

Développement de l'analyse de spéciation du sélénium dans des compléments alimentaires par la détermination de la sélénométhionine

Development of speciation analysis for selenium in nutritional supplements by the determination of the selenomethionine

Sébastien SANNAC^{1,2}, Florence PANNIER², Guillaume LABARRAQUE¹, Paola FISICARO¹ et Martine POTIN-GAUTIER²

¹ Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE), 1 Rue Gaston Boissier, 75724 Paris Cedex 15, France, paola.fisicaro@lne.fr.

² Université de Pau et des Pays de l'Adour CNRS/UMR 5254, Laboratoire de Chimie Analytique, Bio-Inorganique et Environnement (IPREM), Hélioparc, 2 Avenue Pierre Angot, 64053 Pau Cedex 9, France.

Résumé

Le développement d'une méthode de référence pour la détermination de la sélénométhionine dans des compléments alimentaires est présenté. L'utilisation de la chromatographie liquide reliée à une détection par spectrométrie atomique permet l'analyse de spéciation des échantillons. La traçabilité des analyses est assurée par l'emploi d'une méthode primaire, la dilution isotopique. Les protocoles mis en place sont validés par l'analyse d'un matériel de référence certifié.

MOTS CLÉS : TRAÇABILITÉ, DILUTION ISOTOPIQUE, SPÉCIATION, SÉLÉNOMÉTHIONINE, HPLC-ICP-MS, COMPLÉMENT ALIMENTAIRE.

Abstract

The development of a reference method in analytical chemistry is presented. Liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry is employed to perform speciation analysis. Applications are developed for the determination of selenomethionine in nutritional supplements. The use of isotope dilution, a primary method, is required to enable measurement traceability. Method validation is ensured by the study of a certified reference material.

KEY WORDS: TRACEABILITY, ISOTOPE DILUTION, SPECIATION, SELENOMETHIONINE, HPLC-ICP-MS, NUTRITIONAL SUPPLEMENT.

1. Introduction

La spéciation d'un élément chimique, c'est-à-dire la distribution de ses espèces au sein d'un échantillon [1], est une notion à prendre en compte pour pleinement comprendre l'impact qu'il peut avoir sur l'environnement. La caractérisation des formes chimiques sous lesquelles apparaît un élément est ainsi devenue une priorité pour de nombreux laboratoires de recherches. Avec l'évolution de la législation, cette notion sort du « laboratoire » pour être prise en compte par les industriels. En effet, plusieurs directives et règlements européens font état du concept de spéciation des éléments :

- la directive 2000/60/CE (Directive Cadre Eau : DCE) concernant une politique communautaire pour la protection et la gestion des eaux ;
- le règlement n° 466/2001 sur la fixation de teneurs maximales de contaminants dans les denrées alimentaires ;
- la directive 2002/46/CE concernant la composition des compléments alimentaires ;

- le règlement n° 95/2002 (RoHS) sur la restriction d'usage de certaines substances dangereuses dans les équipements électriques et électroniques ;
- le règlement N°1907/2006 (REACH) prévoyant l'évaluation des risques liés aux substances chimiques.

Au vu des conséquences que peuvent avoir les résultats d'une analyse, tant du point de vue judiciaire que sur l'impact économique, il est essentiel d'assurer la qualité des mesures. Des efforts doivent donc être menés pour s'assurer de leur justesse, en particulier pour :

- valider la méthode d'analyse employée ;
- assurer la traçabilité des résultats.

Les moyens dont disposent les laboratoires pour y parvenir sont l'utilisation de matériaux de référence certifiés (MRC) ou la participation à des essais d'aptitudes sous certaines conditions [2]. Dans ce cadre, l'une des missions du Laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) est le développement de ces outils pour assurer le transfert de la traçabilité des analyses vers les utilisateurs. La mise en place de méthodes primaires [3] utilisant la dilution isotopique [4] et la reconnaissance des capacités de mesures (CMC) [5] permet au LNE de fournir des valeurs de référence lors de la certification de MRC ou lors de participations à l'organisation d'essais d'aptitudes [2,6,7].

