

## INTERET DES ANALYSES DE SPECIATION EN AGRO-ALIMENTAIRE : EXEMPLES D'APPLICATIONS

**Vacchina Véronique<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UT2A - Hélioparc Pau-Pyrénées, 2 avenue du président Angot - 64000 PAU

[veronique.vacchina@uni-pau.fr](mailto:veronique.vacchina@uni-pau.fr)

### RÉSUMÉ

Les éléments trace peuvent être soit toxiques, soit essentiels de par leur rôle dans les fonctions métaboliques. Mais à la fois la toxicité et l'essentialité sont fortement dépendantes de la forme chimique sous laquelle ils se trouvent. Par conséquent la connaissance de cette-dernière est de première importance pour appréhender la biodisponibilité des éléments trace essentiels (en particulier dans le cas de suppléments alimentaires) ou pour évaluer la toxicité de certains aliments. Il existe donc un réel besoin pour le développement de méthodes analytiques justes, précises et reproductibles pour les analyses de spéciation dans les aliments, compléments alimentaires mais aussi dans les tissus animaliers et pour l'évaluation des déchets. Les techniques de couplage, basées sur la combinaison de techniques de séparation (HPLC, GC, électrophorèse capillaire) avec une détection par spectrométrie de masse suite à une préparation d'échantillon adéquate (fonction des espèces recherchées) sont un outil performant pour effectuer une rapide évaluation des échantillons agro-alimentaires. Les approches analytiques incluent : (1) les analyses de fractionnement; (2) le dosage quantitatif des espèces d'intérêt qu'elles soient essentielles, telles que la sélénométhionine qui est dosée pour évaluer la qualité des suppléments alimentaires sélénisés, ou qu'elles soient toxiques; (3) l'établissement d'empreintes relatives aux éléments trace ou la détection de marqueurs sur l'origine commerciale des produits. L'objectif de la présentation est d'illustrer l'état de l'art concernant les méthodologies analytiques pour la spéciation dans le domaine de l'agro-alimentaire. Elles permettent de répondre aux problématiques d'évaluation du bénéfice/risque, de biodisponibilité et de traçabilité aux travers d'exemples concrets. Les moyens de contrôle qualité de ces analyses sont également abordés.

### ABSTRACT

#### Interest of speciation analysis in foodstuff : examples of applications

Trace elements can be toxic or essential thanks to their role in metabolic functions. But both their toxicity and essentiality highly depend on their chemical form. As a consequence the knowledge of this latter is of primary importance to understand essential trace elements bioavailability (especially in the case of feed additives) or to evaluate the toxicity of certain elements. Therefore there is a real need for the development of accurate, precise and reproducible analytical methods for speciation analysis in feeds and feed additives but also in animal tissues and for wastes evaluation. Hyphenated techniques, based on the combination of separation techniques (HPLC, GC, capillary electrophoresis) with mass spectrometry detection following the proper sample preparation (function of the species investigated) are a powerful tool to perform a rapid evaluation of foodstuff. Analytical approaches include : (1) fractionation analysis; (2) quantitative determination of the species of interest either essential, like selenomethionine which is determined to evaluate selenized feed additives quality, or toxic; (3) the establishment of trace elements fingerprints or the detection of markers on the commercial origin of the products. The objective of the presentation is to highlight the state-of-the-art regarding analytical methodologies for speciation in foodstuff. They allow the evaluation of the benefit/risk approach, the bioavailability and the traceability through concrete examples. Control quality tools of those analyses will also be touched on.

## INTRODUCTION

Le bon fonctionnement des organismes vivants dépend très fortement des éléments trace à plusieurs niveaux. Certains métaux, comme le Cd, le Pb, le Hg... sont toxiques alors que d'autres comme le Cu, le Zn ou le Fe... sont essentiels puisqu'ils jouent un rôle dans les processus physiologiques et peuvent dès lors être artificiellement ajoutés aux aliments. Mais il est aujourd'hui bien admis que le dosage de la teneur totale en éléments trace est insuffisante pour évaluer l'aspect bénéfice/risque des aliments. Les analyses de fractionnement, permettant de caractériser les éléments trace dans une fraction bien définie (fraction soluble à l'eau...), donnent des informations plus poussées. Elles vont par exemple permettre d'évaluer leur bioaccessibilité. Néanmoins, la bioaccessibilité, de même que la biodisponibilité, sont très fortement dépendants de la forme chimique sous laquelle se trouve l'élément trace. Cette information ne peut être obtenue que par des analyses de spéciation. Il est donc devenu de première importance de développer des méthodes analytiques, précises, sensibles, justes et reproductibles pour doser les espèces d'intérêt dans les aliments.

