

Développement d'une méthode analytique (HS-SPME-GC-MS/MS) pour la quantification simultanée de 21 composés organiques volatils microbiens dans l'urine et le sang

Sarah Tabbal

Étudiante de doctorat en santé publique, option toxicologie et analyse de risque

Sous la direction de: Professeur Sami Haddad

et la codirection de: Dr. Geneviève Marchand

Table de matières

- ▶ Contexte
- ▶ Objectifs
- ▶ Optimisation de la méthode:
 - ▶ Identification et séparation des COVm et des standards internes
 - ▶ Optimisation de la méthode d'extraction (HS-SPME) dans l'eau pure, l'urine et le sang
- ▶ Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

Contexte

Qualité de l'air intérieur: risque pour la santé des occupants

Moisissures: un des facteurs affectant la qualité de l'air intérieur

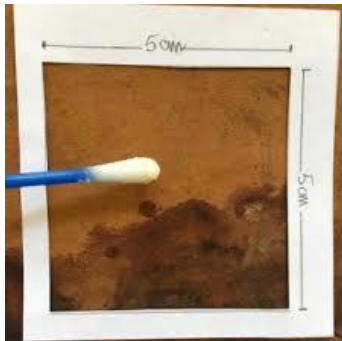
Effets sur la santé humaine: irritants, infectieux, immunologiques et toxiques

Contamination microbienne de l'air: préoccupation en matière de santé et sécurité au travail

Exposition aux moisissures: risque pour la santé publique et santé au travail → Évaluation de l'exposition aux moisissures : prévenir les effets sur la santé

Contexte

- Évaluation de l'exposition aux moisissures:
 - Approche actuelle: bilan environnemental des moisissures cultivables dans l'air
 - Inconvénients: nombre élevé d'échantillons, analyses coûteuses et chronophages par des spécialistes, sous-estimation de l'exposition



Contexte

- ▶ Évaluation de l'exposition aux moisissures:
 - ▶ Approche alternative: mesure des COVm dans les matrices biologiques humaines
 - ▶ COVm: métabolites secondaires produits suite à la croissance des moisissures
 - ▶ Mesure environnemental des COVm: limites
 - ▶ Potentiel biomarqueurs d'exposition aux moisissures:
 - ▶ Possibilité d'analyse biologique
 - ▶ Associations spécifiques moisissures-COV (Garcia-Alcega et al., 2017)
 - ▶ Capacité à traverser les matériaux poreux



Contexte

- ▶ Sélection des 21 COVm (El Aroussi et al., 2018):
 - ▶ Paramètres toxicocinétiques estimés (CP sang:air, Vd)
 - ▶ Associations moisissures-COVm
- ▶ Liste des 21 COVm:
 - ▶ Éthyle acétate, 2-butanone, 2-pentanone, 3-pentanol, 2-pentanol, 1-pentène-3-ol, cyclopentanone, 3-méthyl-1-butanol, 3-octanone, cyclohexanone, 2-pentène-1-ol, chalcogran, 2-nonanone, 2-octanol, 1-octène-3-ol, décanal, hexanoate de pentyle, 6-undécanone, 1-octanol, 3-nonèn-1-ol et hexan-4-olide.

Objectifs

- ▶ Développer une méthode analytique (HS-SPME-GC-MS/MS) : détecter et quantifier 21 COVm inchangés dans l'urine et le sang
- ▶ Valider la méthode développée

Identification et séparation des COVm

- ▶ Pour quantifier les 21 COVm, il faut bien les **séparer!**
- ▶ Optimiser la séparation des COVm:
 - ▶ Tester **2 colonnes chromatographiques** : DB-624 (60m x 0.32mm, 1.8µm) et DB-wax (30m x 0.32mm, 0.5µm)
 - ▶ Tester plusieurs **solvants** : méthanol, dichlorométhane, acétonitrile
 - ▶ Optimiser les paramètres du GC: **mode d'injection** (splitless, split 1:100...), **débit** (1.3-1.8 ml/min), **programme du four**.

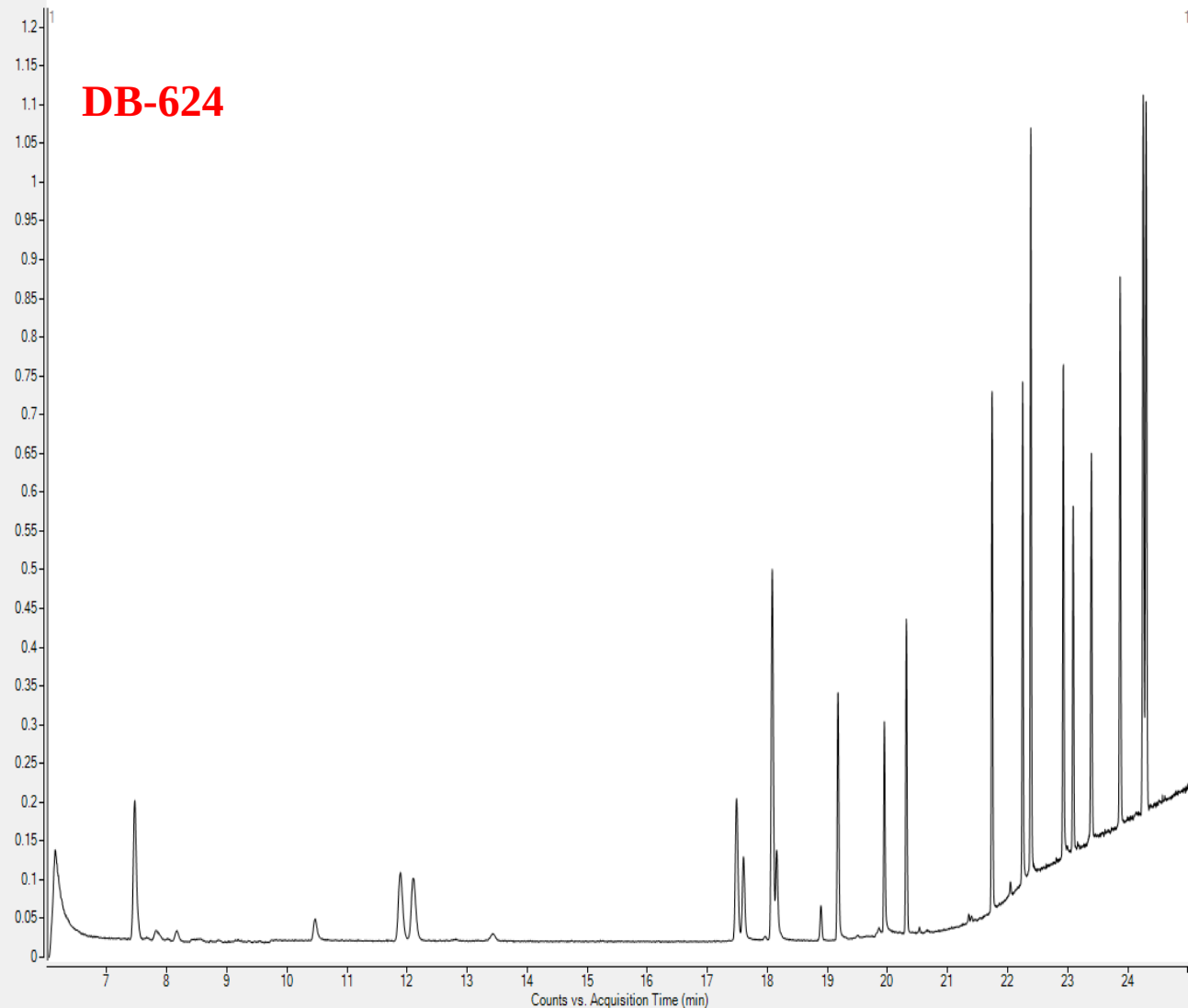
Tester 2 colonnes chromatographiques

- ▶ Choix des colonnes: utilisées fréquemment dans les études sur les COV
- ▶ Préparation d'un mélange des 21 COVm dans le méthanol (800-1000 ppm)
- ▶ Optimisation de la séparation des COVm sur les 2 colonnes (injections liquides):
 - ▶ **DB-624 (mi-polaire)**: température de l'injecteur: 250°C, mode d'injection: split 1:10, débit: 1.8 mL/min et programme du four: 40°C/4 min; 2.5°C/min/72°C/0 min; 40°C/min/170°C/0 min; 30°C/min/255°C/3 min.
 - ▶ **DB-wax (hautement polaire)**: température de l'injecteur: 250°C, mode d'injection: split 1:10, débit: 1,4 mL/min, et programme du four: 50°C/0 min; 7°C/min/70°C/0 min; 20°C/min/220°C/0 min.

Tester 2 colonnes chromatographiques

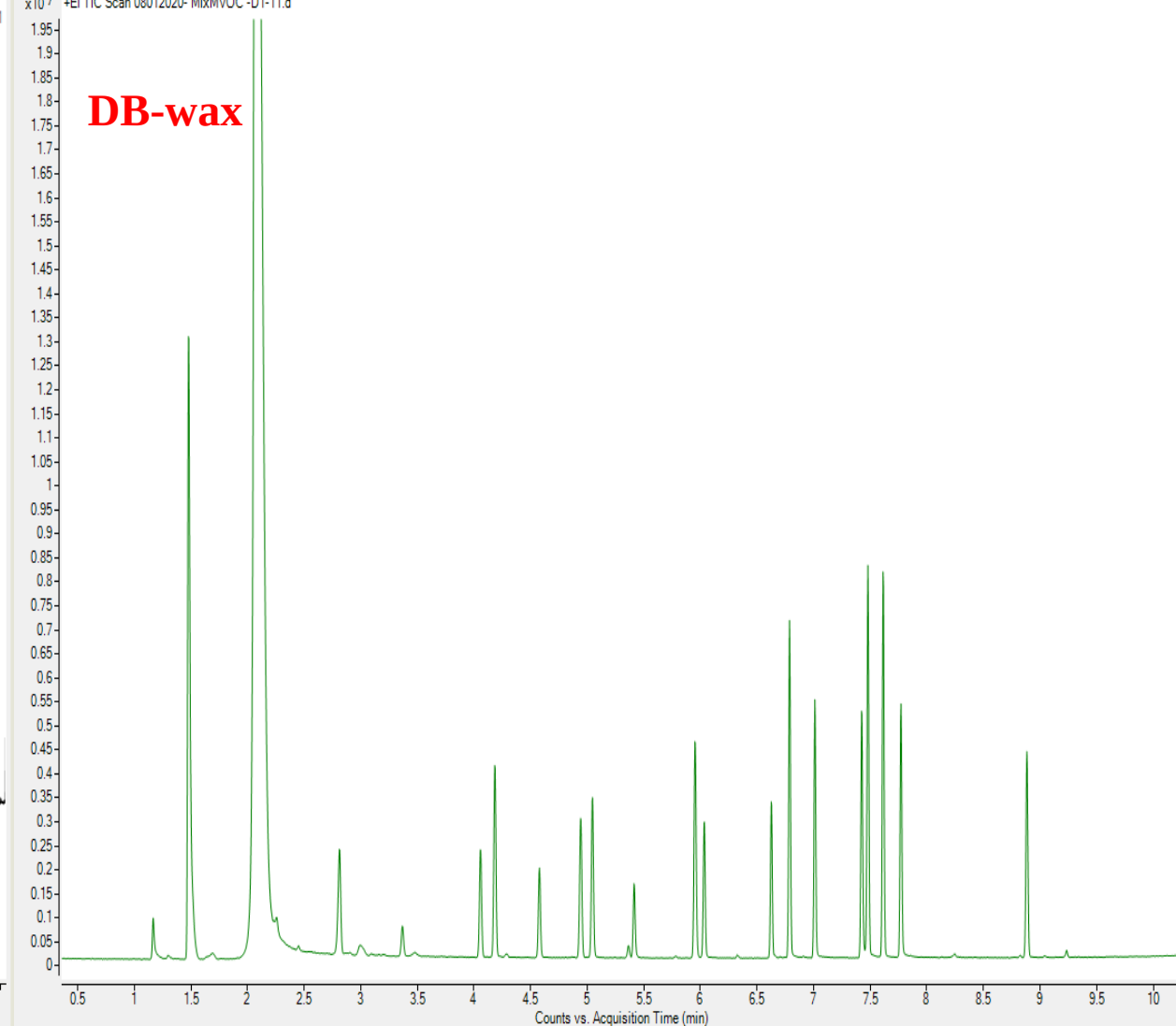
x10⁷ +EI TIC Scan 19122019-MixMVOC-D1-1.d

