



Service de Toxicologie

Rapport de laboratoire - programme de Biomonitoring humain Wallon

Analyses complémentaires

Méthodes d'analyse des substances perfluorées (PFAS), des retardateurs de flamme bromés (PBDEs), et des PCBs indicateurs dans le sang.

Octobre 2022

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.....	3
1 INTRODUCTION	4
2 DESCRIPTION DES MÉTHODES ANALYTIQUES.....	5
2.1 DOSAGE DES SUBSTANCES PERFLUORÉES (PFAS)	5
2.1.1 Extraction	5
2.1.2 Analyse par LC-MS/MS	5
2.1.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus	6
2.1.4 Limites de quantification.....	7
2.3 DOSAGE DES RETARDATEURS DE FLAMME BROMÉS (PBDES).....	8
2.3.1 Préparation de l'échantillon.....	8
2.3.2 Analyse par GC-MS/MS	8
2.3.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus	9
2.3.4 Limites de quantification.....	9
2.4 DOSAGE DES PCBS INDICATEURS	10
2.4.1 Préparation de l'échantillon.....	10
2.4.2 Analyse par GC-MS/MS	10
2.4.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus	11
2.4.4 Limites de quantification.....	12
2.5 RECAPITULATIFS DES SUBSTANCES MESUREES.....	13
3 PLANNING DE LA RÉALISATION DES MESURES	14
4 RÉSULTATS DES ANALYSES	15
4.1 CONTROLES DE QUALITE INTERNES UTILISES LORS DES ANALYSES COMPLÉMENTAIRES DE LA PHASE 1	16
5 CONTRÔLES DE QUALITÉ EXTERNE ET CERTIFICATION	20
5.1 VALIDATION ANALYTIQUE	20
5.2 CONTROLES DE QUALITE EXTERNES.....	22
RÉFÉRENCES	25

TABLE DES ACRONYMES

HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

PFAS : substances perfluorées

PCBs : Bbiphenyls polychlorés

PFHxA :acide perfluorohexanoïque

PFHpA : acide perfluoroheptanoïque

PFOA : acide perfluorooctanoïque

PFNA : acide perfluorononanoïque

PFDA : acide perfluorodécanoïque

PFHxS : sulfonate de perfluorohexane

PFOS : sulfonate de perfluorooctane

LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem

ESI : electrospray

MRM : Multiplke Reaction Monitoring

LOQ: Limite de quantification

LOL: limite de linéarité

PBDEs : polybromodiphénylethers

NCI : Ionisation chimique négative

TG : triglycérides

CHT : cholestérol total

QCI : contrôle de qualité interne

SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

CV : coefficient de variation

S/N : signal-sur-bruit

1 INTRODUCTION

Le premier programme de Biomonitoring Humain Wallon, financé par le Gouvernement Wallon, a démarré en 2019 avec pour objectif principal l'obtention de données de référence sur l'exposition des Wallons à diverses substances polluantes rencontrées dans l'environnement.

Les données obtenues via le biomonitoring ont pour objectifs de permettre :

- de déterminer les concentrations de référence spécifiques de la population wallonne,
- de déterminer si certaines classes d'âge sont plus exposées,
- de déterminer si l'imprégnation est la même pour les deux sexes,
- de déterminer l'influence de la typologie du lieu de résidence (urbaine/rurale/agricole/industrielle), en fonction des critères retenus pour la sélection des aires géographiques d'études,
- de déterminer si l'exposition des Wallons aux substances est similaire ou différente de l'exposition dans les autres pays (européens) de niveau socio-économique similaire,
- lorsque des valeurs limites d'exposition sont disponibles, d'évaluer si les concentrations sanguines ou urinaires atteintes posent un problème pour la santé et nécessitent des mesures de prévention ou d'intervention particulières.

