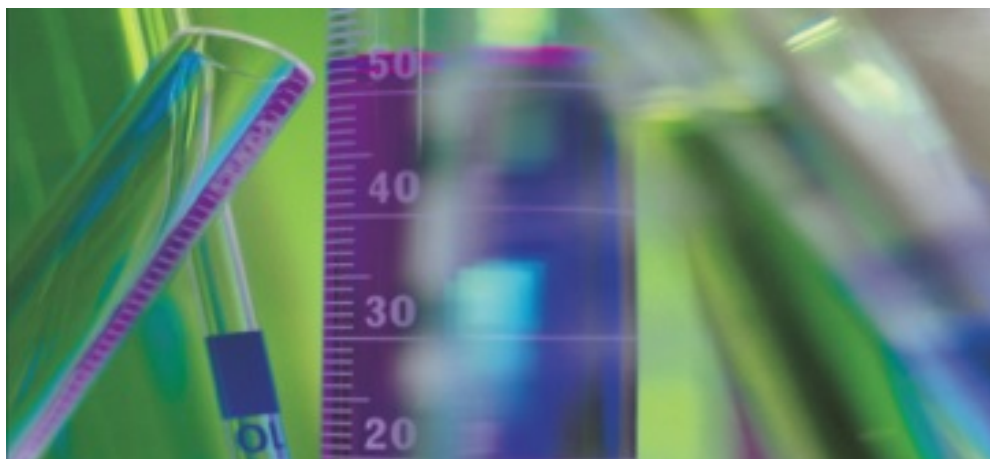


M

Méthodes de laboratoire

Dosage de l'acide t,t-muconique urinaire

MÉTHODE ANALYTIQUE 317



Applicabilité

Cette méthode est utilisée pour le dosage de l'acide t,t-muconique (AMU) dans l'urine.

IBE

Benzène : AMU urinaire = 1,2 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ créatinine¹

Prélèvement

20 mL d'urine à la fin du quart de travail

Non exposé

0,10 $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ créatinine

Analyse

Chromatographie liquide à ultra performance couplée à un détecteur de spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS)

Valeur minimale rapportée (VMR)

1,4 $\mu\text{mol}/\text{L}$

Domaine d'application

3,46 $\mu\text{mol}/\text{L}$ à 34,6 $\mu\text{mol}/\text{L}$

Fidélité

2% répliquabilité; 2 % répétabilité

Incertitude analytique (CV_A)

9,8 %



Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 6 - Date de diffusion: 2015-02-26



Solidement implanté au Québec depuis 1980, l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) est un organisme de recherche scientifique reconnu internationalement pour la qualité de ses travaux.

NOS RECHERCHES *travaillent pour vous !*

Mission

Contribuer, par la recherche, à la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles ainsi qu'à la réadaptation des travailleurs qui en sont victimes;

Assurer la diffusion des connaissances et jouer un rôle de référence scientifique et d'expertise;

Offrir les services de laboratoires et l'expertise nécessaires à l'action du réseau public de prévention en santé et en sécurité du travail.

Doté d'un conseil d'administration paritaire où siègent en nombre égal des représentants des employeurs et des travailleurs, l'IRSST est financé par la Commission de la santé et de la sécurité du travail.

Pour en savoir plus

Visitez notre site Web ! Vous y trouverez une information complète et à jour. De plus, toutes les publications éditées par l'IRSST peuvent être téléchargées gratuitement. www.irsst.qc.ca

Pour connaître l'actualité de la recherche menée ou financée par l'IRSST, abonnez-vous gratuitement au magazine Prévention au travail, publié conjointement par l'Institut et la CSST. Abonnement : www.csst.qc.ca/AbonnementPAT

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec
2015
ISBN : 978-2-89631-651-9 (PDF)
ISSN : 0820-8395

IRSST - Direction des communications
et de la valorisation de la recherche
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec) H3A 3C2
Téléphone : 514 288-1551
Télécopieur : 514 288-7636
publications@irsst.qc.ca
www.irsst.qc.ca

