

Méthode analytique

Détermination du 1-hydroxypyrrène dans l'urine après hydrolyse par UPLC-MS/MS

Responsable technique de la méthode

Sébastien Gagné, M. Sc., chimiste toxicologue

Personne ayant contribué à la présente version de
cette méthode

Eric Langlois, technicien de laboratoire

MA-419





Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information. Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle. Les méthodes d'analyses ou d'étalonnages sont celles mises au point ou retenues par l'IRSST pour l'exécution de ses différents mandats. Elles peuvent requérir l'utilisation de matériels, d'opérations ou d'équipements dangereux. Ces méthodes n'ont pas pour but de mentionner tous les problèmes de sécurité associés avec leur utilisation. C'est la responsabilité de l'utilisatrice et de l'utilisateur d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées. L'utilisation des données incluses dans ces méthodes se fera aux seuls risques de l'utilisatrice et de l'utilisateur : l'IRSST se dégage de toute responsabilité relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de telle utilisation et de telle application. Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication.

Cette publication est disponible en version PDF sur le site Web de l'IRSST.

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2023

ISBN : 978-2-89797-270-7



SUIVI DES MODIFICATIONS

PAGE	NATURE DE LA MODIFICATION
Toutes	Nouvelle méthode



BIOMARQUEUR	VALEUR RECOMMANDÉE (IBE ¹)
1-hydroxypyrene dans l'urine avec hydrolyse – Exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	11 nmol/L avec ajustement pour le ratio pyrene/benzo(a)pyrene

¹ IBE (Indice Biologique d'Exposition)

APPLICABILITÉ

1-hydroxypyrene dans l'urine avec hydrolyse : IBE établi suivant un ajustement pour le ratio pyrene/benzo(a)pyrene. Le ratio varie d'un milieu de travail à un autre, d'une tâche à une autre, en fonction de la source d'HAP. La consultation de la documentation de l'ACGIH est requise pour connaître le ratio qui s'applique avec la situation (ACGIH, 2017).

Domaine : 0,25 à 50 nmol/L

Coefficient de détermination (r^2) > 0,995

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

On distingue deux types d'interférences : les effets de matrice et les composés apparentés. Les effets de matrice peuvent trouver leur origine lors de l'ionisation des ions qui vont affecter la réponse obtenue des composés d'intérêts (suppression ou surexpression du signal). Ils peuvent aussi subvenir lors de la chromatographie et affecter la qualité de celle-ci par une déviation des temps de rétention attendus pour les composés donnés ainsi que l'asymétrie des pics chromatographiques. Une diminution de la sélectivité de la méthode peut aussi être observée par la présence de composés apparentés, éluant près du composé d'intérêt et dont l'ionisation conduit à la présence des mêmes transitions que le composé évalué, soit un rapport masse/charge de l'ion précurseur et de l'ion fragment équivalent. Les ions de ces composés apparentés sont formés lors de la nébulisation et l'ionisation de ceux-ci à la sortie du chromatographe et ils sont fragmentés lors de leur passage dans la cellule de collision du spectromètre de masse en tandem de la même façon que l'ion précurseur. L'aire du pic calculée peut ainsi être surévaluée et/ou mal interprétée. Plusieurs stratégies permettent d'éliminer et/ou de diminuer ces interférences. Les stratégies principales utilisées dans cette méthode d'analyse pour diminuer ou éliminer les interférences sont les suivantes :

- ▶ Ajout d'un étalon interne aux solutions d'étalonnages et aux échantillons ;
- ▶ Comparaison des ratios ioniques de deux ions par pics chromatographiques d'intérêts entre un étalon et l'échantillon ;
- ▶ Dilution de l'échantillon pour diminuer les effets matrices lorsque trop importants.

Afin de cibler les interférences le plus efficacement possible, il importe de considérer tout élément pertinent lors du prélèvement avant le traitement de l'échantillon et l'interprétation des résultats. Il peut s'avérer qu'une interférence est impossible à résoudre, causant une sous-estimation ou une surestimation du résultat. Une note au rapport est alors émise à cet effet.



PRÉLÈVEMENT

1) Contenant et quantité

Contenant	Bouteille en polyéthylène Nalgène de 125 mL
Quantité	20 mL d'urine minimum, mais de 50 mL à 100 mL préférablement

2) Conditions de prélèvement recommandées

Moment : Fin du dernier quart de travail de la semaine

3) Durée de conservation testée et validée

Non évaluée à l'IRSST (Référence : ACGIH 2017)

4) Entreposage

Au congélateur (-20 à -80 °C)
Durée maximale : 1 an

5) Détails

Prévenir les risques de contamination externe de l'échantillon lors du prélèvement.

Le personnel médical doit prendre les dispositions nécessaires afin qu'il n'y ait pas de contamination du liquide biologique lors du prélèvement. Les travailleurs doivent être informés au besoin des précautions à prendre lors de la cueillette d'échantillons urinaires, et ce, en fonction des commodités disponibles sur les lieux de travail (lavage des mains, douche, changement de vêtements, etc.).

