

IMPORTANCE DE LA PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR UNE ANALYSE DE SPECIATION DU SELENIUM PAR HPLC-ID-ICP-MS. DETERMINATION D'INCERTITUDES DU RENDEMENT D'EXTRACTION AU RESULTAT SUR LA SELENOMETHIONINE.

S. Sannac¹, C. Oster¹, G. Labarraque¹, G. Hervouët¹, F. Pannier² et M. Potin-Gautier²

**1. Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE)
1rue Gaston Boissier 75724 Paris Cedex
sebastien.sannac@lne.fr**

**2. Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), UMR 5254 IPREM,
Avenue de l'Université, BP 1155, 64013 Pau Cedex**

Résumé

L'objectif de notre étude est d'augmenter l'extraction du sélénium total contenu dans une levure. En comparant les qualités intrinsèques de plusieurs solvants disponibles dans la littérature, il a été établi un mode opératoire combinant leur différente action pour arriver à une meilleure extraction du sélénium. Pour juger de l'efficacité des différentes mises en solution, les rendements, ainsi que leur incertitude, ont été déterminés. La validation de méthode s'est faite, tant sur l'efficacité d'extraction que sur le respect de la spéciation durant le traitement, par l'emploi d'un matériel certifié (en sélénium total et en une de ses espèces : la sélénométhionine).

Summary

The aim of this study was to increase the extraction efficiency of selenium from a yeast. After the comparison of different procedures, their combination allowed us to reach the quantitative leaching of selenium. The extraction efficiency was evaluated by the calculation of selenium recovery and its uncertainty. Method validation was achieved by the analysis (in speciation and in total selenium) of a certified reference material in total selenium and selenomethionine.

Introduction

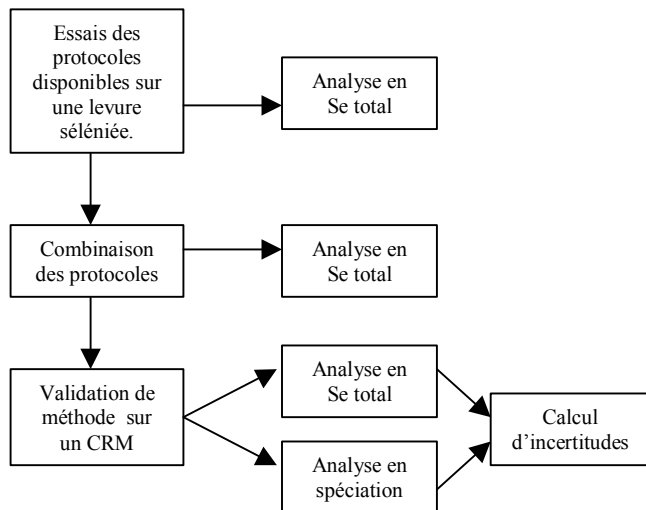
De nos jours, l'analyse d'un élément depuis un échantillon ne se fait plus seulement sur la teneur totale de celui-ci. En effet, cette information ne donne qu'une indication parcellaire de l'interaction de l'élément avec l'environnement. Pour comprendre pleinement son impact, il est essentiel de déterminer les différentes formes sous lesquelles l'élément est rencontré dans l'échantillon, c'est à dire réaliser une analyse de spéciation. Les applications de ce type d'analyse sont nombreuses que ce soit dans le domaine de l'environnement, de la santé ou de l'agroalimentaire.

Toutefois le manque de matériaux de référence certifiés (CRM) pour les différentes espèces d'un élément, limite la validation des méthodes d'analyses. Dans notre

programme de recherche, un protocole de dosage des différentes formes du sélénium dans des levures sélénées, fréquemment utilisées comme suppléments alimentaires, est mis en place. Après extraction, les composés sont séparés par chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée en continu à une détection par un spectromètre de masse à couplage inductif du plasma (ICP-MS). Le dosage est réalisé par dilution isotopique (ID). L'objectif est de disposer d'une méthode de référence primaire dont les incertitudes sur la mesure sont pleinement connues pour permettre d'assurer la traçabilité des analyses et la certification de matériaux de référence.