Dans le cadre de sa politique de R&D, le LNE a souhaité mettre en place les moyens analytiques permettant de réaliser l'étude de la spéciation des éléments dans différents types de matériaux. Le développement de ces techniques s'est fait dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement (LCABIE), laboratoire reconnu pour son savoir-faire à mener ce type d'analyse. La première application développée a concerné le contenu en sélénium de compléments alimentaires. Cet oligo-élément présente des propriétés bénéfiques pour l'Homme [8] et plusieurs types de suppléments nutritionnels ont vu le jour sur le marché pour limiter toute carence [9]. Cependant, le sélénium peut rapidement s'avérer toxique au dessus d'un certain seuil de présence dans le corps [8]. Son métabolisme étant dépendant de ses espèces, il est évident qu'il est nécessaire de contrôler les formes et les teneurs sous lesquelles est administré et assimilé cet élément dans ce type d'échantillons.

La méthode analytique choisie est l'association d'une chromatographie liquide haute performance (HPLC) à un spectromètre de masse à couplage inductif du plasma (ICP-MS) pour permettre d'utiliser la dilution isotopique comme technique de mesure.

2. Matériels et méthodes analytiques mises en œuvre

La démarche d'une analyse de spéciation repose sur plusieurs étapes essentielles :

- mise en solution des espèces du sélénium présentes dans l'échantillon ;
- séparation des différentes formes par HPLC ;

- détection du sélénium en sortie de colonne chromatographique par l'ICP-MS.

Pour chacune de ses étapes, il faut s'assurer que la spéciation originelle de l'échantillon est respectée sans qu'aucune modification de la répartition des espèces n'intervienne.

2.1. Echantillons étudiés

Deux échantillons sont étudiés pour leur contenu en sélénium. Il s'agit de compléments alimentaires préparés avec des levures : *saccharomyces cerevisiae* cultivées sur un milieu riche en sélénium qui lui permet d'accumuler de forte teneur du métalloïde [10]. L'assimilation du sélénium par la levure mène à une multitude de composés organiques dans cet organisme [11] avec la formation d'une espèce majoritairement présente : la sélénométhionine (SeMet) [10,12]. Cet acide aminé est l'analyte d'intérêt principal dans ce type de matrice car bien qu'il semble être moins toxique que d'autres espèces comme les sels de sélénium inorganiques, sa capacité à s'accumuler dans l'organisme peut mener à une surexposition en sélénium [13].

Le premier échantillon analysé (Selm-1) est une levure dont la teneur en sélénométhionine a été une première fois certifiée [14] puis récemment révisée [15]. Il se présente sous forme d'une poudre lyophilisée. Cet échantillon a servi à évaluer les performances de la méthode d'analyse et a permis ainsi sa validation. Le second échantillon (avec une concentration environ six fois moins élevée) est issu d'une comparaison internationale organisée par le Comité consultatif pour la quantité de matière (CCQM) entre des laboratoires nationaux de métrologie et des laboratoires experts dans le domaine de la spéciation. Le LNE a participé à cette étude dans le cadre de la détermination de la teneur totale en sélénium dans l'échantillon. Cette intercomparaison a permis d'établir une valeur de concentration consensuelle en SeMet dans l'échantillon [15]. Cette étude a surtout mis en avant la difficulté que représente la détermination de la sélénométhionine dans ce type de matrice. Ce second échantillon (P-86) se présente sous la forme de comprimés pharmaceutiques où la levure séléniée est enrobée d'excipients (cellulose, phosphate de calcium, oxyde de silicium, sels de magnésium et oxyde de titane).

2.2. Traitement des échantillons

Pour l'échantillon P-86, le premier traitement appliqué a été le broyage des comprimés à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate. Par la suite, les deux échantillons (Selm-1 et P-86) ont subi chacun deux mises en solution différentes. Les protocoles précédemment mis en place au LCABIE [12,16] ont été optimisés. Cette optimisation a été présentée lors d'une communication de la part du laboratoire [17].

Le protocole 1 repose uniquement sur une hydrolyse enzymatique de la levure : incubation 16 h à 37 °C de 200 mg d'échantillon en présence de 20 mg de protéase XIV et de 10 mg de lipase VII dans une solution tampon

(5 mL de Tris-HCl à 30 mmol·L⁻¹ et pH = 7). Le surnageant est séparé du culot par centrifugation (2 500 tours par minute, 10 min) et le résidu solide subit deux nouvelles extractions enzymatiques identiques. A la fin du protocole, les surnageants sont mutualisés et mis en présence de 0,1 % (v/v) de 2-mercapto-éthanol afin d'éviter leur oxydation.