Mais outre la caractérisation des aliments, la traçabilité des éléments ingérés est également importante à suivre, en particulier dans le cadre de la nutrition animale, et ce pour plusieurs raisons : (i) une raison purement scientifique visant à comprendre les mécanismes mis en jeu; (ii) une caractérisation des fluides et tissus biologiques (muscles, abats) pouvant à leur tour être consommés. Cette traçabilité inclut le dosage des espèces d'intérêt dans des matrices telles que le sang ou les tissus biologiques pour évaluer leur assimilation ou dans les urines par exemple pour évaluer leur élimination.

L'identification et la quantification des espèces d'intérêt peuvent être obtenues par des analyses de spéciation. Le couplage de techniques de séparation de haute résolution (HPLC, GC, électrophorèse capillaire) avec la spectrométrie de masse (ICP MS, ESI MS/MS) suite à une préparation d'échantillon adéquate permet d'accéder à ces informations.

Le but de la présentation est donc d'expliciter différents exemples représentatifs d'analyses de spéciation dans des échantillons agro-alimentaires, à la fois pour des éléments toxiques et des éléments essentiels, et leur utilisation pour tracer ces éléments.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Bioaccessibilité *in-vitro*

L'extraction est réalisée en deux étapes correspondant aux conditions de l'estomac et de l'intestin. L'échantillon est incubé durant 4h à 37°C avec 5 mL de jus gastrique (1% de pepsine dans NaCl 0.15 M acidifié avec du HCl à pH 2). Puis les échantillons

sont neutralisés à pH neutre par addition de 2 M de NaHCO<sub>3</sub>. Finalement, 5 mL de jus intestinal (3% de pancréatine, 1.5% d'amylase et 1% de sels de bile dans du NaCl 0.15 M) sont ajoutés et les échantillons sont à nouveau incubés 4 h à 37°C. Après extraction, le surnageant est séparé par centrifugation (3000 rpm, 5 min) et analysé.

### 1.2. Fractionnement du Se dans les levures sélénées

Le protocole d'extraction séquentielle est décrit en détail ailleurs (Encinar *et al.*, 2003). Brièvement, les levures sont extraites séquentiellement par de l'eau, de la Driselase, du SDS, de la protéase et de l'acide nitrique. Le Se total est mesuré dans chaque extrait et un profil HPLC – ICP MS est également établi.

### 1.3. Spéciation du sélénium

Le dosage de la SeMet dans les levures sélénées est effectué après incubation (16h, 37°C) dans 5 mL de lipase/protéase (10/20 mg) dans un tampon 30 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl. L'extrait est alors analysé par couplage de la chromatographie liquide d'échange d'anions avec détection ICP MS.

Le dosage simultané des acides aminés sélénés (SeMet et SeCys) a été décrit en détail ailleurs dans le sang (Bierla *et al.*, 2008a) et dans les tissus biologiques (Bierla *et al.*, 2008b). Brièvement, il est réalisé par digestion enzymatique après stabilisation de la SeCys par alkylation par l'iodoacétamide. Le dosage est alors réalisé par HPLC – ICP MS après purification de l'extrait sur colonne d'exclusion stérique.

### 1.4. Spéciation des glycinates dans les prémélanges

Le protocole de dosage a été décrit en détail ailleurs (Vacchina *et al.*, 2010). Brièvement, les glycinates sont extraits par un tampon acétate d'ammonium à pH neutre et analysés par couplage de l'électrophorèse capillaire avec l'ICP MS.

### 1.5. Spéciation de l'As dans les urines

L'échantillon d'urine est dilué deux fois dans de l'eau ultrapure. Les espèces arsénées sont séparées sur une colonne d'échange d'anion (Hamilton PRPX-100) par du carbonate d'ammonium à pH 8.9 et détectées par ICP MS.