© Institut de recherche Robert-Sauvé
en santé et en sécurité du travail,
2015

IRSST – Direction des laboratoires (12^e étage)
505, boul. De Maisonneuve Ouest
Montréal (Québec) H3A 3C2
sac.labo@irsst.qc.ca

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 6 - Date de diffusion: 2015-02-26

Méthodes de laboratoire

Dosage de l'acide t,t-muconique urinaire

MÉTHODE ANALYTIQUE 317

Avis de non-responsabilité

Les méthodes d'analyse ou d'étalonnage sont conçues ou ont été retenues par l'IRSST pour l'exécution de divers travaux dans le cadre de mandats qu'on lui confie. Elles peuvent nécessiter des opérations délicates ou requérir l'utilisation de matériels ou d'équipements dangereux. Des risques pour la santé et la sécurité des personnes peuvent être associés à leur utilisation. Ces méthodes sont fournies « telles quelles » sans aucune garantie de quelque nature que ce soit relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de leur utilisation et de leur application. Le présent avis de non-responsabilité n'entend pas contrevvenir aux dispositions de législations canadiennes applicables en cette matière, qu'il s'agisse des lois fédérales, provinciales ou territoriales en vigueur au Canada.

Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication.

Responsable technique de la méthode

Sébastien Gagné, chimiste toxicologue, M.Sc.,
Direction des laboratoires - IRSST

Personne ayant contribué à la version de cette méthode

Josée Poulin, chimiste, B.Sc.
Direction des laboratoires - IRSST



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

http://www.irsst.qc.ca/fr/methodes_par_type.html

Ce document technique a été financé par l'IRSST et préparé par la Direction des laboratoires.

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 6 - Date de diffusion: 2015-02-26

IRSST

Lorsque imprimé, ce document est non contrôlé.
SVP vous référer au document disponible sur support informatique.

No. Révision: 6 - Date de diffusion: 2015-02-26

TABLE DES MATIÈRES

Préambule	1
1. Domaine d'application	2
2. Principe de la méthode	2
3. Interférences	2
4. Matériel	3
5. Réactifs	3
6. Échantillonnage	4
7. Protocole analytique	4
7.1 Préparation des solutions	4
7.2 Étalonnage	4
7.3 Préparation des échantillons	5
7.4 Préparation des contrôles de la qualité	5
7.5 Analyse	6
8. Calculs	7
9. Paramètres de performance	8
9.1 Limite de détection, limite de quantification et valeur minimale rapportée (VMR)	8
9.2 Fidélité	8
9.3 Exactitude	8
9.4 Incertitude de mesure	9
10. Références	9

Préambule

La surveillance biologique de l'exposition (SBE) est l'un des outils de prévention de première ligne mis à la disposition des médecins, des hygiénistes et autres professionnels de la santé au travail. Elle constitue un complément aux activités de surveillance environnementale (SE) et de dépistage des effets précoces sur la santé. On en distingue trois types : le biomarqueur d'exposition, le biomarqueur d'effets précoces et le biomarqueur de susceptibilité. La présente méthode s'applique uniquement au biomarqueur d'exposition.

Alors que les stratégies d'échantillonnage environnemental sont bien définies dans la littérature, moins de données existent en ce qui concerne la proposition de stratégies dans le domaine de la SBE. Lorsque la SBE est possible, elle constitue bien souvent un meilleur outil de prévention que les mesures atmosphériques parce qu'elle fournit des indications sur des aspects importants de l'exposition et des effets attendus. En effet, l'un des principaux avantages de la SBE consiste à évaluer l'exposition globale des travailleurs en intégrant les différentes voies d'exposition possibles (pulmonaire, cutanée, digestive). Cette approche permet également de tenir compte de plusieurs facteurs liés à la tâche ou à l'individu, lesquels peuvent influencer l'absorption, le métabolisme ou l'excrétion des xénobiotiques.

Par définition, la SBE vise à évaluer l'exposition d'un travailleur et le risque pour la santé qui en découle en mesurant un paramètre approprié dans une matrice biologique prélevée à un moment précis. Le paramètre mesuré peut être le contaminant d'origine ou un métabolite, et les milieux biologiques utilisés sont le plus souvent le sang et l'urine. Selon les caractéristiques du contaminant et du paramètre biologique sélectionné, la mesure effectuée reflétera l'exposition de la journée, de la semaine ou l'exposition chronique cumulative. Cette approche permet d'évaluer l'exposition interne des substances ayant une action systémique, mais elle est cependant peu efficace pour les substances qui exercent un effet au site de contact.

