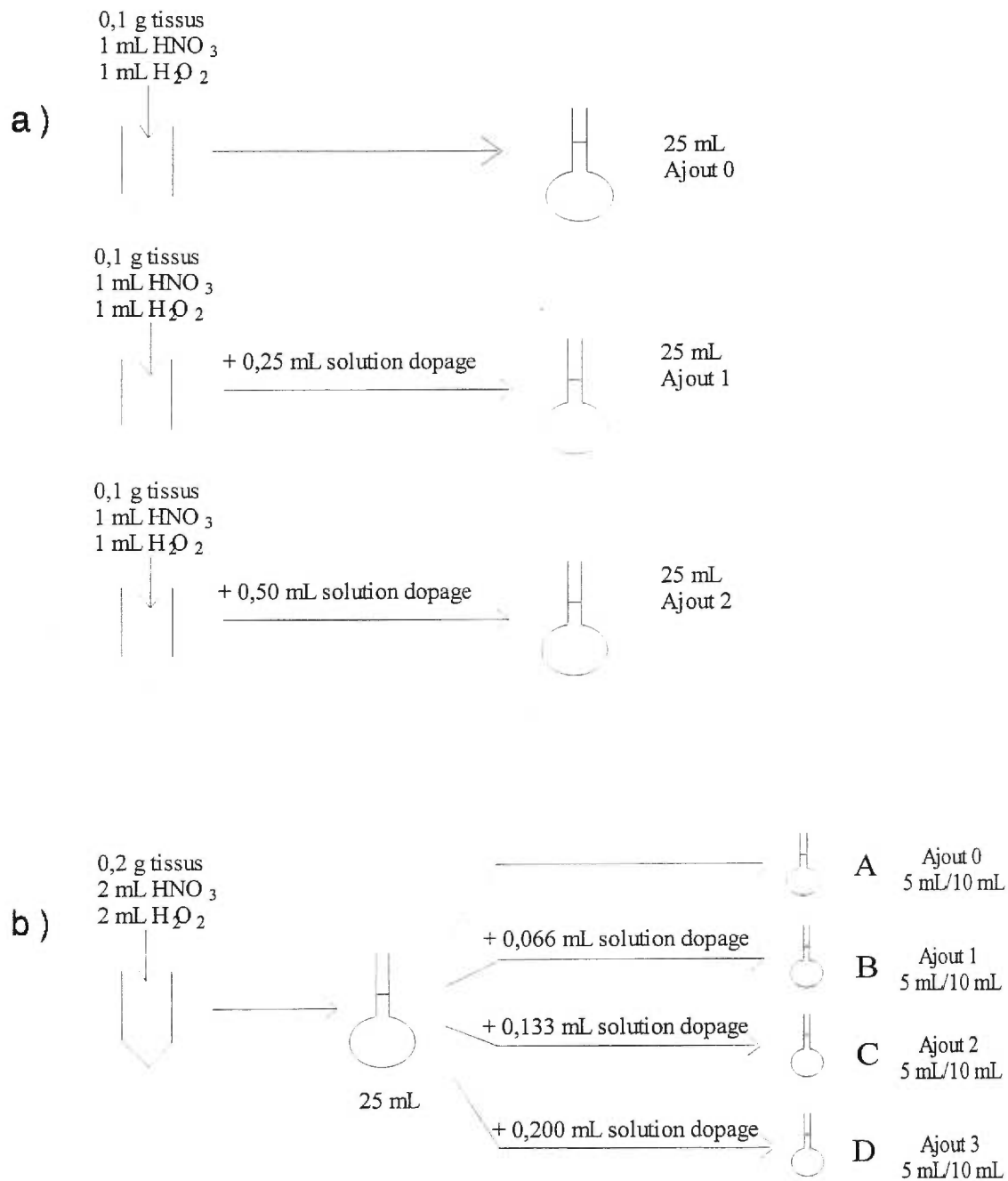


Figure 6 : Schémas analytiques des méthodes des ajouts dosés selon la procédure de Lauzon (a) et selon la procédure retenue (b).

Tableau XVII : Concentrations mesurées¹ ($\mu\text{g/g}$) dans les digestats de foie de boeuf certifié par ajouts dosés selon la procédure de Lauzon (a) et la procédure retenue (b). Moyenne \pm écart-type égal au poids statistique basé sur la variance.

Isotope	Procédure <i>a</i>	Procédure <i>b</i>	Certification ²
¹¹⁴ Cd	0,39 \pm 0,01 (+44 %)	0,29 \pm 0,01 (+7 %)	0,27 \pm 0,04
²⁰⁸ Pb	0,53 \pm 0,09 (+56 %)	0,35 \pm 0,02 (+3 %)	0,34 \pm 0,08
⁵⁵ Mn	13,4 \pm 0,6 (+30 %)	10,03 \pm 0,07 (-3 %)	10,3 \pm 1,0
⁶⁵ Cu	306 \pm 47 (+58 %)	182 \pm 8 (-6 %)	193 \pm 10
⁶⁶ Zn	211 \pm 12 (+62 %)	142 \pm 6 (+9 %)	130 \pm 10

1 : Digestion avec HNO₃ pendant 15 min et H₂O₂ pendant 20 min à 105 °C.

2 : Moyenne \pm IC à 95 %.

Les valeurs entre parenthèses représentent l'écart relatif par rapport à la valeur certifiée.

Les résultats du tableau XVII reflètent le manque de concordance entre les concentrations obtenues par la procédure *a* et la concentration certifiée dans le foie de boeuf. L'exactitude varie entre +30 % pour Mn et +62 % pour ⁶⁶Zn. Avec la procédure proposée *b*, tous les éléments voient leurs concentrations ramenées vers une valeur beaucoup plus exacte. Pour les mêmes éléments et par la même digestion, l'exactitude oscille maintenant entre +9 % et -3 %. Au niveau de l'écart-type sur le résultat final, un gain appréciable est obtenu avec la procédure *b*, encore une fois pour tous les éléments

du tableau XVII. De meilleurs coefficients de corrélation (r^2) et des écarts quadratiques moyens plus faibles sont à l'origine de l'augmentation de la qualité des résultats analytiques obtenus par la procédure b. Cette méthodologie est donc retenue pour l'application future de la méthode des ajouts dosés.

3.4.3. Comparaison de l'étalonnage interne aux ajouts dosés

Tel que mentionné auparavant, la méthode des ajouts dosés ne peut servir pour une analyse de routine, vu sa complexité et le temps qu'elle requiert. Elle est utilisée pour la mise au point d'une méthode d'analyse et est comparée à l'étalonnage interne ou externe. Si les valeurs concordent, c'est que la méthode d'analyse proposée peut être adoptée pour la préparation d'échantillons et acceptée pour l'analyse de routine.