Le protocole 2 reprend les deux premières étapes du précédent mode opératoire mais est complété par l'utilisation de deux autres agents : la Driselase puis le sodium dodécyl-sulfate (SDS). Chaque réactif (100 mg) est mis successivement en présence du culot de la précédente extraction avec 5 mL de Tris-HCl. A la fin du mode opératoire, les surnageants sont également mutualisés et protégés d'une éventuelle oxydation par l'ajout de 2-mercapto-éthanol.

Pour la détermination du sélénium total, les extraits des échantillons subissent une étape de minéralisation (digestion en présence d'acide nitrique et d'eau oxygénée avec activation par champ micro-ondes), cette étape permet ainsi d'établir les rendements d'extraction sur le sélénium total. Pour leur analyse en spéciation par le couplage HPLC-ICP-MS, les échantillons sont simplement dilués.

2.3. Séparation des espèces de sélénium

Le système de chromatographie liquide est un ensemble SpectraSYSTEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique). La séparation est effectuée sur une colonne échangeuse d'anions composée d'une phase stationnaire de polystyrène-divinylbenzène liée à des groupements échangeurs d'anions quaternaires en triméthyl-ammonium (PRP-X100, 250 mm × 4,1 mm, 10 µm, Hamilton Company, Reno, Nevada, Etats-Unis d'Amérique) équipée d'une pré-colonne de phase stationnaire identique. Les liaisons entre l'HPLC, la colonne et l'ICP-MS sont réalisées avec des tubes en Poly-éther-éther-cétone (PEEK, 0,25 mm × 1,6 mm). La phase mobile utilisée est composée de 5 mmol·L⁻¹ de citrate d'ammonium au pH de 5,6 plus 2 % (v/v) de méthanol [17,18] avec un débit de 1 mL·min⁻¹. Le volume d'injection est fixé à 100 µL.

2.4. Détection par ICP-MS

La détection des espèces s'effectue en sortie de la colonne chromatographique. Le spectromètre de masse à ionisation par couplage inductif du plasma est le modèle PQ-ExCell (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique). L'appareil est de type quadripolaire utilisant une cellule de collisions/réactions, nommée CCT (*Collision Cell Technology*), composée d'un hexapôle [7]. Les gaz de la CCT utilisés sont l'hydrogène et l'hélium à des débits de 3,1 mL·min⁻¹ et 3,8 mL·min⁻¹ respectivement. Plusieurs paramètres sont corrigés pour obtenir les intensités les plus justes possibles : le temps mort du détecteur [20], la formation d'hydrures de sélénium dans la cellule CCT à

cause de la présence d'hydrogène (SeH⁺) et le biais en masse dû à l'interface ICP [21].

Pour la détermination du sélénium en mode total, les minéralisats des extraits sont directement analysés par ICP-MS.

2.5. Dilution Isotopique

La technique choisie pour la quantification est la dilution isotopique (DI) par espèce marquée : la sélénométhionine est dosée avec l'ajout d'un étalon de SeMet dont la distribution isotopique en sélénium est modifiée. L'ajout utilisé (nommé spike) est enrichi en isotope 76 (⁷⁶SeMet) et a été fourni par les organisateurs lors de l'exercice de l'intercomparaison (CCQM-P-86). Il est ajouté à l'échantillon avant le début de l'extraction. Le rapport choisi pour mener la DI est l'isotope 78 sur l'isotope 76. Une approche métrologique de la DI est utilisée [6] afin d'assurer le caractère primaire de la méthode et de permettre de relier les résultats au Système international d'unités (SI).

2.6. Évaluation des incertitudes

Pour assurer la comparaison des résultats entre eux et permettre la traçabilité des analyses, les incertitudes sur les différentes mesures sont calculées. Le procédé employé repose sur la méthode analytique préconisée par le GUM [22]. A partir d'un modèle mathématique qui décrit l'ensemble du processus de mesure et de l'évaluation des incertitudes types de chaque grandeur prise en compte, l'incertitude est calculée par la loi de propagation des incertitudes [22]. Le modèle mathématique utilisé est l'équation générale de la dilution isotopique [6] auquel sont ajoutées les corrections liées à la détection par ICP-MS. Le détail des variables prises en comptes pour le calcul des incertitudes a été explicité précédemment [17].