Il est à noter que pour la présente méthode, toute la terminologie utilisée est décrite dans l'instruction de travail « I-G-014 » du système de gestion documentaire associé au système qualité de l'IRSST.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode s'applique à la détermination d'un biomarqueur d'exposition présent dans l'urine par chromatographie en phase liquide à ultra performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UPLC-MS/MS). Les essais pour la mise au point de la méthode ont été effectués avec un UPLC-MS/MS de marque Waters Acquity-Xevo TQ. L'acide t,t-muconique urinaire est le biomarqueur d'exposition recommandé pour le benzène¹.

La linéarité de la méthode d'analyse a été vérifiée initialement pour des concentrations de 3,46 µmol/L à 34,6 µmol/L d'acide t,t-muconique (AMU) urinaire. Le coefficient de détermination (r^2) alors obtenu était $\geq 0,990$ pour un total de 36 échantillons distribués sur six concentrations sur le domaine étudié, ce qui inclut nécessairement des concentrations couvrant l'indice d'exposition biologique (IBE). Pour qu'un prélèvement urinaire soit jugé valable, le niveau de créatinine doit se situer entre 4,4 mmol/L et 26,5 mmol/L et la densité urinaire doit être comprise entre 1,010 et 1,030.

Le document présente également le mode opératoire de la méthode, les contrôles de performance et propose une séquence d'analyse de routine. Ces éléments ne sont pas essentiels à la réalisation de la méthode afin d'obtenir les paramètres de performance présentés dans la section 9.

2. PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Selon la procédure décrite dans le *Guide de prélèvement des échantillons biologiques*², un échantillon d'urine est prélevé dans un contenant, au moment de prélèvement déterminé pour la substance en cause. L'échantillon d'urine est ensuite traité pour assurer sa compatibilité avec le système analytique. La solution résultante est analysée par chromatographie en phase liquide à ultra performance avec détection par spectrométrie de masse en tandem. La concentration d'AMU est calculée en tenant compte d'une courbe d'étalonnage, de la surface du pic et d'une correction avec la créatinine et la densité urinaire pour le niveau de dilution de l'urine.

3. INTERFÉRENCES

Pour causer une interférence analytique, une substance doit être présente dans l'urine, avoir un même temps de rétention dans les conditions de chromatographie utilisées et les mêmes masses que les substances d'intérêts. Si cette situation se présente, les conditions chromatographiques peuvent être modifiées de façon à obtenir une meilleure séparation des pics sur le chromatogramme. Il peut s'avérer qu'une interférence chromatographique soit impossible à résoudre, causant une sous-estimation ou une surestimation du résultat, selon le cas, une note au rapport sera émise à cet effet si une possibilité d'interférence a été décelée. Il est important que les responsables de l'échantillonnage signalent au laboratoire tout élément pertinent sur le prélèvement afin de cibler les interférences le plus efficacement possible avant le traitement de l'échantillon.

4. MATÉRIEL

- ✓ Micropipette 20 à 1000 µL
- ✓ Embout à micropipette
- ✓ Tube jetable de 1,5 mL avec bouchon
- ✓ Vial HPLC en verre avec bouchon "pre-slitted" en PTFE
- ✓ Ensemble de verrerie de laboratoire (ballons volumétriques avec bouchon étanche et septum, béchers, etc.)
- ✓ Microcentrifugeuse Thermo Sorvall Legend micro 21 ou équivalent
- ✓ Vortex
- ✓ Chromatographe en phase liquide à ultra performance couplé à un spectromètre de masse en tandem de type triple quadropoles.
- ✓ Générateur d'azote N2-14 pour pureté ≥ 95 %
- ✓ Bouteille d'argon de pureté $> 99,997$ %
- ✓ Colonne chromatographique à ultra performance Waters Acquity HSS T3, 1,8 µm, 2,1 x 50 mm (il est important de noter que selon l'instrumentation disponible, une colonne chromatographique différente peut être utilisée, pourvu que la séparation entre l'AMU et les autres constituants potentiellement présents dans le mélange soit adéquate).

