



Service de Toxicologie

## Rapport de laboratoire - BIOBRO

**Méthodes d'analyse des marqueurs urinaires de mercure (Hg) et d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs); et de substances perfluorées (PFAS) et PCBs sanguins**

**Novembre 2023**

Professeure Corinne Charlier

Cheffe de Service

Toxicologie clinique, médico-légale, de  
l'environnement et en entreprise, CHU Liège

Catherine Pirard

Responsable scientifique

Toxicologie clinique, médico-légale, de  
l'environnement et en entreprise, CHU Liège

## **TABLE DES MATIERES**

TABLE DES ACRONYMES.....	4
1 INTRODUCTION .....	5
2 DESCRIPTION DES MÉTHODES ANALYTIQUES.....	6
2.1 DOSAGE DU MERCURE .....	6
2.1.1 Préparation de l'échantillon.....	6
2.1.2 Analyse par FIMS.....	6
2.1.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus .....	6
2.1.4 Limites de quantification.....	6
2.2 DOSAGE DE MÉTABOLITES D'HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs).....	7
2.2.1 Préparation de l'échantillon.....	7
2.2.2 Analyse par GC-MS/MS .....	7
2.2.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus .....	8
2.2.4 Limites de quantification.....	9
2.3 DOSAGE DES SUBSTANCES PERFLUORÉES (PFAS) .....	10
2.3.1 Extraction .....	10
2.3.2 Analyse par LC-MS/MS .....	10
2.3.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus .....	11
2.3.4 Limites de quantification.....	12
2.5 DOSAGE DES RETARDATEURS DE FLAMME BROMÉS (PBDEs) .....	13
2.5.1 Préparation de l'échantillon.....	13
2.5.2 Analyse par GC-MS/MS .....	13
2.5.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus .....	14
2.5.4 Limites de quantification.....	14
2.6 DOSAGE DES PCBs INDICATEURS.....	15
2.6.1 Préparation de l'échantillon.....	15
2.6.2 Analyse par GC-MS/MS .....	15
2.6.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus .....	16
Limites de quantification.....	17
2.7 DOSAGE DES PCBs DIOXIN-LIKE .....	18
2.7.1 Préparation de l'échantillon.....	18

2.7.2	Analyse par GC-MS/MS .....	18
2.7.3	Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus .....	20
2.7.4	Limites de quantification.....	20
2.8	RECAPITULATIFS DES SUBSTANCES MESUREES.....	21
3	PLANNING DE LA RÉALISATION DES MESURES .....	23
4	RÉSULTATS DES ANALYSES .....	24
4.1	CONTROLES DE QUALITE INTERNES UTILISES LORS DE LA PHASE 1 .....	25
5	CONTRÔLES DE QUALITÉ EXTERNE ET CERTIFICATION .....	30
5.1	VALIDATION ANALYTIQUE .....	30
5.2	CONTROLES DE QUALITE EXTERNES.....	32
	REFERENCES .....	35

## TABLE DES ACRONYMES

HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
PFAS : substances perfluorées  
PCBs : polychlorobiphényles  
FIMS: Flow Injection Mercury System  
HCl : Acide chlorhydrique  
KMnO<sub>4</sub>:Permanganate de potassium  
KBrO<sub>3</sub>:Bromate de potassium  
KBr : Bromure de potassium  
PI : pour injectable  
LOQ : Limites de quantification  
GC/MS : : Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse  
GC-MS/MS : Chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem  
MSTFA : N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide  
MRM : Multiple Reaction Monitoring  
LOL: Limite de linéarité  
1-NAP: 1-naphtol  
2-NAP: 2-naphtol  
2-FLU: 2-hydroxyfluorène  
3-FLU: 3-hydroxyfluorène  
9-FLU: 9-hydroxyfluorène  
1-PHE: 1-hydroxy-phenanthrene  
2-PHE: 2-hydroxy-phenanthrene  
3-PHE: 3-hydroxy-phenanthrene  
4-PHE: 4-hydroxy-phenanthrene  
1-PY: 1-hydroxypyrrène  
PFHxA: acide perfluorohexanoïque  
PFHpA: acide perfluoroheptanoïque  
PFOA : acide perfluorooctanoïque  
PFNA : acide perfluorononanoïque  
PFDA : acide perfluorodécanoïque  
PFHxS : sulfonate de perfluorohexane  
PFOS : sulfonate de perfluorooctane  
3-PBA : acide 3-phenoxybenzoïque  
LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem  
UPLC/MS : chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse  
ESI : electrospray  
HRMS : spectrométrie de masse à haute résolution  
NCI : Ionisation chimique négative  
TG : triglycérides  
CHT : cholestérol total  
SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques  
CV : coefficient de variation

## 1 INTRODUCTION

---

Le premier programme de Biomonitoring Humain Wallon, financé par le Gouvernement Wallon a démarré en 2019 et a permis d'établir des valeurs de référence sur l'exposition de Wallons âgés entre 3 et 39 ans à diverses substances polluantes rencontrées dans l'environnement. Dans la foulée, un biomonitoring spécifique (BIOBRO) a été mis en place visant à déterminer l'imprégnation de riverains de sites de broyeurs à métaux à certains polluants qui potentiellement contaminent cet environnement industriel particulier.

Les 7 sites étudiés sont :

- Mons-Obourg
- Namur-Beez
- Engis
- Courcelles
- Châtelet
- Charleroi-Marchienne
- Aubange

Les substances à cibler ont été sélectionnées en fonctions des données environnementales (sols, retombées atmosphériques, légumes et fourrage, etc) disponibles autour d'un des sites wallons de broyeur (Obourg), et des données issues d'une campagne de biomonitoring similaire réalisée à Menin par la Région Flamande entre 2007 et 2011.

Ont été retenus :

- Plusieurs métaux dans l'urine: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Tl, Zn et Hg
- Des métabolites urinaires d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dont les 1- et 2-naphtols (métabolites du naphthalène), les 2-, 3- et 9-hydroxyfluorènes (métabolites du fluorène), les 1-, 2-, 3-, et 4-hydroxyphénanthrènes (métabolites du phénanthrène) et le 1-hydroxypyrene (métabolite du pyrène et souvent utilisé comme marqueur représentatif d'une exposition globale aux HAPs) ;
- Des substances perfluorées (PFAS) dans le sang ;
- Des polychlorobiphényles (PCBs) dans le sang dont 7 PCBs indicateurs et 12 PCBs dioxin-like) ;
- Des retardateurs de flamme bromés (7 polybromodiphényléthers ou PBDEs)

Le présent rapport décrit les méthodes analytiques utilisées pour le mercure urinaire, les métabolites de HAPs, les PFAS, les PCBs et les PBDEs, le planning de la réalisation des mesures, et les mesures d'Assurance Qualité (concentrations des différents contrôles internes utilisés, description des méthodes de validation, participation aux programmes de contrôles de qualité externes).

## 2 DESCRIPTION DES MÉTHODES ANALYTIQUES

---

### 2.1 DOSAGE DU MERCURE

Le dosage quantitatif du mercure dans l'urine est réalisé en oxydant l'échantillon par un réactif bromate-bromure (décomposition des composés mercure organiques), avant analyse sur un FIMS (Flow Injection Mercury System).

#### 2.1.1 Préparation de l'échantillon

Après centrifugation (5 minutes à 3000 rpm), 500 µL d'HCl concentré (37%), 200 µL d'un mélange bromate-bromure de potassium (2g de KBr, 0,56 g de KBrO<sub>3</sub> et 25 ml d'eau), et 50 µL d'une solution triton (diluée 100 fois dans l'eau) sont ajoutés à 5 mL d'urine.

