

Méthode analytique

Dosage du Triclopyr et du TCPy dans l'urine par UPLC-MS/MS après hydrolyse

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-420





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 de 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, 2024

ISBN : 978-2-89797-277-6



SUIVI DES MODIFICATIONS

PAGE	NATURE DE LA MODIFICATION
Toutes	Nouvelle méthode



DÉTERMINANTS	VALEUR RECOMMANDÉE (IBE ¹)
Triclopyr dans l'urine après hydrolyse (Herbicide)	Aucune
TCPy dans l'urine après hydrolyse (Métabolite biomarqueur de l'herbicide)	Aucune

¹ IBE (Indice biologique d'exposition)

APPLICABILITÉ

Cette méthode s'applique au dosage de l'herbicide Triclopyr (3,5,6-Trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid) et de son métabolite et biomarqueur TCPy (3,5,6-trichloro-2-pyridinol) dans l'urine par UPLC MS/MS*, après hydrolyse (Fišerová *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2022; Gosselin *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2022). Aucun IBE n'est disponible (Gagné, 2019; Sarazin *et al.*, 2019). Le domaine d'applicabilité de la méthode a été fixé approximativement de la limite de quantification de la méthode jusqu'à une concentration équivalente à 200 fois cette dernière.

* Chromatographie liquide à ultraperformance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Domaine d'applicabilité : 2,5 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'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

1 mois à 4°C
1 mois à -20°C

4) Entreposage

Au réfrigérateur ($\approx 4\text{ °C}$)
Durée maximale : 30 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 ($\approx 4\text{ °C}$) en attendant leur envoi au laboratoire.

Remarque : Ils ne doivent pas être congelés.



RÉACTIFS ET ÉTALONS

- 3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCPy; pestanal grade) (CAS 6515-38-4)
- 3,5,6-trichloro-2-pyridinol-4,5,6-¹⁵N¹³C₃ (>97%) (standard interne) (CAS 6515-38-4 non marqué)
- Triclopyr (3,5,6-Trichloro-2-pyridinyloxyacetic acid; pestanal grade) (CAS 55335-06-3)
- 2,4-D-¹³C₆ (acide dichlorophenoxyacétique; 99%) (CAS 150907-52-1) (standard interne)
- β-glucuronidase Type HP-2, ≥100,000 unités/mL
- Acide formique (HCOOH ; CAS : 64-18-6), grade LC-MS (abréviation : FA)
- Acide chlorhydrique (HCl), grade ULTREX
- 1-Chlorobutane (C₄H₉Cl; CAS 109-69-3), OmniSolv, grade HPLC
- Acétate d'ammonium (C₂H₇NO₂; CAS 631-61-8), >99 %
- Eau (H₂O), Grade LC/MS
- Acétonitrile (CH₃CN ; CAS 75-05-8 ; ACN), Optima Grade LC-MS (abréviation : HCN)
- Méthanol (CH₃OH ; CAS : 67-56-1), Optima Grade LC-MS
- Urine synthétique
- G-EQUAS *Urine Control*

APPAREILLAGE ET MATÉRIEL

- UPLC-MS/MS
- Argon de pureté > 99,997 %
- Générateur d'azote pour pureté ≥ 95 %
- Agitateur alternatif Eberbach ou équivalent
- Bain d'évaporation à sec
- Pipettes à volume variable (10 µL-1000 µL)
- Embouts pour pipettes
- Pipette répétitive de type Eppendorf
- Tubes en borosilicate 16x100 mm
- Tubes en borosilicate 16x100 mm vissable avec bouchons
- Microtube jetable Safe-Lock de 1,5 mL
- Centrifugeuse
- Microcentrifugeuse
- Agitateur de type Vortex
- Vial ambré de 15 mL avec bouchon et septum
- Vial ambré de 7 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*).



PRÉPARATION DE L'ANALYSE

Nombre d'étapes de préparation : 19

Étape 1	Bien agiter les échantillons.
Étape 2	Prélever 600 µL d'échantillon et déposer dans une éprouvette en verre vissable de 16 x 100 mm
Étape 3	Ajouter dans l'éprouvette, 100 µL de solution de standard interne (TCPy- ¹⁵ N ¹³ C ₃ 1500 nmol/L, 2,4-D- ¹³ C ₆ 200 nmol/L dans l'eau de grade LC/MS)
Étape 4	Ajouter dans l'éprouvette, 100 µL de solution aqueuse d'acétate d'ammonium 1 mol/L de pH 5,2 ajustée avec du HCl.
Étape 5	Ajouter dans l'éprouvette, 50 µL de solution d'enzyme β-Glucuronidase 6000 unités/mL
Étape 6	Mélanger à l'aide d'un agitateur de type vortex
Étape 7	Incuber dans un bain d'évaporation à sec à 35 °C durant environ 60 minutes sans couvrir
Étape 8	Retirer les échantillons du bain d'évaporation à sec
Étape 9	Ajouter 25 µL d'acide chlorhydrique concentré
Étape 10	Ajouter 400 µL d'eau (grade LC/MS) et agiter environ 5 secondes à l'aide d'un agitateur de type vortex
Étape 11	Ajouter 6 mL de 1-chlorobutane
Étape 12	Boucher les éprouvettes et agiter à haute vitesse avec l'agitateur alternatif (Eberbach) durant environ 10 minutes
Étape 13	Agiter à basse vitesse pour environ 10 minutes supplémentaires
Étape 14	Centrifuger à l'aide de la centrifugeuse à 2500 RPM pour environ 3 minutes
Étape 15	Retirer les éprouvettes avec précaution sans mélanger les phases et faire une congélation rapide (<i>flash freeze</i> – voir la section « Commentaires » pour la définition sommaire)
Étape 16	Transvider le 1-chlorobutane en versant directement dans les éprouvettes
Étape 17	Évaporer à l'aide du bain d'évaporation à sec à 15 psi pour 15 minutes à 40 °C
Étape 18	Ajouter 400 µL de la solution de reconstitution (Méthanol/eau 50/50 % v/v, 0,1% acide formique)
Étape 19	Agiter à l'aide d'un agitateur de type vortex pendant environ 5 secondes et transférer 250 µL dans des vials ; 10 µL seront injectés sur l'instrument d'analyse, soit l'UPLC MS/MS.