5. RÉACTIFS

Les composés chimiques utilisés doivent être de grade Optima LC-MS ou meilleurs, à moins de spécifications particulières.

- ✓ AMU 98 %
- ✓ AM-d₄ 99 % D atome
- ✓ Méthanol (CH₃OH)
- ✓ Eau
- ✓ Acide formique (HCOOH)
- ✓ Solution Clincheck®
- ✓ Blanc d'urine préparé à partir d'un pool d'urine de travailleurs non exposés

6. ÉCHANTILLONNAGE

Les prélèvements d'urine pour le dosage d'AMU doivent être réalisés dans un contenant propre exempt de toute contamination. Le moment du prélèvement est crucial à l'obtention de résultats valables et comparables aux valeurs d'IBE recommandées. Le moment de prélèvement tient compte de la vitesse d'élimination des substances dans l'organisme qui peut être différente d'une substance à l'autre. Dans le cas d'une exposition au benzène, l'urine doit être prélevée à la fin du quart de travail.

Pour plus de détails sur le prélèvement des échantillons et la stratégie utilisée, se référer au *Guide de prélèvement des échantillons biologiques* de l'IRSST².

7. PROTOCOLE ANALYTIQUE

7.1 *Préparation des solutions*

La réponse du détecteur pouvant varier sensiblement d'une journée à l'autre, il est nécessaire d'effectuer un étalonnage de l'instrument à chaque série d'analyses. Avec le matériel de laboratoire adéquat, préparer six solutions étalons en diluant de l'AMU dans de l'urine de façon à couvrir l'IBE, ce qui équivaut à l'intervalle de 3,46 µmol/L à 34,6 µmol/L. Le blanc de laboratoire est préparé de la même manière à la seule différence qu'aucune solution étalon d'AMU n'est ajoutée. Les solutions doivent être fraîchement préparées.

Chaque solution étalon doit suivre la même préparation que les échantillons. Le point 7.3 décrit la procédure à suivre pour le traitement des échantillons.

7.2 *Étalonnage*

Les solutions étalons sont analysées en début de séquence afin de construire une courbe d'étalonnage avec la concentration d'analyte en abscisse et le ratio signal analyte / signal standard interne (surface du pic) en ordonnée. La courbe d'étalonnage est calculée par le logiciel d'acquisition du chromatographe, par régression linéaire et est exprimée sous la forme de l'équation suivante :

$$RS = m[\text{Canalyte}]_{\text{étalon}} + b$$

ou

RS =	Ratio surface analyte / surface standard interne
$[\text{Canalyte}]_{\text{étalon}}$ =	Concentration analyte
m =	Pente de la courbe d'étalonnage
b =	Ordonnée à l'origine

La courbe d'étalonnage est considérée comme valide lorsque le coefficient de détermination (r^2) est $\geq 0,990$.

7.3 Préparation des échantillons

Bien agiter les standards, contrôles de qualités et échantillons.

Ajouter 970 μ L d'eau contenant le standard interne d'AMU-d4 à 20 μ M dans un tube de 1,5 ml.

Ajouter 30 μ L d'urine (échantillon, contrôle ou standard).

Agiter à l'aide du vortex et centrifuger.

Injecter le surnageant et analyser par UPLC-MS/MS.

7.4 Préparation des contrôles de la qualité

Plusieurs types de contrôles sont analysés au cours de la séquence d'analyse afin de vérifier l'étalonnage et la variation de la sensibilité. Les critères établis pour chaque contrôle doivent être respectés et tout dépassement ou déviation doit être documenté et des actions adéquates prévues par le système qualité devront être entreprises.

Certains sigles utilisés dans cette méthode pour les éléments de contrôle de la qualité sont d'origine anglaise pour faciliter la communication avec l'organisme qui gère le programme d'accréditation du laboratoire.