3. Résultats

3.1. Echantillon Selm-1

L'efficacité d'extraction des deux solvants a été jugée par le calcul du rendement de mise en solution du sélénium total (tableau 1). Le second protocole présente une plus grande efficacité avec une extraction quantitative du sélénium. Ce résultat assure que la teneur en SeMet n'est pas biaisée par un mauvais équilibre entre l'analyte et l'espèce marquée isotopiquement (⁷⁶SeMet).

Tableau 1

Rendement d'extraction sur le Selm-1 des deux protocoles.

	Rendement d'extraction en % (k = 2)
Protocole 1	89 ± 3
Protocole 2	102 ± 3

Les deux extraits de l'échantillon de Selm-1 ont été par la suite analysés par couplage HPLC-ICP-MS. La figure 1 représente les chromatogrammes obtenus. Il est à noter que le rapport isotopique avait été choisi égal à 2 entre les deux isotopes (78 et 76) pour mener la dilution isotopique. Il est usuel de prendre un rapport égal à 1 afin d'obtenir les meilleures performances spectrométriques de l'ICP-MS, mais la teneur en SeMet dans le Selm-1 était trop importante pour ne pas générer des effets de dilution avec l'ajout d'une grande quantité de spike. Il ressort de la figure 1 que, sur cette séparation, un seul composé du sélénium est majoritairement présent quel que soit le protocole de mise en solution appliqué. Cette espèce a été identifiée comme étant de la sélénométhionine par la présence de l'étalon marqué isotopiquement. Ce résultat est en accord avec ceux de la littérature [10,12,14]. La séparation sur cette colonne, possédant un mécanisme d'échanges d'anions, ne permet pas de distinguer correctement d'autres espèces de sélénium, seuls deux pics de faible intensité sont observables pour des temps de rétention entre une et deux minutes. Ces composés ne correspondaient avec aucune des autres espèces étudiées au laboratoire, sélénite ou séléniate de sodium, et par conséquent ils n'ont pu être identifiés.

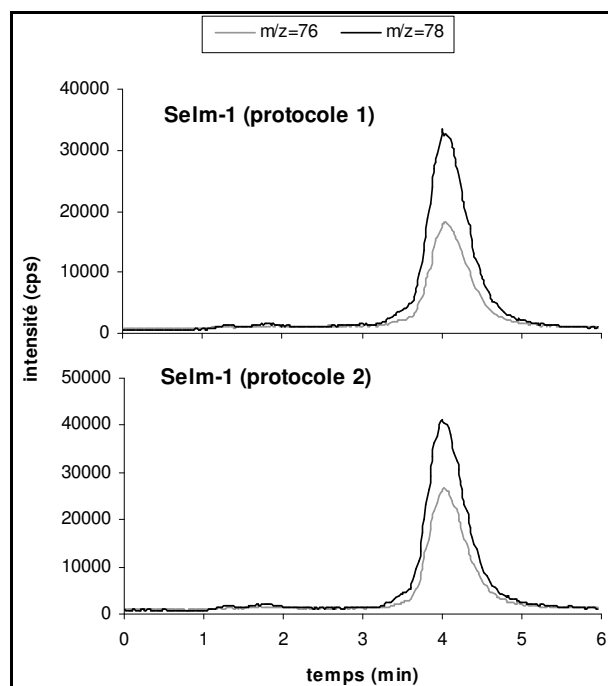


Fig. 1. – Chromatogrammes des deux extraits de Selm-1.

Le tableau 2 regroupe les résultats sur la détermination de SeMet dans le Selm-1 en fonction du protocole d'extraction.

Les deux protocoles d'extraction mènent à une même teneur en SeMet dans l'échantillon Selm-1. Cette teneur est compatible avec la valeur fournie par le certificat d'analyse du Selm-1 ce qui permet de valider les processus de mesure mis en place au laboratoire.