#### 2.1.2 Analyse par FIMS

L'échantillon est ensuite analysé par un FIMS-400 qui consiste en un spectromètre à absorption atomique (lampe à mercure paramétrée à 253.7 nm) couplé à un système d'injection FIAS-400 et un Autosampler S10 (Perkin-Elmer). Le volume de la boucle est de 500 µL, et le diamètre intérieur des tubes de la pompe péristaltique est de 1,52 mm pour l'échantillon et le réactif vecteur (acide chlorhydrique 1,2 M) et 1,14 mm pour le KMnO<sub>4</sub> et le borohydrure de sodium. Les autres paramètres du FIMS sont tels que détaillés par Guo et Baasner 1993.

#### 2.1.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

Chaque séquence d'échantillons inclut une courbe de calibration de 7 points constituée d'eau PI fortifiée à des concentrations allant de 0.25 à 10 µg/L, un blanc réactif (eau PI), 2 contrôles de qualité maison (eau PI fortifiée à 2.5 et 7.5 µg/L), 1 matériel provenant d'anciens programmes de Contrôles Externes G EQUAS 8B (Institute and Out-Patient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine of the University Erlangen-Nuremberg), et de maximum 20 échantillons inconnus.

#### 2.1.4 Limites de quantification

LOQ = 0.25 µg/L

## 2.2 DOSAGE DE MÉTABOLITES D'HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs)

Le dosage des 1- et 2-naphtols (métabolites du naphthalène), des 2-, 3-, et 9- hydroxyfluorènes (métabolites du fluorène), des 1-, 2-, 3-,et 4-hydroxyphénanthrènes (métabolites du phénanthrène), et du 1-hydroxypyrene (métabolites du pyrène) dans l'urine est réalisé par extraction liquide-liquide après hydrolyse enzymatique, dérivation au MSTFA et injection en GC-MS/MS.

### 2.2.1 Préparation de l'échantillon

Un millilitre d'urine est hydrolysé une nuit à 40°C en présence d'1 mL tampon acétate de sodium 0.1M (pH ajusté à 5), de 20 µL de sulfatase, 20 µL de β-glucuronidase, et 40 µL de standard interne. L'échantillon hydrolysé est ensuite dilué par 3 mL d'eau ultrapure, puis extrait deux fois par 5 mL d'un mélange pentane-toluène (v/v 80/20). Les 2 phases organiques recueillies après agitation (vortex 10 minutes à 2500 rpm) et centrifugation (5 minutes à 5000 rpm) sont rassemblées, évaporées à sec à 40°C maximum sous un léger flux d'azote, reprises par 30 µL de toluène et 10 µL de MSTFA, transférées dans un vial avec réducteur pour GC/MS, et mises 1/2h à 60°C pour optimiser la réaction de dérivation.

### 2.2.2 Analyse par GC-MS/MS

La détermination finale est réalisée par GC-MS/MS sur un GC 7890A (GC System Agilent Technologies) couplé à un spectromètre de masse 7000A GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies), équipé d'une colonne capillaire HP-5MS (30 m×0.25 mm i.d.×0.25 µm), traversée par de l'Helium (He N60, Air Liquide) à un débit constant de 1.2 ml/min.

#### Programme GC

- Injection : splitless
- Température d'injection : 270°C
- Pression d'injection (surge pressure): 30 psi
- Volume d'injection: 2µL
- Gaz vecteur : hélium
- Température de la ligne de transfert : 230°C

	Rampe t° (°C/min)	Température (°C)	Temps de maintien (min)
Température initiale (°C)		95	1
Rampe 1	30	195	0
Rampe 2	2	201	0
Rampe 3	10	230	5
Rampe 4	30	325	2

## Programme MS/MS

- Ionisation : impact électronique (70eV)
- Température de la source : 230°C
- Température des quadripôles : 150°C
- Mode d'acquisition : MRM

Nom	Ions parents (m/z)	Ions fils (m/z)	Energie de collision (eV)
1-NAP	<b>216.0</b>	<b>185</b>	<b>25</b>
	216.0	73	20
2-NAP	<b>216.0</b>	<b>185</b>	<b>25</b>
	216.0	73	20
2-NAP D7	<b>223.0</b>	<b>191.1</b>	<b>25</b>
9-FLU	<b>254.0</b>	<b>165.1</b>	<b>25</b>
	254.0	239.1	12
3-FLU	<b>254.0</b>	<b>165.1</b>	<b>25</b>
	254.0	239.1	12
2-FLU	<b>254.0</b>	<b>165.1</b>	<b>25</b>
	254.0	239.1	12
4-PHE	<b>234.9</b>	<b>220.0</b>	<b>25</b>
	266.0	73.0	25
4-PHE D9	<b>260.1</b>	<b>243.1</b>	<b>15</b>
3-PHE	<b>266.0</b>	<b>235.2</b>	<b>25</b>
	266.0	73.0	25
1-PHE	<b>266.0</b>	<b>235.2</b>	<b>25</b>
	266.0	73.0	25
2-PHE	<b>266.0</b>	<b>235.2</b>	<b>25</b>
	266.0	73.0	25
1-PY	<b>290.0</b>	<b>259.0</b>	<b>25</b>
1-PY D9	<b>299.0</b>	<b>267.0</b>	<b>25</b>

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification

### 2.2.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

La quantification des métabolites de HAPs est faite par dilution isotopique en utilisant l'isotope 2-NAP D7 pour les 1- et 2-NAP, le 4-PHE D9 pour les 2-, 3-, 9-FLU et les 1-, 2-, 3-, et 4-PHE, et le 1-PY D9 pour le 1-PY.

La courbe de calibration est constituée de 7 points, et construite dans de l'urine synthétique fortifiée à des concentrations croissantes allant de 0.2 à 120 µg/L pour les 1- et 2-NAP, et de 0.05 à 30 µg/L pour les autres métabolites de HAPs. Ces points de calibration sont extraits comme des échantillons réels. Chaque séquence inclut la courbe de calibration, un blanc réactif (urine synthétique), 2 contrôles de qualité maison (urine synthétique enrichie à 3 et 16 µg/L pour les 1- et 2-NAP, et à 0.75 et 3 µg/L pour les autres métabolites de HAPs), 2 matériels

provenant d'anciens programmes de Contrôles Externes (2 G EQUAS 14/15 A et 14/15B organisés par the Institute and Out-Patient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine of the University Erlangen-Nuremberg ; et 1 OSEQAS provenant de l'Institut National de Santé Publique du Québec – INSPQ), et 30 à 40 échantillons inconnus maximum.

#### 2.2.4 Limites de quantification

Nom	LOQ (µg/L)	LOL (µg/L)
1-NAP	0.4	120
2-NAP	0.4	120
2-FLU	0.10	30
3-FLU	0.10	30
9-FLU	0.10	29
1-PHE	0.10	30
2-PHE	0.10	30
3-PHE	0.10	30
4-PHE	0.10	30
1-PY	0.15	30

## 2.3 DOSAGE DES SUBSTANCES PERFLUORÉES (PFAS)

Le dosage de l'acide perfluorohexanoïque (PFHxA), acide perfluoroheptanoïque (PFHpA), acide perfluorooctanoïque (PFOA), acide perfluorononanoïque (PFNA), acide perfluorodécanoïque (PFDA), sulfonate de perfluorohexane (PFHxS) et sulfonate de perfluorooctane (PFOS) a été réalisé dans le sérum après extraction en phase solide et injection en chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS), selon la méthode décrite dans Dufour et al., 2018.

### 2.3.1 Extraction

Vingt microlitres de standard interne (solution contenant chacun des 7 PFAS marqué au <sup>13</sup>C) sont ajoutés à 1 mL d'échantillon de sérum, qui est ensuite acidifié par 2 mL d'un mélange acide formique-H<sub>2</sub>O (50/50) et mis au bain à ultra son pendant 15 minutes. Après centrifugation (5 min à 3000 rpm), l'échantillon acidifié est chargé sur une cartouche SPE Oasis WAX (60 mg) préalablement conditionnée avec 2 mL de méthanol et 2 mL d'eau ultrapure. La cartouche est lavée par 1 mL d'une solution d'acide formique (2% dans l'eau) et 1.5 mL de méthanol, avant d'être éluée par 2 mL d'un mélange méthanol-ammoniaque 98/2. L'éluat est évaporé à sec à 30°C sous un léger flux d'azote, et repris par 80 µL d'une solution d'acétate d'ammonium 2 mM /acétonitrile (75/25), et transférées dans un vial avec réducteur pour UPLC/MS.