Solution de contrôle d'étalonnage (CCV, Continuing Calibration Verification). Les contrôles CCV sont les mêmes solutions que celles utilisées pour la courbe d'étalonnage et d'une concentration environ équivalente à celle du milieu de cette courbe. Ils suivent toutes les étapes de préparation et d'analyse d'un échantillon. Les CCV sont analysées séquentiellement au début de la séquence et à tous les 10 échantillons. (CCVU = CCV urinaire)

Valeur minimum rapportée (VMR). Les contrôles VMR sont des solutions de contrôle analysées en début et en fin de séquence. Ces contrôles vérifient la réponse de la méthode analytique à la valeur minimale rapportée de la méthode analytique. Ils suivent toutes les étapes de préparation et d'analyse d'un échantillon.

Les solutions commerciales servant à préparer ces solutions de contrôle doivent idéalement provenir d'un manufacturier différent de celui qui produit les solutions utilisées pour la préparation des solutions d'étalonnage. Sinon, elles doivent provenir d'un lot différent du même manufacturier ou, en dernier recours, d'une solution intermédiaire différente du même manufacturier.

Échantillon de contrôle de la qualité (QCS, Quality Control Sample). Ces échantillons de contrôle sont des urines dont la concentration des métabolites recherchés a été caractérisée par un organisme de référence (solution commerciale) ou validée par un laboratoire extérieur accrédité. Dans cette méthode, la solution commerciale utilisée est le ClinCheck®. Les contrôles suivent toutes les étapes de

préparation et d'analyse d'un échantillon. Les résultats sont utilisés pour estimer l'exactitude de la méthode analytique.

La solution commerciale servant à préparer ces solutions de contrôle d'étalonnage doit idéalement provenir d'un manufacturier différent de celui qui produit les solutions utilisées pour la préparation des solutions d'étalonnage. Sinon, elle doit provenir d'un lot différent du même manufacturier ou, en dernier recours, d'une solution intermédiaire différente du même manufacturier.

Blanc de réactifs (LRB, Laboratory Reagent Blank). Le contrôle LRB est un échantillon qui contient seulement les réactifs. Il suit toutes les étapes de préparation et d'analyse comme un échantillon. Il sert à vérifier si les étapes de préparation amènent une contamination des échantillons. Les résultats doivent être inférieurs à la valeur de la VMR.

7.5 Analyse

7.5.1 Conditions analytiques utilisées pour l'implantation de cette méthode

L'exposition aux contaminants organiques en milieu de travail est presque toujours multiple. Les conditions chromatographiques doivent en conséquence être ajustées selon la nature et la complexité de l'échantillon. Les conditions suggérées pour l'analyse d'AMU sont :

Type de colonne	Acquity UPLC HSS T3, 1,8 μm , 2,1 x 50 mm
Éluant	Organique = MeOH + 0,1 % HCOOH; Aqueux = Eau + 0,1 % HCOOH
Température de la colonne	50°C
Gradient	10 % _{org} (0min), 10 % _{org} (0,5 min), 95 % _{org} (1,25 min), 95 % _{org} (2 min)
Volume d'injection	10 μL
Ionisation	Électronébuliseur en mode négatif
Transition MRM	AMU = 141 > 97 ; AMU-d ₄ = 145 > 100

7.5.2 Séquence d'analyses

Les solutions étalons, blancs de laboratoire, solutions de contrôle qualité ainsi que les échantillons sont analysés par chromatographie en phase liquide ultra performance.

De plus, la solution étalon de concentration équivalente à la mi-courbe est réanalysée à une fréquence régulière en cours d'analyse ainsi qu'à la fin de la séquence pour s'assurer du maintien de l'étalonnage.