Malgré la meilleure efficacité d'extraction en sélénium du protocole n° 2, la quantité en SeMet mise en solution

depuis l'échantillon n'a pas été augmentée. Ceci traduit le fait qu'avec le protocole n° 1, toute la sélénométhionine a déjà pu être extraite ou que l'équilibre entre SeMet de l'échantillon et l'ajout de ⁷⁶SeMet a été atteint. Cependant, l'utilisation du second protocole procure les avantages :

- i) d'être quantitatif sur l'extraction du sélénium,
- ii) de traiter plus rapidement l'échantillon car deux incubations de 1 h remplace la troisième étape du protocole 1 qui est une incubation de 16 h ;
- iii) d'avoir une traçabilité de l'analyse établie. En effet, le traitement de l'échantillon avec des rendements non quantitatifs est souvent considéré comme une rupture de la chaîne de traçabilité de par le manque d'information sur ce qui arrive à l'analyte pendant cette étape.

Tableau 2
Teneur dans le Selm-1 en sélénométhionine.

	SeMet en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($k = 2$)	Certificat en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($k = 2$)
Protocole 1	3 330 ± 210	3 389 ± 173
Protocole 2	3 340 ± 290	

La démonstration d'une extraction quantitative permet de relier le traitement des échantillons aux processus de mesure sans rupture de la chaîne de traçabilité en démontrant que tout l'analyte se retrouve en solution.

3.2. Echantillon de P-86

Une fois validé par l'analyse du MRC Selm-1, le mode opératoire a été appliqué sur un nouvel échantillon. L'intérêt de l'étude menée sur l'échantillon P-86 est qu'il se présente sous une forme commerciale avec son enrobage d'excipients. Ainsi, il sera possible de contrôler la reproductibilité des modes opératoires sur des échantillons représentatifs de compléments nutritionnels accessibles dans le système commercial traditionnel.

Les deux protocoles d'extractions ont été appliqués sur le P-86. Le tableau 3 regroupe les résultats sur le rendement d'extraction en sélénium total. L'efficacité des deux modes opératoires est la même pour cet échantillon. Une explication peut être trouvée dans la formulation sous laquelle se présente l'échantillon avec son enrobage d'excipients. La présence de cette matrice peut avoir diminué l'efficacité des agents d'extraction sur la levure.

Tableau 3
Rendement d'extraction sur le P-86 des deux protocoles.

	Rendement d'extraction en % ($k = 2$)
Protocole 1	92 ± 5
Protocole 2	92 ± 4

Les surnageants ont ensuite été analysés en couplage HPLC-ICP-MS. La figure 2 regroupe les chromatogrammes obtenus pour chaque mode opératoire sur les masses 78 et 76. Le rapport isotopique a été pris

égal à 1 entre les deux isotopes du sélénium. Comme pour les extraits du Selm-1, SeMet est l'espèce prédominante dans les surnageants. Avec cette technique de séparation aucune autre espèce de sélénium n'a été observée pour l'échantillon P-86. La teneur totale du P-86 étant six fois moins élevée que celle du Selm-1, d'autres composés ont pu être présents mais à des concentrations inférieures aux limites de détection de la méthode analytique utilisée.

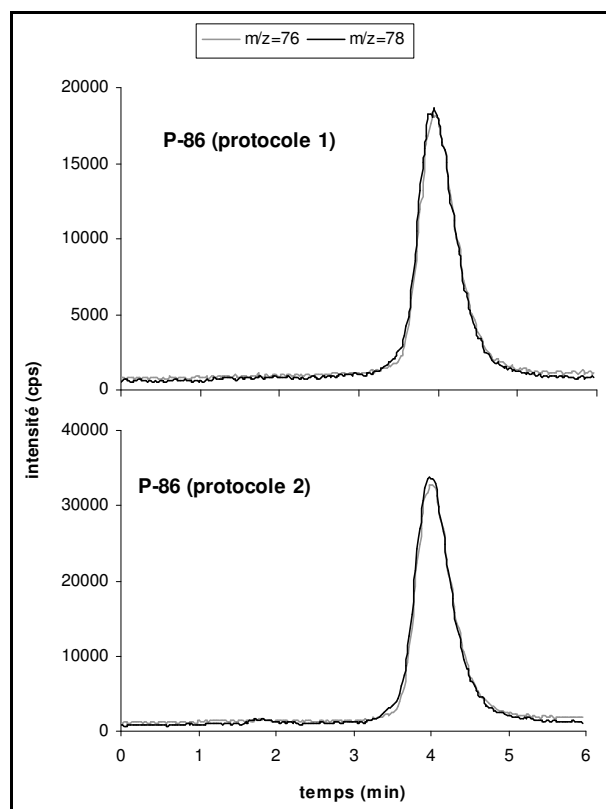


Fig. 2. – Chromatogrammes des deux extraits de P-86.