La démarche pour réaliser une analyse de spéciation est composée de plusieurs étapes essentielles. L'une d'entre elles, et des plus importantes, est l'extraction/mise en solution des différentes formes du sélénium depuis l'échantillon solide. Une fois réalisée l'extraction solide/liquide la séparation est effectuée par chromatographie en phase liquide. La difficulté provient de la nécessité d'être quantitatif sans pour autant modifier la spéciation originelle contenue dans l'échantillon. Lors d'essais inter-laboratoire pour la certification de matériaux, les rendements ne sont pas toujours calculés, ou du moins exprimés. Or l'association du recouvrement aux résultats apporte une information essentielle pour juger des différentes méthodes d'extraction mises en œuvres, surtout lorsqu'elles ne sont pas quantitatives.

L'approche développée vise à améliorer la préparation d'échantillon par l'augmentation de l'extraction du sélénium depuis des levures. Ainsi, les rendements de plusieurs protocoles disponibles dans la littérature ont été évalués sur une levure sélénée. Ces informations ont servi de bases pour établir une extraction séquencée alliant l'efficacité propre des différents solvants. Une fois le protocole établi, la validation s'est faite par l'emploi d'un CRM. Il s'agit d'une levure certifié en sélénium total et en une de ses espèces de principal intérêt : la sélénométhionine (acide aminé sélénié). Les analyses sur le CRM se sont déroulées en analyse totale d'une part (pour juger de son rendement d'extraction) et en analyse de spéciation d'autre part. Les incertitudes des différents résultats ont été déterminées. La démarche scientifique est récapitulée dans l'organigramme 1.



Organigramme 1 : démarche de l'étude

Étude de l'extraction du sélénium depuis une levure

Comparaison de l'efficacité de plusieurs solvants :

La première étape de notre étude a été d'évaluer l'efficacité d'extraction de différents solvants sur une levure sélénée (échantillon fourni par le LCABIE). Dans la littérature plusieurs protocoles d'extraction sont proposés [1]. Leurs différences proviennent essentiellement de la nature des agents employés, du temps d'incubation ainsi que de la température à laquelle l'extraction est réalisée. En fonction du solvant utilisé, il est permis de récupérer différentes fractions de sélénium dans la levure. L'action de l'eau seule permet d'atteindre la partie hydrosoluble. Un mélange d'enzymes tel que la Driselase (laminarinase, xylanase et cellulase) agit essentiellement sur les parois cellulaires composées de polysaccharides. Le sodium dodecyl-sulfate (SDS) est un solubilisateur de chaînes polypeptidiques. Enfin, il est possible d'atteindre les acides aminés par l'action d'une enzyme protéolytique, comme la protéase XIV. Les extractions se déroulent en milieu tamponné avec du Tris-HCl (30mmol/L, pH=7) permettant de perpétuer l'environnement cellulaire pour préserver la spéciation originelle de notre échantillon. Le tableau 1 récapitule les modes opératoires appliqués selon les différents solvants. A la fin des extractions, le surnageant est séparé du culot par centrifugation. Chaque fraction subit une minéralisation sous champ micro-onde en système fermé pour permettre la détermination du sélénium total par ICP-MS.

L'efficacité de chaque mode a été estimée afin de disposer d'une évaluation claire des protocoles pour les combiner dans une extraction séquencée, dans le but d'augmenter le rendement global d'extraction. Les analyses ont été dans

un premier temps conduites en sélénium total pour la détermination des rendements.

Solvant d'extraction	Température d'extraction (°C)	Temps d'incubation (h)
5 mL d'eau milli-Q	90	1
200 mg Driselase, avec 5mL de Tris-HCl	25	1
200 mg de SDS, avec 5mL de Tris-HCl	25	1
20mg de Protéase XIV, 10mg de Lipase VII, avec 5mL de Tris-HCl	37	16

Tableau 1 : protocole d'extraction du sélénium sur une levure [1]

Le rendement d'extraction a été établi en divisant la quantité de matière contenue dans le surnageant par la quantité totale théoriquement présente dans la prise d'essai. De même, le pourcentage de sélénium restant dans le culot a été déterminé. Les résultats obtenus pour chaque type d'extraction sont regroupés dans la figure 1, accompagnés de leur écart-type sur la mesure (n=3).