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

### 2.1. Bioaccessibilité *in-vitro*

La biodisponibilité représente la fraction d'un élément qui atteint le sang à partir du tractus gastro-intestinal

et qui agit alors sur l'organisme exposé. La première étape pour accéder à la biodisponibilité est l'étude de la bioaccessibilité qui rend compte de la fraction maximale libérée théoriquement durant le tractus gastro-intestinal. *In-vitro*, une façon d'évaluer l'efficacité de la digestion chez l'humain est de simuler les processus se produisant dans l'estomac et le petit intestin. Cette approche pourrait notamment être utilisée pour évaluer les fractions d'éléments trace bioaccessibles dans les parties comestibles de la volaille.

## 2.2. Fractionnement du Se dans les levures sélénées

Le Se est un élément très utilisé en supplémentation alimentaire, particulièrement en nutrition animale, puisqu'une déficience en Se cause notamment des problèmes au niveau de la reproduction. L'une des sources de Se les plus utilisées est les levures sélénées de part leur bonne biodisponibilité. La caractérisation de ces levures est donc de première importance. Les analyses de fractionnement sont une première approche pour y parvenir. Elles peuvent être réalisées via des protocoles de dégradation contrôlés, soit seuls soit dans un schéma d'extractions séquentielles, suivi par le dosage de la teneur totale en élément dans chaque fraction par ICP MS. Ceci permet de vérifier la balance en masse entre l'élément total extrait dans chaque fraction et dans l'échantillon total. En parallèle, la distribution de l'élément en termes de poids moléculaire peut être étudiée par couplage de la chromatographie d'exclusion stérique avec l'ICP MS. Une procédure d'extractions séquentielles du Se a été développée pour suivre le fractionnement des composés sélénés dans les levures. Cette approche donne une empreinte caractéristique des batchs étudiés et peut, dans beaucoup de cas, permettre de distinguer des batchs de différents producteurs. Cependant, quand les batchs sont très similaires, une approche plus poussée impliquant l'identification des espèces par spectrométrie de masse moléculaire est nécessaire.

## 2.3. Spéciation du sélénium

Si les levures sélénées sont une source économique de sélénométhionine (SeMet), la forme de Se supposée être la plus biodisponible. Être capable de doser la SeMet totale dans les levures sélénées est donc de première importance. Ceci peut être réalisé par couplage de la chromatographie liquide et de l'ICP MS suite à une extraction protéolytique qui permet de casser les liaisons entre acides aminés et donc de libérer la SeMet incluse dans des protéines. La Figure 1a présente un chromatogramme typique obtenu après digestion enzymatique d'une levure sélénée. Elle montre clairement que le composé majoritaire dans les levures sélénées est la SeMet. Sous couvert de modifications permettant de gérer les

effets de matrice et les faibles niveaux de concentration, cette méthode analytique est transposable aux prémélanges et aux aliments. Cette approche analytique permet donc un contrôle qualité des produits commerciaux.

Après supplémentation, le Se se retrouve dans les fluides et tissus biologiques sous la forme de deux acides aminés, la SeMet et la sélénocystéine (SeCys). Si la SeCys est considérée comme biologiquement active, ce n'est pas le cas de la SeMet, d'où la nécessité d'une méthode analytique pour les discriminer entre eux. Une méthode basée sur le couplage HPLC – ICP MS a donc été développée notamment dans le sang, les tissus biologiques (muscles, abats) ou les œufs. La Figure 1b montre des chromatogrammes typiques obtenus dans du foie et des muscles. La méthode permet donc clairement de différencier les deux acides aminés. Son application au cours de tests de supplémentation permet donc d'étudier l'assimilation (organes de stockage, forme de stockage) et l'élimination du Se mais également d'évaluer la spéciation du Se dans des échantillons pouvant par la suite entrer dans la chaîne alimentaire humaine.

## 2.4. Spéciation des glycinates

Les glycinates (nom générique donné aux complexes d'éléments trace avec la glycine) de Cu, Mn et Zn sont l'une des formes les plus biodisponibles de ces trois éléments, ce qui explique leur utilisation en tant qu'additif alimentaire pour les animaux. Néanmoins, faute de méthode analytique permettant de les doser spécifiquement, leur inclusion dans les aliments est toujours basée sur les données des sulfates. Par ailleurs, aucune méthode analytique n'existait pour essayer de mieux comprendre les raisons de cette meilleure biodisponibilité. Une méthode basée sur le couplage CE – ICP MS a donc été développée. Elle a notamment permis de doser ces trois glycinates dans les prémélanges, avec des justesses variant entre 90 et 114% selon les glycinates et les prémélanges étudiés.