Le tableau XVIII montre les résultats obtenus pour l'analyse multiélémentaire des métaux dans le foie de boeuf certifié par étalonnage interne et ajouts dosés. Avec l'étalonnage interne l'incertitude est exprimée en terme d'intervalle de confiance à un niveau de certitude de 95 %. Pour les ajouts dosés, l'incertitude représente l'écart-type. Un test statistique, comme le test t de Student par exemple, ne peut être appliqué pour comparer les valeurs obtenues par les différentes méthodes à la valeur certifiée car on ne connaît pas exactement le nombre de mesures pour chaque élément du foie de boeuf. On sait simplement que l'incertitude mentionnée correspond à un niveau de confiance de 95 % pour $n = 6$ à 12, sans avoir de valeur exacte de n pour un élément donné. Comme l'incertitude pour les ajouts dosés n'est pas un intervalle de confiance, on ne peut pas non plus faire le test de recouvrement des intervalles de confiance. La comparaison des résultats obtenus par les différentes méthodes de préparation avec la certifiée sera donc effectuée avec le recouvrement des incertitudes disponibles. Maintes fois la comparaison des résultats est faite ainsi dans la littérature [53, 57, 70, 91 et 95].

La présentation des résultats sera en fonction du niveau de concentration des éléments. Le cas du chrome est très intéressant. On remarque une complète discordance entre les deux méthodes d'étalonnage et surtout une surévaluation très importante de la concentration par rapport à la valeur de référence. Une telle surévaluation n'est pas normale. La valeur attendue devrait se situer au niveau de la limite de détection, alors que la plus faible valeur quantifiée est dix fois plus élevée que la LD_m . Cette

surestimation varie d'un facteur 8 à 20 selon les méthodes de digestion. Une cause possible est la présence de carbone dans la matrice. On soupçonne qu'il y a donc plus de 50 mg/L de carbone dans les digestats (voir tableau IV). D'ailleurs, ceux qui analysent les métaux dans les tissus biologiques par spectrométrie de masse à plasma ICP évitent généralement de quantifier cet élément. Quand ils le font, leur valeur dépasse la valeur certifiée ou acceptée quand la concentration de Cr se situe dans les dixièmes ou centièmes de $\mu\text{g/g}$, comme dans le cas présent. C'est en effet le cas de Beauchemin *et al.* [92]. Ces chercheurs obtenaient une valeur trop élevée pour Cr dans le foie de roussette (DOLT-1), même par ajouts dosés, laissant supposer que l'interférence était de type isobarique. Deux espèces sont potentiellement responsables : $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ et $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$. Il leur était clair que ArC^+ se forme grâce à la matière organique résiduelle en solution [92]. Beauchemin *et al.* ont même essayé de faire la digestion selon une procédure permettant d'oxyder presque totalement la matière organique, mais sans aucune différence significative sur les résultats. Alors, l'interférence isobarique toujours persistante serait donc causée par ClOH^+ , car le tissu DOLT-1 contient 0,69 % de Cl. Des résultats concluants furent obtenus en analysant Cr dans un autre tissu certifié contenant moins de matière grasse (5 % plutôt que 24 %), donc contenant moins de carbone total, et dans lequel la concentration en Cr se situe à un niveau supérieur, soit 3,60 $\mu\text{g/g}$ [92]. Le fait que ce second tissu contienne le double de chlore (1,13 %) suggère que l'interférence isobarique provienne presque exclusivement de $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ et non des espèces à base de Cl. Dans le cas qui nous occupe, si on se réfère au tableau VI, la contribution du blanc chimique est minime à la concentration mesurée en Cr. Ceci confirme bien que la surestimation est due à un effet de la matrice, probablement de ArC^+ .

Tableau XVIII : Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans le foie de boeuf certifié NBS 1577a par étalonnage interne (EI) et ajouts dosés (AD).

Isotope	HNO ₃ 30 min		HNO ₃ + H ₂ O ₂ 10 min + 20 min		HNO ₃ + H ₂ O ₂ 15 min + 20 min		Valeur certifiée
	EI	AD	EI	AD	EI	AD	
⁵² Cr	1,4 ± 0,2	0,69 ± 0,08	0,86 ± 0,08	1,113 ± 0,003	1,02 ± 0,03	1,54 ± 0,04	(0,088 ± 0,012)
⁶⁰ Ni	0,2 ± 0,1	0,224 ± 0,015	0,2 ± 0,1	0,38 ± 0,02	0,19 ± 0,07	0,225 ± 0,004	n.d.
¹¹⁴ Cd	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,30 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,04
²⁰⁸ Pb	0,42 ± 0,09	0,35 ± 0,01	0,38 ± 0,03	0,38 ± 0,03	0,30 ± 0,04	0,35 ± 0,02	0,34 ± 0,08
⁵⁵ Mn	9,2 ± 0,5	12,6 ± 0,4	9,2 ± 0,2	10,3 ± 0,3	10,1 ± 0,1	10,03 ± 0,07	10,3 ± 1,0
⁶⁵ Cu	209 ± 10	197 ± 27	165 ± 9	182 ± 2	184 ± 2	196 ± 15	193 ± 10
⁶⁶ Zn	109 ± 4	106 ± 8	126 ± 3	135 ± 2	125 ± 2	136 ± 1	130 ± 10

Moyenne ± IC ($n = 5$) à 95 % pour EI. Moyenne ± écart-type pour AD.

Diverses corrections ont été suggérées pour quantifier Cr dans les tissus animaux. La plus simple et la moins coûteuse consiste à recourir à l'isotope ^{53}Cr , comme le font Friel *et al.* [70]. Étant donné que C ne contient que 1,11 % de ^{13}C , l'interférence de ArC^+ sera moins importante à cette masse. Toutefois, la faible abondance de cet isotope de Cr (9,50 %), donc sa faible sensibilité, rend l'analyse ardue dans les tissus où sa teneur est si faible. Outre l'interférence de ArC^+ , l'étude de Vanhoe, Goossens et Dams [86] mentionne que 5 mg/L de Cl suffisent pour amener une concentration apparente de 0,10 $\mu\text{g/g}$ de Cr, sensiblement la même teneur que dans le foie de boeuf. Des essais dans notre laboratoire ont d'ailleurs démontré que l'utilisation du ^{53}Cr est inappropriée pour la quantification du Cr. Ashley [93] a proposé une correction mathématique basée sur la détermination du carbone à partir du signal de $^{13}\text{C}^+$. Malheureusement, cette correction ne marche pas car elle repose sur la supposition de l'invariabilité du rapport $\text{ArC}^+ / ^{13}\text{C}^+$ déterminé dans une expérience autre que celle consacrée à l'analyse des digestats de tissus biologiques. Une étude de Lam, McLaren et Methven [94] démontre que, parmi quatre approches possibles pour déterminer Cr avec exactitude par ICP-MS dans les tissus animaux au niveau de 0,37 $\mu\text{g/g}$, la meilleure est l'analyse par dilution isotopique avec l'utilisation d'un plasma dont le gaz de nébulisation est constitué de 12 % d'air et d'Ar. Une approche similaire, préconisée par Crews *et al.* [90], consiste à l'emploi d'un plasma dont le gaz de nébulisation est composé de 8 % de N_2 dans Ar. Les deux dernières solutions énumérées ci-dessus sont valables et facilement applicables mais on doit garder en mémoire que la modification des propriétés du plasma par l'ajout d'un autre gaz que Ar provoque des conséquences moins désirables sur d'autres éléments qui ne posaient pas de problèmes avant la modification. Bien que la dilution isotopique constitue un grand avantage du couplage de la spectrométrie de masse à un plasma ICP, elle est difficilement applicable de façon routinière. Un autre moyen efficace serait d'utiliser un spectromètre de masse à double focalisation ionique, permettant de séparer Cr des espèces polyatomiques interférentes.