En fonction de la taille de l'échantillon et sur base d'une enquête complémentaire, des associations entre le niveau d'imprégnation et des sources d'exposition potentielles aux substances /polluants, le statut socio-économique des participants ou certaines habitudes de vie pourraient être recherchées.

La phase 1 de ce programme s'est focalisée sur une population couvrant 3 tranches d'âge : les nouveau-nés, les adolescents (12-19 ans) et les jeunes adultes (20-39 ans). Les prélèvements biologiques ont été collectés entre décembre 2019 et juillet 2020. Les substances sélectionnées dans un premier temps sont des métaux et éléments traces, des plastifiants (bisphénols), des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs), plusieurs familles de pesticides et des PCBs.

Dans un deuxième temps, d'autres marqueurs sanguins comme les substances perfluorées (PFAS), des retardateurs de flammes bromés ou les PCBs indicateurs (Biphenyls Polychlorés) ont été dosés soit sur l'ensemble des populations recrutées, soit sur certaines tranches d'âge seulement.

Le présent rapport décrit les méthodes analytiques utilisées, 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 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.

2.1.1 Extraction

Vingt microlitres de standard interne (solution contenant chacun des 7 PFAS marqué au ¹³C) sont ajoutés à 1 mL d'échantillon de sérum, qui est ensuite acidifié par 2 mL d'un mélange acide formique-H₂O (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.

2.1.2 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

	Temps (min)	Débit (ml/min)	Composition A (%)	Composition 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 (N₂) : 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	118.9	10	20	0.15
			268.9	10	10	0.15
6.2 – 7.8 min	PFHpA	362.8	168.9	10	15	0.2
			318.9	10	10	0.2
7.8 – 9.2 min	PFHxS	398.7	80	45	35	0.1
			99	45	30	0.1
	PFOA	412.7	168.9	14	20	0.1
			368.9	14	10	0.1
9.2 – 10.1 min	PFNA	462.7	219	10	15	0.2
			418.9	10	10	0.2
10.1 – 11.2 min	PFOS	498.7	80	50	50	0.04
			99	50	35	0.04
	PFDA	512.7	219	13	20	0.1
			468.8	13	10	0.1

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification

2.1.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

Chaque PFAS est quantifié avec son homologue marqué au ¹³C. 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.

2.1.4 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

2.3 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).

2.3.1 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.

2.3.2 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 maintient (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.

2.3.3 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.

2.3.4 Limites de quantification

Composé	LOQ (ng/L)	LOL (ng/L)
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

2.4 DOSAGE DES PCBS INDICATEURS

Une technique analytique uniquement dédiée pour les PCBs indicateurs a été développée afin d'y ajouter les PCB-28, -52, et -101 qui n'étaient pas initialement dosés dans l'ancienne méthode multi-analyte (voir « dosage des pesticides organochlorés et PCBs » dans le rapport de labo phase 1 & 2), et d'augmenter la sensibilité pour pouvoir mesurer les PCBs présents en plus faibles concentrations dans les échantillons (PCB-118 et -138). Les limites de quantification ont été sensiblement diminuées (divisées par 10) par rapport à l'ancienne méthode. Cette nouvelle technique est fortement inspirée du protocole utilisé pour le dosage des PBDEs (Pirard et al., 2018).

2.4.1 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. 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.

2.4.2 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 maintient (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 (EI)
- 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	257.9	186.0	30
	185.9	151.0	25
PCB-28 ¹³ C ₁₂	267.5	198.1	30
PCB-52	289.3	220.0	30
	291.3	222.0	25
PCB-52 ¹³ C ₁₂	303.4	233.9	30
PCB-101	325.3	256.0	35
	327.3	256.0	35
PCB-101 ¹³ C ₁₂	337.3	267.9	35
PCB-118	325.3	256.0	35
	327.3	256.0	35
PCB-118 ¹³ C ₁₂	337.3	267.9	35
PCB-138	359.8	289.9	35
	359.8	287.8	35
PCB-138 ¹³ C ₁₂	371.3	301.9	35
PCB-153	359.8	289.9	35
	359.8	287.8	35
PCB-153 ¹³ C ₁₂	371.3	301.9	35
PCB-180	393.3	323.9	35
	395.2	323.9	35
PCB-180 ¹³ C ₁₂	405.4	335.9	35

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification

2.4.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

Chaque PCB est quantifié avec son homologue marqué au ¹³C₁₂. 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.