Les résultats sur la détermination de SeMet sont regroupés dans le tableau 4. Aucune valeur certifiée n'est valable pour la teneur en SeMet du P-86, seule une valeur moyenne accompagnée de son écart type (σ) est issue de l'intercomparaison [15] et peut être considérée comme sa valeur de référence. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence significative et sont donc compatibles.

Tableau 4
Teneur dans le P-86 en sélénométhionine.

	SeMet en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ($k = 2$)	Valeur consensuelle et écart type en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Protocole 1	580 ± 22	$562 ; \sigma = 44$
Protocole 2	571 ± 17	

La valeur de la teneur en SeMet dans cet échantillon est donc confirmée par les deux protocoles expérimentaux mis en place. Même si les rendements des extractions ne sont pas quantitatifs sur le sélénium total, il semble qu'ils le soient pour SeMet. La méthode analytique mise en

place est donc efficace pour la détermination de la sélénométhionine dans des compléments alimentaires à base de levures sélénisées.

4. Conclusion

La mise en place de protocoles d'analyse de spéciation du sélénium dans des compléments alimentaires s'est avérée concluante avec la validation des protocoles analytiques par l'analyse d'un MRC. L'application de ces protocoles à un second type de supplément nutritionnel, 6 fois moins concentré et se présentant sous une formulation commerciale, a démontré leur reproductibilité sur la mesure de la sélénométhionine dans cette classe d'échantillons. Ainsi la méthode peut être directement applicable pour le contrôle de denrées distribuées dans le commerce.

Grâce à l'utilisation d'une méthode primaire pour le dosage de SeMet, les mesures peuvent prétendre être raccordées au SI. La seule réserve qui peut être émise concerne l'étalon de sélénométhionine utilisé. Celui-ci n'étant pas un MRC, la certification sur sa pureté ne répond pas au critère de traçabilité. Le manque d'étalons certifiés en spéciation représente une rupture dans la chaîne de comparaisons exigée pour prétendre à la totale traçabilité des analyses.

Les prochaines applications du LNE dans le domaine de la spéciation seront d'étudier les capacités de mesure de SeMet dans d'autres échantillons. Une seconde matrice est à l'étude, il s'agit d'échantillons de blé qui peuvent aussi constituer un apport en sélénium non négligeable à travers l'alimentation.

Outre l'exposition des populations au sélénium *via* leur alimentation, le LNE s'intéresse au devenir du sélénium dans le corps humain. Une nouvelle étude a donc été démarrée dans le domaine de la chimie biomédicale pour le dosage de la sélénométhionine et des sélénoprotéines dans le sérum humain.

De nouvelles applications sont aussi en cours de développement au sein du LNE pour réaliser l'analyse de spéciation de nouveaux éléments.

Références

- [1] TEMPLETON D., ARIESE F., CORNELIS R., DANIELSSON L.G., MUNTAU H., VAN LEEUWEN H. et LOBINSKI R., "Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches", *Pure and Applied Chemistry*, **72**, 2000, 1453-1470.
- [2] FISICARO P., LABARRAQUE G. et CHARLET P., « Rôle d'un laboratoire national de métrologie en vue d'assurer la traçabilité des valeurs assignées issues des essais d'aptitudes », *Revue française de métrologie*, **12**, 2007, 29-33.
- [3] ISO/CEI Guide 99:2007, 3^e édition, "International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology", *International Organisation for Standardisation*.