DB-624

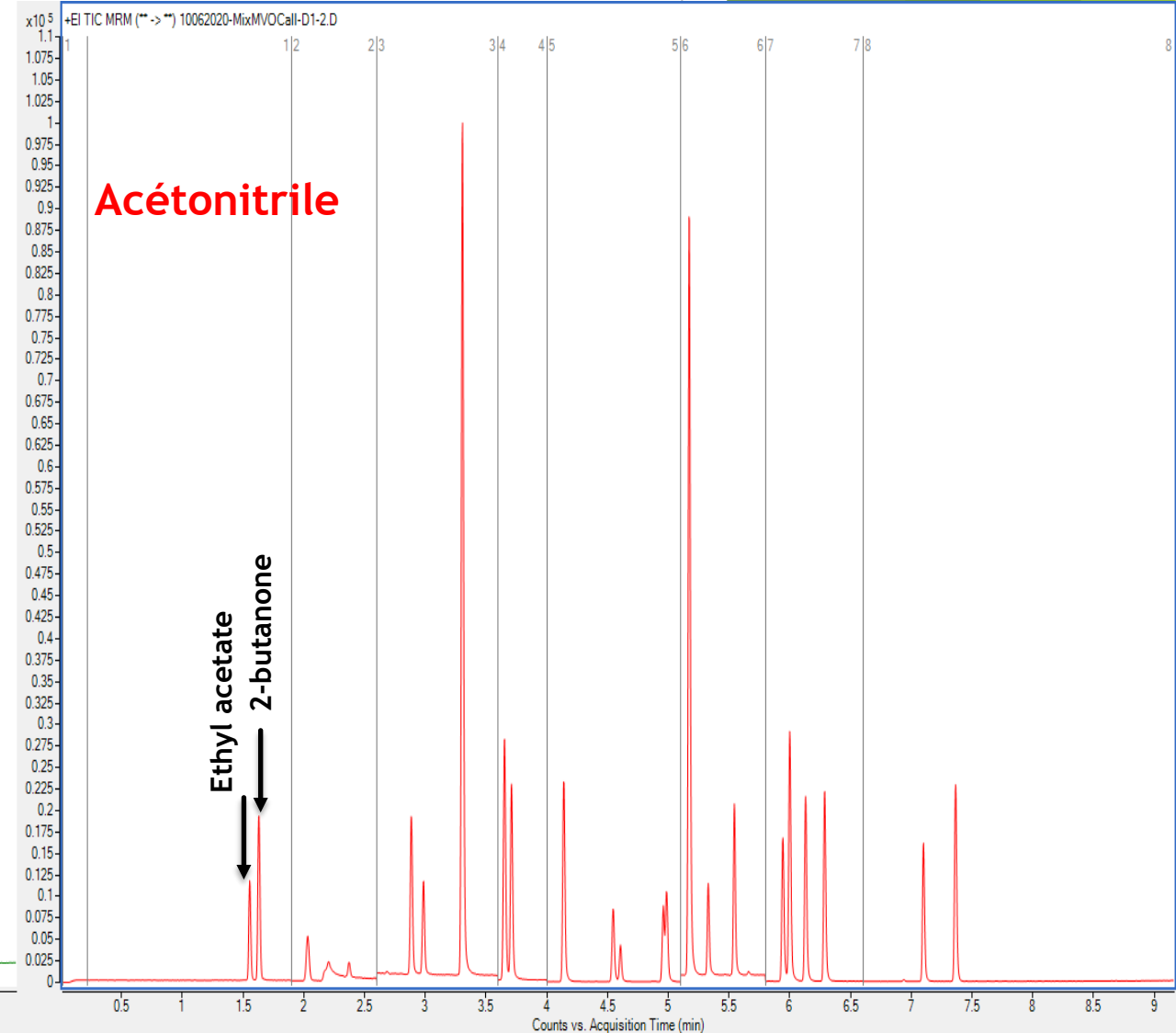
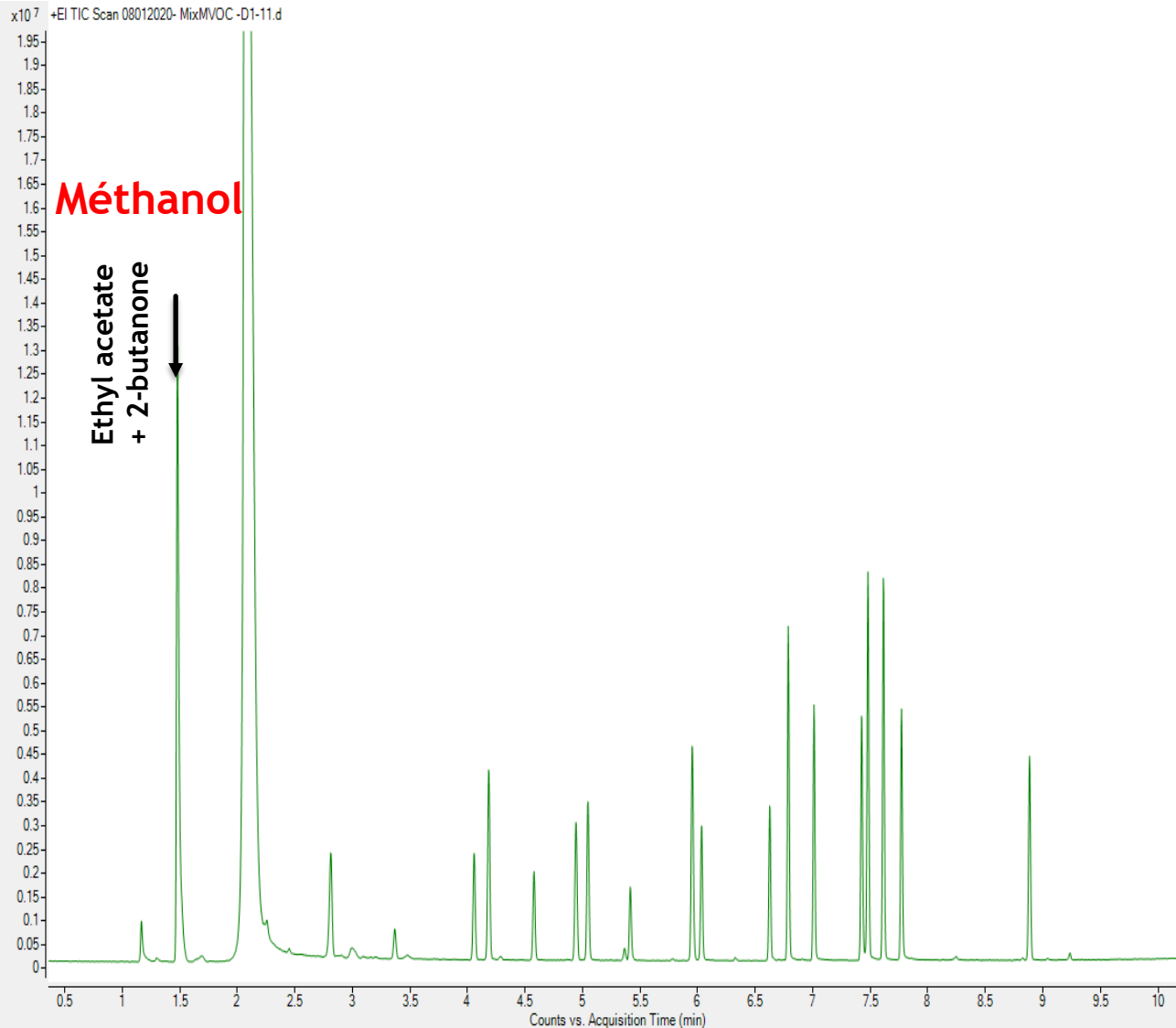


x10⁷ +EI TIC Scan 08012020- MixMVOC -D1-11.d

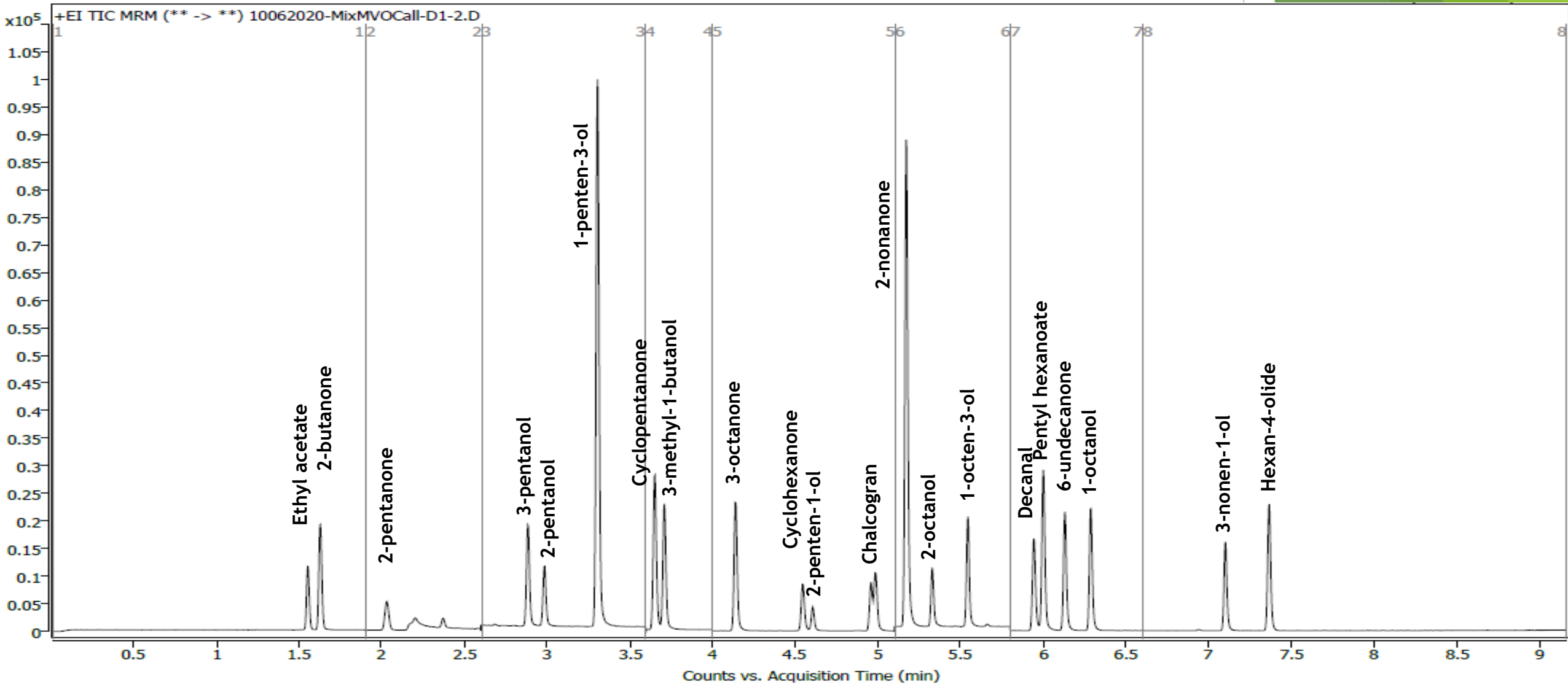
DB-wax



Tester plusieurs solvants



Identification et séparation des 21 COVm



Identification des 21 COVm

- ▶ Ce qui caractérise un composé d'un autre et permet la sélectivité:
 - ▶ Le temps de rétention
 - ▶ Les transitions: l'ion précurseur, les deux ions fils (quantifier et qualifier) et l'énergie de collision propre à chaque transition

Identification des 21 COVM

	Temps de rétention (min)	Transitions		Énergies de collision (quantifier/qualifier)
		Ion précurseur → ion produit (quantifier)	Ion précurseur → ion produit (qualifier)	
Éthyle acetate	1.54	69.9→55.1	69.9→43.2	4/17
2-butanone	1.62	71.9→43.2	71.9→57.2	7/1
2-pentanone	2.01	70.9→43.2	70.9→41.2	5/14
3-pentanol	2.90	58.9→43.2	58.9→39.2	30/21
2-pentanol	3	72.9→55.2	72.9→43.2	3/9
1-penten-3-ol	3.30	56.9→31.2	56.9→29.2	17/7
Cyclopentanone	3.63	83.9→55.1	83.9→39.2	10/38
3-methyl-1-butanol	3.70	69.9→55.2	69.9→42.2	5/2
3-octanone	4.12	98.9→43.3	98.9→71.1	9/1
Cyclohexanone	4.53	97.9→69.1	97.9→80.1	2/6
2-penten-1-ol	4.59	67.9→53.2	67.9→41.2	13/20

Identification des 21 COVM

	Temps de rétention (min)	Transitions		Énergies de collision (quantifier/qualifier)
		Ion précurseur → ion produit (quantifier)	Ion précurseur → ion produit (qualifier)	
Chalcogran	4.96	127→85.1	127→57.1	7/16
2-nonanone	5.15	58.2→43.2	70.7→43.2	10/10
2-octanol	5.32	115→96.9	115→55	1/10
1-octen-3-ol	5.53	71.7→43.2	71.7→57.2	5/6
Decanal	5.93	82.2→67.2	57.2→39.2	7/23
Pentyl hexanoate	5.99	117.2→89.1	117.2→69.3	5/13
6-undecanone	6.12	98.7→71.2	98.7→81.1	1/10
1-octanol	6.27	83.7→55.2	83.7→69.1	7/2
3-nonen-1-ol	7.01	80.9→79.1	80.9→53.1	6/15
		94.9→67.1	94.9→55.2	8/14
Hexan-4-olide	7.35	85→57	85→43.3	1/7

Standards internes (ISTD)

- ▶ Équivalents deutérés des COVm: se comportent de la même manière que l'analyte mais ont des masses différentes et fournissent des signaux à des temps de rétention différents.
- ▶ But:
 - ▶ Corriger les écarts par rapport à la linéarité
 - ▶ Normaliser l'aire des pics pour tenir compte des différences résultant de:
 - ▶ La capacité d'absorption des différentes fibres
 - ▶ L'usure des fibres lors de l'utilisation
 - ▶ Changements de température de sorption, changements dus à la compétition de différentes molécules à différentes affinités pour le matériau sorbant

Standards internes (ISTD)

Critères de sélection des ISTD:

- ▶ Temps de rétention (RT) proches de nos COVm
- ▶ Couvrir tout le chromatogramme contenant les 21 COVm
- ▶ Structures et propriétés proches de nos COVm

ISTD	Temps de rétention (min)	Ion précurseur → ion produit	Ion précurseur → ion produit	Énergies de collision (quantifier/qualifier)
2-pentanone-d5	1.89	73.1→45.2	73.1→43.2	2/13
d4-3-methyl-1-butanol	3.54	74.1→58.2	74.1→44.1	5/2
2-nonanone-d5	4.99	63.1→46.2	75.1→46.2	10/13
1-octanol-d17	6.03	96.2→78.2	96.2→62.2	2/10

Optimisation de la méthode d'extraction des COVm dans l'eau pure, l'urine et le sang

SPME:

- ▶ Micro extraction en phase solide
- ▶ 1 seule étape: échantillonnage, extraction, concentration, introduction d'échantillons

Principe SPME

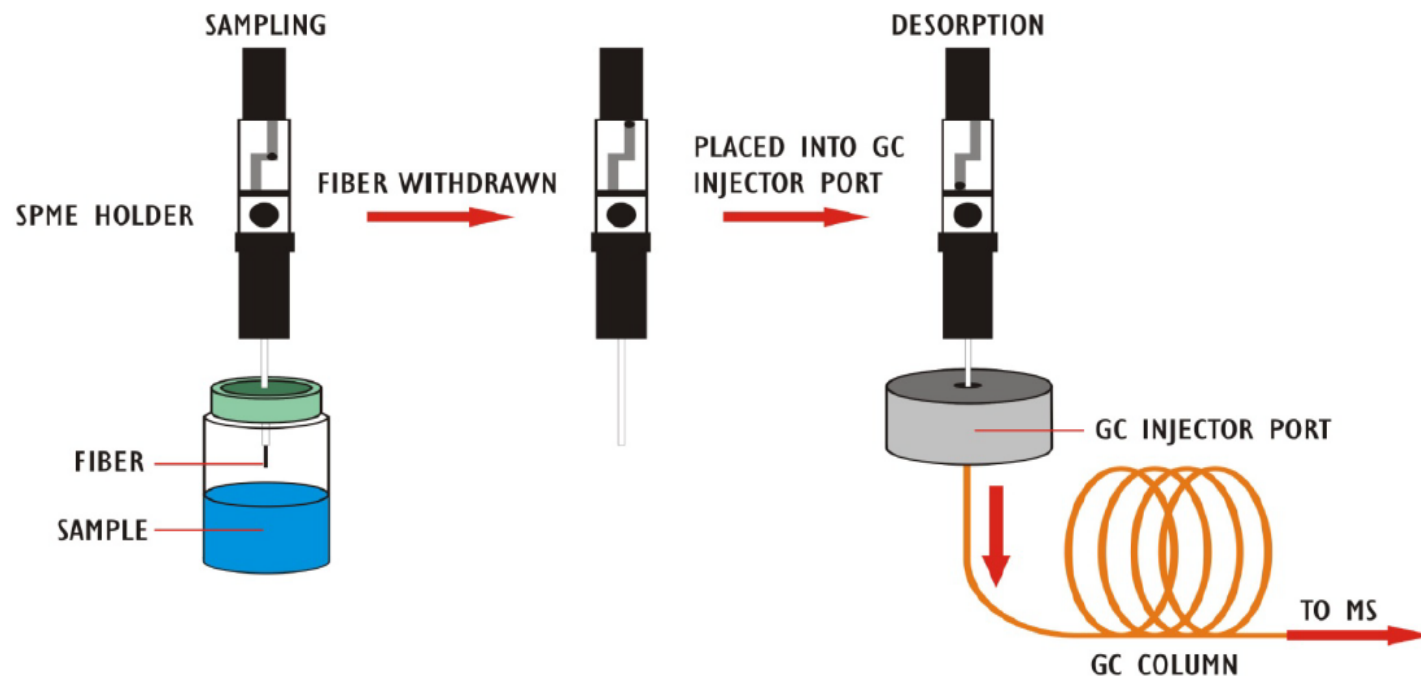


Figure 1: Diagram of analysis with solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry [SPME-GC-MS] [5].