2.4.4 Limites de quantification

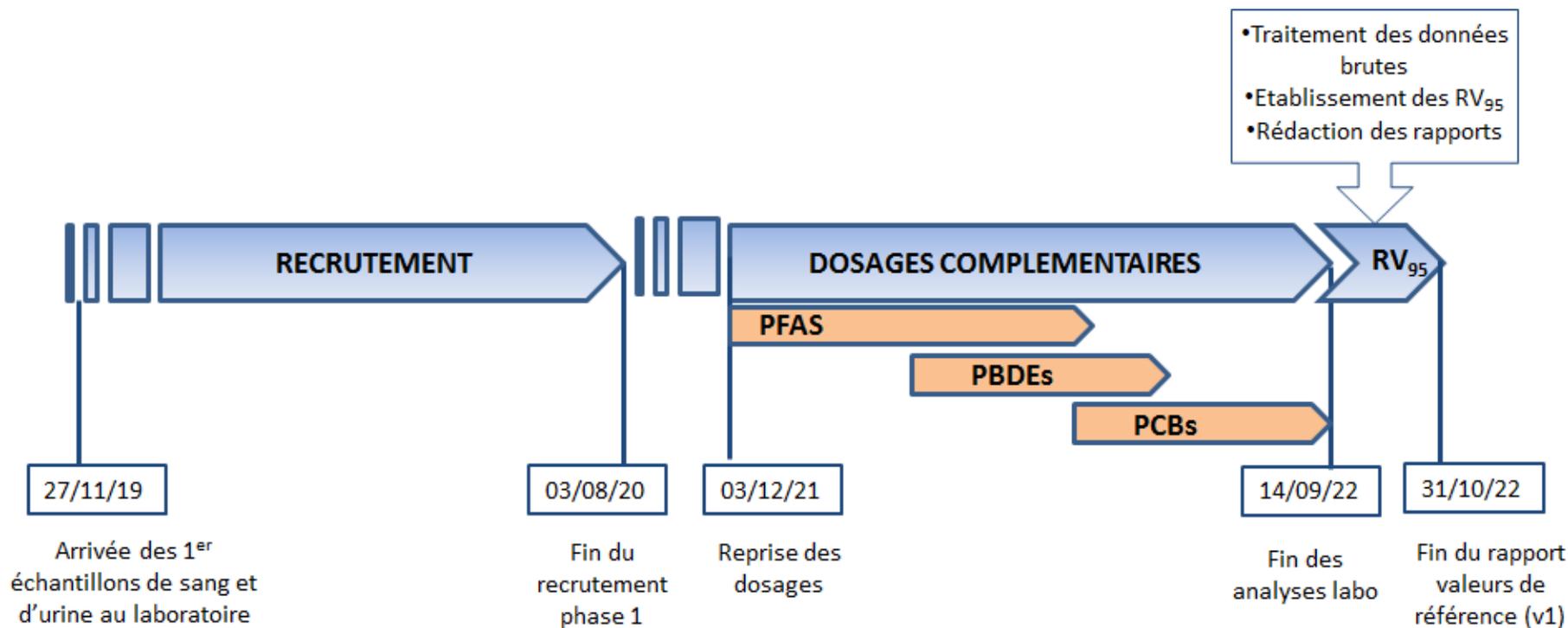
Composé	LOQ (ng/L)	LOL (ng/L)
PCB 28	18	1000
PCB 52	15	1000
PCB 101	15	1000
PCB 118	5	1000
PCB 138	6	1000
PCB 153	7	1000
PCB 180	5	1000