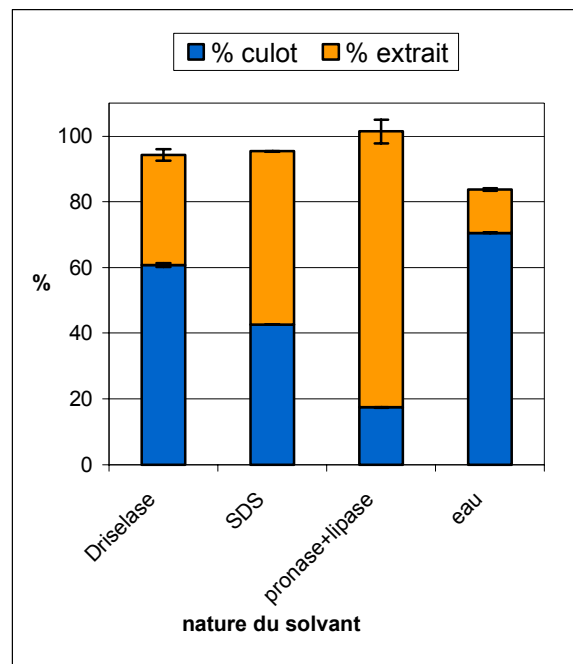


Figure 1 : efficacité d'extraction des solvants en sélénium total

Il est démontré l'efficacité propre à chaque solvant sur sa capacité de mise en solution du sélénium présent dans la levure. Les modes de principaux intérêts sont ceux ayant une action ciblée sur les chaînes polypeptidiques de la levure (SDS et protéase/lipase).

Extractions séquencées

Suite à l'évaluation de l'action propre des solvants d'extractions, leur action combinée a été étudiée. Deux protocoles d'extractions séquencées ont été établis.

Le premier mode consiste à reproduire trois fois l'hydrolyse enzymatique par les enzymes protéolytiques (protéase XIV plus lipase VII), protocole repris de la littérature [2]. Les résultats sont représentés dans le figure 2.

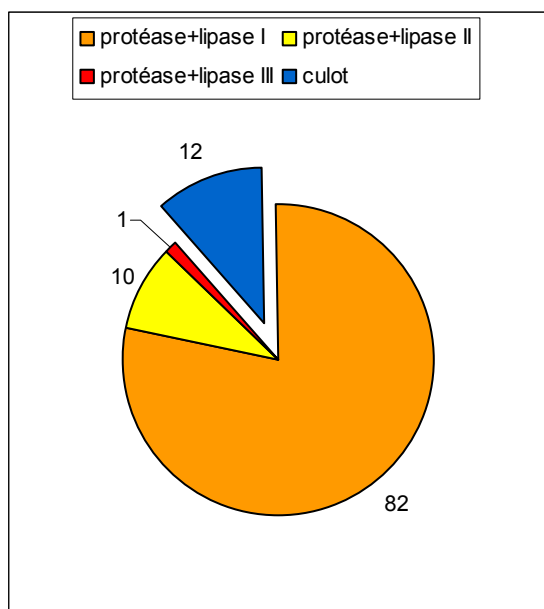


Figure 2: pourcentage d'extraction de l'hydrolyse enzymatique reproduite trois fois

La répétition de l'hydrolyse enzymatique permet d'augmenter le rendement global d'extraction de 80 à 90%. Seule la pertinence de la troisième étape est discutable au regard du temps de traitement de l'échantillon vis à vis de son efficacité (16 h d'incubation pour 1% de sélénium extrait).