Le cas de Ni est aussi intéressant. Le Ni possède cinq isotopes stables. Les seuls assez abondants, donc assez sensibles, n'ayant pas d'interférence isobarique avec d'autres éléments sont ^{60}Ni (26,10 %) et ^{62}Ni (3,59 %). Or, plusieurs espèces à base de Ca et O causent des interférences à ces deux masses. Le ^{62}Ni ne figure pas au tableau XVIII, car Templeton *et al.* ont démontré qu'il n'était pas approprié à l'analyse de matrices biologiques [95]. Le signal de Na_2O^+ est trop important à cette masse et une surévaluation très importante en résulte [95]. D'ailleurs, des essais en laboratoire confirment l'inefficacité de l'utilisation de ^{62}Ni .

En examinant les résultats du tableau XVIII pour Ni, on remarque une concordance entre les résultats obtenus par l'étalonnage interne et par ajouts dosés par la digestion avec HNO₃ uniquement et par la digestion avec HNO₃ durant 15 min HNO₃ et H₂O₂ durant 20 min. Seule la méthode avec 10 min par HNO₃ et 20 min par H₂O₂ ne permet pas d'obtenir une telle concordance. Ceci est possible en partie à cause de la grande incertitude obtenue par EI. La concentration certifiée pour cet élément est inconnue. Pour cette raison et à cause des interférences isobariques sévères, un peu comme Cr, cet élément est souvent ignoré par ceux qui analysent les métaux dans les tissus ou fluides biologiques, riches en minéraux et surtout en Ca, par spectrométrie de masse à plasma d'Ar. On peut conclure que la méthode avec 15 min HNO₃ + 20 min H₂O₂ est retenue pour l'analyse du Ni car l'incertitude relative est tout de même la plus basse. Ce métal demeure néanmoins très difficile à analyser par ICP-MS. Friel *et al.* donnent des valeurs de $0,8 \pm 0,4$ µg/g pour le foie de boeuf certifié SRM 5277a et $0,251 \pm 0,410$ µg/g pour le muscle animal IAEA CRM H4 (valeur de référence de 0,006 µg/g pour ce tissu) [70]. Ces écarts-types pour quatre mesures de 50 % et 163 % respectivement témoignent de cette difficulté.

Quelques auteurs ont essayé des procédures alternatives permettant d'analyser correctement Ni dans les matrices complexes, chargées en sels minéraux. Templeton *et al.* suggèrent une méthode permettant d'analyser exactement Ni avec une précision de 6 % à des niveaux de concentration de 5 µg/L, ce qui représente environ 1,25 µg/g dans notre travail [95]. Cette méthode consiste à faire des droites d'étalonnage de Na, K et Ca en utilisant un étalon interne (¹⁰³Rh). Le concept statistique du "Principal Component Analysis" appliqué sur les données brutes recueillies permet d'appliquer une correction mathématique au signal mesuré au rapport m/z = 60 [95]. Des moyens exigeant un traitement chimique plus exhaustif des échantillons sont également proposés. Plantz *et al.* ont séparé les analytes (V, Ni et Cr) des anions, ions alcalins et alcalino-terreux par extraction avec l'agent complexant bis(carboxyméthyl) dithiocarbamate [96]. Barnes *et al.* ont mis au point une méthode semi-quantitative pour l'extraction et l'analyse de plusieurs éléments par ICP-MS dans des matrices biologiques [89]. Ils obtiennent des résultats assez exacts pour le Ni dans un tissu certifié d'huître et de pancréas de homard. Ils ont fait la digestion avec HNO₃, H₂O₂, H₃BO₃ et HF suivi d'une neutralisation de l'excès de HF par l'ajout d'une amine tertiaire. Par contre, certains problèmes sont

apparus suite à l'amélioration de la capacité d'analyse d'autres éléments, notamment des interférences isobariques sévères pour Cr, As, Se, Si, Al et Mg [89].

De tous les isotopes stables connus de Cd, le plus abondant, ^{114}Cd , subit une interférence avec ^{114}Sn (0,65 %). Dans le présent travail, les résultats pour ^{111}Cd étaient compilés simultanément avec ^{114}Cd et aucune divergence entre les résultats n'a été observée. Un essai visant l'application d'une correction mathématique sur le signal à $m/z = 114$ par la mesure du signal à $m/z = 117$ ($^{117}\text{Sn} = 7,67\%$) n'a pas changé le résultat final. La similitude est si évidente qu'aucun test statistique est nécessaire pour trancher, peu importe la matrice analysée. L'isotope choisi est donc l'isotope 114 pour tous les tissus étudiés dans le présent travail en raison de sa sensibilité. Mais une étude est nécessaire pour s'assurer que l'étain n'interfère pas lors de l'analyse de Cd dans un nouveau tissu. Toujours en se référant au tableau XVIII, on remarque que les procédures avec HNO_3 seul et HNO_3 15 min + H_2O_2 20 min donnent des résultats exacts et une excellente concordance les résultats obtenus par ajouts dosés et étalonnage interne. La précision est toutefois meilleure avec la dernière procédure car l'incertitude relative est de 6,9 % comparativement à 10 % pour HNO_3 seul. Bien que tous les résultats sont dans l'intervalle certifié, les résultats avec la digestion proposée s'avèrent une fois de plus les plus près de la valeur certifiée de $0,27 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$. Les résultats obtenus sont excellents compte tenu que la concentration mesurée est à peine quelques fois plus élevée que la LD_m .

Pour Pb, des quatre isotopes stables connus, trois isotopes sont disponibles et exempts d'interférence isobarique (206, 207 et 208 uma). Le plus abondant, ^{208}Pb , est préféré pour sa plus grande sensibilité, car il représente 52,35 % du Pb retrouvé naturellement. Encore une fois, les données pour ^{206}Pb , deuxième isotope plus abondant (24,14 %), ont été mesurées simultanément avec ^{208}Pb et aucune différence est observable. Au niveau des résultats, on remarque immédiatement la parfaite concordance des concentrations obtenues par étalonnage interne et par ajouts dosés avec la digestion avec HNO_3 pendant 10 min et H_2O_2 pendant 20 min. Cependant, selon notre traitement, tous les résultats obtenus pour Pb, peu importe la digestion utilisée, sont acceptables. Tous se recourent, qu'on compare les résultats obtenus par l'étalonnage interne à ceux par ajouts dosés, ceux d'ajouts dosés à la valeur certifiée ou par étalonnage interne avec la valeur de référence. L'analyse de ce métal n'est généralement pas reconnue comme étant problématique, même s'il est présent au niveau ultra-trace.