### 2.3.2 Analyse par LC-MS/MS

La détermination finale est réalisée par LC-MS/MS sur une UHPLC Acquity (Waters) équipée d'une colonne Kinetex F5 (Phenomenex) de 100 mm, et couplée à un spectromètre de masse Quattro Premier opérant en electrospray négatif (ESI-)

#### *Programme LC*

- Colonne : Kinetex F5 100 x 2.1 mm, 1.7 µm
- Température de la colonne : 40°C
- Volume d'injection : 10 µL
- Phase mobile A : acétate d'ammonium 2 mM
- Phase mobile B : Acétonitrile

	<b>Temps (min)</b>	<b>Débit (ml/min)</b>	<b>Composition A (%)</b>	<b>Composition B (%)</b>
Initiale		0.400	92	8
Rampe 1	0.5	0.400	92	8
Rampe 2	11.0	0.400	60	40
Rampe 3	11.2	0.400	0	100
Rampe 4	12.7	0.400	0	100
Rampe 5	13.0	0.400	92	8
Rampe 6	16.0	0.400	92	8

#### *Programme MS/MS*

- Mode d'ionisation : électrospray négatif (ESI-)
- Voltage du capillaire : 1 kV
- Température de la source : 140°C
- Température de désolvatation : 400°C
- Débit du gaz de désolvatation (N<sub>2</sub>) : 13.33 mL/min
- Débit du gaz de collision : 0.1 ml/min
- Mode d'acquisition : MRM

Plage	Composé	Ion précurseur (m/z)	Ion produit (m/z)	Voltage du cône (V)	Énergie de collision (eV)	Dwell time (s)
3.9 – 6.2 min	PFHxA	312.8	<b>118.9</b>	10	20	0.15
			268.9	10	10	0.15
6.2 – 7.8 min	PFHpA	362.8	<b>168.9</b>	10	15	0.2
			318.9	10	10	0.2
7.8 – 9.2 min	PFHxS	398.7	<b>80</b>	45	35	0.1
			99	45	30	0.1
	PFOA	412.7	<b>168.9</b>	14	20	0.1
			368.9	14	10	0.1
9.2 – 10.1 min	PFNA	462.7	<b>219</b>	10	15	0.2
			418.9	10	10	0.2
10.1 – 11.2 min	PFOS	498.7	<b>80</b>	50	50	0.04
			99	50	35	0.04
	PFDA	512.7	<b>219</b>	13	20	0.1
			468.8	13	10	0.1

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification

### 2.3.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

Chaque PFAS est quantifié avec son homologue marqué au <sup>13</sup>C. La courbe de calibration est réalisée au moyen de 7 solutions standards de concentrations croissantes (correspondant à des concentrations sériques allant de 0.5 à 50 µg/L pour le PFOS et PFOA, et de 0.1 à 10 µg/L pour les autres PFAS). Chaque série d'échantillons comprend la droite non extraite, un blanc réactif, 3 matériels provenant d'anciens programmes de Contrôles Externes (AMAP provenant de l'Institut National de Santé Publique du Québec – INSPQ), et jusque 55 échantillons inconnus.

#### 2.3.4 Limites de quantification

Nom	LOQ ( $\mu\text{g/L}$ )	LOL ( $\mu\text{g/L}$ )
PFHxA	0.10	10.0
PFHpA	0.10	10.0
PFOA	0.50	50.0
PFNA	0.10	10.0
PFDA	0.10	10.0
PFHxS	0.15	10.0
PFOS	0.50	50.0

## 2.5 DOSAGE DES RETARDATEURS DE FLAMME BROMÉS (PBDES)

Le dosage de 7 polybromodiphényléthers (PBDEs), incluant le PBDE-28, PBDE-47, PBDE-99, PBDE-100, PBDE-153, PBDE-154, et le PBDE-183 a été réalisé selon la méthode décrite dans Pirard et al. (2018). Brièvement, l'échantillon de sérum est hydrolysé en milieu acide, extrait par un mélange de solvants organiques, et purifié sur une colonne PHREE avant injection en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

### 2.5.1 Préparation de l'échantillon

A 1 mL de sérum sont ajoutés 0.7 mL d'eau LC/MS, 0.3 mL d'acide acétique glacial et 20 µL de standard interne. L'échantillon est ensuite agité pendant 1h (2500 tour/min), et extrait 2 fois par 4 mL d'hexane/acétone (95/5) (agitation 10 min à 2500 tour/min). Les deux phases organiques successives collectées après centrifugation (5 min à 300 rpm) sont évaporées à 40°C sous un faible flux d'azote jusque 500 µL, déposée sur une cartouche PHREE (Phenomenex) surmontée d'1 cm de sulfate de sodium anhydre. L'éluat est ensuite transféré dans un vial silanisé contenant 50 µL de nonane, et laissé évaporé à température ambiante une nuit jusque 50 µL.

La vaisselle réutilisable (tubes servant à l'évaporation) est lavée à l'eau et au savon, rincées à l'acétone et à l'hexane, et laissée une nuit à 300°C afin de minimiser au maximum la contamination externe.

### 2.5.2 Analyse par GC-MS/MS

La détermination finale est réalisée par GC-MS sur un GC 7890A couplé à un spectromètre de masse 7000A GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies), équipé d'une colonne capillaire Restek Rtx-1614 (30m x 0.25mm ID x 0.10 µm df), traversée par de l'Helium (He N60, Air Liquide) à un débit constant de 2.0 ml/min.

#### *Programme GC*

- Injection : pulsed splitless
- Température d'injection : 325°C
- Pression d'injection (surge pressure): 65 psi
- Volume d'injection: 2 µL
- Gaz vecteur : hélium
- Température de la ligne de transfert : 300°C

	Rampe t° (°C/min)	Température (°C)	Temps de maintien (min)
Température initiale (°C)		140	1
Rampe 1	10	180	0
Rampe 2	3	195	0
Rampe 3	10	240	0
Rampe 4	5	250	0
Rampe 5	100	315	8

### Programme MS/MS

- Ionisation : Ionisation chimique négative (NCI)
- Température de la source : 200°C
- Température des quadripôles : 150°C
- Mode d'acquisition : SIM

Les rapports masse sur charge des ions sélectionnés en SIM sont 79.2 et 81.2 pour tous les PBDEs mesurés.

#### 2.5.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

Les PBDEs sont quantifiés avec le PBDE-51, PBDE-156 ou le PBDE-181 selon leur degré de bromation. Ces PBDEs utilisés comme standard interne ne sont pas détectés (ou en quantités négligeables) dans les échantillons sanguins.

La courbe de calibration est constituée de 7 points, et construite dans du sérum fœtal de bœuf fortifiée à des concentrations croissantes allant de 2 à 500 ng/L. Ces points de calibration sont extraits comme des échantillons réels. Chaque séquence inclut la courbe de calibration, un blanc réactif (eau LC/MS), un blanc sérum fœtal de bœuf, un contrôle de qualité maison (sérum fœtal de bœuf enrichi à 10 ng/L), 1 matériel provenant d'anciens programmes de Contrôles Externes (AMAP provenant de l'Institut National de Santé Publique du Québec – INSPQ), et jusque 30 échantillons inconnus.

