

## Méthode analytique

# Analyse du 4,4'-méthylènedianiline urinaire hydrolysé

### Responsable technique de la méthode

Sébastien Gagné, M. Sc., chimiste

### Personnes ayant contribué à la présente version de cette méthode

Maggy Lépine, étudiante à la maîtrise pour M.Sc. Biochimie

Lucile Richard, technicienne de laboratoire

MÉTHODES DE  
LABORATOIRES

MA-392



#### 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'étalonnage 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'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'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, 2019  
ISBN : 978-2-89631-990-9  
ISSN : 0820-8395

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

No. Révision : 1 - Date de diffusion: 2019-09-11

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

No. Révision : 1 - Date de diffusion: 2019-09-11

BIOMARQUEUR	VALEUR RECOMMANDÉE (VBG <sup>1</sup> )
4,4'-méthylènedianiline urinaire hydrolysé	50 nmol/L

<sup>1</sup> VBG (Valeur Biologique Guide)

## APPLICABILITÉ

4,4'-méthylènedianiline (MDA) urinaire hydrolysé.

**Domaine** : 0 à 500 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'étalonnage et aux échantillons;
- ▶ Appariement de la composition (matrice) des solutions d'étalonnage et celle des solutions d'échantillon;
- ▶ 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 soit 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

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

### 2) Conditions de prélèvement recommandées

**Moment :** Fin du quart de travail

### 3) Durée de conservation testée et validée

Non évaluée à l'IRSST (Référence : NMS Labs)

### 4) Entreposage

Au réfrigérateur ( $\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Durée maximale : 14 jours

### 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 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 ( $\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) en attendant leur envoi au laboratoire.

*Remarque : Ils ne doivent pas être congelés.*

## RÉACTIFS ET ÉTALONS

- 4,4'-MDA (CAS 101-68-8)
- 4,4'-MDA- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}_2$ ] (CAS 101-77-9)
- Eau grade Optima LC-MS
- Acide acétique (AA) grade ACS
- Méthanol (MeOH) grade LC-MS
- Acétonitrile (ACN) grade LC-MS
- Acide formique (AF) grade LC-MS
- Acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 18M grade ACS
- Hydroxyde de sodium (NaOH) 10N grade ACS
- Toluène ( $\text{C}_7\text{H}_8$ ) grade HPLC

## APPAREILLAGE ET MATÉRIEL

- UPLC-MS/MS Waters Acquity Xevo-TQ
- Bouteille d'argon de pureté  $> 99,997\%$
- Générateur d'azote N2-14 pour pureté  $\geq 95\%$
- Pipettes Thermo Scientific 10, 100, 300 et 1000  $\mu\text{L}$
- Embouts Thermo pour pipette
- Pipette pasteur
- Microtube "Safe-Lock" 1,5 mL
- Évaporateur centrifuge (par exemple, SpeedVac)
- Mélangeur thermique (par exemple, Thermomixer®)
- Centrifugeuse Thermo Scientific Sorvall LEGEND MICRO 21
- Vial d'injection HPLC en verre avec insert de 300  $\mu\text{L}$  et bouchon "pré-fendu"

### Commentaires :

Avant de commencer l'analyse, attendre que toutes les solutions et échantillons soient à la température ambiante.

## PRÉPARATION DE L'ANALYSE

Nombre d'étapes de préparation : 14

Étape 1	Bien brasser les échantillons
Étape 2	Déposer 190 µL d'échantillon dans un microtube de 1,5 mL.
Étape 3	Ajouter 10 µL de la solution de standard interne 4,4'-MDA-[ <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ] de travail à 1 µM, ≈ 50 nM.
Étape 4	Agiter le tube à l'aide d'un agitateur à vortex
Étape 5	Hydrolyser avec 20 µL d'acide sulfurique 18M à 100 °C durant 1 heure à l'aide du mélangeur thermique
Étape 6	Laisser refroidir à la température ambiante durant environ 5 minutes.
Étape 7	Neutraliser avec 140 µL de NaOH 10N.
Étape 8	Extraire avec 400 µL de toluène.
Étape 9	Centrifuger 20 minutes à environ 14 500 RPM.
Étape 10	Transférer la phase organique dans un nouveau microtube de 1,5 mL (≈ 350 µL).
Étape 11	Évaporer à sec à 50 °C (environ 20 minutes) au moyen de l'évaporateur centrifuge (SpeedVac).
Étape 12	Resuspendre dans 200 µL d'eau de grade LC-MS.
Étape 13	Transférer une aliquote de la solution dans un vial d'injection.
Étape 14	Injecter et analyser par 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