Commentaires :

Tous les étalons et échantillons de contrôle de qualité (CQ) sont traités selon la même procédure que les autres échantillons. Les étalons sont préparés dans l'urine synthétique afin de les apparier à la matrice des échantillons urinaires.

La congélation rapide consiste à geler la phase aqueuse à l'aide d'un bloc métallique à -70°C pour transférer plus facilement la phase organique.



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	0,6	68	32	
2,64	0,6	68	32	6
2,65	0,6	5	95	6
2,95	0,6	5	95	6
2,96	0,6	68	32	6
3,50	0,6	68	32	6

Colonne : Waters Acquity UPLC BEH C8, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm

Température de la colonne : 50 °C

Température des échantillons : 15 °C

Volume d'injection : 10 µL

Mode d'ionisation : Électronébulisation négatif (ESI-)

Voltage du capillaire : 0,1 kV

Température de désolvatation : 500 °C

Débit de gaz du cône : 150 L/h

Débit du gaz de collision : 0,16 mL/min

Paramètres MRM :

Canaux	Analyte	Ion parent (m/z)	Ion fille (m/z)	Temps de résidence (s)	Cone (V)	Collision (eV)
1	TCPy	196,02	196,03	0,100	10	10
2	TCPy- ¹⁵ N ¹³ C ₃	201,90	201,91	0,050	16	10
3	2,4-D- ¹³ C ₆	225,00	166,90	0,050	16	14
4	Triclopyr	253,90	195,81	0,100	18	12

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

CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

Calcul de la concentration de déterminants avec correction pour la densité urinaire et pour la créatinine :

Déterminants

La concentration d'un déterminant se calcule comme suit :

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

Où :

Conc. = Concentration du déterminant à doser (en nmol/L)

Conc. lue = Concentration du déterminant obtenue sur la courbe d'étalonnage (en nmol/L)

D = Facteur de dilution

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 :

$$C_{\text{corr}} = \frac{C_i (1,024 - 1)}{(d-1)}$$

Où :

C_{corr} = Concentration corrigée pour la densité (nmol/L corrigé densité)

C_i = Concentration du paramètre biologique (déterminant) (nmol/L)

d = Densité de l'urine analysée

Créatinine

La concentration corrigée en fonction de la créatinine est obtenue en divisant la concentration brute du déterminant par la concentration de la créatinine de cette même urine. Le résultat correspond à la concentration du déterminant en nmol/mmol de créatinine.

$$C_{\text{corr créatinine}} = C_i / C_{\text{créatinine}}$$

Où :

$C_{\text{corr créatinine}}$ = Concentration corrigée en créatinine (nmol/mmol cr.)

C_i = Concentration du paramètre biologique (déterminant) (nmol/L)

$C_{\text{créatinine}}$ = Concentration de créatinine (mmol/L)



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)
Triclopyr urinaire après hydrolyse	0,23	0,76
TCPy urinaire après hydrolyse	0,58	1,9

Précision (Fidélité)

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	RÉPLICABILITÉ (%)	RÉPÉTABILITÉ (%)
Triclopyr urinaire après hydrolyse	3,3	4,6
TCPy urinaire après hydrolyse	2,1	2,8

Justesse

COMPOSÉ OU ÉLÉMENT	JUSTESSE (%)
Triclopyr urinaire après hydrolyse	95
TCPy urinaire après hydrolyse	96

Récupération

Ne s'applique pas puisqu'un appariement de matrice avec de l'urine synthétique a été utilisé pour les étalons et autres contrôles, par rapport aux échantillons urinaires.

RÉFÉRENCES

- Fišerová, P. S., Kohoutek, J., Degrendele, C., Dalvie, M. A. et Klánová, J. (2021). New sample preparation method to analyse 15 specific and non-specific pesticide metabolites in human urine using LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 1166, 122542. 10.1016/j.jchromb.2021.122542
- Gagné, S. (2019). *Guide de prélèvement des échantillons biologiques* 2^e éd. IRSST.
- Gao, B., Poma, G., Malarvannan, G., Dumitrascu, C., Bastiaensen, M., Wang, M. et Covaci, A. (2022). Development of an analytical method based on solid-phase extraction and LC-MS/MS for the monitoring of current-use pesticides and their metabolites in human urine. *J Environ Sci (China)*, 111, 153-163. 10.1016/j.jes.2021.03.029
- Gosselin, N. H., Brunet, R. C., Carrier, G. et Dosso, A. (2005). Worker exposures to triclopyr: risk assessment through measurements in urine samples. *Ann Occup Hyg*, 49(5), 415-422. 10.1093/annhyg/meh106
- Li, Y., Wang, X., Feary McKenzie, J., Mannetje, A., Cheng, S., He, C., Douwes, J. (2022). Pesticide exposure in New Zealand school-aged children: Urinary concentrations of biomarkers and assessment of determinants. *Environ Int*, 163, 107206. 10.1016/j.envint.2022.107206
- Sarazin, P., Lavoué, J., Tardif, R. et Lévesque, M. (2019). *Guide de surveillance biologique de l'exposition - Stratégie de prélèvement et interprétation des résultats*, 8^e éd. IRSST.