#### 2.5.4 Limites de quantification

<b>Composé</b>	<b>LOQ (ng/L)</b>	<b>LOL (ng/L)</b>
PBDE-28	5.4	500
PBDE-47	5.0	500
PBDE-99	5.3	500
PBDE-100	5.0	413
PBDE-153	5.0	500
PBDE-154	6.0	500
PBDE-183	5.0	500

## 2.6 DOSAGE DES PCBs INDICATEURS

Le dosage des 7 PCBs indicateurs (PCB-28, -52, -101, -118, -138, -153, -180) a été réalisé selon une méthode inspirée du protocole utilisé pour le dosage des PBDEs (Pirard et al., 2018). Brièvement, l'échantillon de sérum est hydrolysé en milieu acide, extrait par un mélange de solvants organiques, et purifié sur une colonne PHREE avant injection en chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS).

### 2.6.1 Préparation de l'échantillon

Vingt microlitres de standard interne sont ajoutés à 1 mL de sérum et laissés agiter pendant 1h (2500 tour/min) pour équilibration. Ensuite, 0.7 mL d'eau LC/MS, 0.3 mL d'acide acétique glacial, et 50 µL d'isopropanol sont ajoutés, avant une extraction double par un mélange d'hexane/acétone 95/5 (2x4mL). Les deux phases organiques successives collectées après centrifugation (5 min à 300 rpm) sont évaporées à 40°C sous un faible flux d'azote jusque 500 µL, déposées sur une cartouche PHREE (Phenomenex) surmontée d'1 cm de sulfate de sodium anhydre. L'éluat est ensuite transféré dans un vial silanisé contenant 50 µL de nonane, et laissé évaporé à température ambiante une nuit jusque 50 µL.

La vaisselle réutilisable (tubes servant à l'évaporation) est lavée à l'eau et au savon, rincées à l'acétone et l'hexane, et laissée une nuit à 300°C afin de minimiser au maximum la contamination externe.

### 2.6.2 Analyse par GC-MS/MS

La détermination finale est réalisée sur un GC 7890A-7000A GC/MS (Agilent Technologies). Un duo de colonnes Restek Rxi-17SIL (1.5m x 0.25mm ID x 0.25 µm) et Rxi-XLB (30m x 0.25mm ID x 0.25 µm) reliées entre elles par un connecteur press-fit (0.25x0.25 mm ID) est utilisé avec un débit constant de 1.4 ml/min d'He (He N60, Air Liquide).

#### *Programme GC*

- Injection : splitless
- Température d'injection : 300°C
- Volume d'injection: 2 µL
- Gaz vecteur : hélium
- Température de la ligne de transfert : 230°C

	Débit (°C/min)	Température (°C)	Temps de maintien (min)
Température initiale (°C)		140	1
Rampe 1	60	200	0
Rampe 2	20	290	0
Rampe 3	2	300	0

## Programme MS/MS

- Ionisation : Impact électronique
- Température de la source : 230°C
- Température des quadripôles : 150°C
- Mode d'acquisition : MRM

Nom	Ions parents (m/z)	Ions fils (m/z)	Energie de collision (eV)
PCB-28	<b>257.9</b>	<b>186.0</b>	<b>30</b>
	185.9	151.0	25
PCB-28 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>267.5</b>	<b>198.1</b>	<b>30</b>
PCB-52	<b>289.3</b>	<b>220.0</b>	<b>30</b>
	291.3	222.0	25
PCB-52 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>303.4</b>	<b>233.9</b>	<b>30</b>
PCB-101	<b>325.3</b>	<b>256.0</b>	<b>35</b>
	327.3	256.0	35
PCB-101 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>337.3</b>	<b>267.9</b>	<b>35</b>
PCB-118	<b>325.3</b>	<b>256.0</b>	<b>35</b>
	327.3	256.0	35
PCB-118 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>337.3</b>	<b>267.9</b>	<b>35</b>
PCB-138	<b>359.8</b>	<b>289.9</b>	<b>35</b>
	359.8	287.8	35
PCB-138 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>371.3</b>	<b>301.9</b>	<b>35</b>
PCB-153	<b>359.8</b>	<b>289.9</b>	<b>35</b>
	359.8	287.8	35
PCB-153 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>371.3</b>	<b>301.9</b>	<b>35</b>
PCB-180	<b>393.3</b>	<b>323.9</b>	<b>35</b>
	395.2	323.9	35
PCB-180 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>405.4</b>	<b>335.9</b>	<b>35</b>

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification

### 2.6.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

Chaque PCB est quantifié avec son homologue marqué au <sup>13</sup>C<sub>12</sub>. La courbe de calibration est réalisée au moyen de 9 solutions standards de concentrations croissantes (correspondant à des concentrations sériques allant de 1 à 1000 ng/L). Chaque série d'échantillons comprend la droite non extraite, 1 contrôle de qualité maison (sérum enrichi à 10 ng/L), un blanc sérum (du sérum utilisé pour les QC), 1 blanc réactif, 1 matériel provenant d'anciens programmes de Contrôles Externes (AMAP provenant de l'Institut National de Santé Publique du Québec – INSPQ), et jusque 30 échantillons inconnus.

## Limites de quantification

<b>Composé</b>	<b>LOQ (ng/L)</b>	<b>LOL (ng/L)</b>
PCB 28	18	1000
PCB 52	15	1000
PCB 101	15	1000
PCB 118	5	1000
PCB 138	6	1000
PCB 153	7	1000
PCB 180	5	1000

## 2.7 DOSAGE DES PCBs DIOXIN-LIKE

Les PCBs-DL comprennent les 4 PCBs coplanaires (ou non-ortho substitués) c'est-à-dire les PCB-77, -81, -126 et -169, et 7 PCBs mon-ortho substitués à savoir les PCB-105, -114, -123, -156, -157, -167, et -189. Le PCB-118 avait été dosé précédemment parmi les PCBs indicateurs. Une étape de purification supplémentaire est réalisée par rapport aux PCBs indicateurs afin de pouvoir utiliser une injection en large volume sur la GC-MS/MS. Ce type d'injection permet de compenser en partie le manque de sensibilité du triple quadrupôle par rapport à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS).

### 2.7.1 Préparation de l'échantillon

Vingt microlitres de standard interne sont ajoutés à 1 mL de sérum et laissés agiter pendant 1h (2500 tour/min) pour équilibration. Ensuite, 0.7 mL d'eau LC/MS, 0.3 mL d'acide acétique glacial, et 50 µL s'isopropanol sont ajoutés, avant une extraction double par un mélange d'hexane/acétone 95/5 (2x4mL). Les deux phases organiques successives collectées après centrifugation (5 min à 300 rpm) sont évaporées à 40°C sous un faible flux d'azote jusque 500 µL, déposées sur une cartouche PHREE (Phenomenex) surmontée d'1 cm de sulfate de sodium anhydre. Ensuite, l'éluat est déposé sur une nouvelle cartouche PHREE, puis transféré dans un vial silanisé contenant 50 µL de nonane, et laissé évaporé à température ambiante une nuit jusque 50 µL.

La vaisselle réutilisable (tubes servant à l'évaporation) est lavée à l'eau et au savon, rincées à l'acétone et l'hexane, et laissée une nuit à 300°C afin de minimiser au maximum la contamination externe.

### 2.7.2 Analyse par GC-MS/MS

La détermination finale est réalisée sur un GC 7890A-7000A GC/MS (Agilent Technologies). Un duo de colonnes Restek Rxi-17SIL (1.5m x 0.25mm ID x 0.25 µm) et Rxi-XLB (30m x 0.25mm ID x 0.25 µm) reliées entre elles par un connecteur press-fit (0.25x0.25 mm ID) est utilisé avec un débit constant de 1.4 ml/min d'He (He N60, Air Liquide).