Suite à ces résultats, un protocole utilisant successivement les propriétés distinctes des divers solvants a été mis en place. Après avoir appliqué deux fois l'extraction à l'aide d'enzymes protéolytiques (lipase VII plus protéase XIV), le culot subit une nouvelle extraction enzymatique, non protéolytique, avec l'utilisation de la Driselase. La dernière étape de l'extraction consiste à récupérer les chaînes polypeptidiques qui n'ont pu être digérées par les enzymes avec du SDS. Les résultats sont regroupés dans le figure 3.

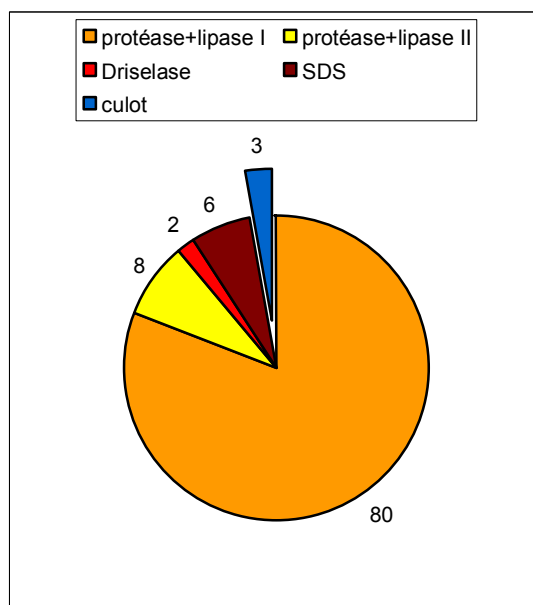


Figure 3 : pourcentage d'extraction des différents solvants agissant successivement

Le rendement global de l'extraction avoisine les 96%, soit la meilleure mise en solution du sélénium total testée sur une levure.

Essais sur une levure certifiée

Pour s'assurer de la reproductibilité et du respect de la spéciation sur ce type de matrice, les protocoles d'extractions séquencées ont été répétés sur un échantillon de levure de référence (Selm-1, NRC, Canada). Le matériel est certifié en sélénium total ainsi qu'en sélénométhionine (SeMet), voir tableau 2.

Valeurs certifiées	
Sélénium total	2059 ± 64 mg(Se)/kg
Sélénométhionine	3431 ± 157 mg(SeMet)/kg

Tableau 2 : valeurs certifiées du MRC Selm-1

Premier protocole d'extraction sur la levure certifiée

Détermination de la sélénométhionine, analyse de spéciation:

En premier lieu, le protocole d'extraction proposant la triple action du mélange protéase plus lipase a été appliqué afin de s'assurer de la validité de la méthode d'analyse de spéciation. Cette technique a été employée lors de l'intercomparaison ayant servi à certifier la levure étudiée [3]. La séparation des composés du sélénium a été réalisée au moyen d'une colonne échangeuse d'anions par chromatographie liquide couplée à un ICP-MS.

La dilution isotopique développée au LNE fait appel à la caractérisation de l'ajout de sélénométhionine isotopiquement modifiée en sélénium (⁷⁶SeMet) par dilution

isotopique inverse, permettant la traçabilité de l'analyse [4, 5].

Dans le cas d'une analyse du sélénium par ICP-MS, des facteurs affectant la justesse de la mesure des intensités doivent être pris en compte, tels :

- la correction de la formation d'hydrures de sélénium dans la cellule de collisions/réactions de l'ICP-MS affectant le comptage des isotopes 77 et 78[6];
- le biais en masse de l'appareil, discriminant les masses les plus faibles par rapport aux plus fortes [6, 7].

La valeur de sélénométhionine dans la levure a été déterminée à 3335 mg(SeMet)/kg avec un écart-type sur la mesure de 111 mg(SeMet)/kg. Cette concentration est en accord avec le certificat de la levure (3431 ± 157 mg(SeMet)/kg).

Une fois la concentration en sélénométhionine déterminée, le calcul de son incertitude a été réalisé. La démarche élaborée pour associer une incertitude à un résultat repose sur la méthode analytique préconisée par le GUM [8]. La figure 4 représente le diagramme de causes et effets regroupant tous les paramètres pouvant affecter le résultat. L'incertitude élargie sur la concentration de sélénométhionine donne une valeur de ± 230 mg(SeMet)/kg ($k=2$).