2.5 RECAPITULATIFS DES SUBSTANCES MESUREES

SUBSTANCES MESURÉES	TECHNIQUE ANALYTIQUE	LOQ (µg/L)
PFAS		
PFHxA	SPE-LC-MS/MS	0.10
PFHpA	SPE-LC-MS/MS)	0.10
PFOA	SPE-LC-MS/MS	0.50
PFNA	SPE-LC-MS/MS	0.10
PFDA	SPE-LC-MS/MS	0.10
PFHxS	SPE-LC-MS/MS	0.15
PFOS	SPE-LC-MS/MS	0.50
SUBSTANCES MESURÉES	TECHNIQUE ANALYTIQUE	LOQ (ng/L)
PBDEs		
PBDE-28	LLE-SPE-GC-MS (NCI)	5.4
PBDE-47	LLE-SPE-GC-MS (NCI)	5.0
PBDE-99	LLE-SPE-GC-MS (NCI)	5.3
PBDE-100	LLE-SPE-GC-MS (NCI)	5.0
PBDE-153	LLE-SPE-GC-MS (NCI)	5.0
PBDE-154	LLE-SPE-GC-MS (NCI)	6.0
PBDE-183	LLE-SPE-GC-MS (NCI)	5.0
PCBs indicateurs		
PCB-28	LLE-SPE-GC-MS/MS (EI)	18
PCB-52	LLE-SPE-GC-MS/MS (EI)	15
PCB-101	LLE-SPE-GC-MS/MS (EI)	15
PCB-118	LLE-SPE-GC-MS/MS (EI)	5.0
PCB-138	LLE-SPE-GC-MS/MS (EI)	6.0
PCB-153	LLE-SPE-GC-MS/MS (EI)	7.0
PCB-180	LLE-SPE-GC-MS/MS (EI)	5.0

3 PLANNING DE LA REALISATION DES MESURES

Les dosages de PFAS, PBDEs et PCBs ont été réalisés entre décembre 2021 et septembre 2022, et se sont succédés comme représentés ci-dessous.



4 RESULTATS DES ANALYSES

Les résultats sont exprimés en µg/L pour les dosages de PFAS, et en ng/L et ng/g lipide pour les dosages de PBDEs et PCBs.

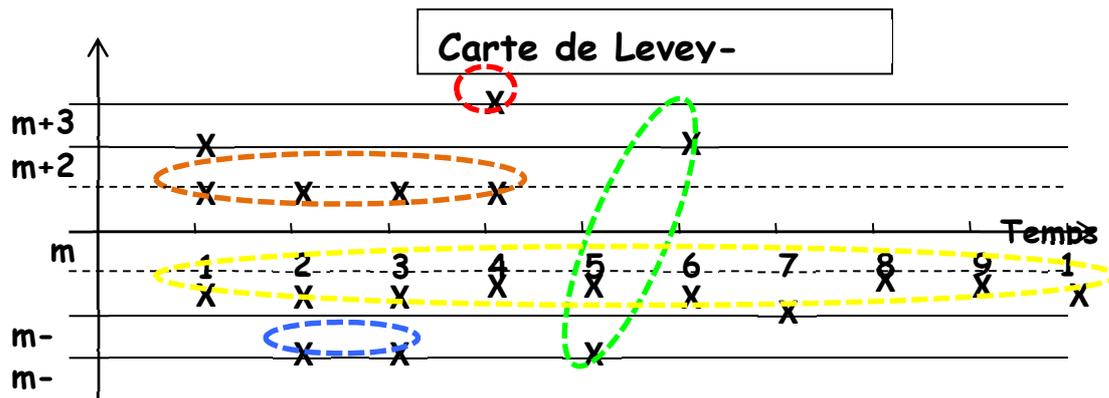
Le contenu lipidique des échantillons de sérum a été déterminé en dosant les triglycérides (TG) et le cholestérol total (CHT) par réactions enzymatiques sur l'automate ALINITY C + en utilisant les kits de réactifs Abbott prévus à cet effet.