#### Programme GC

- Injection : Solvent vent
- Volume et vitesse d'injection: 25 µL ; 700 µL/min
- Température d'injection : 140°C maintenu 0.32 min, puis augmentation jusque 340°C à 600°C/min, maintenu 5 minutes
- Paramètres de ventilation (« vent ») : 200 mL/min, 5 psi, 0.32 min

	Débit (°C/min)	Température (°C)	Temps de maintien (min)
Température initiale (°C)		140	1
Rampe 1	60	200	0
Rampe 2	20	290	0
Rampe 3	2	300	0

- Gaz vecteur : hélium
- Température de la ligne de transfert : 325°

*Programme MS/MS*

- Ionisation : Impact électronique
- Température de la source : 230°C
- Température des quadripôles : 150°C
- Mode d'acquisition : MRM

Nom	Ions parents (m/z)	Ions fils (m/z)	Energie de collision (eV)
PCB-77	<b>289.3</b>	<b>220.0</b>	<b>30</b>
	291.3	222.0	25
PCB-77 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>303.4</b>	<b>233.9</b>	<b>30</b>
PCB-81	<b>289.3</b>	<b>220.0</b>	<b>30</b>
	291.3	222.0	25
PCB-81 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>303.4</b>	<b>233.9</b>	<b>30</b>
PCB-105	<b>325.3</b>	<b>256.0</b>	<b>35</b>
	327.3	256.0	35
PCB-105 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>337.3</b>	<b>267.9</b>	<b>35</b>
PCB-114	<b>325.3</b>	<b>256.0</b>	<b>35</b>
	327.3	256.0	35
PCB-114 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>337.3</b>	<b>267.9</b>	<b>35</b>
PCB-123	<b>325.3</b>	<b>256.0</b>	<b>35</b>
	327.3	256.0	35
PCB-123 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>337.3</b>	<b>267.9</b>	<b>35</b>
PCB-126	<b>325.3</b>	<b>256.0</b>	<b>35</b>
	327.3	256.0	35
PCB-126 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>337.3</b>	<b>267.9</b>	<b>35</b>
PCB-156	<b>359.8</b>	<b>289.9</b>	<b>35</b>
	359.8	287.8	35
PCB-156 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>371.3</b>	<b>301.9</b>	<b>35</b>
PCB-157	<b>359.8</b>	<b>289.9</b>	<b>35</b>
	359.8	287.8	35
PCB-157 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>371.3</b>	<b>301.9</b>	<b>35</b>
PCB-167	<b>359.8</b>	<b>289.9</b>	<b>35</b>
	359.8	287.8	35
PCB-167 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>371.3</b>	<b>301.9</b>	<b>35</b>
PCB-169	<b>359.8</b>	<b>289.9</b>	<b>35</b>
	359.8	287.8	35
PCB-169 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>371.3</b>	<b>301.9</b>	<b>35</b>
PCB-189	<b>393.3</b>	<b>323.9</b>	<b>35</b>
	395.2	323.9	35
PCB-189 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	<b>405.4</b>	<b>335.9</b>	<b>35</b>

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification

### 2.7.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

Chaque PCB est quantifié avec son homologue marqué au  $^{13}\text{C}_{12}$ . La courbe de calibration est réalisée au moyen de 9 solutions standards de concentrations croissantes (correspondant à des concentrations sériques allant de 0.5 à 500 ng/L). Chaque série d'échantillons comprend la droite non extraite, 1 contrôle de qualité maison (sérum enrichi à 10 ng/L), un blanc sérum (du sérum utilisé pour les QC), 1 blanc réactif, un contrôle commercial SRM 1589a (National Institute of Standards and Technology - NIST, Maryland, États-Unis) et jusque 30 échantillons inconnus.

### 2.7.4 Limites de quantification

<b>Composé</b>	<b>LOQ (ng/L)</b>	<b>LOL (ng/L)</b>
PCB-77	1.0	500
PCB-81	1.0	500
PCB-105	5.5	500
PCB-114	1.2	500
PCB-123	1.6	500
PCB-126	1.0	500
PCB-156	3.4	500
PCB-157	2.1	500
PCB-167	2.3	500
PCB-169	1.0	500
PCB-189	2.0	500

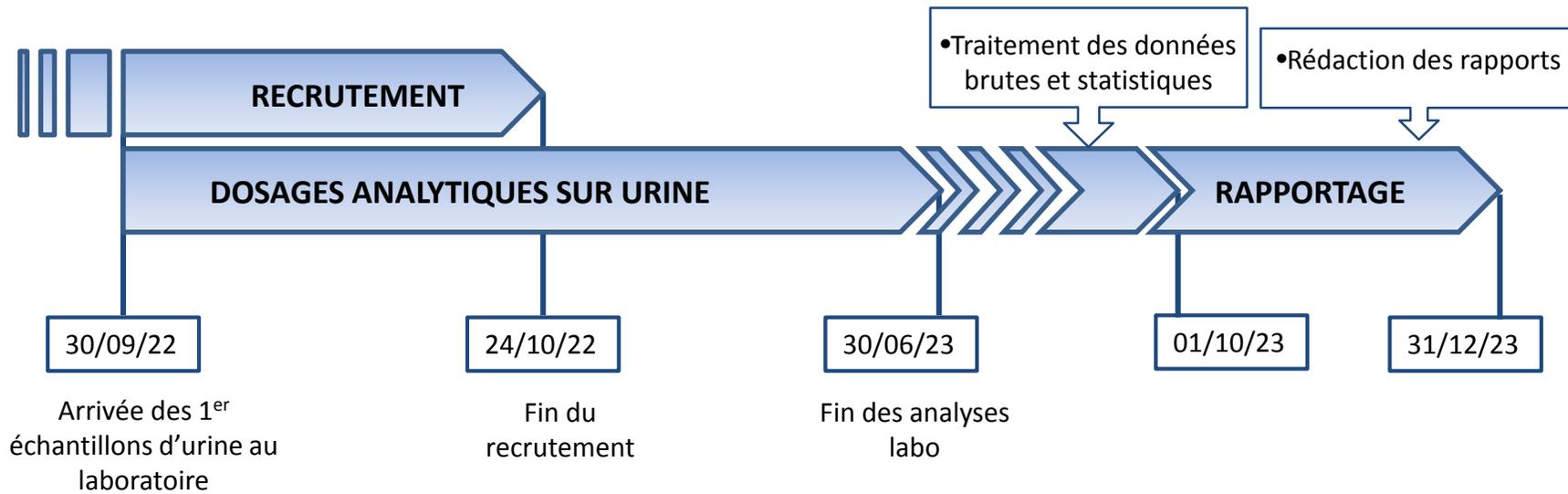
## 2.8 RECAPITULATIFS DES SUBSTANCES MESUREES

SUBSTANCES MESURÉES	SUBSTANCES MÈRES	TECHNIQUE ANALYTIQUE	LOQ (µg/L)
<b><i>Mercur</i></b>			
Hg	Hg	FIMS	0.25
<b><i>Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)</i></b>			
1-naphtol	Naphtalène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.40
2-naphtol	Naphtalène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.40
2-hydroxyfluorène	Fluorène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.10
3-hydroxyfluorène	Fluorène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.10
9-hydroxyfluorène	Fluorène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.10
1-hydroxyphénanthrène	Phénanthrène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.10
2-hydroxyphénanthrène	Phénanthrène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.10
3-hydroxyphénanthrène	Phénanthrène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.10
4-hydroxyphénanthrène	Phénanthrène	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.10
1-hydroxypyrene	Pyrene	LLE-GC-MS/MS (dérivé au MSTFA)	0.15