Pour le Mn, seule la digestion de 15 min avec HNO_3 et 20 min avec H_2O_2 donne une concordance absolue entre les valeurs obtenues par étalonnage interne, ajouts dosés et la valeur certifiée. Les autres digestions donnent une concentration trop faible par étalonnage interne par rapport aux ajouts dosés. On note aussi au tableau XVIII que les deux procédures impliquant H_2O_2 donnent une valeur par ajouts dosés concordant avec la concentration certifiée. La digestion de 15 min avec HNO_3 et 20 min avec H_2O_2 à 105 °C semble être la meilleure procédure.

Le Cu est présent à des concentrations élevées, environ 190 $\mu\text{g/g}$ dans le tissu de foie de boeuf sec, donc environ 760 $\mu\text{g/L}$ dans les digestats. En regardant les résultats obtenus par étalonnage interne uniquement, on remarque que la concentration mesurée varie en fonction de la méthode de digestion utilisée. La digestion de 10 min avec HNO_3 suivie de 20 min avec H_2O_2 donne une faible valeur de 165 $\mu\text{g/g}$, alors qu'avec HNO_3 seul, pendant 30 min, on mesure 209 $\mu\text{g/g}$. La digestion du tissu selon la procédure proposée (15 min HNO_3 + 20 min H_2O_2) donne 184 $\mu\text{g/g}$. De toutes les procédures testées, seule celle de 10 min avec HNO_3 + 20 min avec H_2O_2 ne permet pas d'obtenir des résultats acceptables en étalonnage interne. Pour cette digestion, la concentration mesurée n'est pas en accord avec celle obtenue par ajouts dosés ni avec la valeur de référence.

Le Zn est le deuxième métal le plus concentré de ceux qui ont été analysés. Il est présent à une concentration de 130 $\mu\text{g/g}$. On remarque d'abord au tableau XVIII que la digestion avec HNO_3 donne des résultats inférieurs à la valeur certifiée d'environ 15 %, autant par étalonnage interne que par ajouts dosés. Par contre, la digestion semble donner de meilleurs résultats avec l'ajout de H_2O_2 et les résultats sont semblables pour les deux digestions avec H_2O_2 . En effet, dans les deux cas, l'étalonnage interne et les ajouts dosés donnent des résultats en accord avec la valeur certifiée, mais la concordance entre les résultats de l'étalonnage interne et des ajouts dosés n'est pas observée. Si on se rappelle le tableau XV, la récupération du Zn se chiffrait à 85 % pour le foie de boeuf. Cela signifie qu'il se passe quelque chose au niveau de la matrice et non au niveau du signal analytique. Le signal est mesuré correctement et la droite d'étalonnage s'étend de façon à ce que la concentration mesurée ($\approx 1300 \mu\text{g/L}$) ne soit pas déterminée par extrapolation. Donc un effet de matrice doit retenir le Zn ajouté dans la solution, mais

lorsque aucun ajout n'est effectué, la concentration mesurée est en accord parfait avec la concentration attendue.

À titre d'information uniquement, il semble pertinent de mentionner que la qualité des résultats obtenus témoignent de l'homogénéité de l'échantillon de foie de boeuf qui a été certifié en 1972 et qui semble assez stable. Quelques auteurs sèchent leur matériau biologique avant l'utilisation, chose qui n'est pas faite dans ce travail. Par exemple, Friel *et al.* sèchent leurs tissus toute une nuit à 55 °C dans une étuve [70]. Un essai interne a démontré que le foie de boeuf a perdu seulement 1,6 % de sa masse après 5,25 h de chauffage à 92 °C, ce qui est très satisfaisant pour un échantillon de cet âge.

L'analyse des résultats obtenus par étalonnage interne et par ajouts dosés dans une matrice différente, mais aussi riche en matière grasse, est un beau défi pour tester l'efficacité de la méthode de digestion proposée. Le foie de roussette certifié de la seconde génération de matériau DOLT-2 comprend environ 24 % de matières grasses. La roussette, aussi appelée "chien de mer", est un poisson inoffensif de la famille des requins. Le tableau XIX énumère les valeurs obtenues par la digestion proposée ainsi que la valeur certifiée. Les incertitudes mentionnées expriment l'intervalle de confiance à un niveau de 95 %. Les ajouts dosés sont exprimés avec la moyenne \pm l'écart-type égal au poids statistique calculé avec la variance de chacun des points de la droite d'ajouts dosés.

On remarque d'abord que le Cr, un des éléments problématiques, n'est pas analysable sous ces conditions. Bien que la concentration soit environ 0,37 $\mu\text{g/g}$ (environ six fois la LD_{m}), les valeurs obtenues par ajouts dosés et par étalonnage interne sont nettement supérieures à la valeur certifiée. Comme l'avaient supposés Beauchemin *et al.* [92], le fait que la valeur obtenue par ajouts dosés dépasse la valeur certifiée signifie qu'il y a une interférence isobarique et non une interférence d'un autre type. On peut aussi supposer avec confiance que ArC^+ est responsable de cette interférence. Ceci est confirmé par le fait que l'analyse d'un digestat de DOLT-2 dilué d'un facteur 10 donne un résultat semblable à celui obtenu ($0,80 \pm 0,10 \mu\text{g/g}$).

Pour Ni, la valeur obtenue par l'étalonnage interne est en parfait accord avec la concentration de référence. Or, la méthode des ajouts dosés est supérieure à la

concentration certifiée en Ni de près de quatre fois (0,978 au lieu 0,20 $\mu\text{g/g}$), mais fort heureusement, le résultat obtenu avec par l'étalonnage interne ($0,23 \pm 0,04 \mu\text{g/g}$) est inclus dans l'intervalle certifié. La courbe obtenue par les ajouts dosés possède quand même une bonne linéarité ($r^2 = 0,99996$ calculé par la méthode des moindres carrés sans poids statistiques pour quatre points). Le problème viendrait donc du signal mesuré.

Pour Cd et Pb, les résultats obtenus par ajouts dosés et par étalonnage interne correspondent chacun parfaitement à la valeur de référence. La comparaison des valeurs obtenues par ajouts dosés à celles de l'étalonnage interne montre que les résultats sont acceptables pour Pb et moins satisfaisants pour Cd.

Tableau XIX : Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans le foie de roussette certifié DOLT-2 par étalonnage interne et par ajouts dosés par digestion avec HNO_3 pendant 15 min + H_2O_2 pendant 20 min à 105 °C.