Tous les échantillons biologiques doivent être conservés au réfrigérateur (≈ 4 °C) en attendant leur envoi au laboratoire. Si l'échantillon ne peut pas être expédié au laboratoire à l'intérieur de 24h, il faut le congeler dès que possible.



RÉACTIFS ET ÉTALONS

- 1-hydroxypyrene (1-OHP; $C_{16}H_{10}O$) ; (CAS : 5315-79-7), $\geq 99\%$
- 1-hydroxypyrene- $^{13}C_6$ (1-OHPL; $C_{10}^{13}C_6H_{10}O$) ; (CAS : 5315-79-7), 98 %+ *atom D* (standard interne)
- 1-hydroxypyrene β -D-glucuronide (1-OHPG; $C_{22}H_{18}O_7$); CAS : 154717-05-2, $\geq 96\%$
- β -glucuronidase 6000 unités/mL
- Acide formique (HCOOH ; CAS : 64-18-6), grade LC-MS (abréviation : FA)
- Acide chlorhydrique (HCl), grade ULTREX
- 1-Chlorobutane (C_4H_9Cl ; CAS 109-69-3), OmniSolv, grade HPLC
- Bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$; CAS : 144-55-8), grade BioXtra
- Acétate d'ammonium ($C_2H_7NO_2$; CAS 631-61-8), >99 %
- Chlorure de danzyle ($C_{12}H_{12}ClNO_2S$; CAS : 605-65-2), grade Bioreagent
- Hydroxyde de sodium (NaOH; CAS : 1310-73-2), solution 10N
- Acétone (CH_3COCH_3 ; CAS : 67-64-1), grade ACS
- Diméthyl sulfoxyde (DMSO ; C_2H_6OS ; CAS : 67-68-5, >99,9 %
- Eau (H_2O), Grade LC/MS
- Acétonitrile (CH_3CN ; CAS 75-05-8 ; ACN), Optima Grade LC-MS (abréviation : HCN)
- Méthanol (CH_3OH ; CAS : 67-56-1), Optima Grade LC-MS
- ClinChek® Urine Control

APPAREILLAGE ET MATÉRIEL

- UPLC-MS/MS
- Argon de pureté > 99,997 %
- Générateur d'azote pour pureté $\geq 95\%$
- Agitateur alternatif Eberbach
- Bain d'évaporation à sec
- Thermolyne DRI-BATH
- Pipettes à volume variable (2 μ L-1000 μ L)
- Embouts pour pipettes
- Pipette répétitive de type Eppendorf
- Tubes en borosilicate 16x100 mm
- PAL Acrodisc 13 mm avec filtre 0,45 μ m PTFE
- Seringue 20 mL
- Microtube jetable Safe-Lock de 1,5 mL
- Centrifugeuse
- Microcentrifugeuse
- Vortex
- Vial ambré de 15 mL avec bouchon et septum
- Vial d'injection HPLC en verre et bouchon « préfendu »

Commentaires :

Avant de commencer l'analyse, attendre que toutes les solutions et tous les échantillons soient à la température ambiante. L'instrument UPLC-MS/MS utilisé pour la mise au point de la méthode est le Waters Acquity Xevo-TQ-XS avec injecteur FTN (*Flow Through Needle*). Le bain à sec est de marque Thermolyne.



PRÉPARATION DE L'ANALYSE

Nombre d'étapes de préparation : 17

Étape 1	Bien agiter les échantillons
Étape 2	Pipeter 400 µL d'échantillon d'urine dans un tube de verre vissable de 16 mm x 100 mm identifié et ajouter 50 µL de standard interne (25 nmol/L 1-OHPL dans l'eau)
Étape 3	Ajouter à l'aide d'une pipette 100 µL d'acétate d'ammonium 1 mol/L dans l'eau pH 5,2
Étape 4	Ajouter à l'aide d'une pipette 50 µL d'enzyme β-glucuronidase 6000 unités/mL
Étape 5	Mélanger au vortex 5 secondes
Étape 6	Chauffer les échantillons à 35 °C dans un bain chauffant durant exactement 45 minutes
Étape 7	Ajouter à l'aide d'une pipette 6mL de 1-chlorobutane après le chauffage
Étape 8	Boucher les tubes et agiter sur l'agitateur alternatif Eberbach à haute vitesse pendant 10 minutes
Étape 9	Après 10 minutes à haute vitesse, agiter à basse vitesse pendant 10 minutes supplémentaires
Étape 10	Centrifuger à 2000 rpm pendant 3 minutes
Étape 11	Retirer les tubes avec précaution sans mélanger les phases et faire une congélation rapide ("flash freeze")
Étape 12	Une fois la phase aqueuse congelée, transvider la phase de 1-chlorobutane (celle sur le dessus) dans des tubes 16 mm x 100 mm identifiés
Étape 13	Évaporer à 15 psi pendant 15 minutes à 40 °C à l'aide d'un bain d'évaporation à sec
Étape 14	Ajouter à l'aide d'une pipette 150 µL de la solution de chlorure de danzyl (2 mg/mL dans l'acétone) et 150 µL de bicarbonate de sodium 100 mmol/L pH 10,5
Étape 15	Agiter au vortex 5 secondes et incuber au DRI-BATH exactement 3 minutes à 60 °C
Étape 16	Agiter au vortex pendant 5 secondes et transférer 250 µL dans des vials
Étape 17	Injecter 5 µL sur UPLC-MS/MS