<b>SUBSTANCES MESURÉES</b>	<b>TECHNIQUE ANALYTIQUE</b>	<b>LOQ (ng/L)</b>
<b><i>Substances perfluorées (PFAS)</i></b>		
PFHxA	SPE-LC-MS/MS	100
PFHpA	SPE-LC-MS/MS	100
PFOA	SPE-LC-MS/MS	500
PFNA	SPE-LC-MS/MS	100
PFDA	SPE-LC-MS/MS	100
PFHxS	SPE-LC-MS/MS	150
PFOS	SPE-LC-MS/MS	500
<b><i>Retardateurs de flamme bromés (PBDEs)</i></b>		
PBDE-28	LLE-SPE-GC-(NCI)MS	5.4
PBDE-47	LLE-SPE-GC-(NCI)MS	5.0
PBDE-99	LLE-SPE-GC-(NCI)MS	5.3
PBDE-100	LLE-SPE-GC-(NCI)MS	5.0
PBDE-153	LLE-SPE-GC-(NCI)MS	5.0
PBDE-154	LLE-SPE-GC-(NCI)MS	6.0
PBDE-183	LLE-SPE-GC-(NCI)MS	5.0
<b><i>PCBs indicateurs</i></b>		
PCB-28	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	18
PCB-52	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	15
PCB-101	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	15
PCB-118	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	5
PCB-138	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	6
PCB-153	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	7
PCB-180	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	5
<b><i>PCBs dioxin-like</i></b>		
PCB-77	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	1.0
PCB-81	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	1.0
PCB-105	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	5.5
PCB-114	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	1.2
PCB-123	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	1.6
PCB-126	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	1.0
PCB-156	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	3.4
PCB-157	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	2.1
PCB-167	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	2.3
PCB-169	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	1.0
PCB-189	LLE-SPE-GC-(EI)MS/MS	2.0

### 3 PLANNING DE LA REALISATION DES MESURES

Les dosages de mercure, HAPs, PFAS, PBDEs, et PCBs ont été réalisés au fur et à mesure de l'arrivée des échantillons, et en fonction des disponibilités des instruments LC et GC-MS/MS. Les diagrammes ci-dessous représentent le déroulement des évènements.



#### 4 RESULTATS DES ANALYSES

---

Les résultats sont exprimés en µg/L (et µg/ g créatinine en annexe) pour les dosages dans l'urine, et en µg/L pour les dosages de PFAS dans le sérum, et ng/g lipide et ng/L pour les dosages PCBs et PBDEs dans le sérum.

La créatinine urinaire a été mesurée au CHU de Liège sur un ARCHITECT ci 4100 (ABBOTT, Illinois, USA), par test colorimétrique cinétique fondé sur la méthode de Jaffé. Dans cette méthode, la créatinine forme avec le picrate en milieu alcalin un complexe jaune orangé. La vitesse de formation de la coloration est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon.

Le contenu lipidique des échantillons de sérum a été déterminé en dosant les triglycérides (TG) et le cholestérol total (CHT) par réactions enzymatiques sur l'automate ALINITY C + en utilisant les kits de réactifs Abbott prévus à cet effet.

La concentration en lipides totaux est ensuite calculée en utilisant la formule suivante (Phillips et al., 1989):

$$\text{Lipides totaux (g/L)} = \text{CHT (g/L)} \times 2.27 + \text{TG (g/L)} + 62.3$$

Le laboratoire de Toxicologie du CHU Liège est accrédité selon les normes ISO17025 et 15189 par Belac pour plusieurs dosages dont celui du mercure urinaire. Si le laboratoire n'est pas accrédité pour les autres dosages du biomonitoring, la validation analytique ainsi que les mesures pour assurer la qualité des résultats pour chaque échantillon sont identiques aux méthodes accréditées. Ces mesures consistent à encadrer les échantillons (20 à 50 maximum par série suivant l'analyse) par différents contrôles de qualité internes, et un blanc réactif afin de s'assurer du contrôle d'une éventuelle contamination de la verrerie, des réactifs, et des instruments du laboratoire. La droite de calibration suivant le même cheminement que les échantillons (à l'exception des PCBs et des PFAS) et étant donc impactée de la même manière, les concentrations des échantillons ne sont pas corrigées par le blanc réactif. Néanmoins, si ce dernier montre des concentrations supérieures à la LOQ, la série d'échantillons est invalidée.

#### 4.1 CONTROLES DE QUALITE INTERNES UTILISES LORS DE LA PHASE 1

Les valeurs des différents contrôles de qualité internes ainsi que les écarts acceptables sont reprises dans les tableaux ci-dessous pour chaque marqueur mesuré lors de la phase 1. Certains matériaux ont été dilués afin de rester dans les gammes de concentrations rencontrées en population générale (pour le TCPY par exemple).

<b>MERCURE</b>		
	<b>Hg (µg/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable
QC maison N1	2.5	2s: 2.16-2.84 3s: 2.00-3.00
QC maison N2	7.5	2s: 6.97-8.03 3s: 6.71-8.29
G EQUAS 63 8B	0.47	0.29-0.65
G EQUAS 65 8B	0.29	0.20-0.38

<b>HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPs)</b>										
	<b>1-NAP (µg/L)</b>		<b>2-NAP (µg/L)</b>		<b>2-FLU (µg/L)</b>		<b>3-FLU (µg/L)</b>		<b>9-FLU (µg/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
QC maison N1	3.00	2s: 2.40-3.60 3s: 2.10- 3.90	3.00	2s: 2.40-3.60 3s: 2.10- 3.90	0.75	2s: 0.600-0.900 3s: 0.525-0.975	0.75	2s: 0.600-0.900 3s: 0.525-0.975	0.75	2s: 0.600-0.900 3s: 0.525-0.975
QC maison N2	16.00	2: 12.8-19.2 3s: 11.2-20.8	16.00	2: 12.8-19.2 3s: 11.2-20.8	4.00	2s: 3.20-4.80 3s: 2.80-5.20	4.00	2s: 3.20-4.80 3s: 2.80-5.20	4.00	2s: 3.20-4.80 3s: 2.80-5.20
OSEQAS 2101	-	-	17.1	10.1-24.1	1.60	0.939-2.26	4.71	2.72-6.70	0.991	0.564-1.42
OSEQAS 2104	-	-	9.09	5.44-12.7	2.77	1.65-3.89	1.67	0.91-2.35	0.871	0.486-1.26
G EQUAS 66 14/15A	7.65	5.64-9.66	9.71	7.07-12.35	-	-	-	-	-	-
G EQUAS 66 14/15B	16.91	13.16-20.66	15.35	13.13-17.57	-	-	-	-	-	-
G EQUAS 67 14/15A	2.58	1.77-3.39	3.74	2.72-4.76	-	-	-	-	-	-

<b>PFAS</b>				
	<b>PFHxS (µg/L)</b>		<b>PFOS (µg/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
AM-S-Y1801	1.64	1.13-2.15	27.1	18.3-35.9
AM-S-Y1802	14.1	9.79-18.4	86	60.2-112
AM-S-Y1803	4.3	2.96-5.64	58.5	40.7-76.3

<b>PFAS</b>										
	<b>PFHxA (µg/L)</b>		<b>PFHpA (µg/L)</b>		<b>PFOA (µg/L)</b>		<b>PFNA (µg/L)</b>		<b>PFDA (µg/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
AM-S-Y1801	3.79	2.63-4.95	1.49	0.874-2.10	50.2	38.9-61.5	2.35	1.60-3.10	0.407	0.227-0.587
AM-S-Y1802	1.19	0.822-1.56	0.843	0.495-1.19	5.18	3.84-6.52	0.884	0.595-1.17	1.37	0.794-1.95
AM-S-Y1803	2.44	1.68-3.20	3.85	2.24-5.45	8.96	6.85-11.1	1.52	1.05-1.99	3.96	2.32-5.61

<b>PBDEs</b>											
	<b>PBDE-28 (ng/L)</b>		<b>PBDE-47 (ng/L)</b>		<b>PBDE-99 (ng/L)</b>		<b>PBDE-100 (ng/L)</b>		<b>PBDE-153 (ng/L)</b>		
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Ecart acceptable
QC maison	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5
AM-W-2003*	0.174	0.125-0.223	0.98	0.748-1.21	0.78	0.609-0.951	0.094	0.064-0.123	0.161	0.115-0.207	
AM-W-2106*	0.341	0.249-0.433	0.172	0.116-0.228	0.462	0.352-0.572	0.374	0.285-0.463	0.208	0.150-0.266	

\*Le contrôle AM-W-2003 a été systématiquement dilué deux fois, le contrôle AM-W-2106 dilué 4 fois.