Isotope	Étalonnage interne	Ajouts dosés	Valeur certifiée
^{52}Cr	$0,71 \pm 0,03$	$0,74 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,08$
^{60}Ni	$0,23 \pm 0,04$	$0,978 \pm 0,008$	$0,20 \pm 0,02$
^{208}Pb	$0,22 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$
^{55}Mn	$6,1 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,1$	$6,88 \pm 0,56$
^{114}Cd	$19,8 \pm 0,7$	$21,1 \pm 0,2$	$20,8 \pm 0,5$
^{65}Cu	27 ± 2	$28,0 \pm 0,3$	$25,8 \pm 1,1$
^{66}Zn	87 ± 3	$90,8 \pm 0,4$	$85,8 \pm 2,5$

Moyenne \pm IC ($n = 5$) à 95 % pour l'étalonnage interne.

Moyenne \pm écart-type pour les ajouts dosés.

Dans ce tissu, Mn est moins concentré que dans le foie de boeuf et est présent à une concentration de 6,88 $\mu\text{g/g}$ de tissu sec. La valeur obtenue par étalonnage interne étant en parfaite concordance avec celle obtenue par ajouts dosés (à 0,2 % près), mais cette dernière valeur n'entre pas dans l'intervalle certifié. On peut parler immédiatement de Cu car la même constatation est faite. L'étalonnage interne donne des résultats inclus dans l'intervalle certifié et en accord avec celle obtenue par ajouts dosés également. Or, ce sont les valeurs obtenues par ajouts dosés qui ne concordent pas avec la certification. Comme l'incertitude des ajouts dosés est évaluée par l'écart-type, l'intervalle de confiance est probablement sousestimé et le recouvrement des valeurs obtenues par l'étalonnage interne et par les ajouts dosés pourraient coïncider. Une autre explication pourrait provenir de la faible quantité de tissu utilisée. Sur le certificat d'analyse du DOLT-2, on mentionne que l'homogénéité de l'échantillon est assurée seulement si une masse de 250 mg ou plus est utilisée et notre explication est donc plausible. Le fait que ce tissu soit plus riche en matière grasse ou de granulométrie différente à celle du foie de boeuf (plus grosse) n'affecte pas les digestats, qui ressemblent à ceux de foie de boeuf par leur coloration et leur clarté. Si un effet de matrice important devait survenir à cause d'une digestion inefficace (donc de la présence de particules), on observerait plutôt une suppression du signal, comme cela a été observé par Ridout, Jones et Williams [88], menant à une valeur obtenue par ajouts dosés supérieure à la valeur certifiée. De plus, un essai sur une solution diluée 10 fois donne les mêmes résultats. Si les espèces polyatomiques étaient responsables de la surestimation des valeurs mesurées en ajouts dosés, l'interférence serait perceptible également par étalonnage interne.

Finalement, pour Zn, le résultat obtenu par étalonnage interne est en accord avec la valeur de référence. Les résultats obtenus par les ajouts dosés et par l'étalonnage interne sont proches compte tenu de la surestimation de l'incertitude par ajouts dosés. Par contre, l'écart entre les valeurs obtenues par ajouts dosés et la valeur certifiée reste assez grand (2,5 %).

Voyons maintenant les résultats obtenus par étalonnage interne et par ajouts dosés pour les échantillons de moules (tableau XX). Il faut mentionner que la granulométrie des moules (≤ 1 mm) est nettement plus grosse que celle des tissus certifiés et que les digestats de moules sont néanmoins clairs et d'un jaune plus pâle. N'ayant point de valeur cible ou de référence, seule la concordance entre les résultats obtenus par ajouts

dosés et par l'étalonnage interne servira d'indice de qualité des résultats. Ces derniers sont énumérés au tableau XX pour les trois principales méthodes de digestion testées.

Pour Cr d'abord, il est fort possible que la même situation observée avec les deux matériaux certifiés se répète, c'est-à-dire que l'espèce diatomique ArC^+ interfère à la valeur de $m/z = 52$. Les résultats aussi discordants les uns que les autres et même une valeur négative est obtenue par la méthode des ajouts dosés (HNO_3 10 min + H_2O_2 20 min), portent à croire que la valeur vraie se situe à un niveau inférieur de concentration car Beauchemin *et al.* ont eu des problèmes de surévaluation avec un étalon certifié qui contenait près de $3,7 \mu\text{g/g}$ [92].

Les résultats obtenus pour Ni ne diffèrent pas des résultats obtenus avec les autres tissus. Les résultats sont mauvais pour la digestion avec HNO_3 seul et par HNO_3 pendant 15 min + 20 min avec H_2O_2 . Nous pouvons tout de même imaginer que la concentration de Ni dans les moules serait de l'ordre de $1,4$ - $1,7 \mu\text{g/g}$ car quatre résultats sur cinq vont dans ce sens avec un degré de précision surprenant. Les résultats d'une autre technique d'analyse seraient nécessaires afin de déterminer une valeur de référence interne.

Comme Cd et Pb subissent peu d'interférences spectrales et qu'on peut les analyser exactement et précisément dans les autres tissus, et ce même s'ils sont présents à un niveau de concentration plus faible, on devrait s'attendre à obtenir des résultats acceptables pour les moules. Effectivement, toutes les digestions essayées donnent un concordance des résultats obtenus par étalonnage interne et par ajouts dosés. Pour Pb, la valeur de $1,4 \mu\text{g/g}$ est obtenue pour toutes les digestions. Pour Cd cependant, une plus grande variabilité est remarquée. Bien qu'elles se recoupent toutes, les concentrations mesurées varient entre $1,00$ et $1,24 \mu\text{g/g}$.

Tableau XX : Concentrations mesurées ($\mu\text{g/g}$) dans les moules par étalonnage interne (EI) et par ajouts dosés (AD).

Isotope	HNO ₃ 30 min		HNO ₃ + H ₂ O ₂ 10 min + 20 min		HNO ₃ + H ₂ O ₂ 15 min + 20 min	
	EI	AD	EI	AD	EI	AD
⁵² Cr	1,97 ± 0,08	1,08 ± 0,05	1,5 ± 0,2	n.d.	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
⁶⁰ Ni	1,7 ± 0,2	1,37 ± 0,03	2 ± 1	1,7 ± 0,2	1,44 ± 0,02	1,7937 ± 0,0005
¹¹⁴ Cd	1,10 ± 0,04	1,00 ± 0,06	1,18 ± 0,06	1,24 ± 0,04	1,16 ± 0,03	1,13 ± 0,06
²⁰⁸ Pb	1,4 ± 0,2	1,32 ± 0,04	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,42 ± 0,08
⁵⁵ Mn	6,7 ± 0,3	4,9 ± 0,2	6,4 ± 0,2	5,6 ± 0,6	5,9 ± 0,2	5,8 ± 0,1
⁶⁵ Cu	7,7 ± 0,7	4,9 ± 0,2	8 ± 1	6,5 ± 0,5	7,1 ± 0,5	6,86 ± 0,08
⁶⁶ Zn	85 ± 4	80 ± 2	92 ± 4	89 ± 5	83 ± 2	84 ± 3

Moyenne de 5 mesures ± IC à 95 % pour l'étalonnage interne.