(Schimdt and Podmore, 2015)

Développement et optimisation de la méthode SPME

Type de fibre

Incubation

Conditions d'extraction

Conditions de désorption

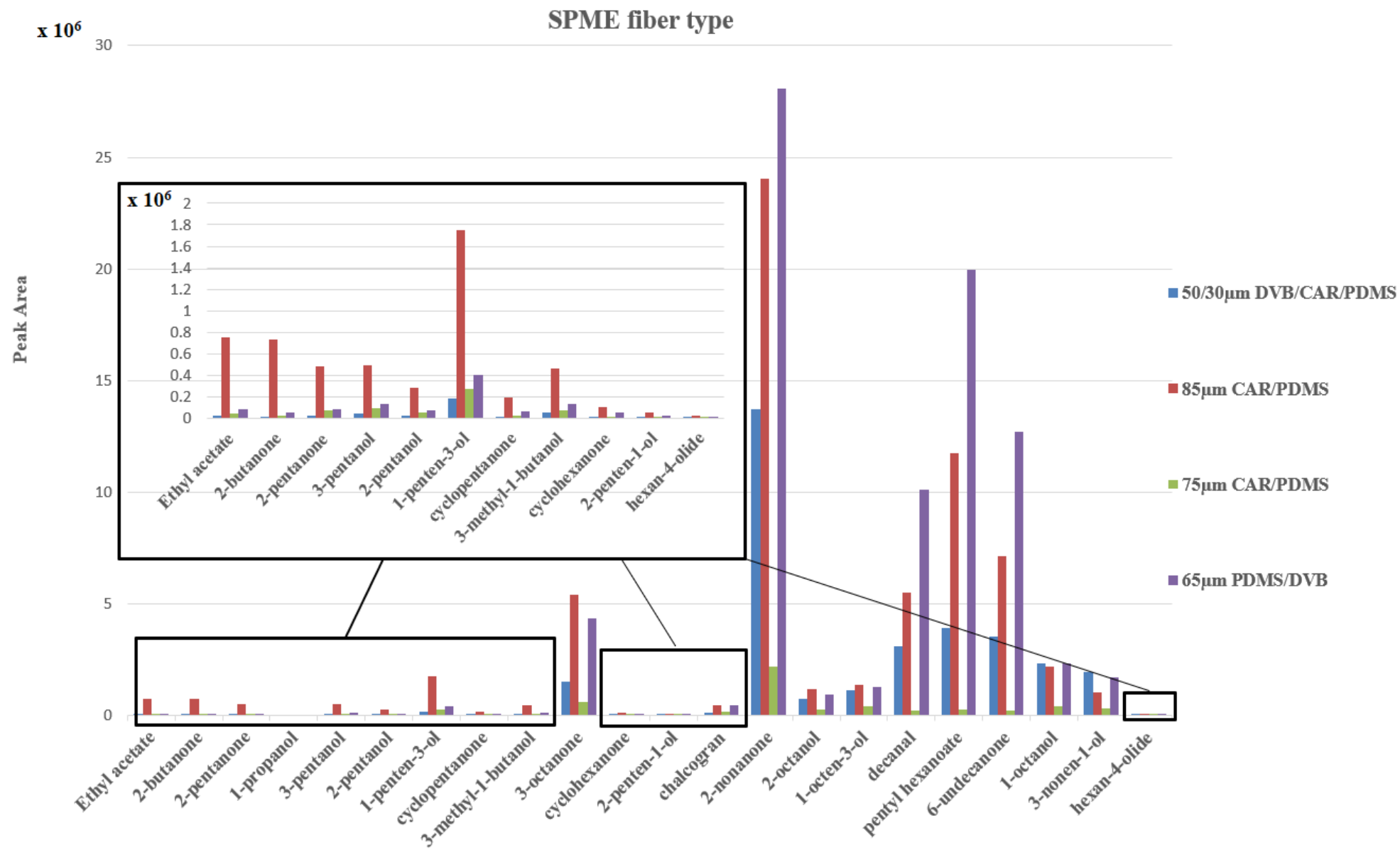
Type de fibre SPME

Polymer coating and thickness	Recommended application	Mechanism	MW	Polarity
100 µm PDMS	Volatiles	Absorbent	60-275	Non-polar
30 µm PDMS	Non-polar semi-volatiles	Absorbent	80-500	Non-polar
7 µm PDMS	Non-polar high molecular weight compounds	Absorbent	125-600	Non-polar
60 µm PEG	Alcohols and polar compounds	Absorbent	40-275	Polar
85 µm PA	Polar semi-volatiles	Absorbent	80-300	Polar
75 µm/85 µm CAR/PDMS	Gases and low molecular weight compounds	Adsorbent	30-225	Bipolar
65 µm PDMS/DVB	Volatiles, amines and nitro-aromatic compounds	Adsorbent	50-300	Bipolar
60 µm PDMS/DVB	Amines, nitroaromatic and polar compounds (HPLC use only)	Adsorbent	50-300	Bipolar
50/30 µm DVB/CAR/PDMS on a StableFlex fiber	Flavour compounds: volatiles and semi-volatiles, C3-C20	Adsorbent	40-275	Bipolar
50/30 µm DVB/CAR/PDMS on a 2 cm StableFlex fiber	Trace compound analysis	Adsorbent	40-275	Bipolar

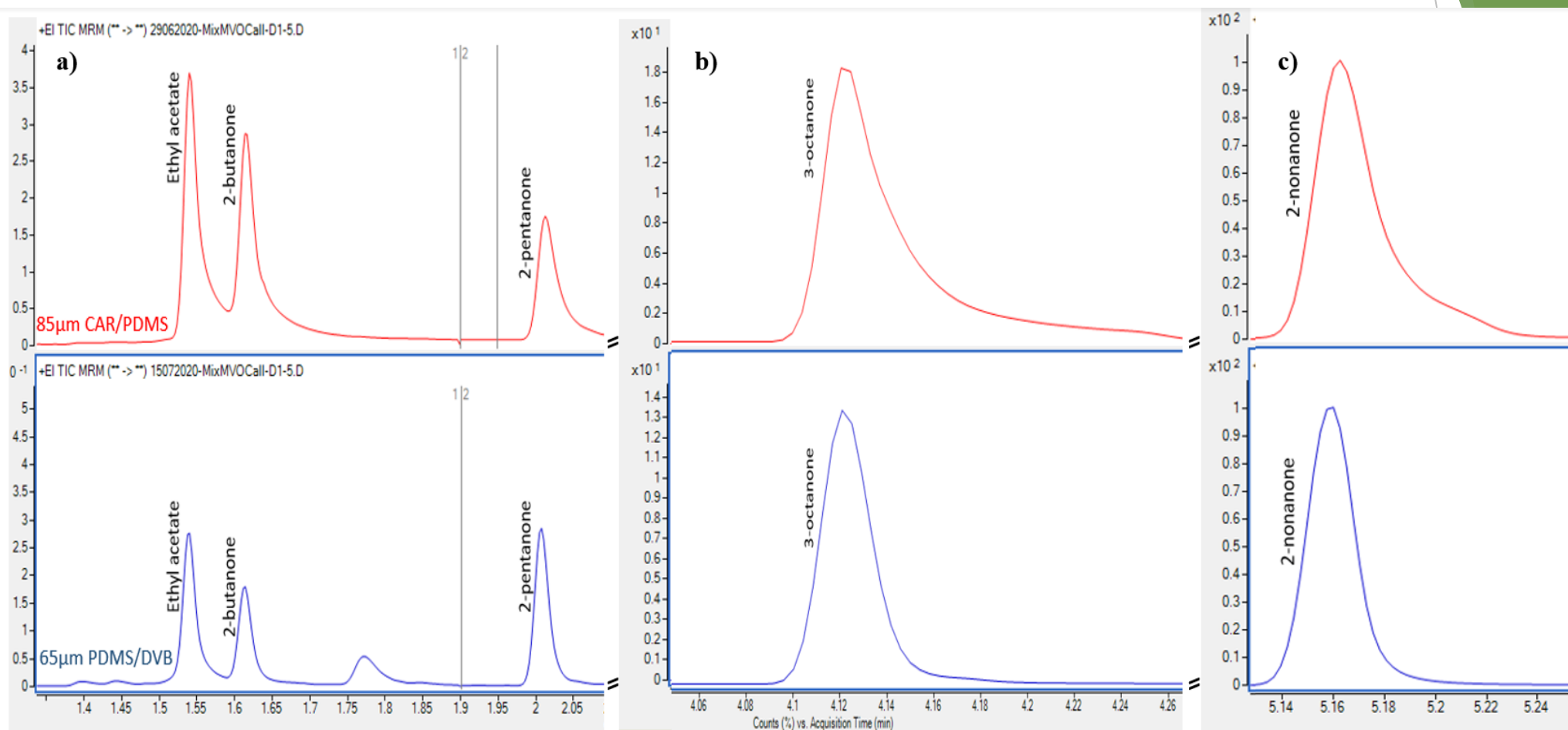
CAR: Carboxen; PDMS: Polydimethylsiloxane; DVB: Divinylbenzene; HPLC: High Performance Liquid Chromatography; PA: Polyacrylate; PEG: Carbowax-Polyethylene Glycol [19].

(Schimdt and Podmore, 2015)

Type de fibre SPME



Type de fibre SPME



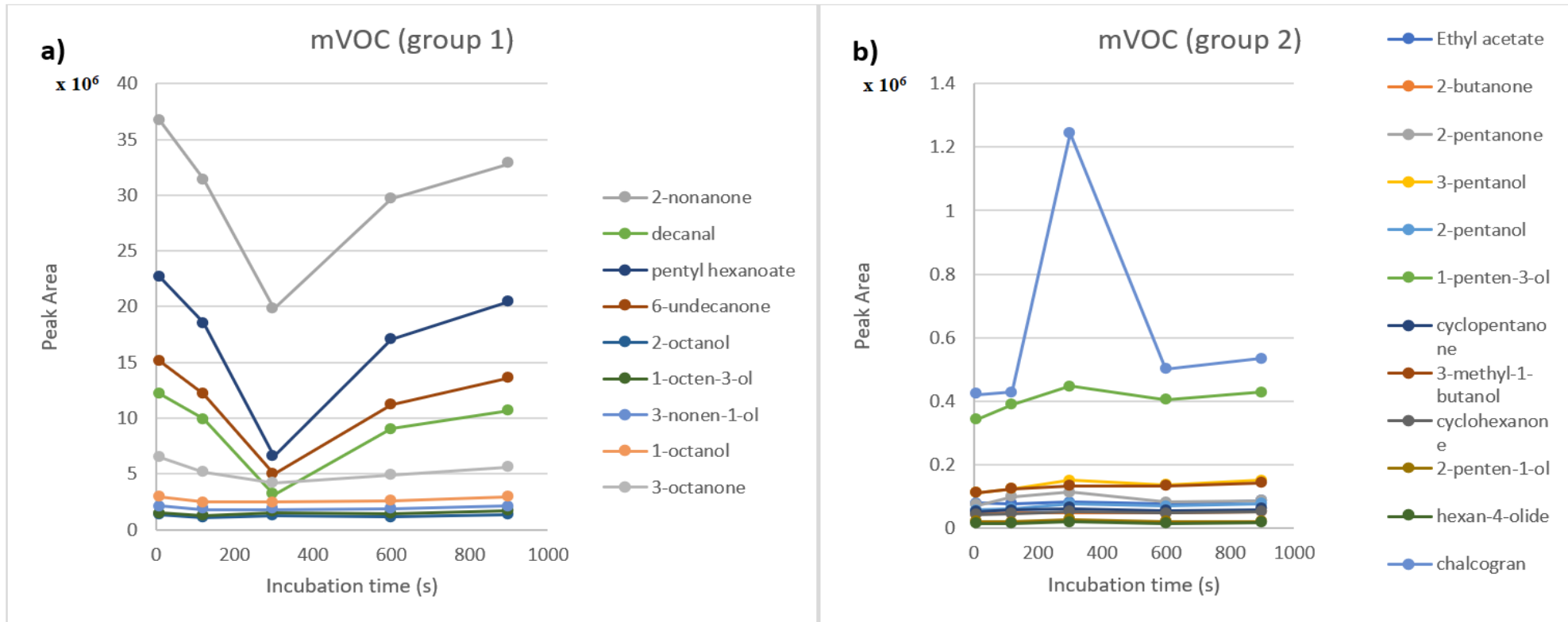
Type de fibre choisie: 65 µm PDMS/DVB

Paramètres à optimiser

- ▶ Temps d'incubation
- ▶ Temps d'extraction
- ▶ Température d'extraction
- ▶ Temps de désorption
- ▶ Température de l'injecteur GC
- ▶ Ajout de sel
- ▶ Effet du pH (acide)
- ▶ Effet du volume de l'espace tête

Temps d'incubation

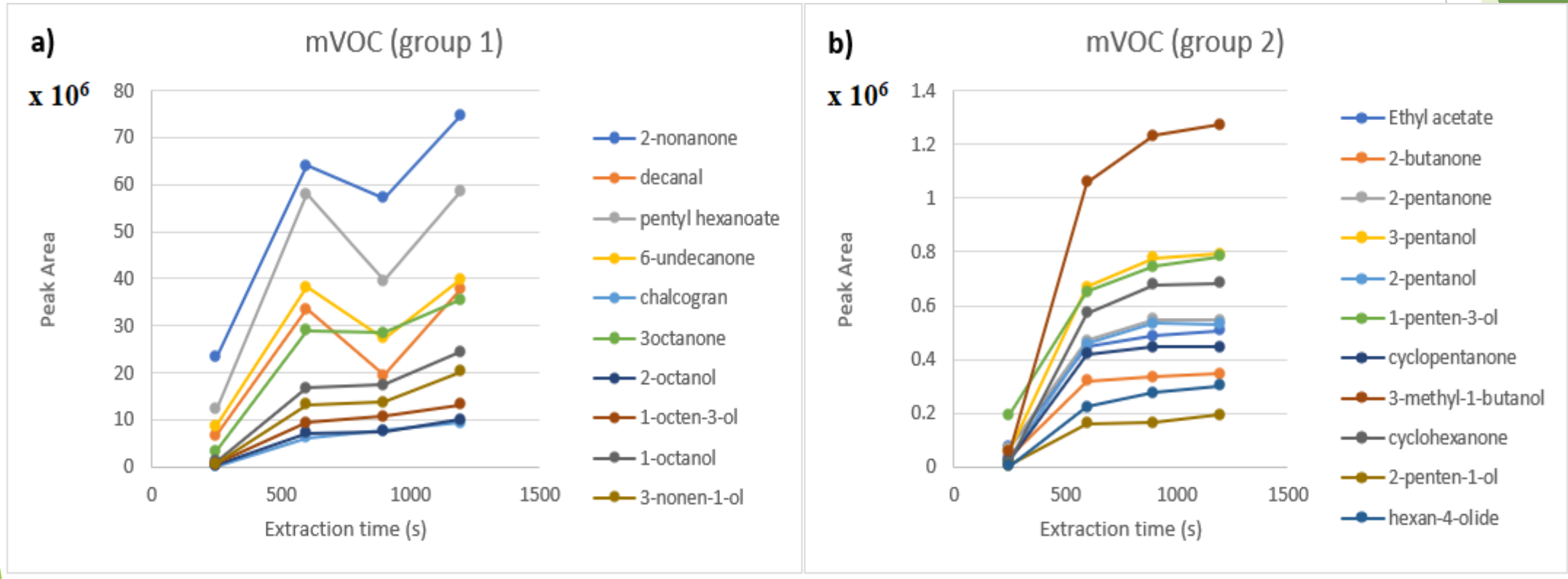
- Temps d'incubation testés: 10, 120, 300, 600 et 900 s



Temps d'incubation choisi: 300 s (5 min)