<b>PBDEs</b>				
	<b>PBDE-154 (ng/L)</b>		<b>PBDE-183 (ng/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
QC maison	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5
AM-W-2003*	0.464	0.353-0.575	0.318	0.194-0.442
AM-W-2106*	0.463	0.350-0.576	0.145	0.0816-0.208

\*Le contrôle AM-W-2003 a été systématiquement dilué deux fois, le contrôle AM-W-2106 dilué 4 fois.

<b>PCBs indicateurs</b>										
	<b>PCB-28 (ng/L)</b>		<b>PCB -52 (ng/L)</b>		<b>PCB-101 (ng/L)</b>		<b>PCB-118 (ng/L)</b>		<b>PCB-138 (ng/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
QC maison	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5
AM-W-2003*	889	601-1180	319	220-418	678	469-887	424	318-530	418	262-574
AM-W-2106*	895	614-1180	395	272-518	569	394-744	496	373-619	867	729-1005
SRM 1589a (NIST)	40.8	34.7-46.9	45.0	38.2-51.8	58.3	49.6-67.0	168	143-193	537	456-618

\*Le contrôle AM-W-2003 a été systématiquement dilué deux fois, le contrôle AM-W-2106 dilué 4 fois.

<b>PCBs indicateurs</b>				
	<b>PCB-153 (ng/L)</b>		<b>PCB-180 (ng/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
QC maison	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5
AM-W-2003*	539	374-704	353	254-461
AM-W-2106*	1730	1240-2220	426	299-553
SRM 1589a (NIST)	936	796-1076	523	445-601

\*Le contrôle AM-W-2003 a été systématiquement dilué deux fois, le contrôle AM-W-2106 dilué 4 fois.

<b>PCBs-DL</b>												
	<b>PCB-77 (ng/L)</b>		<b>PCB-81 (ng/L)</b>		<b>PCB-105 (ng/L)</b>		<b>PCB-114 (ng/L)</b>		<b>PCB-123 (ng/L)</b>		<b>PCB-126 (ng/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
QC maison	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5
SRM 1589a	<1	-	1.9	1.5-2.2	39.8	31.8-47.8	16.2	13.0-19.4	-	-	<1	-

<b>PCBs DL</b>										
	<b>PCB-156 (ng/L)</b>		<b>PCB-157 (ng/L)</b>		<b>PCB-167 (ng/L)</b>		<b>PCB-169 (ng/L)</b>		<b>PCB-189 (ng/L)</b>	
	Valeur cible	Ecart acceptable								
QC maison	10.0	2s: 9.0-11.0 3s: 8.5- 11.5								
SRM 1589a	74.0	59.2-88.8	18.9	15.1-22.7	25.9	20.7-31.1	<1	-	7.8	6.2-9.4

## 5 CONTROLES DE QUALITE EXTERNE ET CERTIFICATION

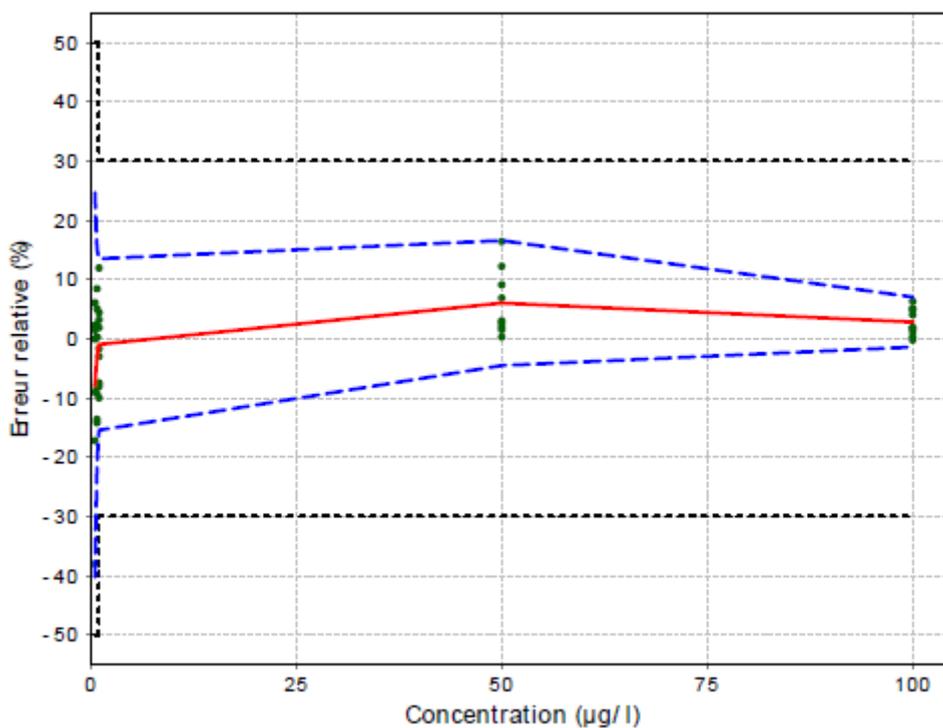
---

### 5.1 VALIDATION ANALYTIQUE

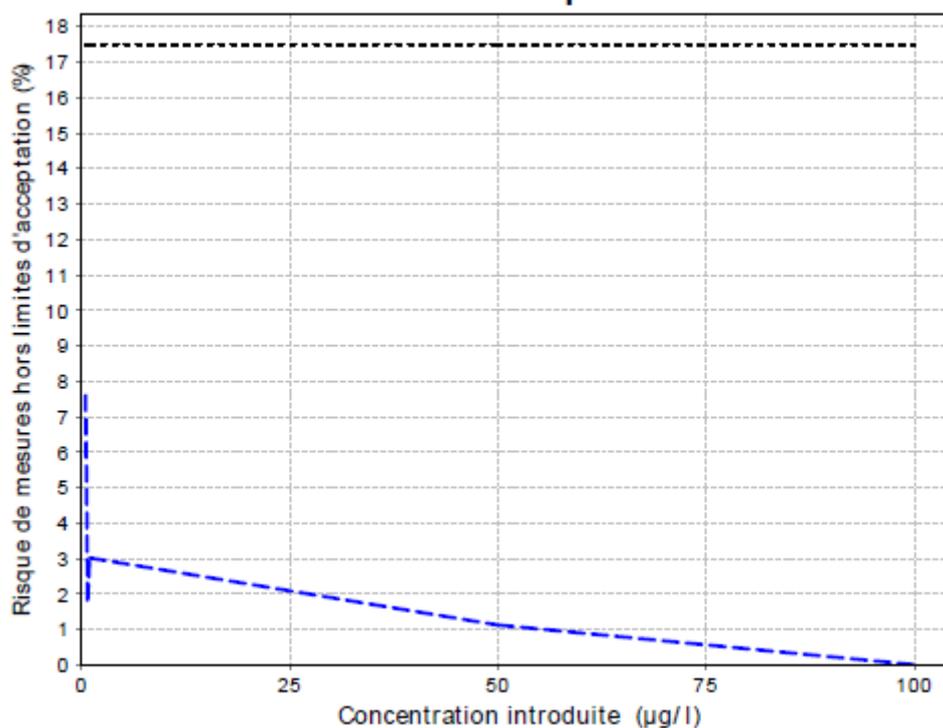
Les méthodes analytiques ont été validées selon la norme ISO17025 et les directives de la Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques (SFSTP). Cette validation basée sur l'approche de l'erreur totale a été réalisée à l'aide du logiciel ENOVAL (Arlenda, Liege, Belgique). La linéarité, la précision inter et intra essai (répétabilité et reproductibilité) et la justesse ont été évalués en mesurant les analytes ciblés en triple dans des échantillons d'eau ou d'urine synthétique (pour éviter les contaminations liées à la matrice de départ) fortifiés à différents niveaux de concentrations, et ce à trois reprises (trois jours différents). La droite de calibration a été réalisée en double lors de chaque jour de validation.