Moyenne ± écart-type pour les ajouts dosés.

Pour Mn, dont la concentration dans les moules est à peu près équivalente à celle trouvée dans le foie de roussette, les résultats obtenus par ajouts dosés et par étalonnage interne sont acceptables seulement avec les digestions incluant H_2O_2 . Comme dans le cas du foie de boeuf, la digestion avec HNO_3 pendant 30 min ne permet pas d'avoir des résultats similaires par ajouts dosés et par étalonnage interne.

Second en ordre de concentration, le Cu est retrouvé à un niveau assez proche de la LD_m . Comme dans le cas du Mn, les digestions faites avec HNO_3 et H_2O_2 sont les seules à donner des résultats par étalonnage interne et par ajouts dosés qui se recouvrent pour Cu. Les résultats obtenus par ajouts dosés par la digestion avec HNO_3 sont difficiles à expliquer puisque la concentration obtenue est 36 % inférieure au résultat obtenu par l'étalonnage interne. La teneur en Cu est environ 7 $\mu g/g$.

Dans les moules, Zn est l'élément le plus concentré de ceux que nous avons analysés. Tous les résultats sont situés entre 80 et 92 $\mu g/g$. Chacune des méthodes de digestion offre une concordance parfaite entre les résultats obtenus par l'étalonnage interne et par les ajouts dosés. Cependant, l'incertitude est plus faible pour la digestion avec HNO_3 pendant 15 min et H_2O_2 pendant 20 min. On peut déduire que la concentration en Zn dans les moules est de l'ordre de 85 $\mu g/g$.

Dans l'ensemble, les digestions testées qui emploient H_2O_2 comme agent oxydant en plus de HNO_3 permettent d'obtenir des résultats par l'étalonnage interne et par ajouts dosés qui sont en accord, sauf pour Cr et Ni. Ceci était tout de même un peu prévisible considérant les résultats obtenus sur les tissus certifiés. Étant donné la qualité des résultats obtenus par la digestion de 15 min avec HNO_3 et de 20 min avec H_2O_2 , cette méthode est retenue et recommandée.

4. CONCLUSION

En guise de synthèse, notons que les métaux les plus difficiles à analyser sont Cr et Ni. Pour les autres éléments, les limites de détection obtenues et les performances de reproduction des résultats et de leur exactitude sont très satisfaisantes.

Plus précisément, il a d'abord été démontré par des études de variation de pH et de concentration de métaux mesurée en fonction du temps de chauffage en présence de H_2O_2 , après une digestion préalable de 15 min dans HNO_3 , qu'un chauffage de 15 min avec HNO_3 suivi de 20 min avec H_2O_2 assure une certaine stabilité des concentrations mesurées dans les moules.

Un article de Vanhoe, Goossens, Moens et Dams [86] et les résultats obtenus ont permis de fixer le choix des isotopes utilisés pour la quantification des éléments de transition. Les concentrations d'éléments pouvant potentiellement former des espèces polyatomiques interférentes ont été comparées avec celles mesurées dans les digestats. Les isotopes choisis pour les métaux de transition sont le ^{52}Cr , le ^{55}Mn (monoisotopique), le ^{60}Ni , ^{65}Cu et ^{66}Zn . Le ^{114}Cd et ^{208}Pb sont les deux métaux lourds analysés. Durant ces travaux, les résultats ont été aussi calculés parallèlement pour ^{53}Cr , ^{62}Ni , ^{63}Cu , ^{64}Zn , ^{111}Cd et ^{206}Pb . Le ^{53}Cr est peu intéressant en raison de sa faible sensibilité, de l'interférence des chlorures et probablement de celle de $Ar^{13}C^+$. Le ^{62}Ni est aussi peu intéressant pour quantifier Ni dans les tissus biologiques mais ce résultat confirmerait ceux de la littérature. Pour les autres éléments, aucune variation significative des résultats a été observée entre les deux isotopes. Le plus susceptible de subir des interférences spectrales, le ^{64}Zn , est tellement élevé en concentration dans les tissus étudiés ($> 85 \mu g/g$) que les interférences prévues ont peu d'impact réel. L'acquisition des données pour un nombre plus élevé d'isotopes justifie d'ailleurs le choix du mode balayage au lieu du mode de "sauts d'ions" pour ce travail.

La différence de l'efficacité de la digestion n'a pu être quantifiée mais seulement constatée visuellement pour les trois tissus analysés. Les procédures avec HNO_3 et H_2O_2 donnent des digestats plus clairs et contenant peu ou pas de particules en suspension et aucune matière grasse flottant à la surface. À la lumière de ces résultats, la pertinence de la centrifugation, nécessaire pour les digestions avec HNO_3 seulement, est

mise en doute. Il a clairement été démontré que les éléments dans les solutions non centrifugées sont vaporisés, atomisés et ionisés dans le plasma induit par des radiofréquences aussi efficacement que ceux d'une solution d'acide propre. Trois paramètres ont fait l'objet d'une étude pour tirer cette conclusion. D'abord la variation du bruit sur le signal analytique, l'exactitude du résultat final et finalement, la récupération des ajouts. La précision variant de façon aléatoire, un gain d'exactitude notable pour Cu, de même qu'une meilleure récupération des ajouts démontrent que l'étape de centrifugation n'est pas nécessaire.

La contribution du blanc chimique a aussi fait l'objet d'une étude approfondie. Les contributions en éléments des réactifs ont d'abord été calculées et comparées avec la LD_i . Une comparaison des concentrations mesurées dans le foie de boeuf avec et sans soustraction du signal du blanc chimique a été effectuée. On a déduit que pour la digestion proposée, cette étape n'est absolument pas utile, à moins d'un cas évident de contamination.

L'évaluation des performances analytiques de la digestion proposée révèle notamment que, bien que la façon de calculer la LD_m soit différente de celle utilisée par la plupart des auteurs, les LD_m sont environ dix fois supérieures à la LD_i et de même ordre de grandeur que les valeurs données par d'autres. La limite de quantification se situe ainsi entre 0,1 et 0,3 $\mu\text{g/g}$ pour Mn, Ni, Cd et Pb, alors que Cu et Zn ont une LQ de 2 $\mu\text{g/g}$. Une étude plus poussée sur la répétabilité démontre que la digestion de 15 min avec HNO_3 et 20 min avec H_2O_2 permet d'obtenir de meilleurs résultats à l'intérieur d'une même série d'analyse et pour deux journées différentes. Cette conclusion est valable à la fois pour le foie de bœuf, les moules et le foie de roussette.