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 et des pesticides organochlorés et PCBs. Si le laboratoire n'est pas accrédité pour les autres dosages du biomonitoring (PFAS, PBDEs, PCBs indicateurs), 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 verrie, des réactifs, et des instruments du laboratoire. Si ce dernier montre des concentrations supérieures à la LOQ, la série d'échantillons est invalidée.

De plus, une séquence est validée si les contrôles de qualités internes (QCI) inclus dans cette séquence respectent les règles de Westgard.



Règles de Westgard :

1_{2s} : la valeur dépasse $m \pm 2\sigma \rightarrow$ alerte

1_{3s} : la valeur dépasse $m \pm 3\sigma \rightarrow$ rejet

2_{2s} : 2 QC consécutifs situés à plus de 2σ du même côté de la moyenne \rightarrow rejet

R_{4s} : Différence entre la valeur la + élevée et la valeur la + basse dépasse $4\sigma \rightarrow$ alerte

4_{1s} : 4 QC consécutifs situés à plus de 1σ du même côté de la moyenne \rightarrow alerte

10_m : 10 QC consécutifs du même côté de la moyenne \rightarrow alerte

4.1 CONTROLES DE QUALITE INTERNES UTILISES LORS DES ANALYSES COMPLEMENTAIRES 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 des analyses complémentaires.

PFAS				
	PFHxS (µg/L)		PFHOS (µg/L)	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
AM-S-Y1506				
AM-S-Y2007	14.3	10.6-18.0	49.9	29.6-70.2
AM-S-Y2008	3.28	2.34-4.22	85.2	50.8-120
AM-S-Y2009	8.51	6.26-10.8	20.0	11.9-28.1
AM-S-Y2101	0.999	0.616-1.38	7.17	4.22-10.1
AM-S-Y2102	4.64	3.39-5.89	90.3	53.2-127
AM-S-Y2103	2.67	1.89-3.45	9.28	5.39-13.2
AM-S-Y2104	14.5	10.9-18.1	47.7	28.4-67.0
AM-S-Y2105	11.9	8.86-14.9	36.5	21.5-51.5
AM-S-Y2107	8.25	6.13-10.4	12.6	7.50-17.7
AM-S-Y2108	9.16	6.79-11.5	22.6	13.4-31.8
AM-S-Y2109	3.43	2.47-4.39	5.45	3.19-7.71

PFAS										
	PFHxA (µg/L)		PFHpA (µg/L)		PFOA (µg/L)		PFNA (µg/L)		PFDA (µg/L)	
	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable	Valeur cible	Ecart acceptable
AM-S-Y1506										
AM-S-Y2007	5.66	4.44-6.88	1.61	0.957-2.26	0.832	0.530-1.13	1.17	0.832-1.51	1.55	0.922-2.18
AM-S-Y2008	1.52	1.12-1.92	0.717	0.426-1.01	6.77	5.16-8.38	0.632	0.424-0.840	4.36	2.60-6.12
AM-S-Y2009	4.72	3.66-5.78	1.95	1.16-2.74	20.5	15.8-25.2	2.62	1.93-3.31	0.685	0.405-0.965
AM-S-Y2101	4.3	3.38-5.22	3.86	2.31-5.41	17.4	13.5-21.3	0.78	0.540-1.02	2.12	1.27-2.97
AM-S-Y2102	1.08	0.775-1.38	0.626	0.372-0.88	11.8	9.14-14.5	2.89	2.14-3.64	3.6	2.15-5.05
AM-S-Y2103	6.87	5.44-8.30	1.07	0.638-1.50	4.5	3.40-5.60	1.44	1.04-1.84	0.484	0.286-0.682
AM-S-Y2104	5.61	4.41-6.81	1.56	0.929-2.19	0.794	0.502-1.09	1.16	0.826-1.49	1.54	0.919-2.16
AM-S-Y2105	1.31	0.951-1.67	3.18	1.89-4.47	9.6	7.37-11.8	2.9	2.15-3.65	2.61	1.55-3.67
AM-S-Y2107	6.31	1.99-7.63	0.884	0.526-1.24	7.69	5.91-9.47	2.36	1.74-2.98	4.04	2.41-5.67
AM-S-Y2108	2.75	2.11-3.39	2.32	1.39-3.25	13.2	10.2-16.2	2.37	1.74-3.00	3.56	2.13-4.99
AM-S-Y2109	0.605	0.392-0.818	0.304	0.180-0.428	1.83	1.32-2.34	0.229	0.121-0.337	0.234	0.137-0.331