La justesse est définie comme l'écart entre la valeur considérée comme vraie et la valeur mesurée. On l'exprime en termes de biais relatif. La fidélité exprime l'écart entre une série de mesures d'échantillons préparés à partir d'un même échantillon homogène. Elle est étudiée en termes de répétabilité et de fidélité intermédiaire. La répétabilité est la mesure de la fidélité sur un court intervalle de temps, on parle aussi de précision intra-essai. On l'évalue à l'aide du coefficient de variation (CV) qui mesure la dispersion des données autour de la moyenne. L'incertitude de mesure caractérise la dispersion des valeurs obtenues qui pourrait raisonnablement être attribuée à la mesure. On la qualifie d'étendue car on définit un intervalle de confiance de largeur  $\pm 30\%$  autour de la valeur moyenne de la mesure, 50% pour les valeurs proches de la LOQ visée. Le profil d'exactitude reporte le biais relatif (en %) en fonction de la concentration. Chaque point illustre l'erreur relative de la concentration obtenue par rapport à la concentration vraie et ce, pour toutes les séries. Un calcul de la moyenne de chaque série est effectué pour obtenir une courbe de biais relatif moyen (en rouge). La méthode est d'autant plus exacte que la courbe tend vers 0% de biais. On établit un intervalle de tolérance de 17,5% (pointillés bleus) autour de la courbe de biais relatif moyen. Ceci signifie que 82,5% des concentrations comprises dans cet intervalle, appelé aussi  $\beta$ -expectation, sont exactes. Enfin, on établit un intervalle d'acceptation (pointillés noirs) représentant le biais relatif maximal toléré. Dans notre cas, les limites hautes et basses sont fixées à 30%. Le profil de risque représente le risque (%), pour chaque niveau de concentration, d'avoir des valeurs hors des limites d'acceptation. Le biais limite toléré (pointillés noirs) a été fixé à 17,5%. Les valeurs de la LOQ inférieure et supérieure sont évaluées à l'aide du profil d'exactitude, et correspondent à l'intersection entre l'intervalle de tolérance et les limites d'acceptation. Un exemple de profil d'exactitude et de profil de risque sont représentés ci-dessous pour le PFOS. Dans cet exemple, les LOQ inférieure et supérieure sont respectivement égales à 0.5 et 100  $\mu\text{g/L}$ .

### Profil d'exactitude



### Profil de risque



La méthode est considérée comme valide pour l'intervalle de dosage où le profil d'exactitude est compris dans les limites d'acceptation fixées (à 30%). De plus, les biais relatifs doivent être inférieurs à 15%, les CV de la répétabilité intra-jours et de la variabilité inter-jours (fidélité

intermédiaire) inférieurs à 15% et 20% respectivement, et l'incertitude de mesure inférieure à 35%, dans le domaine de concentrations validé.

## 5.2 CONTROLES DE QUALITE EXTERNES

Le laboratoire participe plusieurs fois par an à des programmes de contrôles de qualité externes pour les différents marqueurs dosés :

- **Pour le dosage du mercure :**

**G-EQUAS** (German External Quality Assessment Scheme for Analyses in Biological Materials): 2 échantillons 1 à 2x/an

**Trace Elements External Quality Assessment Scheme** OELM organisé par Sciensano: 2 échantillons 12 fois par an

**QMEQAS** (Quebec Multielement External Quality Assessment Scheme) organisé par l'Institut National de Santé Publique du Québec – INSPQ: 3 échantillons 3 fois par an.

- **Pour le dosage de métabolites d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPS) :**

**G-EQUAS** (German External Quality Assessment Scheme for Analyses in Biological Materials): 2 échantillons 1 à 2x/an (1- et 2-NAP, 1-PY)

**OSEQAS** (External Quality Assessment Scheme for Organic Substances in Urine): 3 échantillons 2x/an (tous les métabolites dosés)

- **Pour le dosage des PCBs :**

**AMAP** Ring Test for Persistent Organic Pollutants in Human Serum organisé par l'Institut national de Santé Publique du Québec : 3 échantillons 3x/an (PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153, PCB-180)

**G-EQUAS** (German External Quality Assessment Scheme for Analyses in Biological Materials): 2 échantillons 1 à 2x/an (PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-138, PCB-153, PCB-180)

- **Pour le dosage des PFAS :**

**AMAP** Ring Test for Persistent Organic Pollutants in Human Serum organisé par l'Institut national de Santé Publique du Québec : 3 échantillons 3x/an (tous les PFAS dosés)

**G-EQUAS** (German External Quality Assessment Scheme for Analyses in Biological Materials): 2 échantillons 1 à 2x/an (PFOA, PFOS)

- **Pour le dosage des PBDEs :**

**AMAP** Ring Test for Persistent Organic Pollutants in Human Serum organisé par l'Institut national de Santé Publique du Québec : 3 échantillons 3x/an (tous les PBDEs dosés)

Le laboratoire a également passé avec succès les différents rounds du programme QA/QC organisé en 2019-2020 dans le cadre de HBM4EU (bisphénols-A, -S et -F, métabolites de phtalates, composés perfluorés, retardateurs de flamme bromés, Cd dans le sang et l'urine).

Les certificats pour les perfluorés et PBDEs se trouvent ci-dessous.



science and policy  
for a healthy future



## CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that

**Laboratory of Toxicology. CHU Liège**

has participated in the HBM4EU QA/QC programme and its successful performance has resulted in its qualification as HBM4EU laboratory for the analysis of:

***PFPeA, PFHxA, PFHpA, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFHxS, and PFOS in human serum***

Institute and Outpatient Clinic of Occupational,  
Social and Environmental Medicine (IPASUM)

Organiser of the per- and polyfluoroalkyl  
substances (PFAS) exercise

Argelia Castaño  
Marta Esteban López

WP9 leaders



Thomas Göen

Task 9.4 leader



On behalf of the  
HBM4EU Quality Assurance Unit



science and policy  
for a healthy future



## CERTIFICATE OF PARTICIPATION

This is to certify that

***Laboratory of Toxicology, CHU Liège***

has participated in the HBM4EU QA/QC programme and its successful performance has resulted in its qualification as HBM4EU laboratory for the analysis of:

***BDE-47, BDE-153, BDE-209, DP-syn and DP-anti  
in human serum***

Department of Food Analysis and Nutrition,  
University of Chemistry and Technology, Prague

Organiser of the Brominated Flame Retardants  
(BFRs) exercise



Argelia Castaño  
Marta Esteban López

WP9 leaders



Thomas Göen

Task 9.4 leader



On behalf of the  
HBM4EU Quality Assurance Unit

## REFERENCES

Guo T, Baasner J. Determination of mercury in urine by flow-injection cold vapor atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* 1993; 278:189–96

Phillips, D.L., Pirkle, J.L., Burse, V.W., Bernert, J.T., Omar Henderson, L., Needham, L.L., 1989. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 18:495–500.

Pirard, C., Compere, S., Firquet, K., Charlier, C. The current environmental levels of endocrine disruptors (mercury, cadmium, organochlorine pesticides and PCBs) in a Belgian adult population and their predictors of exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 221 (2018) 211–222.

Pirard, C., Remy, S., Giusti, A., Champon, L., Charlier, C. Assessment of children's exposure to currently used pesticides in wallonia, Belgium. *Toxicology Letters* 329 (2020) 1–11

Pirard, C., Charlier, C. Urinary levels of parabens, phthalate metabolites, bisphenol A and plasticizer alternatives in a Belgian population: Time trend or impact of an awareness campaign? *Environmental Research* 214 (2022) 113852.