Détermination du rendement d'extraction, analyse en total

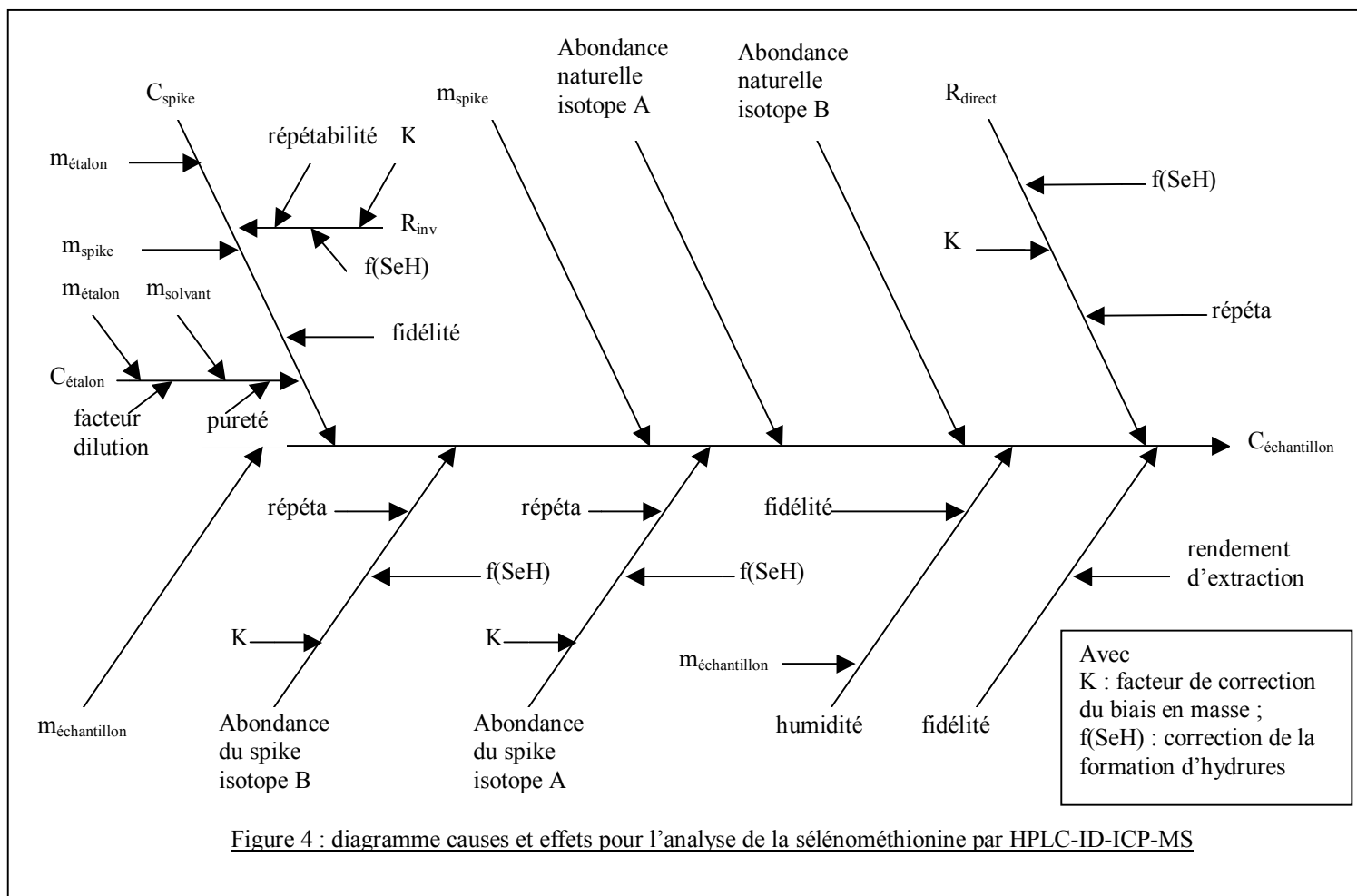
Afin de valider la méthode de dosage du sélénium total par dilution isotopique, la teneur de Se total dans la levure a été déterminée. La valeur mesurée avec son incertitude élargie est de 2044 ± 55 mg(Se)/kg ($k=2$). Cette valeur est en accord avec le certificat : 2059 ± 64 mg(Se)/kg.