Temps d'extraction

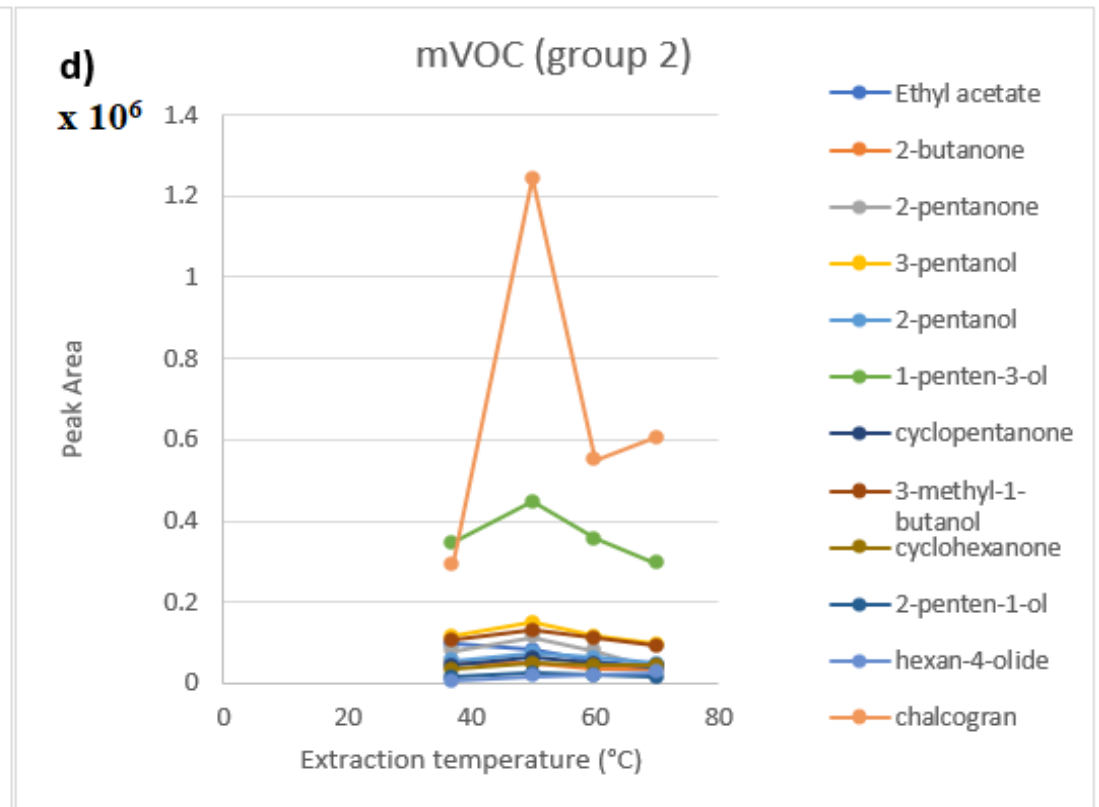
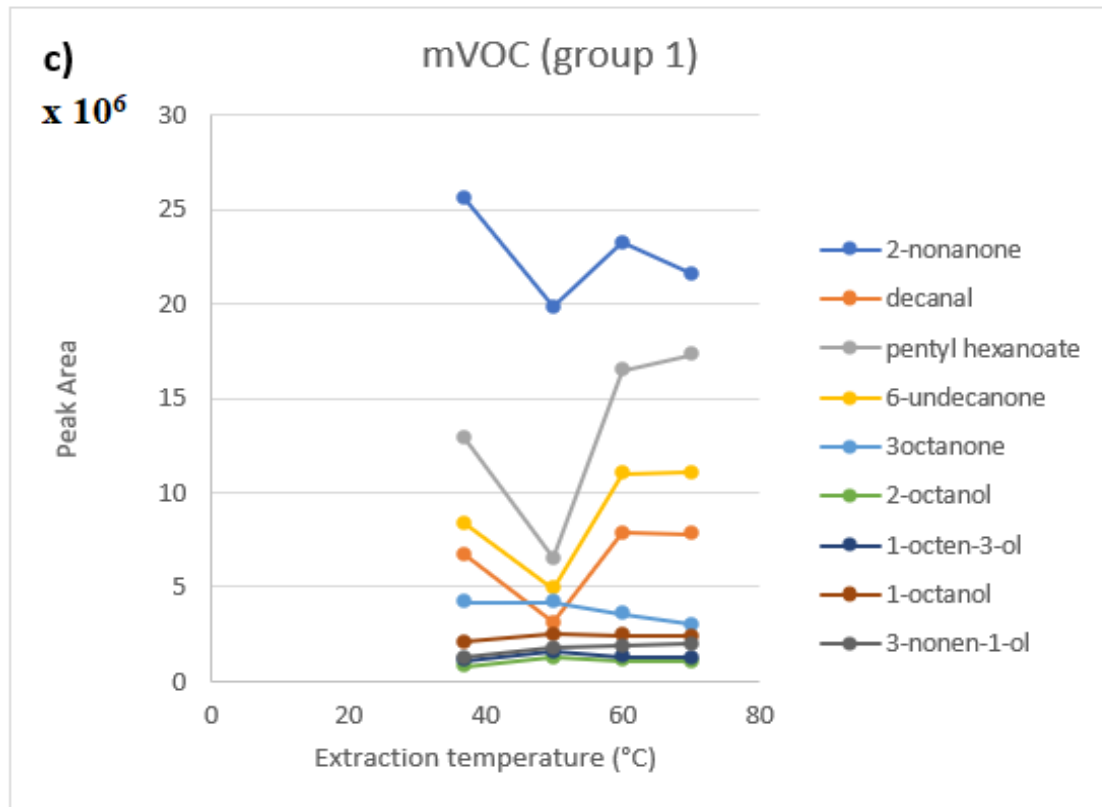
- Temps d'extraction testés: 250, 600, 900, 1200 s



Temps d'extraction choisi: 600 s (10 min)

Température d'extraction

- Températures testées: 37, 50, 60 et 70 °C



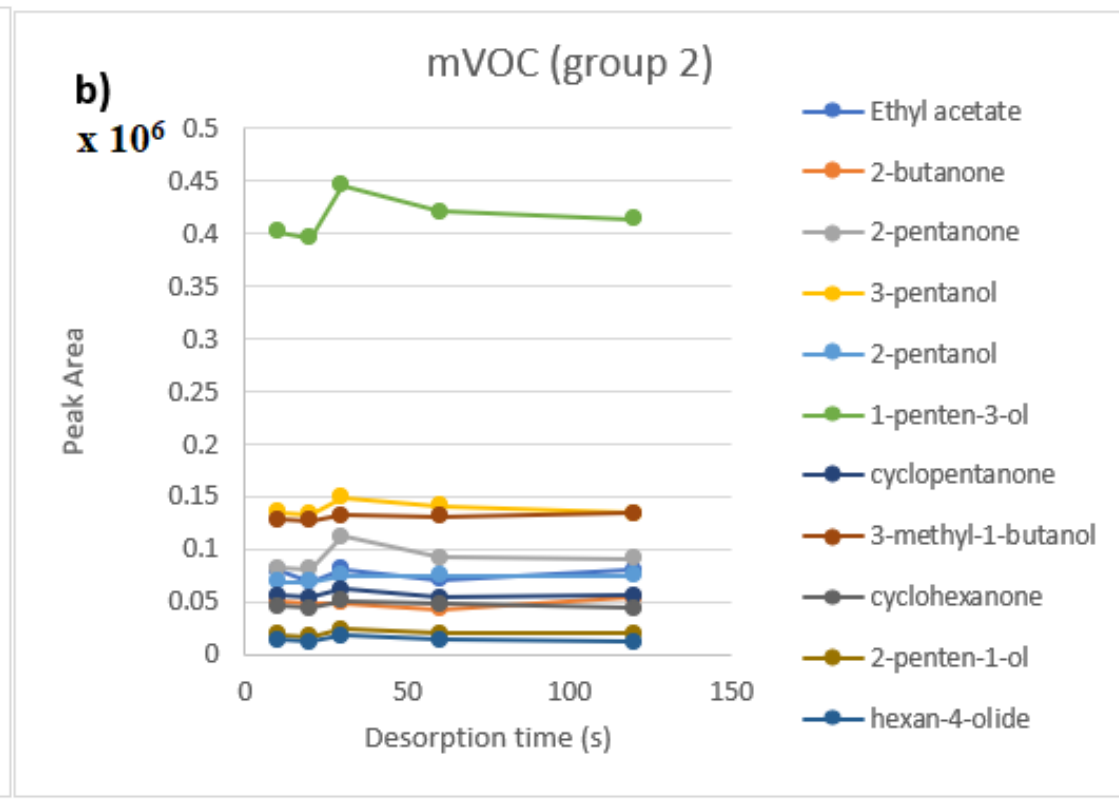
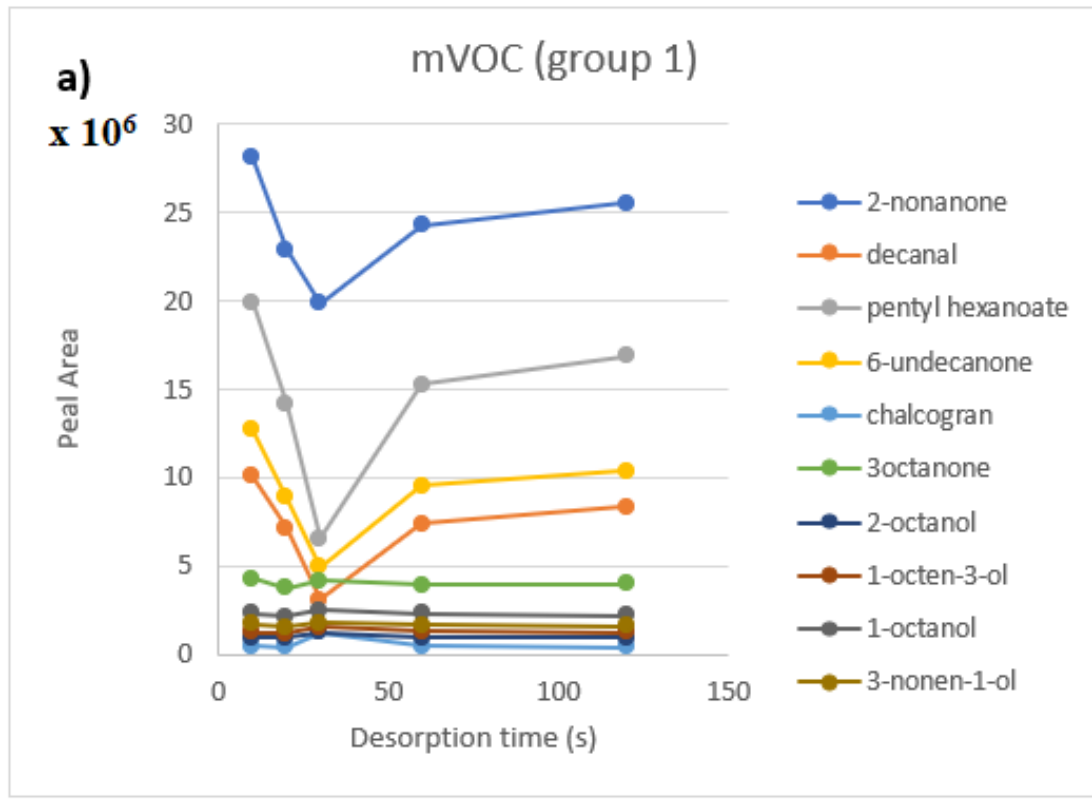
Température d'extraction choisie: 50 °C

Température d'extraction

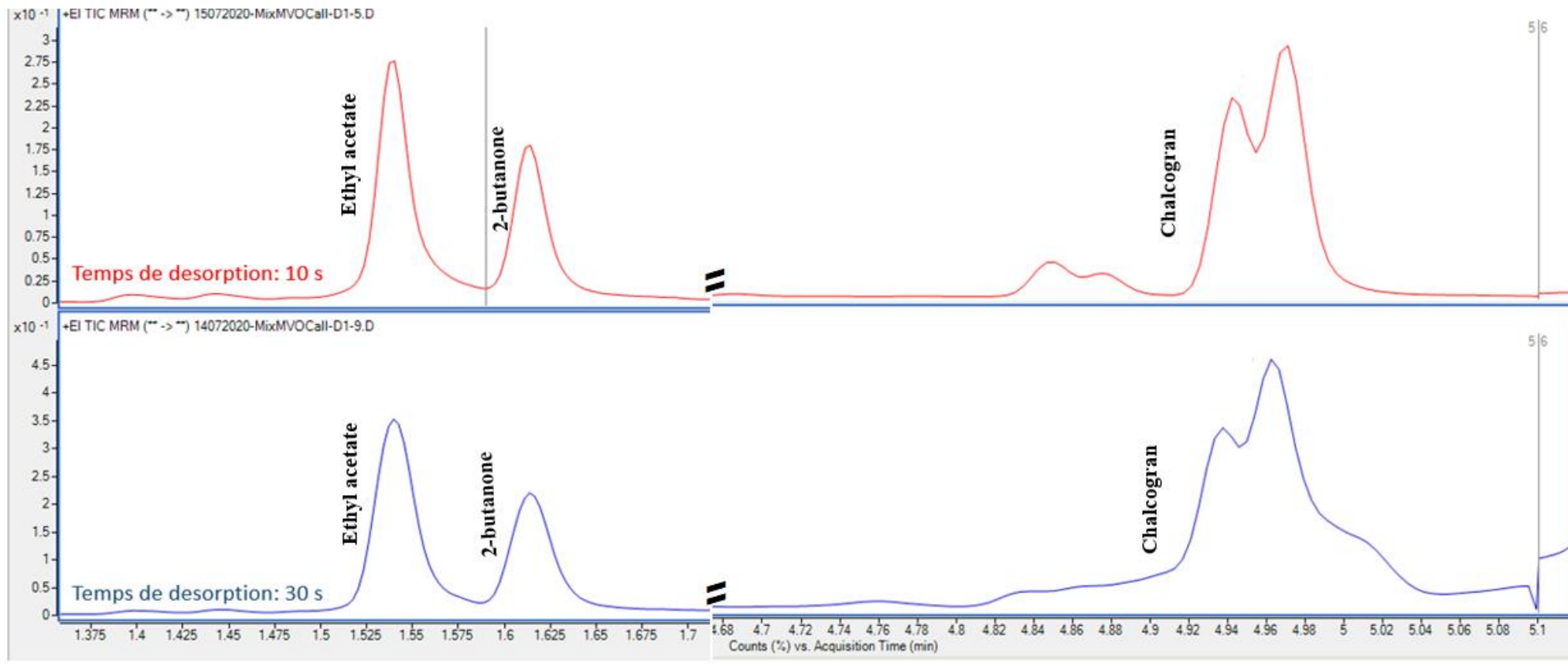
- ▶ Effets des températures d'extraction élevées:
 - ▶ Compétition pour l'adsorption sur la fibre entre les molécules présentes dans les matrices
 - ▶ Diminution de distribution entre la matrice et la fibre
 - ▶ Diminution de la sensibilité (équilibre atteint rapidement mais quantité extraite plus faible)