- [4] DE BIÈVRE P., "SAC 92. Isotope dilution mass spectrometry as a primary method of analysis", *Analytical Proceedings*, **30**, 1993, 328-333.
- [5] CIPM-MRA, « Reconnaissance mutuelle des étalons nationaux de mesure et des certificats d'étalonnage et de mesurage émis par les laboratoires nationaux de métrologie », Comité international des poids et mesures (www.bipm.org), 1999.
- [6] STUMPF C. et LABARRAQUE G., « La dilution isotopique par ICP/MS : une méthode de référence pour l'analyse d'éléments traces », *Spectra Analyse*, **32**, 2003, 14-18.
- [7] STUMPF C. et LABARRAQUE G., « La métrologie analytique inorganique par spectrométrie de masse ICP/MS ; seconde phase de développement », *Revue française de métrologie*, **1**, 2005, 7-17.
- [8] WHO, "Environmental Health Criteria, No. 58: Selenium", *World Health Organisation*, 1987.
- [9] DUMONT E., VANHAECKE F. et CORNELIS R., "Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **385**, 2006, 1304-1323.
- [10] KORHOLA K., VAINIO A. et EDELMANN K., « Selenium yeast », *Annals of Clinical Research*, **18**, 1986, 65-68.
- [11] MCSHEEHY S., PANNIER F., SZPUNAR J., POTIN-GAUTIER M. et LOBINSKI R., « Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection », *The Analyst*, **127**, 2002, 223-229.
- [12] CASIOT C., SZPUNAR J., LOBINSKI R. et POTIN-GAUTIER M., "Sample preparation and HPLC separation approaches to speciation analysis of selenium in yeast by ICP-MS", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **14**, 1999, 645-650.
- [13] RAYMAN M., "The use of high-selenium yeast to raise selenium status : how does it measure up?", *British Journal of Nutrition*, **92**, 2004, 557-573.
- [14] MESTER Z., WILLIE S., YANG L., STURGEON R., CARUSO J.A., FERNANDEZ M.L., FODOR P., GOLDSCHMIDT R.J., GOENAGA-INFANTE H., LOBINSKI R., MAXWELL P., MCSHEEHY S., POLATAJKO A., SADI B.B., SANZ MEDEL A., SCRIVER C., SZPUNAR J., WAHLAN R. et WOLF W., "Certification of a new selenized yeast reference material (Selm-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparaison exercise for quantifying these analytes", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **385**, 2006, 168-180.
- [15] GOENAGA-INFANTE H., STURGEON R., TURNER J., HEARN R., SARGENT M., MAXWELL P., YANG L., BARZEV A., PEDRERO Z., CAMARA C., DIAZ HUERTA V., FERNANDEZ SANCHEZ M.L., SANZ-MEDEL A., EMESE K., FODOR P., WOLF W., GOLDSCHMIDT R., VACCHINA V., SZPUNAR J., VALIENTE L., HUERTAS R., LABARRAQUE G., DAVIS C., ZEISLER R., TURK G., RIZZIO E., MACKAY L., MYORS R., SAXBY D., ASKEW S., CHAO W. et JUN W., "Total selenium and selenomethionine in pharmaceutical yeast supplements: assessment of the state-of-the-art measurement capabilities through international intercomparaison study CCQM-P86", *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **390**, 2008, 629-642.
- [16] POLATAJKO A., BANAS B., RUIZ ENCNAR R. et SZPUNAR J., "Investigation of the recovery of selenomethionine from selenized yeast by two-dimensional LC-ICP MS", *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **381**, 2005, 844-849.
- [17] SANNAC S., OSTER C., LABARRAQUE G., HERVOUET G., PANNIER F. et POTIN-GAUTIER M., « Importance de la préparation de l'échantillon pour une analyse de spéciation du sélénium par HPLC-ID-ICP-MS. Détermination d'incertitudes du rendement d'extraction au résultat sur la sélénométhionine », *13^e congrès international de métrologie*, Lille, France, juin 2007.
- [18] DARROUZES J., BUENO M., LESPES G. et POTIN-GAUTIER M., "Operational optimisation of ICP-octopole collision/reaction cell-MS for applications to ultratrace selenium total and speciation determination", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **20**, 2005, 88-94.
- [19] « Rapport d'activité 2006 de la métrologie française : Chimie », *Revue française de métrologie*, **11**, 2007, 11-14.
- [20] VANHAECKE F., DE WANNEMACKER G., MOENS L., DAMS R., LATKOCZY C., PROHASKA T. et STINGEDER G., "Dependence of detector dead time on analyte mass number in inductively coupled plasma mass spectrometry", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **13**, 1998, 567-571.
- [21] HINOJOSA REYES L., MARCHANTE-GAYON J.M., GARCIA-ALONSO J.I. et SANZ-MEDEL A., "Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **18**, 2003, 11-16.
- [22] ISO/IEC Guide 98:1995, "Guide to the expression of uncertainty in measurement", *International Organization for Standardization*.

Article reçu le 11 décembre 2008 ; version révisée reçue le 23 avril 2009.