<b>Technique analytique</b>	:	Chromatographie liquide à ultra performance couplé à la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS/MS)
<b>Phase mobile</b>	:	Éluant A : MeOH + 0,1 % AA / Éluant B : Eau + 0,1 % AA
<b>Gradient</b>	:	5 % éluant A isocratique pour 0,5 minutes, augmenter linéairement à 90 % éluant A en 2,5 minutes, maintenir à 90 % éluant A pour 1 minute, rééquilibrer à 5 % éluant A pour 2 minutes
<b>Colonne</b>	:	Acquity UPLC HSS T3, 1,8 µm, 2,1 x 50 mm
<b>Débit</b>	:	0,6 mL/min
<b>Température de la colonne</b>	:	40 °C
<b>Température des échantillons</b>	:	15 °C
<b>Volume d'injection</b>	:	5 µL
<b>Mode d'injection</b>	:	Boucle complète
<b>Mode d'ionisation</b>	:	Électronébulisation positif (ESI+)
<b>Paramètres MRM</b>	:	

Channels	Nom composé	Parents (m/z)	Daughter (m/z)	Autodwell	Dwell (s)	Cone (v)	Collision (v)
1	4,4'-MDA	199,0	106,0	√	0.078	35	25
2	4,4'-MDA	199,0	78,9	√	0.078	35	25
3	4,4'-MDA- [ <sup>13</sup> C, <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ]	202,3	108,1	√	0.078	30	25

**Intégration** : Surface de pic

**Transition de quantification** : *m/z* 199 > 106

## 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.

### Commentaires :

La concentration de 4,4'-MDA déterminée dans l'échantillon doit se situer dans le domaine d'étalonnage de la méthode d'analyse. S'il s'avère que la concentration de 4,4'-MDA dans l'échantillon est supérieure à la concentration la plus élevée du domaine d'étalonnage, une dilution manuelle appropriée de l'échantillon avec de l'eau de grade LC/MS est effectuée, puis l'analyse est reprise de nouveau en tenant compte du facteur de dilution lors des calculs.

## CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

La concentration de 4,4'-MDA se calcule comme suit :

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

Où :

Conc. = Concentration de 4,4'-MDA à doser (en nmol/L)  
Conc. lue = Concentration de 4,4'-MDA obtenue 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 (nmol/L)
4,4'-MDA	0,8	2,7

### Précision (Fidélité)

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	RÉPLICABILITÉ (%)	RÉPÉTABILITÉ (%)
4,4'-MDA	4,3	4,3

### Justesse

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	JUSTESSE (%)
4,4'-MDA	97,2

### Récupération

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	RÉCUPÉRATION (%)
4,4'-MDA	94,8

### Incertitude analytique

Note : Ces données représentent la performance de la méthode au moment de sa publication. Pour les valeurs d'incertitude analytique à jour, consulter le site web de l'IRSST.

L'incertitude de mesure analytique ( $CV_a$ ) de la méthode est déterminée à partir de résultats individuels obtenus sur des échantillons soumis à l'ensemble de la procédure analytique. Celle-ci ne tient pas compte d'un seuil de probabilité (95%, par exemple), ni de la contribution de l'incertitude associée à l'échantillonnage.

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	$CV_a$ (%)
4,4'-MDA	6,0

Pour information supplémentaire sur la détermination des incertitudes, se référer au *Document Explicatif pour éléments de validation de méthodes*, I-G-041, de la Direction des Laboratoires de l'IRSST.

## RÉFÉRENCES

1. 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<sup>e</sup> édition, 2019, 129 p.  
<http://www.irsst.qc.ca/media/documents/PubIRSST/T-03.pdf>
2. 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/PubIRSST/T-25.pdf>