Temps de désorption

- Temps de désorption testés: 10, 20, 30, 60, 120s



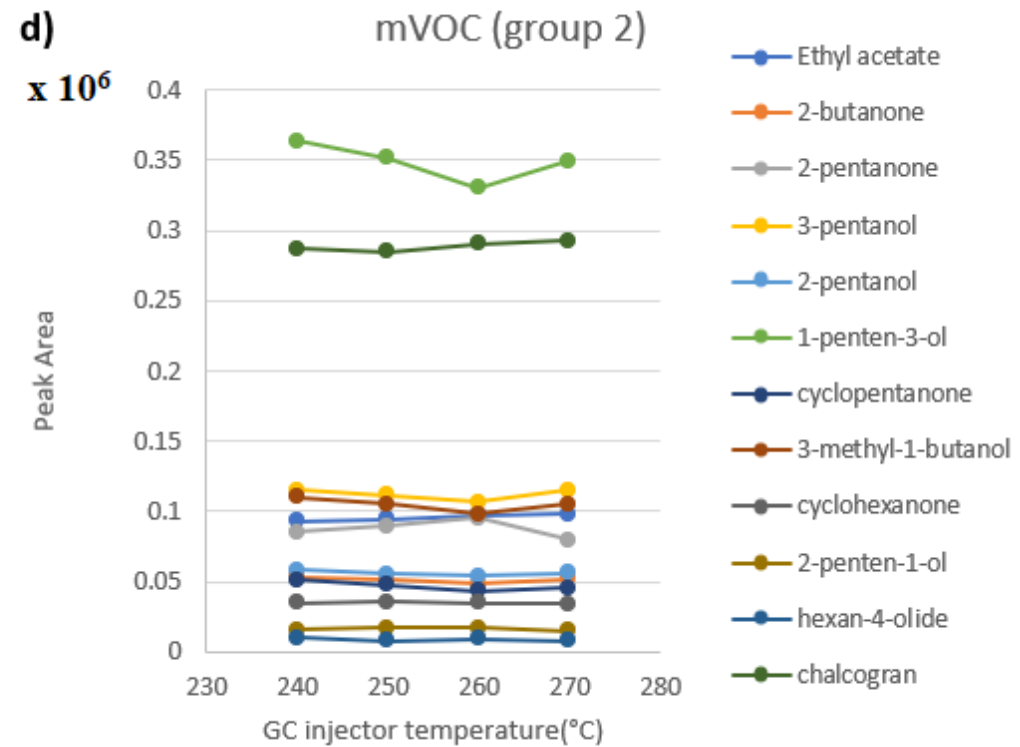
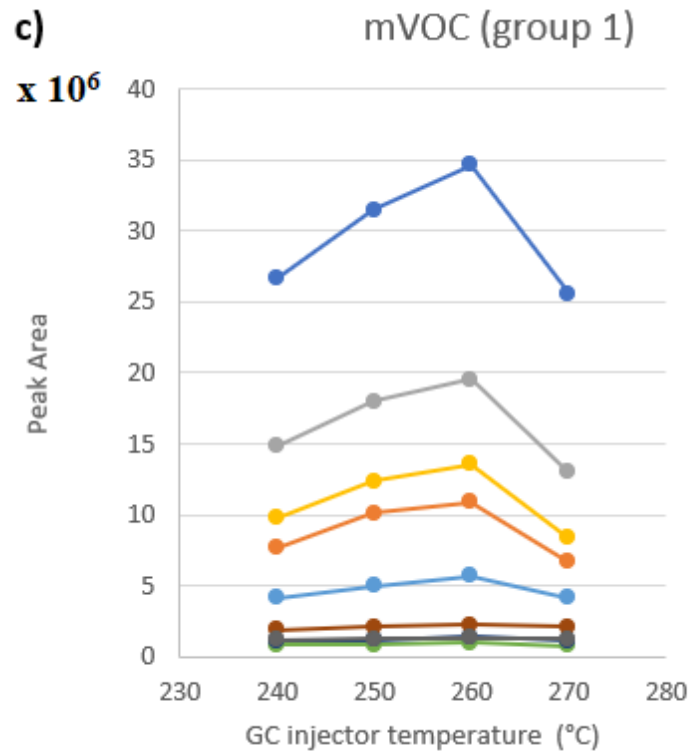
Temps de désorption



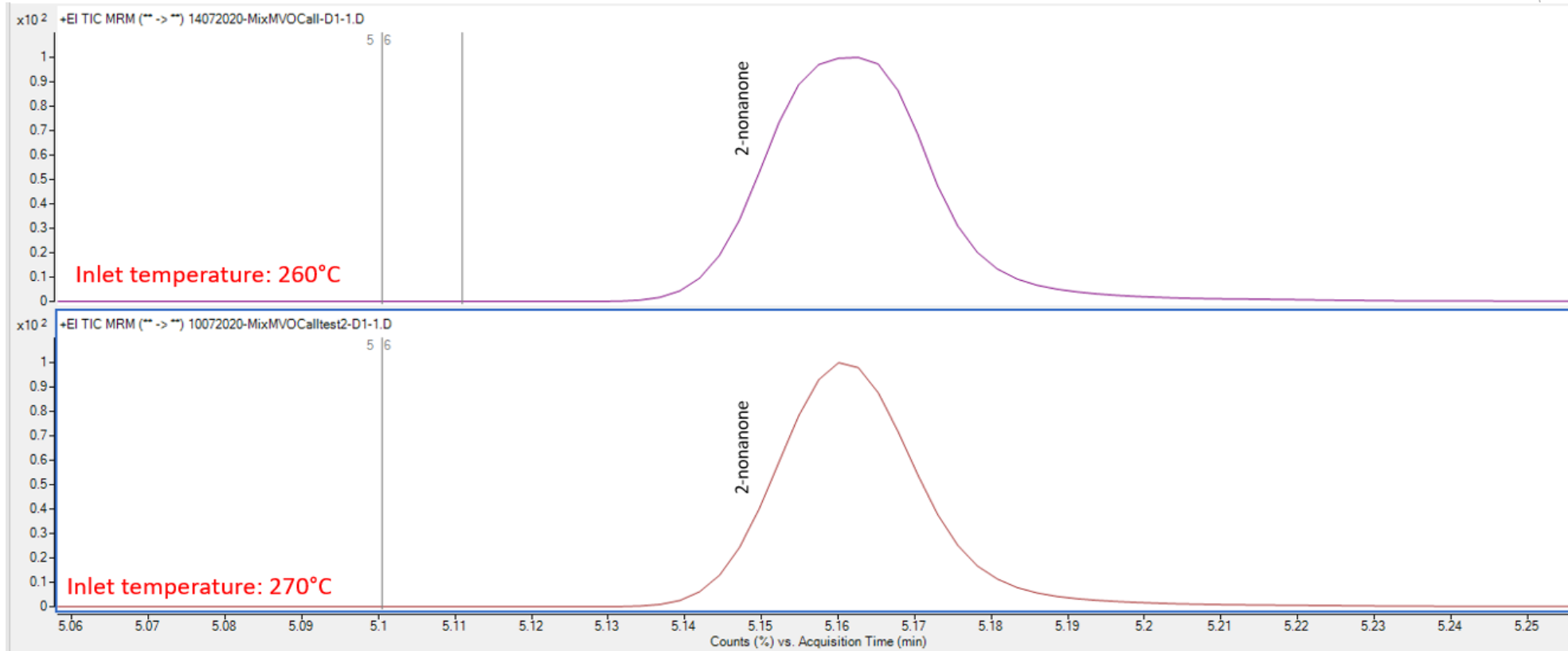
Temps de désorption choisi: 10 s

Température d'injecteur

- Températures d'injecteur GC testées: 240, 250, 260 et 270°C



Température d'injecteur



Température d'injecteur choisie: 270°C

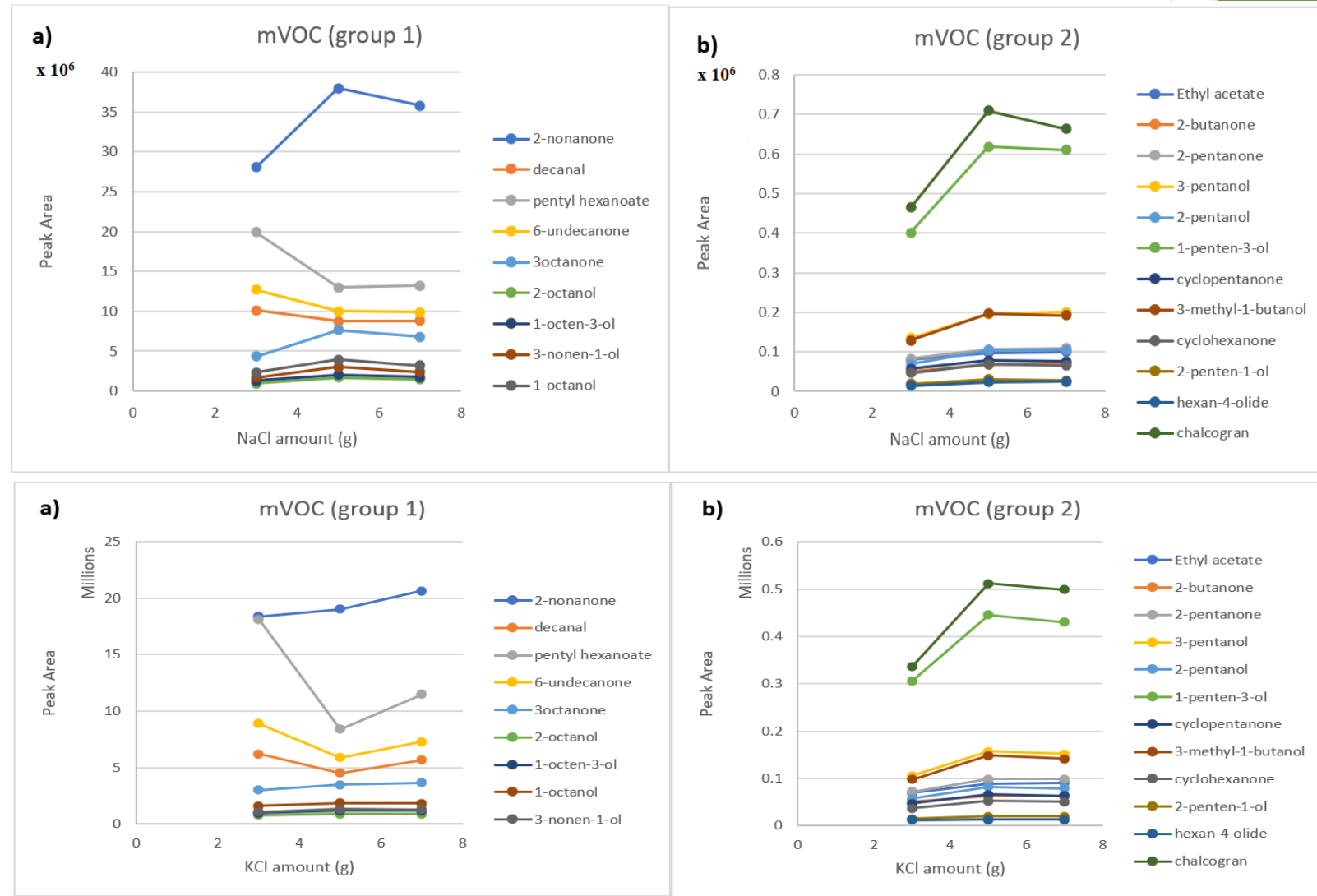
Ajout de sel

- ▶ Modification de la force ionique de l'échantillon
- ▶ Amélioration de l'extraction des composés relativement hydrophobes avec des régions polaires
- ▶ Effet de relargage:
 - ▶ Influencer l'extraction
 - ▶ Diminuer la solubilité des analytes hydrophobes dans la phase aqueuse
 - ▶ Améliorer la sensibilité de la méthode
- ▶ Exemple: NaCl, KCl, K_2CO_3

Ajout de sel

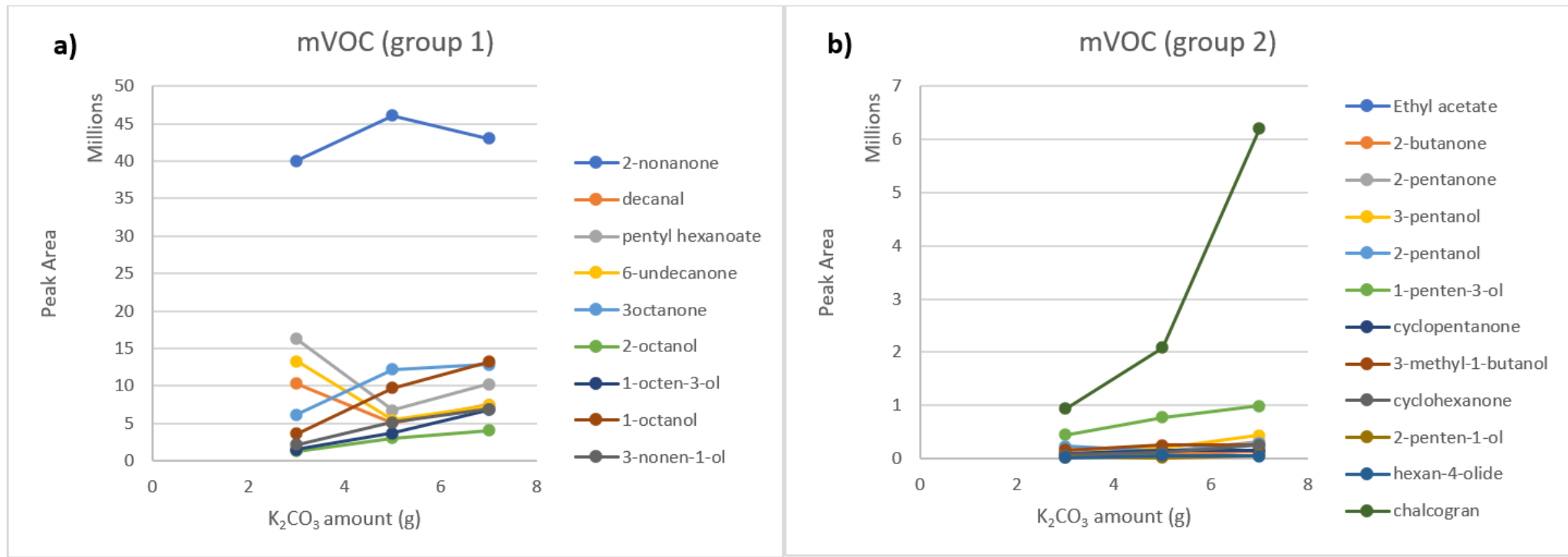
- Différents types de sels sont testés : NaCl (3,5,7 g), KCl (3,5,7 g), K_2CO_3 (3,5,7 g)

Pour NaCl et KCl:



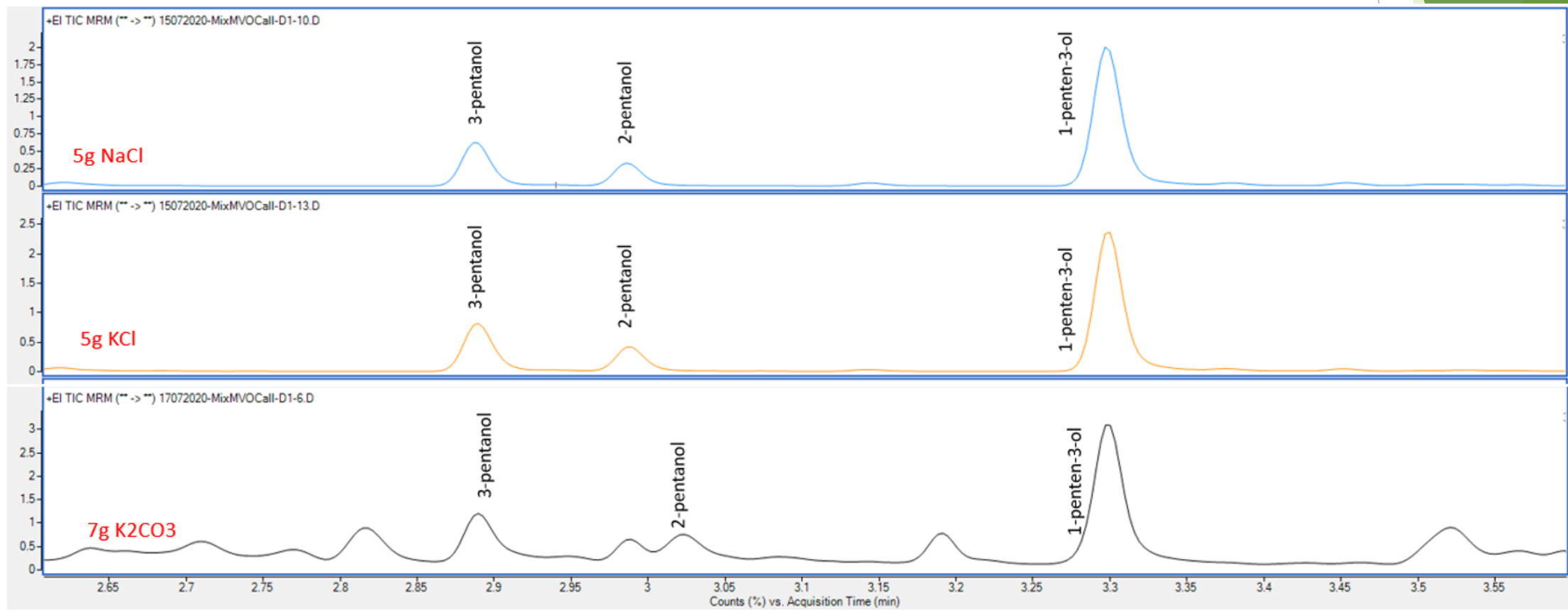
Ajout de sel

Pour K_2CO_3 :



Ajout de sel

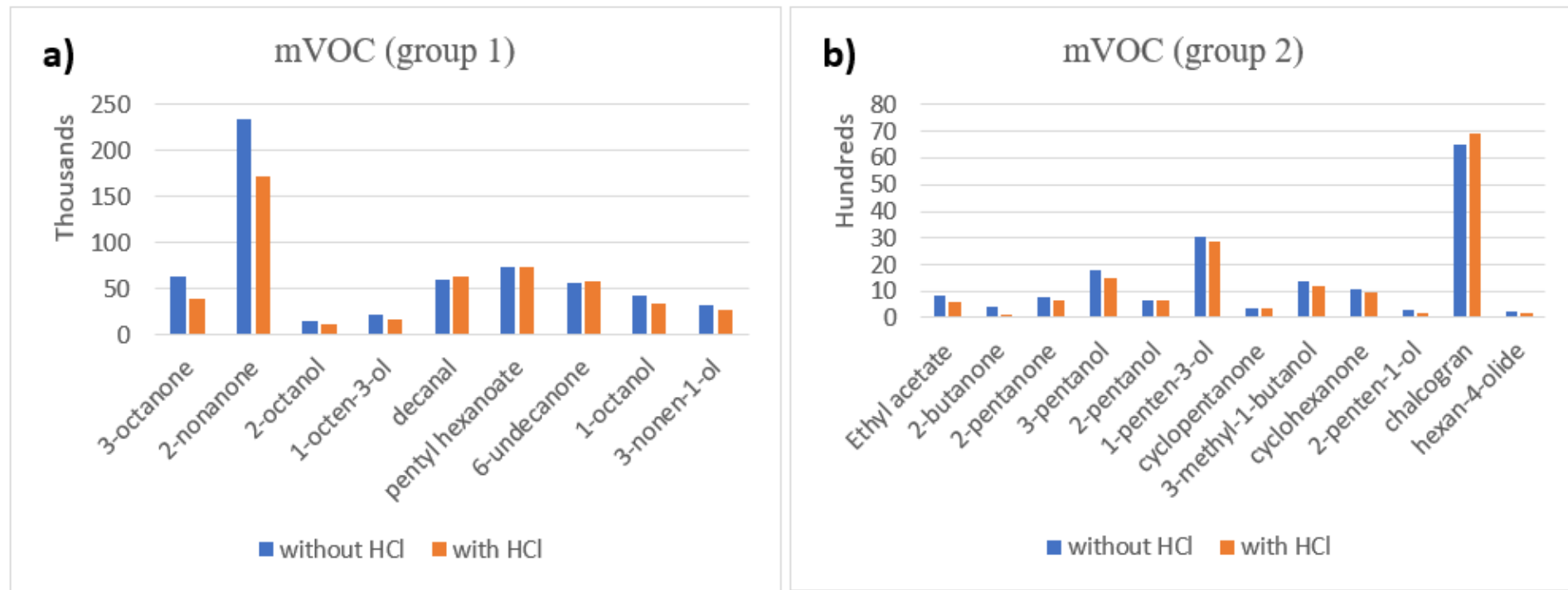
- Comparer la forme des pics pour le meilleur choix de masse pour chaque type de sel:



Sel choisi: 5 g NaCl

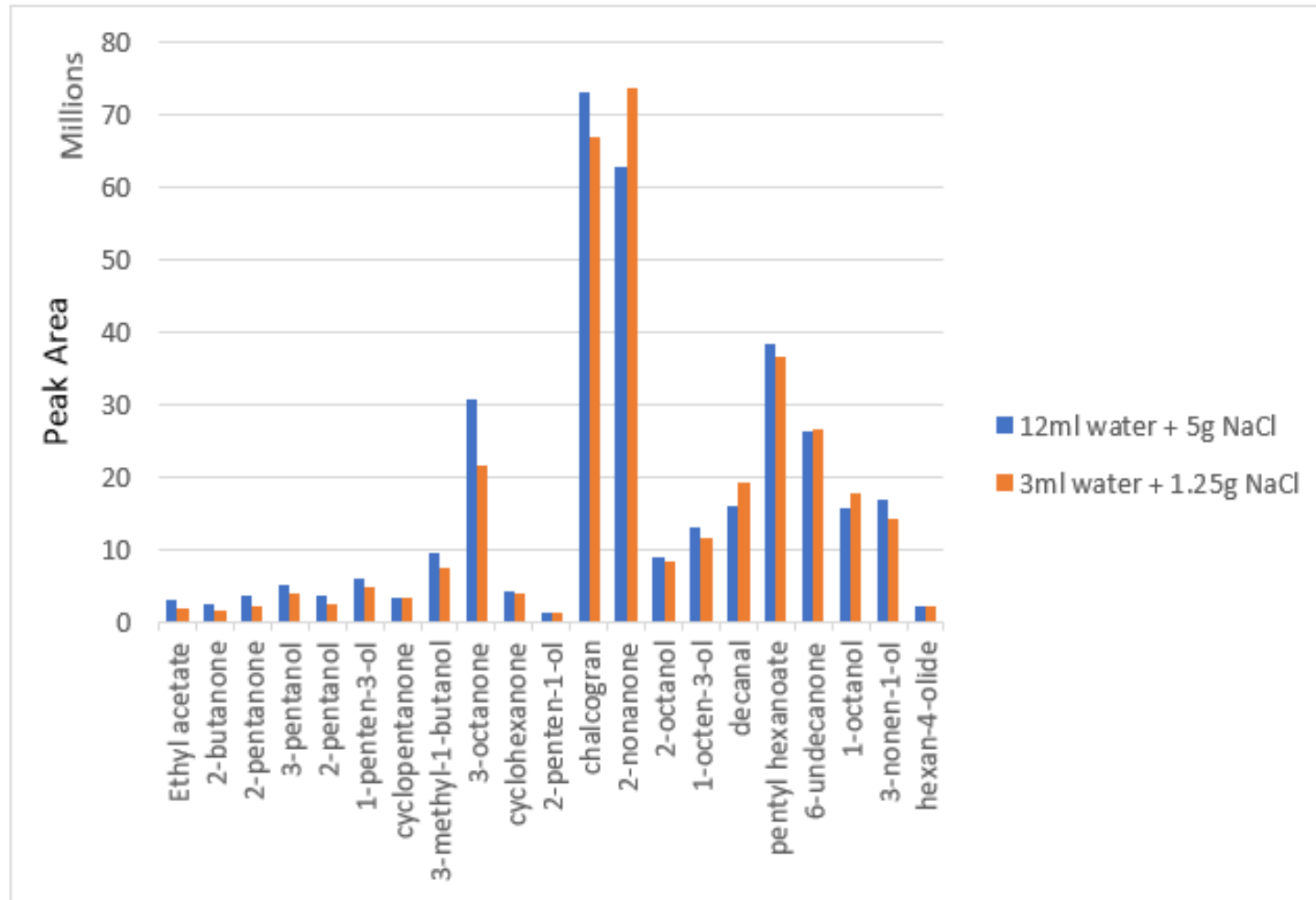
Effet du pH (acide)

- Ajout d'HCl à la solution d'extraction



Choix final: sans HCl

Effet du volume de l'espace de tête

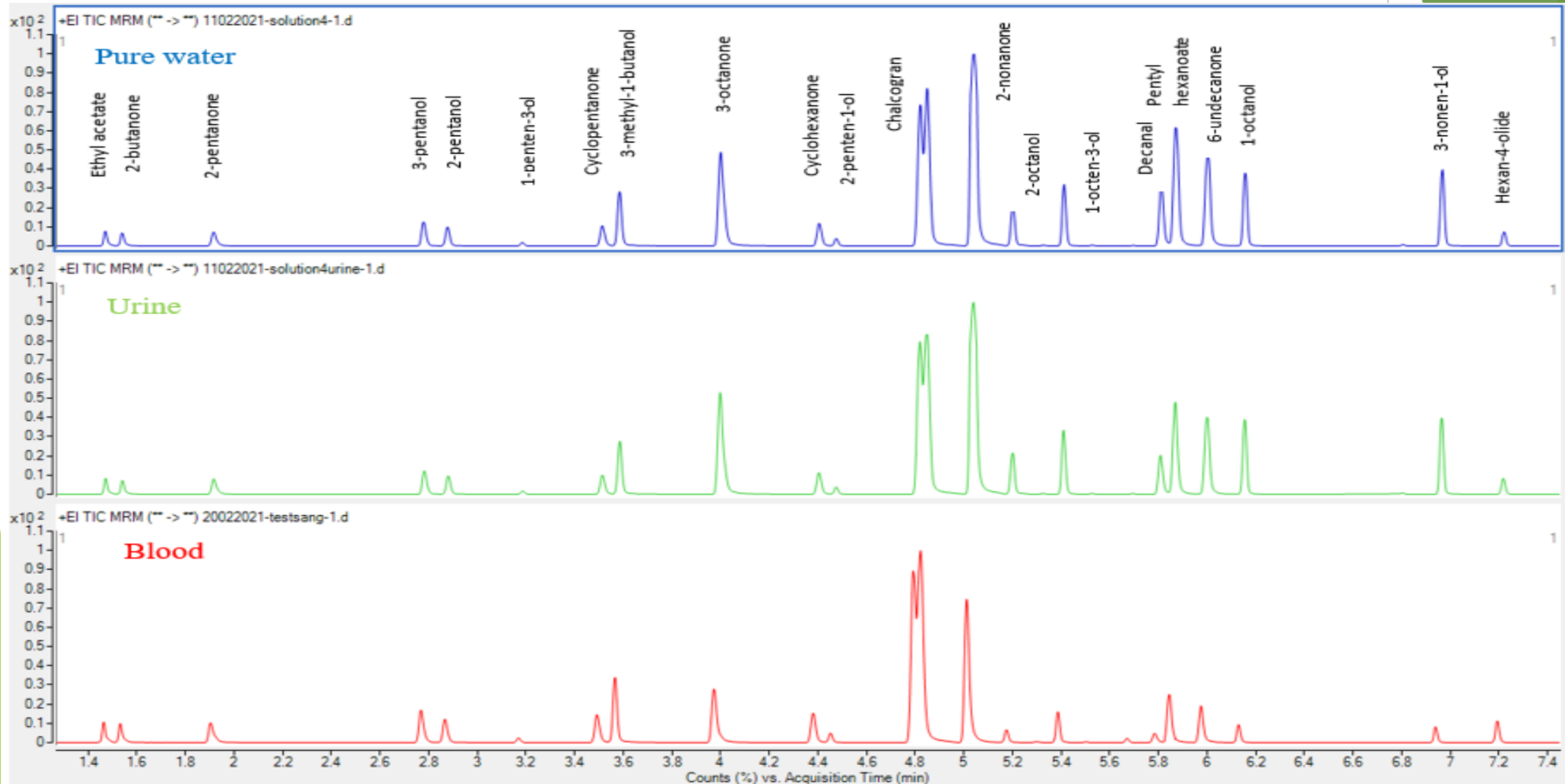


Volume de matrice choisi: 3 mL

Meilleurs paramètres pour l'extraction des COV_m

Paramètres	Choix
Type de fibre	65 µm PDMS/DVB
Temps d'incubation	300 s (5 min)
Temps d'extraction	600 s (10 min)
Température d'extraction	50° C
Temps de désorption	10 s
Température d'injecteur GC	270° C
Ajout de sel	1.25 g NaCl
Effet du pH (acide)	Sans ajout HCl
Volume de matrice	3 mL

Résultats de l'optimisation de l'extraction des COVm de l'eau pure, l'urine et le sang



Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

- ▶ Linéarité
- ▶ Limite de détection et limite de quantification (LOD et LOQ)
- ▶ Précision: réplicabilité et répétabilité
- ▶ Justesse (accuracy)

Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

Linéarité:

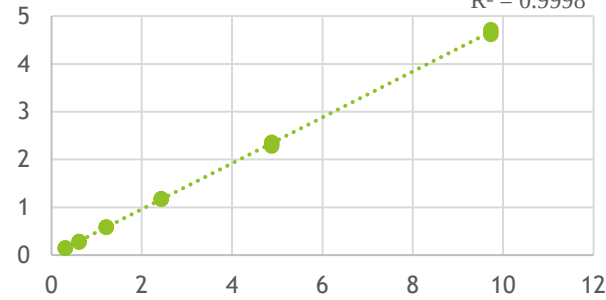
- ▶ Construire une courbe de calibration pour chaque COVm (dans chacune des matrices):
 - ▶ 5 différents niveaux de concentration minimum, formant l'intervalle de linéarité
 - ▶ 3 réplicas/niveau de concentration
 - ▶ Déterminer le coefficient de détermination (R^2)