Identification	Nombre d'injection
CCVU	1
Étalon # 1 (LRB)	1
Étalon # 2	1
Étalon # 3	1
Étalon # 4	1
Étalon # 5	1
Étalon # 6	1
Étalon # 7	1
Étalon # 8	1
VMR	1
QCSpool	1
QCS1	1
QCS2	1
Échantillon duplicata	1
9 échantillons	1
CCVU	1
10 échantillons	1
Échantillon duplicata	1
CCVU	1
QCSpool	1
QCS1	1
QCS2	1

8. CALCULS

Densité

Le calcul de la concentration corrigée en fonction d'une densité moyenne de 1,024 est effectué à l'aide de la relation suivante :

$$C_{corr.} = \frac{Ci (1,024 - 1)}{(d-1)}$$

ou

$C_{corr.}$ = Concentration corrigée

Ci = Concentration du paramètre biologique

d = Densité de l'urine analysée

Créatinine

La concentration corrigée en fonction de la créatinine est obtenue en divisant la concentration brute du paramètre biologique par la concentration de la créatinine de cette même urine. Le résultat correspond à la quantité de contaminants (mol, mmol, μ mol, etc.) /mmol de créatinine.

$$C_{corr. \text{ créatinine}} = Ci / C_{\text{créatinine}}$$

ou

$C_{corr. \text{ créatinine}}$ = Concentration corrigée en créatinine

Ci = Concentration du paramètre biologique

$C_{\text{créatinine}}$ = Concentration de créatinine

9. PARAMÈTRES DE PERFORMANCE

La procédure utilisée pour établir l'ensemble des paramètres de performance a été établie en fonction de méthodes statistiquement éprouvées et reconnues.

9.1 Limite de détection, limite de quantification et valeur minimale rapportée (VMR)

Les limites de détection et de quantification de la méthode analytique ont été évaluées initialement à 0,49 μ M et 1,6 μ M respectivement pour l'AMU. Des limites plus basses pourraient être atteintes, mais il n'a pas été jugé utile d'y parvenir en raison de l'IBE qui est au niveau du μ M. La valeur minimale rapportée (VMR) consiste en la quantité minimale de contaminants qui est évaluée au laboratoire de l'IRSST. Elle tient compte d'un ou de plusieurs des aspects suivants : la linéarité de la méthode dans les conditions expérimentales utilisées et la pertinence du dosage à des bas niveaux de concentration. Une vérification à la VMR est faite à chaque série d'analyses et si la VMR est sous le plus bas point de la courbe, la vérification est faite avec un contrôle de qualité. La VMR de l'AMU est de 1,4 μ M.

9.2 Fidélité

La réplicabilité et la répétabilité de la méthode analytique sont respectivement de 2 %. Ces valeurs ont été déterminées en laboratoire à partir de solutions (6 niveaux de concentration, 6 réplicas par niveau) d'AMU préparées dans de l'urine et soumises à l'ensemble de la procédure analytique.

9.3 Exactitude

L'exactitude de la méthode analytique est vérifiée à chaque série d'analyses à l'aide d'une solution de contrôle contenant la substance analysée. Cette solution est préparée au laboratoire à partir d'AMU d'un lot différent que celui utilisé pour l'étalonnage. Lorsqu'un lot différent n'est pas disponible, un technicien différent prépare la solution de contrôle. La concentration de cette solution est équivalente à une concentration près de l'IBE. Les résultats obtenus sont compilés dans le cadre du suivi d'un contrôle-qualité intralaboratoire.

L'exactitude de la méthode d'analyse déterminée initialement est de 99 %. Cette valeur provient de la compilation de l'écart relatif moyen ($n = 10$) entre la valeur obtenue et la valeur cible de la solution de contrôle-qualité interne décrite dans le paragraphe précédent.

Le laboratoire participe également à un essai d'aptitude pour comparaison interlaboratoire qui lui permet de confirmer la performance de cette méthode analytique.

9.4 Incertitude de mesure

L'incertitude de mesure analytique, équivalant au coefficient de variation *analytique* CV_A de la méthode, a initialement été évaluée à 9,8 %. Elle a été déterminée sur 30 échantillons, répartis en cinq niveaux de concentration sur le domaine d'application, à partir de solutions d'AMU soumises à l'ensemble de la procédure analytique.

10. RÉFÉRENCES

- 1 Lauwerys, R.R., Hoet, P., *Industrial Chemical Exposure*, 3rd edition, Lewis, London, 2001.
- 2 Sébastien Gagné, *Guide de prélèvement des échantillons biologiques*, Montréal, Qc, Canada, 2012.