Au niveau de la rapidité de la digestion, il a été démontré que la méthode proposée sur la plaque chauffante peut être aussi rapide, ou sinon plus, que la digestion aux micro-ondes conventionnelle ou en continu en raison du nombre d'échantillons pouvant être traités simultanément. Le simple inconvénient de la digestion sur la plaque est que son automatisation est plus difficile car les manufacturiers se sont davantage tournés vers l'automatisation de la digestion par des micro-ondes.

Une étude de l'effet de matrice sur le signal analytique a été entreprise afin d'étudier les interactions de celle-ci avec les analytes. Cette étude est réalisée sous trois aspects. D'abord au niveau de la récupération des ajouts. Tous les éléments offrent une récupération supérieure à 92 % dans le foie de bœuf sauf Zn. Par contre, les résultats avec l'étalonnage interne sont excellents pour cet élément. Dans les moules, deux éléments se situent sous les 92 % de récupération, soit Cd et Zn. Il a été mentionné dans l'introduction que ces éléments sont chimiquement semblables et donc une cause chimique serait peut-être à l'origine des valeurs faibles de récupération à partir d'une matrice de moules.

Le second volet de l'étude de matrice, consacré à la méthode des ajouts dosés, démontre que la bonne façon de l'appliquer est de faire une digestion contenant le double de la quantité de réactifs utilisés pour la digestion conventionnelle et de diluer le digestat obtenu en ajoutant la solution de dopage lors de cette dilution. L'ajout d'analyte est de l'ordre de grandeur de la quantité initialement présente dans le tissu. Finalement, la comparaison des résultats obtenus par étalonnage interne et par ajouts dosés a été faite et une comparaison avec la valeur certifiée, lorsqu'elle est disponible a été également faite. De façon générale, Cr est impossible à analyser dans ces tissus dans ces conditions à cause de l'interférence trop sévère de ArC^+ . Le Ni est un autre élément difficile à analyser mais une valeur acceptable peut néanmoins être obtenue sous certaines conditions. Pour les métaux essentiels, Cu et Zn, leur concentration relativement élevée permet de les analyser exactement et assez précisément dans plusieurs tissus biologiques. Le Cd, retrouvé à l'état trace, est analysable de façon assez précise pour un niveau de concentration faible. Le Pb toutefois, retrouvé à un niveau de concentration similaire, est aussi analysable de façon exacte, mais avec une incertitude plus importante, soit de l'ordre de 10 % pour un IC de 95 %.

Pour le futur, comme aucune valeur exacte pour Ni n'est disponible dans la littérature pour le foie de bœuf, on recommande l'analyse de Ni par une autre méthode d'analyse. Au niveau de l'acquisition des données, elles peuvent être acquisitionnées en mode "sauts d'ions", permettant une analyse plus rapide des échantillons, ou encore, plus de mesures peuvent être prises pour le même temps consacré à un échantillon. Le but au niveau instrumental et chimique est donc de trouver une façon d'extraire les métaux de la matrice biologique et d'éliminer les interférences dues au carbone (sur ^{52}Cr) et aux espèces polyatomiques (sur Ni).

BIBLIOGRAPHIE

1. Friberg, L., Norberg, G.F. and Vouk, V.B. "Handbook on the Toxicology of Metals". Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 709 p. (1979).
2. Organisation Mondiale de la Santé. "Le Manganèse". Nations Unies pour l'Environnement/Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 123 p. (1981).
3. Klimis-Tavantzis, D.J. "Manganese in Health and Diseases". CRC Press, Boca-Raton, 212 p. (1994).
4. Browning, E. "Toxicity of Industrial Metals". Butterworths, London, 325 p. (1961).
5. Webb, M. "The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium". Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 465 p. (1979).
6. Conseil National de Recherche Canada, "Effects of Lead in the Canadian Environment - 1978". Publication no. NRCC 16736, Ottawa, 779 p. (1979).
7. Conseil National de Recherche Canada, "Effects of Chromium in the Canadian Environment". Publication no. NRCC 15017, Ottawa, 168 p. (1976).
8. Capar, S.G. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**, 1400 (1977).
9. Langmuir, I. and Tonks, L. *Phys. Rev.*, **33**, 195 (1929).
10. Skoog, D.A. and Leary, J.L. "Principles of Instrumental Analysis : 4th edition". Saunders College Publishing, Orlando, 700 p. (1992).
11. Gray, A.L. and Date, A.R. "Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry". Blackie, London, 254 p. (1989).
12. Houk, R.S., Fassel, V.A., Flesh, G.D., Svec, H.J., Gray, A.L. and Taylor, C.E. *Anal. Chem.*, **52**, 2283 (1980).
13. Horlick, G. *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 593 (1994).
14. Laitinen, H.A. *Anal. Chem.*, **45**, 2305 (1973).
15. Douglas, D.J. and Houk, R.S. *Prog. Analyt. Atom. Spectrosc.*, **8**, 1 (1985).
16. Houk, R.S. *Anal. Chem.*, **58**, 97A (1986).

17. Montaser, A. and Golightly, D.W. "Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry : 2nd edition". VCH, New-York, 1010 p. (1992).
18. Wilson, D.A., Vickers, G.H., Hieftje, G.M. and Zander, A.T. *Spectrochim. Acta*, **42B**, 29 (1987).
19. Fisons Instruments/VG Elemental. "PlasmaQuad System Manual". Fisons Instruments/VG Elemental, Winsford, (1992).
20. Browner, R.F. and Boorn, A.W. *Anal. Chem.*, **56**, 786A (1984).
21. Browner, R.F. and Boorn, A.W. *Anal. Chem.*, **56**, 875A (1984).
22. Thompson, J.J. and Walsh, J.N. "A Handbook of Inductively Coupled Plasma Spectrometry". Blackie, New-York, 273 p. (1983).
23. Montaser, A. and Golightly, D.W. "Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry". VCH, New-York, 660 p. (1987).
24. Sharp, B.L. *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 613 (1988).
25. Smith, T.R. and Denton, M.B. *Appl. Spectrosc.*, **44**, 21 (1990).
26. Ebdon, L. and Cave, M.R. *Analyst*, **107**, 172 (1982).
27. Sharp, B.L. *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 939 (1988).
28. Douglas, D.J. and Kerr, L.A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 747 (1988).
29. Mc Laren, J.W., Lam, J.W.H, Berman, S.S., Akatsuka, K. and Azeredo, M.A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**, 279 (1993).
30. Stroh, A., Völlkopf, U. and Denoyer, E.R. *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, 1201 (1992).
31. Shabani, M.B. and Masuda, A. *Anal. Chim. Acta*, **261**, 315 (1992).
32. Mc Laren, J.W., Akatsuka, K., Lam, J.W.H, Berman, S.S. *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**, 279 (1993).
33. Huang, K.-S. and Jiang, S.-J. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **347**, 238 (1993).
34. Yang, Y.-J., Huang, K.-S., Jiang, S.-J., Wu, C.-C. and Chou, C.-H. *Anal. Chim. Acta*, **282**, 437 (1993).
35. Hill, S.J., Ford, M.J. and Ebdon L. *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, 1157 (1992).