Commentaires :

Tous les standards et échantillons de contrôle de qualité (CQ) sont traités selon la même procédure que les autres échantillons.



CONDITIONS ANALYTIQUES

Technique analytique : Chromatographie liquide à ultraperformance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS)

Phase mobile : Éluant A : H₂O 0,1 % FA / Éluant B : ACN 0,1 % FA

Élution :

Temps (min)	Débit (mL/min)	H ₂ O 0,1 % FA (%)	ACN 0,1 % FA (%)	Pente
0	0,9	30	70	
1,9	0,9	30	70	6
1,91	0,9	5	95	6
2,80	0,9	5	95	6
2,81	0,9	30	70	6
4,50	0,9	30	70	6

Colonne : Waters Acquity UPLC HSS T3, 1,8 µm, 2,1 mm x 50 mm

Température de la colonne : 60 °C

Température des échantillons : 15 °C

Volume d'injection : 5 µL

Mode d'ionisation : Électronébulisation positif (ESI+)

Voltage du capillaire : 1 kV

Température de désolvatation : 500 °C

Débit de gaz du cône : 150 L/h

Débit du gaz de collision : 0,15 mL/min

Paramètres MRM :

Canaux	Analyte	Ion parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Temps de résidence (s)	Cone (V)	Collision (eV)
1	1-OHP dérivé	452,1	217,3	0,1	20	18
2	1-OHP- ¹³ C ₆ dérivé	458,1	223,3	0,1	20	18

Intégration : Surface de pic



ÉTALONNAGE

La concentration de l'échantillon est déterminée par une équation de type quadratique dont l'origine est exclue. Le poids sur la corrélation est $1/x^2$.

Commentaires :

Les concentrations de 1-OHP déterminées dans l'échantillon doivent se situer dans le domaine d'étalonnage de la méthode d'analyse. S'il s'avère que les concentrations de 1-OHP dans l'échantillon sont supérieures à la concentration la plus élevée du domaine d'étalonnage, une dilution manuelle appropriée de l'échantillon avec l'eau est effectuée, puis l'analyse est reprise de nouveau en tenant compte du facteur de dilution lors des calculs.

CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les concentrations de 1-OHP se calculent comme suit :

$$\text{Conc.} = \text{Conc. lue} \times D$$

Où :

Conc.	=	Concentration de 1-OHP à doser dans l'échantillon d'urine (en nmol/L)
Conc. lue	=	Concentration de 1-OHP obtenu à l'aide de la courbe d'étalonnage (nmol/L)
D	=	Facteur de dilution

VALIDATION

Remarque : Ces données de validation représentent la performance de la méthode au moment de sa publication.

Limite de détection et limite de quantification

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	LIMITE DE DÉTECTION (nmol/L)	LIMITE DE QUANTIFICATION (µmol/L)
1-OHP hydrolysé	0,02	0,08

Précision (Fidélité)

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	RÉPLICABILITÉ (%)	RÉPÉTABILITÉ (%)
1-OHP hydrolysé	4	7

Justesse

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	JUSTESSE (%)
1-OHP hydrolysé	99

Récupération

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	RÉCUPÉRATION (%)
1-OHP hydrolysé	102

Pour information supplémentaire, consultez le *Document explicatif pour éléments de validation de méthodes*, I-G-041, de la Direction des laboratoires de l'IRSST.



RÉFÉRENCES

1. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). « TLVs® and BEIs®, Based on the Documentation of the Threshold Limits Values for Chemical Substances and Physical Agents & Biological Exposure Indices » ACGIH, Cincinnati, OH, USA, 2023, 276 p.
2. Institut de recherche en santé et sécurité au travail (IRSST). « Guide de surveillance biologique de l'exposition – Stratégie de prélèvement et interprétation des résultats », *Études et recherches*, Guide technique T-03, 8^e édition, 2019, 129 p.
<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PublIRSST/T-03.pdf>
3. Institut de recherche en santé et sécurité au travail (IRSST). « Guide de prélèvement des échantillons biologiques », *Études et recherches*, Guide technique T-25, version 2, 2019, 29 p.
<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PublIRSST/T-25.pdf>