## 2.5. Evaluation des rejets : exemple de la spéciation de l'As dans les urines

Un autre point important en nutrition animale est d'estimer les rejets. Les analyses de spéciation permettent également de caractériser ces rejets de manière plus précise que la simple mesure de la teneur totale. En effet elles permettent de savoir si les éléments trace sont rejetés sous une forme toxique ou non. A titre d'exemple, un chromatogramme typique d'une urine dopée en cinq espèces d'As est montré Figure 1c. Cette analyse permet donc notamment de doser spécifiquement l'As inorganique (As(III) et As(V)), formes les plus toxiques de l'As, rejeté dans l'environnement. La spéciation d'autres éléments toxiques, tels que l'étain, ou d'autres éléments

essentiels, tels que le Se, dans les urines est également possible.

## 2.6. Contrôle qualité pour les analyses de spéciation

Différentes façons de valider une méthode analytique et d'assurer le contrôle qualité des analyses existent. Le premier est l'utilisation de Matériaux de Référence Certifiés (MRCs). Cependant le choix d'un MRC approprié est fonction de deux facteurs principaux : (i) la matrice doit être la même que celle des échantillons étudiés et (ii) la concentration doit être du même ordre de grandeur que celle des échantillons à analyser. Le principal problème pour les échantillons agro-alimentaires est un manque de MRCs correspondant à ces deux critères. Même si le nombre de MRCs disponibles est en augmentation, il reste insuffisant par rapport aux espèces et/ou matrices à caractériser.

Pour compenser ce problème, des Matériaux de Référence de Laboratoire (MRLs) peuvent être utilisés. Leur utilisation permet d'évaluer la reproductibilité d'une méthode par établissement d'une carte de contrôle. La justesse peut également être évaluée quand le MRL provient d'un programme d'inter-comparaison.

Une autre façon de valider une méthode est basée sur des dopages et l'évaluation de leur taux de recouvrement. Un ajout de glutathion peroxydase a

notamment été utilisé pour valider le dosage de la SeCys dans les tissus biologiques. Idéalement, l'ajout d'une espèce isotopiquement enrichie qui permet d'évaluer la dégradation des espèces d'intérêt durant le protocole analytique est la meilleure solution (analyse par dilution isotopique). Cependant, ici aussi, un manque d'espèces enrichies isotopiquement disponibles est à noter.

Finalement, la balance en masse entre la somme des espèces et la teneur totale en l'élément doit être vérifiée.

## CONCLUSION

Les analyses de spéciation élémentaire sont donc un outil performant pour caractériser les aliments, que ce soit pour les humains ou les animaux et l'évaluation d'une approche bénéfice/risque. Mais au-delà de cela, elles permettent d'étudier la métabolisation et l'élimination des éléments ingérés. Un des facteurs clés reste l'amélioration du contrôle qualité en l'absence de MRCs.

D'autres espèces pour lesquelles des analyses de spéciation ne sont pas encore disponibles dans les matériaux biologiques sont aujourd'hui en cours de développement. C'est le cas notamment du dosage du Cr(VI) dans les matrices agro-alimentaires.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bierla K., Vacchina V., Szpunar J., Bertin G., Lobinski R., 2008a. *J.Anal.At.Spectrom.*, (23), 508-513.  
Bierla K., Dernovics M., Vacchina V., Szpunar J., Bertin G., Lobinski R., 2008b. *Anal.Bioanal.Chem.*, (390), 1789-1798.  
Encinar J.R., Sliwka-Kaszynska M., Polatajko A., Vacchina V., Szpunar J., 2003. *Anal.Chim.Acta.*, (500), 171-183.  
Vacchina V., Oguey S., Ionescu C., Bravo D., Lobinski R., 2010. *Anal.Bioanal.Chem.*, (398), 435-449.

**Figure 1.** (a) chromatogramme AE HPLC – ICP MS typique obtenu pour l'extrait protéolytique d'une levure sélénée. (b) chromatogrammes RP HPLC – ICP MS typiques obtenus pour un échantillon de foie (en gris) et un échantillon de muscle (en noir). (c) chromatogramme AE HPLC – ICP MS typique obtenu pour de l'urine enrichie en 5 espèces arsénisées.