Résultats: $R^2 > 0.995$ pour les 21 COVm dans toutes les matrices

Linéarité dans l'urine

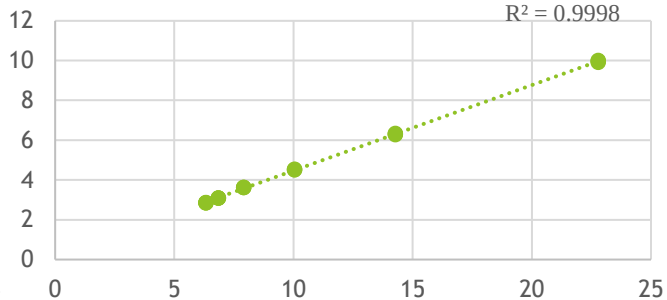
Ethyl acetate

$$y = 0.4802x - 0.001$$
$$R^2 = 0.9998$$



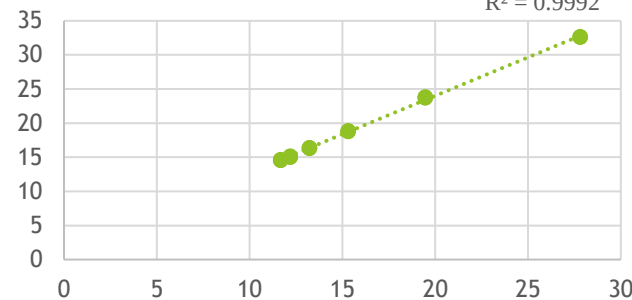
2-butanone

$$y = 0.4299x + 0.175$$
$$R^2 = 0.9998$$



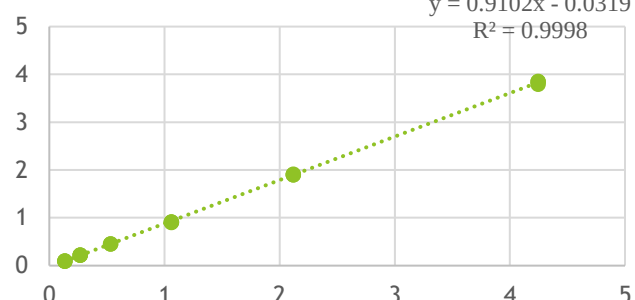
2-pentanone

$$y = 1.1248x + 1.5021$$
$$R^2 = 0.9992$$



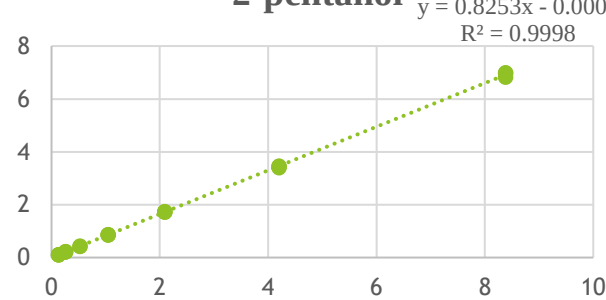
3-pentanol

$$y = 0.9102x - 0.0319$$
$$R^2 = 0.9998$$



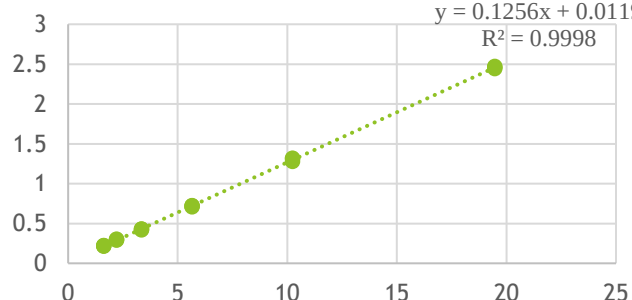
2-pentanol

$$y = 0.8253x - 0.0003$$
$$R^2 = 0.9998$$



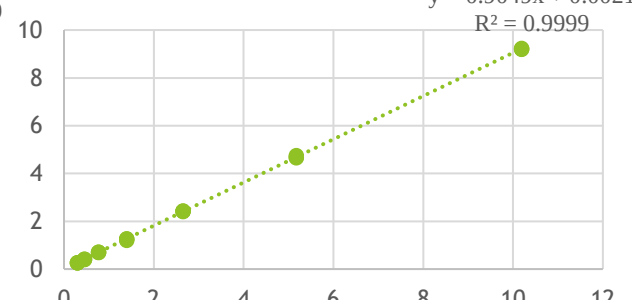
1-penten-3-ol

$$y = 0.1256x + 0.0119$$
$$R^2 = 0.9998$$



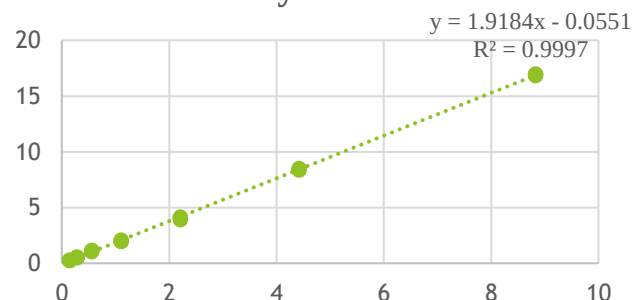
Cyclopentanone

$$y = 0.9049x + 0.0021$$
$$R^2 = 0.9999$$



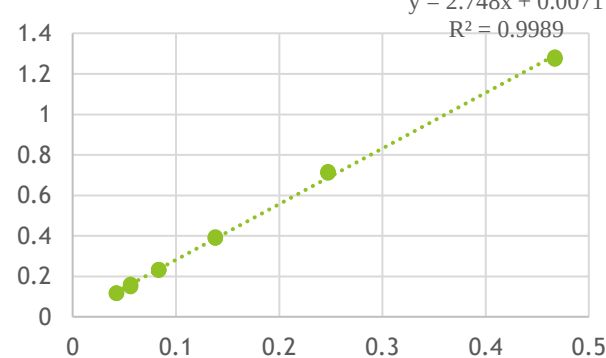
3-methyl-1-butanol

$$y = 1.9184x - 0.0551$$
$$R^2 = 0.9997$$



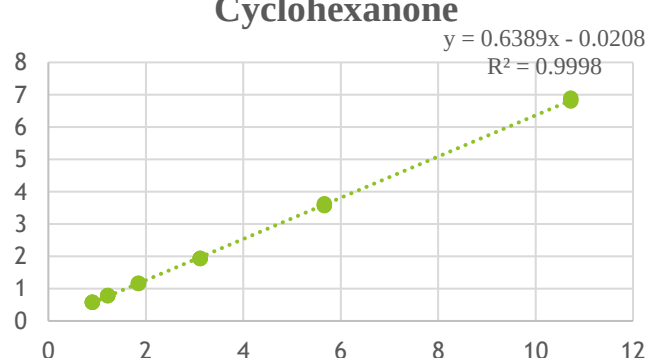
3-octanone

$$y = 2.748x + 0.0071$$
$$R^2 = 0.9989$$



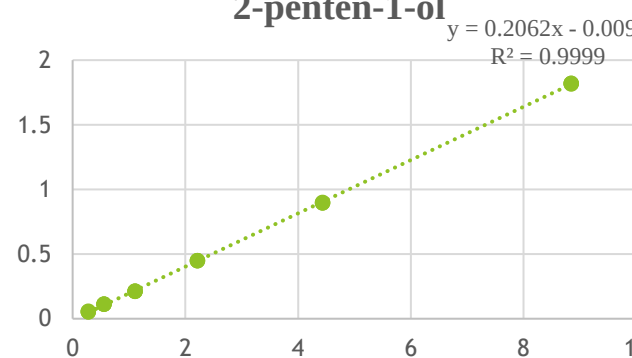
Cyclohexanone

$$y = 0.6389x - 0.0208$$
$$R^2 = 0.9998$$



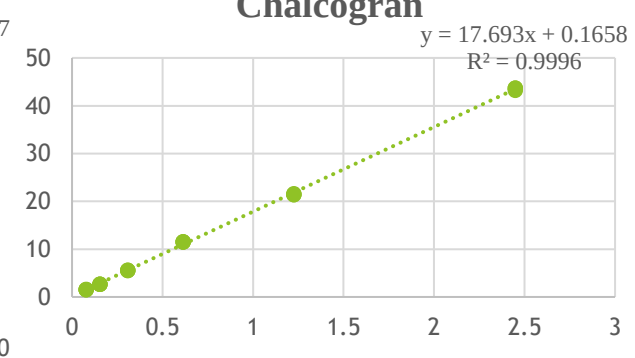
2-penten-1-ol

$$y = 0.2062x - 0.0097$$
$$R^2 = 0.9999$$



Chalcogran

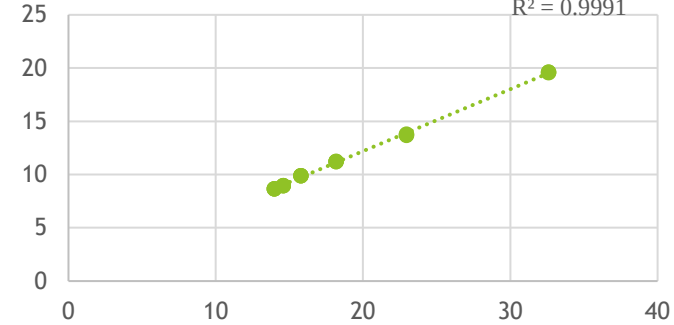
$$y = 17.693x + 0.1658$$
$$R^2 = 0.9996$$



Linéarité dans le sang

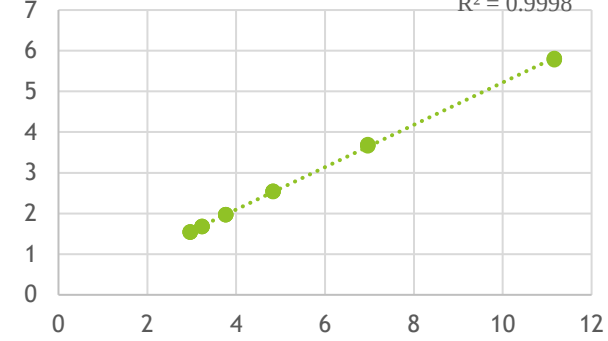
Ethyl acetate

$$y = 0.5822x + 0.5451$$
$$R^2 = 0.9991$$



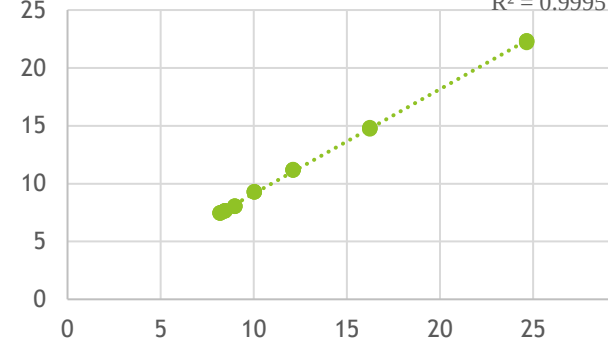
2-butanone

$$y = 0.5205x + 0.0143$$
$$R^2 = 0.9998$$



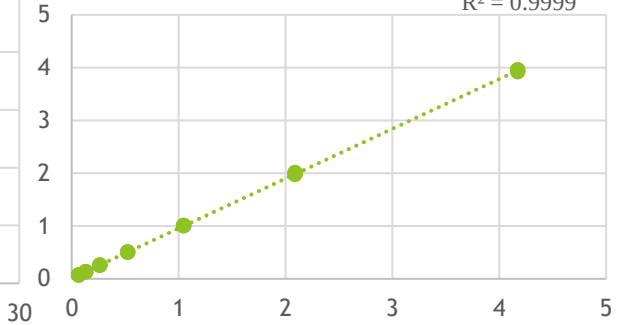
2-pentanone

$$y = 0.9033x + 0.1008$$
$$R^2 = 0.9995$$



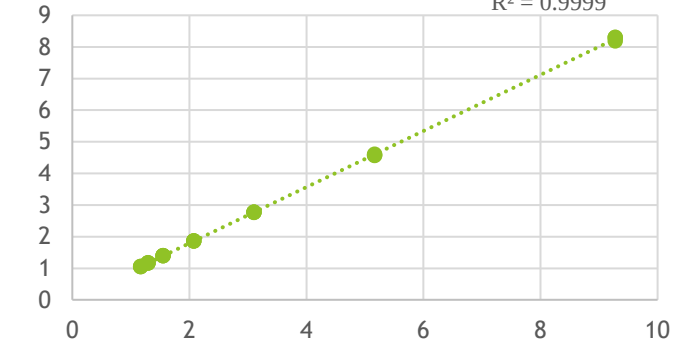
3-pentanol

$$y = 0.943x + 0.0119$$
$$R^2 = 0.9999$$



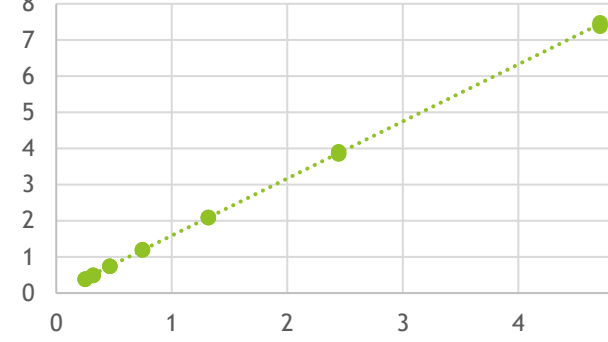
2-pentanol

$$y = 0.887x + 0.0179$$
$$R^2 = 0.9999$$



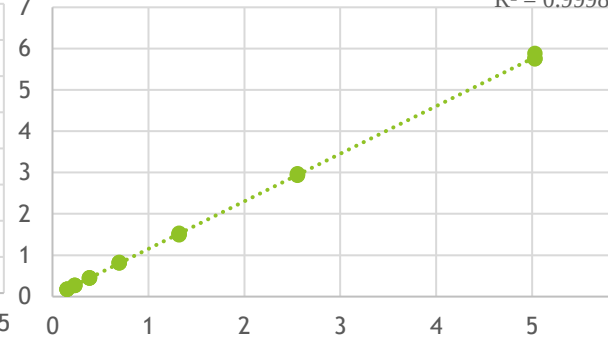
1-penten-3-ol

$$y = 1.5794x + 0.0064$$
$$R^2 = 0.9999$$



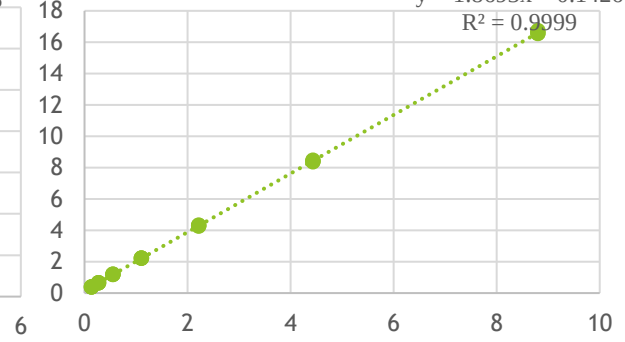
Cyclopentanone

$$y = 1.1518x + 0.0022$$
$$R^2 = 0.9998$$



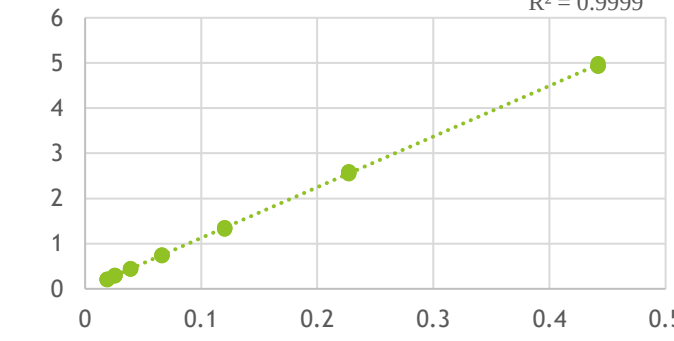
3-methyl-1-butanol

$$y = 1.8693x + 0.1426$$
$$R^2 = 0.9999$$



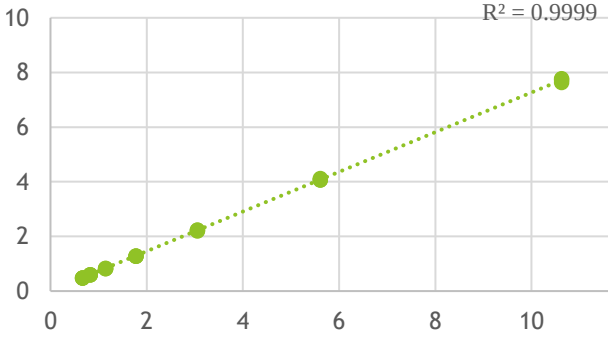
3-octanone

$$y = 11.225x + 0.0025$$
$$R^2 = 0.9999$$



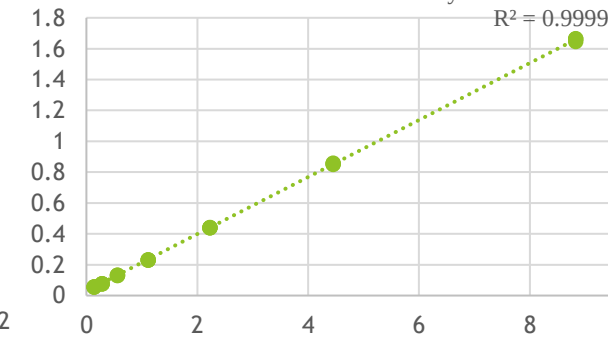
Cyclohexanone

$$y = 0.7267x - 0.0008$$
$$R^2 = 0.9999$$



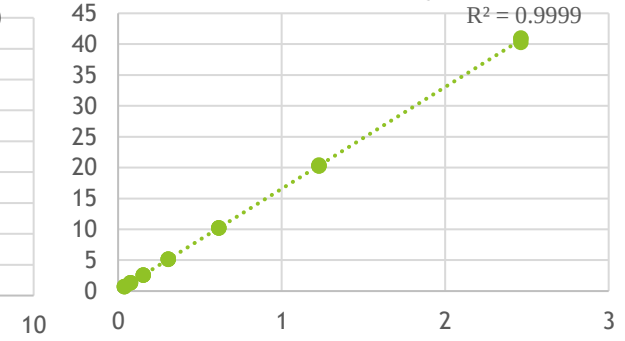
2-penten-1-ol

$$y = 0.1847x + 0.0289$$
$$R^2 = 0.9999$$



Chalcogran

$$y = 16.49x + 0.0782$$
$$R^2 = 0.9999$$



Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

LOD et LOQ:

- Calculer LOD et LOQ en se basant sur l'écart type de l'intercept et la pente de la CC (Konieczka and Namieśnik, 2018):

$$\text{LOD} = (3.3 * \text{SD-intercept}) / \text{slope}$$

$$\text{LOQ} = (10 * \text{SD-intercept}) / \text{slope}$$

LOD		
Eau pure	Urine	Sang
Entre 2 ng/L pour 2-octanol et 230 ng/L pour 2-butanone	Entre 0.7 ng/L pour 6-undecanone et 417 ng/L pour 2-pentanone	Entre 1 ng/L pour pentyl hexanoate et 507 ng/L pour éthyle acétate

Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

Comparaison des valeurs de LOD avec d'autres études

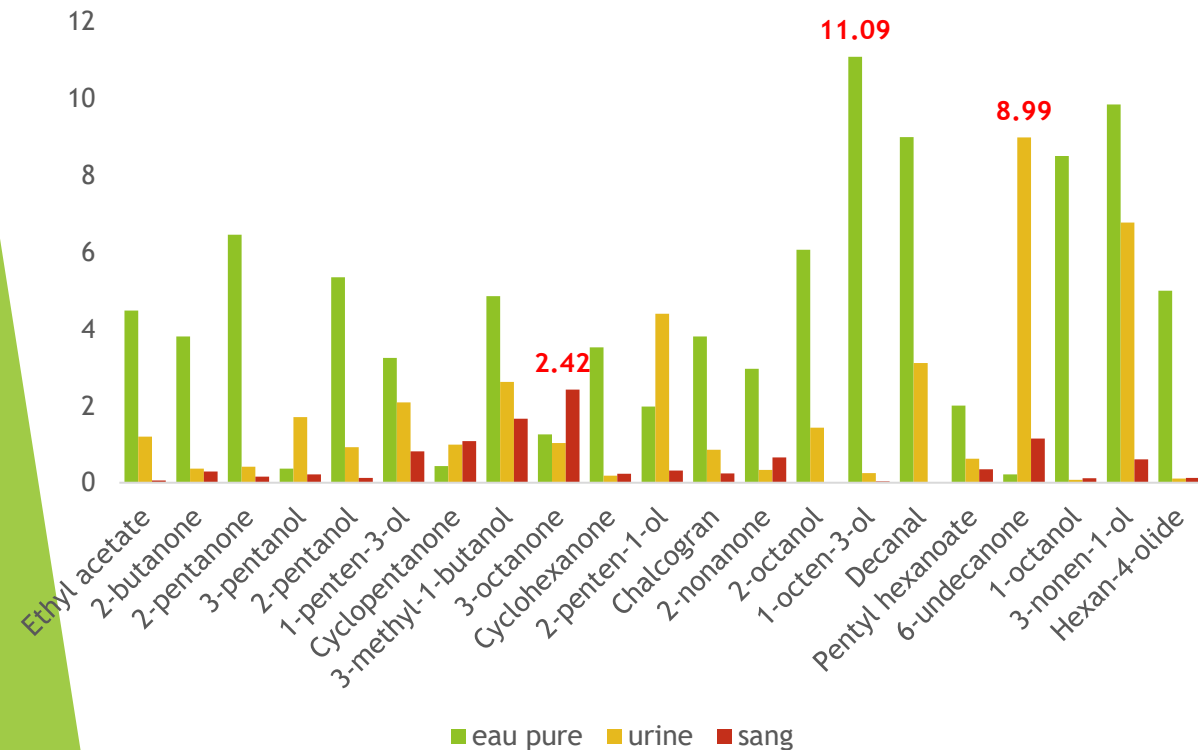
LOD		
COVm	Notre méthode	Autres études
3-octanone	0.0015 µg/L dans le sang	0.188 µg/L dans le sérum (Wazeerud-Din et al., 2021)
1-octen-3-ol	0.0351 µg/L dans le sang	2.77 µg/L dans le sérum (Wazeerud-Din et al., 2021)
Éthyle acétate	0.51 µg/L dans le sang	10 µg/L dans le sang (Ojanperä et al., 1998)
2-butanone	0.16 µg/L dans l'urine	0.61 µg/L dans l'urine (Cassandra et al., 2019)
3-methyl-1-butanol	0.05 µg/L dans l'urine	0.24 µg/L dans l'urine (Cassandra et al., 2019)

Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

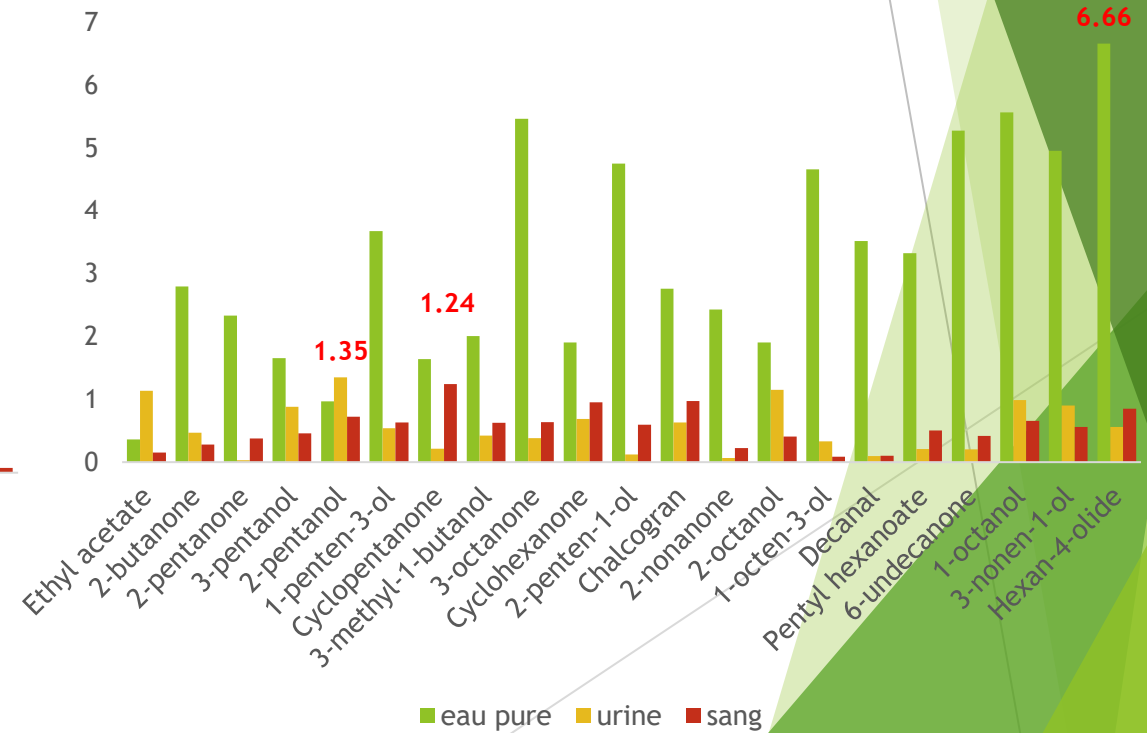
Précision: réplicabilité

- Évaluée par les coefficients de variations (CV %) à faible et à haute concentration pour chaque COVm

CV (%) à faible concentration



CV (%) à concentration élevée

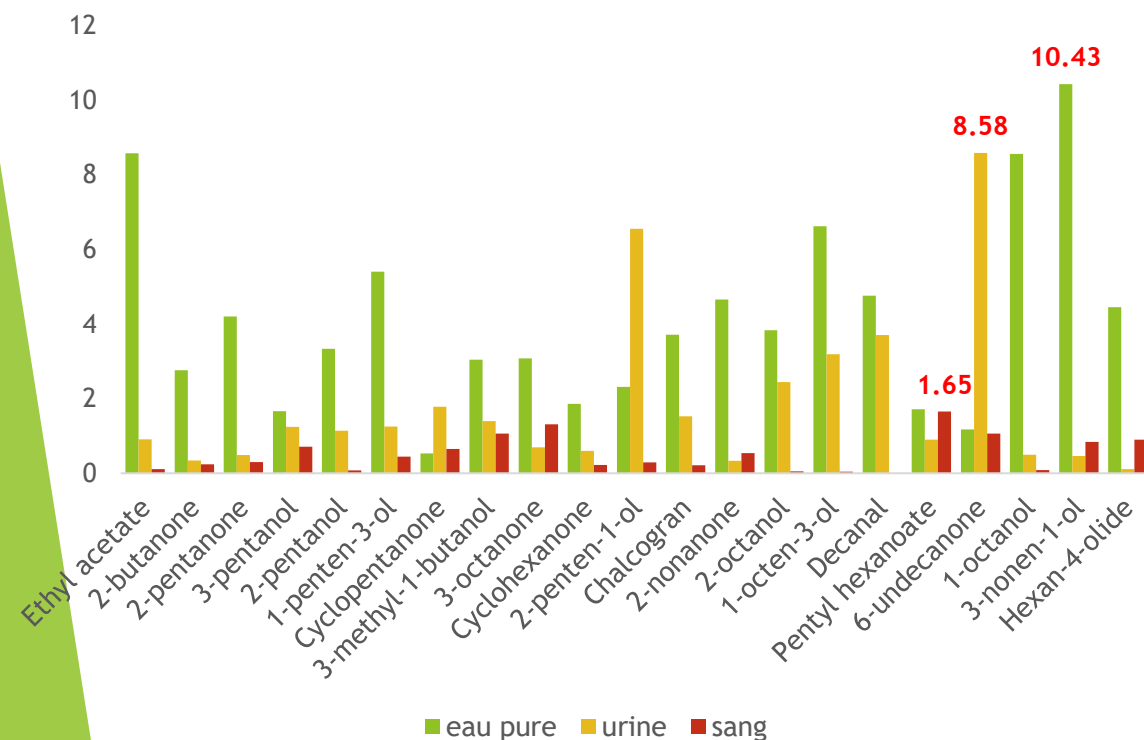


Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

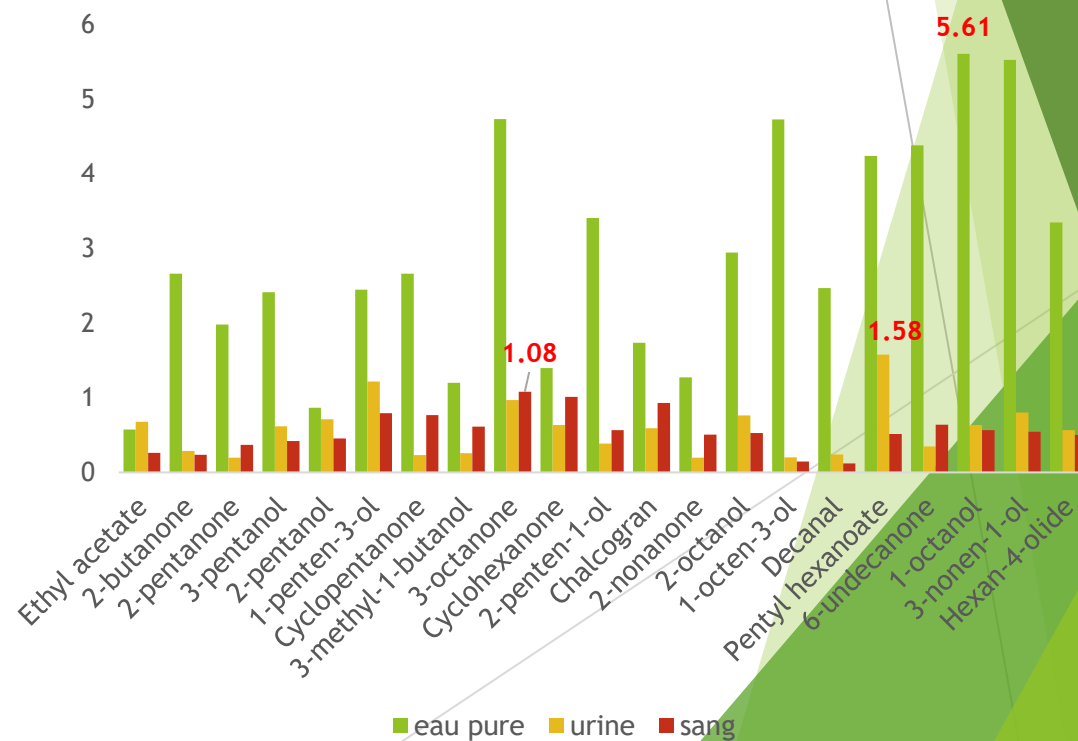
Précision: répétabilité

- Évaluée par les coefficients de variations (CV %) à faible et à haute concentration pour chaque COVm

CV (%) à faible concentration



CV (%) à concentration élevée



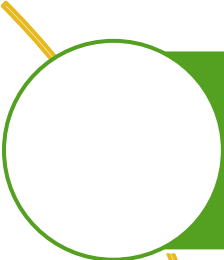
Validation de la méthode analytique dans l'eau pure, l'urine et le sang

Justesse (accuracy):

- ▶ Évaluée par le pourcentage de récupération (Rec %)
 - ▶ Récupération (%) = (valeur calculée de la CC/valeur théorique)*100

Récupération (%)		
Eau pure	Urine	Sang
Entre 81 % - 121 %	Entre 87 % - 120 %	Entre 83 % - 118 %

Conclusion



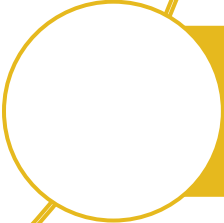
Développement et validation d'une nouvelle méthode HS-SPME-GC-MS/MS dans l'urine et le sang → quantification de 21 COVm (biomarqueurs potentiels de l'exposition aux moisissures)



Optimisation du processus d'extraction



Bonne linéarité et quantification juste et précise pour chaque COVm



Fiabilité et efficacité de la méthode pour détecter et quantifier les COVm à faibles concentrations dans l'urine et le sang

MERCI