Après l'étape d'extraction, les surnageants ont été minéralisés pour déterminer le sélénium total présent, la présence de $^{76}\text{SeMet}$ permettant aussi la quantification par dilution isotopique en analyse totale.

La concentration du sélénium dans le surnageant est de 1815 mg(Se)/kg. Le certificat de la levure annonce une concentration de 2059 mg(Se)/kg. Le rendement global d'extraction du sélénium équivaut donc à 88%.

Le calcul de l'incertitude sur la concentration de sélénium dans le surnageant a donné une valeur de ± 44 mg(Se)/kg ($k=2$). Ce calcul a été réalisé en tenant compte des mêmes facteurs influents sur le mesurande que ceux exprimés dans le diagramme causes et effets (figure 4).

L'incertitude sur le rendement d'extraction attribue une valeur relative égale à $\pm 3.5\%$ ($k=2$).



Au final, le résultat de l'analyse de spéciation de la sélénométhionine contenue dans la levure Selm-1 par l'extraction répétée deux fois de la Protéase XIV plus Lipase VII est de : 3335 ± 230 mg(SeMet)/kg, avec un rendement d'extraction du sélénium total de $87.9 \pm 3.5\%$ ($k=2$).

Second protocole d'extraction

Le second protocole d'extraction testé sur le MRC Selm-1 est celui établi aux seins des laboratoires. Après une extraction par protéase XIV plus lipase VII répétée une fois, le culot subit deux autres traitements avec l'emploi de la Driselase puis du SDS.

Détermination de la sélénométhionine, analyse de spéciation

Comme précédemment, l'analyse de spéciation s'est faite par HPLC-ID-ICP-MS avec ajout de $^{76}\text{SeMet}$. La concentration dosée a été de 3344 mg(SeMet)/kg. Le calcul de l'incertitude sur ce résultat a donné une valeur ± 280 mg(SeMet)/kg ($k=2$), soit un résultat en accord avec le certificat. La mise en solution du sélénium par ce mode d'extraction sur la levure respecte donc la spéciation originelle présente dans l'échantillon.

Détermination du rendement d'extraction, analyse en total

La minéralisation du surnageant issu de la levure a permis de réaliser l'analyse du sélénium total contenu. La valeur dosée a été de 2079 mg(Se)/kg, ce qui équivaut à un rendement d'extraction de 101% .

Le calcul d'incertitude mené sur ces deux résultats a permis de conclure à des incertitudes de ± 56 mg(Se)/kg et de $\pm 4.0\%$ respectivement pour le sélénium total présent dans le surnageant et pour l'efficacité de la mise en solution par notre protocole.

Le résultat final de la sélénométhionine présent dans la levure a été de 3344 ± 280 mg(SeMet)/kg avec une efficacité d'extraction du sélénium total de $101 \pm 4\%$ ($k=2$).

Le tableau 3 récapitule les résultats obtenus au cours de cette étude :

Mode d'extraction	[SeMet] mg(SeMet)/kg	Rendement d'extraction en %
Protéase/lipase x3	3335 ± 230	87.9 ± 3.5
Protéase/lipase x2 ; Driselase ; SDS	3344 ± 280	101 ± 4
Certificat du Selm-1	3431 ± 157	X

Tableau 3 : résultats obtenus en fonction de l'extraction

Conclusion

L'objectif visé consistait à élaborer une extraction quantitative du sélénium depuis une levure. L'amélioration de la mise en solution apporte une meilleure validité pour la certification de matériaux. Cet objectif est atteint.