36. Vanhoe, H., Dams, R. and Versieck, J. *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 23 (1994).
37. Thompson, J.J. and Houk, R.S. *Appl. Spectrosc.*, **41**, 801 (1987).
38. Vanhaecke, F., Vanhoe, H., Dams, R. and Vandecasteele, C. *Talanta*, **39**, 737 (1992).
39. Vaughan, M.A. and Horlick, G. *Appl. Spectrosc.*, **40**, 434 (1986).
40. Zhu, G. and Browner, R.F. *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, 781 (1988).
41. Hutton, R.C. and Eaton, A.N. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2**, 595 (1987).
42. Houk, R.S., Alves, L.C. and Allen, L.A. *Anal. Chem.*, **65**, 2468 (1993).
43. Alves, L.C., Wiederin, D.R. and Houk, R.S. *Anal. Chem.*, **64**, 1164 (1992).
44. Tao, H. and Miyazaki, A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**, 1 (1995).
45. Peters, G.R. and Beauchemin D. *Spectrochim. Acta*, **48B**, 1481 (1993).
46. Tan, S.H. and Horlick, G. *Appl. Spectrosc.*, **40**, 455 (1986).
47. Gießmann, U. and Greb, U. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **350**, 186 (1994).
48. Reed, N.M., Cairns, R.O., Hutton, R.C. and Takaku Y. *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 881 (1994).
49. Vickers, G.H., Ross, B.S. and Hieftje, G.M. *Appl. Spectrosc.*, **43**, 1330 (1989).
50. Tan, S.H. and Horlick, G. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2**, 745 (1987).
51. Tanner, S.D., Cousins, L.M. and Douglas, D.J. *Appl. Spectrosc.*, **48**, 1367 (1994).
52. Fresenius, R. and von Babo, L. *Ann. Chim. Pharm.*, **49**, 287 (1844).
53. Asp, T.N., and Lund, W. *Talanta*, **39**, 563 (1992).
54. White Jr, R.T. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 387 (1989).
55. Abu-Samra, A., Morris, J.S. and Koirtiyohann, S.R. *Anal. Chem.*, **47**, 1475 (1975).
56. Kingston, H.M. and Jassie, L.B. "Introduction to Microwave Sample Preparation". American Chemical Society, Washington, 263 p. (1988).

57. Sturgeon, R.E., Willie, S.N., Methven, B.A., Lam, J.W.H. and Matusiewicz, H. *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**, 981 (1995).
58. Matusiewicz, H. and Sturgeon, R.S. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **349**, 428 (1994).
59. Arruda, M.A., Gallego, M. and Valcarcel, M. *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, 169 (1996).
60. Stewart, L.J.M. and Barnes, R.M. *Analyst*, **119**, 1003 (1994).
61. Burguera, M., Burguera, J.L. and Alarcón, O.M. *Anal. Chim. Acta*, **179**, 351 (1986).
62. De Boer, J.L.M. and Meassens, F.J.M.J., *Spectrochim. Acta*, **38B**, 739 (1983).
63. Tatro, M.E. *Spectroscopy*, **5**, 14 (1990).
64. Mc Carthy, H.T. and Ellis, P.C. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 566 (1991).
65. Krushevska, A., Barnes, R.M. and Amarasiriwaradena, C. *Analyst*, **118**, 1175 (1993).
66. Matusiewicz, H. and Sturgeon, R.E. *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, 323 (1989).
67. Nakashima, S., Sturgeon, R.E., Willie, S.N. and Berman, S.S. *Analyst*, **113**, 159 (1988).
68. Dahlquist, R.L. and Knoll, J.W. *Appl. Spectrosc.*, **32**, 1 (1978).
69. Kingston, H.M. and Jassie, L.B. *Anal. Chem.*, **58**, 2834 (1986).
70. Friel, J.K., Skinner, C.S., Jackson, S.E. and Longerich, H.P. *Analyst*, **115**, 269 (1990).
71. Reid, H.J., Greenfield, S. and Edmonds, T.E. *Analyst*, **120**, 1543 (1995).
72. Niazi, S.B., Littlejohn, D. and Halls, D.J. *Analyst*, **118**, 821 (1993).
73. Mörner, C.T., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **95**, 263 (1915).
74. Mörner, C.T., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **98**, 89 (1916).
75. Mörner, C.T., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **95**, 93 (1916).
76. Mörner, C.T., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **95**, 98 (1916).

77. Mörner, C.T., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **101**, 15 (1917).
78. Stoeppler, M., Müller, K.P. and Backhaus, F. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **297**, 107 (1979).
79. Jackwerth, E. and Gomiseck, S. *Pure Appl. Chem.*, **56**, 475 (1984).
80. Kotz, L., Henze, G., Kaiser, G., Pahlke, S., Veber, M. and Tölg, G. *Talanta*, **26**, 281 (1979).
81. Pratt, K.W., Kingston, H.M., Mac Crehan, W.A. and Foch, W.F. *Anal. Chem.*, **60**, 2024 (1988).
82. Würfels, M., Jackwerth, E. and Stoeppler, M. *Anal. Chim. Acta*, **226**, 1 (1989).
83. Würfels, M., Jackwerth, E. and Stoeppler, M. *Anal. Chim. Acta*, **226**, 17 (1989).
84. Miller, J.C. and Miller, J.N. "Statistics for Analytical Chemistry : 2nd edition". J. Wiley & Sons, New-York, 227 p. (1989).
85. Long, S.E. and Martin, T.D. *ICP Inf. Newsl.*, **16**, 460 (1991).
86. Vanhoe, H., Goossens, J., Moens, L. and Dams, R. *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 177 (1994).
87. Lauzon, C. Travaux non publiés, Université de Montréal (1994).
88. Ridout, P.S., Jones, H.R. and Williams, J.G. *Analyst*, **113**, 1383 (1988).
89. Krushevskaja A., Lasztity, A., Kotrebai, M. and Barnes, R.M. *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, 343 (1996).
90. Laborda, F., Baxter, M.J., Crews, H.M. and Dennis, J. *J. Anal. At. Spectrom.*, **9**, 727 (1994).
91. Lajoie, A. "Contrôle de la qualité (CHI 2900)". Université du Québec à Montréal, 222 p. (1984).
92. Beauchemin, D., Mc Laren, J.W., Willie, S.N. and Berman, S.S. *Anal. Chem.*, **60**, 687 (1988).
93. Ashley, D. *At. Spectrosc.*, **13**, 169 (1992).
94. Lam, J.W.H., Mc Laren, J.W. and Methven, B.A.J. *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**, 551 (1995).

95. Xu, S.X., Stuhne-Sekalec, L. and Templeton, D.M. *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**, 445 (1993).
96. Plantz, M.R., Fritz, J.S., Smith, F.G. and Houk, R.S. *Anal. Chem.*, **61**, 149 (1989).