Les premiers essais de faisabilité ont été réalisés sur une levure sélénée caractérisée en sélénium total par notre laboratoire. Ils ont mis en évidence la possibilité d'une extraction quantitative du sélénium présent dans cet échantillon avec un rendement de 96% .

Par la suite ces tests ont été répétés sur un matériau certifié en sélénium total et en sélénométhionine, deux modes d'extractions sur ce CRM ayant été appliqués afin d'assurer la validation de la méthode.

Le premier mode d'extraction, correspondant au protocole employé lors de sa certification du Selm-1, a contribué à valider :

- le couplage d'analyse (HPLC-ICP-MS) mis en place au laboratoire ;
- la technique de dosage par dilution isotopique (ID) en sélénium total et en analyse de spéciation.

Les teneurs en sélénium total et en SeMet se sont révélées conformes au certificat, validant de ce fait les méthodes employées.

Par ailleurs l'application du premier protocole d'extraction dont le rendement calculé à $87.9 \pm 3.5\%$ ($k=2$) a démontré la nécessité d'améliorer sensiblement ce niveau dans le cadre d'une certification.

Les méthodes d'analyse validées, le protocole établi au sein du laboratoire a été reproduit sur le CRM. La valeur déterminée pour la sélénométhionine a été en accord avec le certificat. Ce mode opératoire respecte donc la spéciation originelle de l'échantillon pour cette espèce de sélénium.

Enfin le calcul du rendement d'extraction a été sensiblement amélioré avec une efficacité de $101 \pm 4\%$. Même si la teneur de la sélénométhionine n'a pas été augmentée avec l'efficacité de la mise en solution, l'amélioration du rendement global d'extraction en sélénium concourt à la fiabilité nécessaire à une certification de matériau.

Bien que le calcul d'incertitude n'ait pas été réalisé sur la première levure de l'étude, il est à noter que l'efficacité du protocole établi semble reproductible sur ce type de matrice avec des rendements similaires pour les deux échantillons étudiés.

Références

- [1] C. Casiot, J. Szpunar, R. Lobinski et M. Potin-Gautier, "Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, vol. 14, pp. 645-650, Avril 1999.
- [2] A. Polatajko, B. Banas, J. Ruiz Encinar et J. Szpunar, "Investigation of the recovery of selenomethionine from selenized yeast by two-dimensional LC-ICP MS", Analytical

and Bioanalytical Chemistry, vol. 381, pp. 844-849, Février 2005.

[3] Z. Mester, S. Willie, L. Yang, R. Sturgeon, J.A. Caruso, M.L. Fernandez, P. Fodor, R.J. Goldschmidt, H. Goenaga-Infante, R. Lobinski, P. Maxwell, S. McSheehy, A. Polatajko, B.B. Sadi, A. Sanz Medel, C. Scriver, J. Szpunar, R. Wahlan et W. Wolf, "Certification of a new selenized yeast reference material (Selm-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes", Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol.385, pp. 168-180, mai 2005.

[4] C. Stumpf, G. Labarraque, "La dilution isotopique par ICP/MS : une méthode de référence pour l'analyse d'éléments traces ", Spectra Analyse, vol 234, pp. 14-18, 2003.

[5] C. Stumpf, G. Labarraque, "La métrologie chimique inorganique par spectrométrie de masse ICP/MS ; seconde phase de développement ", Revue française de métrologie, vol 1, pp. 7-17, 2005.

[6] L. Hinojosa Reyes, J.M. Marchante Gayon, J.I. Garcia Alonso et A. Sanz-Medel, "Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS", Journal of Analytical Atomic Spectrometry, vol. 18, pp. 11-16, Janvier 2002.

[7] S.J. Hill, L.J. Pitts et A.S. Fisher, "High-performance liquid chromatography-isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation studies : an overview", Trends in Analytical Chemistry, vol. 19, pp. 120-126, Février-Mars 2000.

[8] Guide To The Expression Of Uncertainty In Measurement, Genève : International Organization for Standardization, 1993.