PBDEs										
	PBDE-28 (ng/L)		PBDE-47 (ng/L)		PBDE-99 (ng/L)		PBDE-100 (ng/L)		PBDE-153 (ng/L)	
	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*	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]

*Le contrôle AM-W-2003 a été systématiquement dilué deux fois.

PBDEs				
	PBDE-154 (ng/L)		PBDE-183 (ng/L)	
	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]

*Le contrôle AM-W-2003 a été systématiquement dilué deux fois.

PCBs indicateurs										
	PCB-28 (ng/L)		PCB -52 (ng/L)		PCB-101 (ng/L)		PCB-118 (ng/L)		PCB-138 (ng/L)	
	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
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.

PCBs indicateurs				
	PCB-153 (ng/L)		PCB-180 (ng/L)	
	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
SRM 1589a (NIST)	936	796-1076	523	445-601

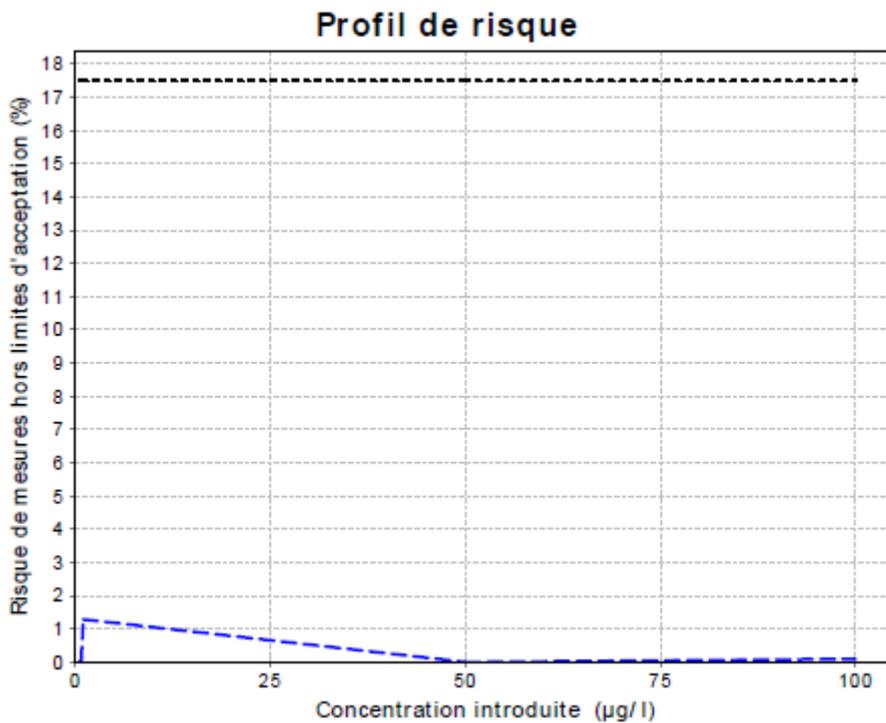
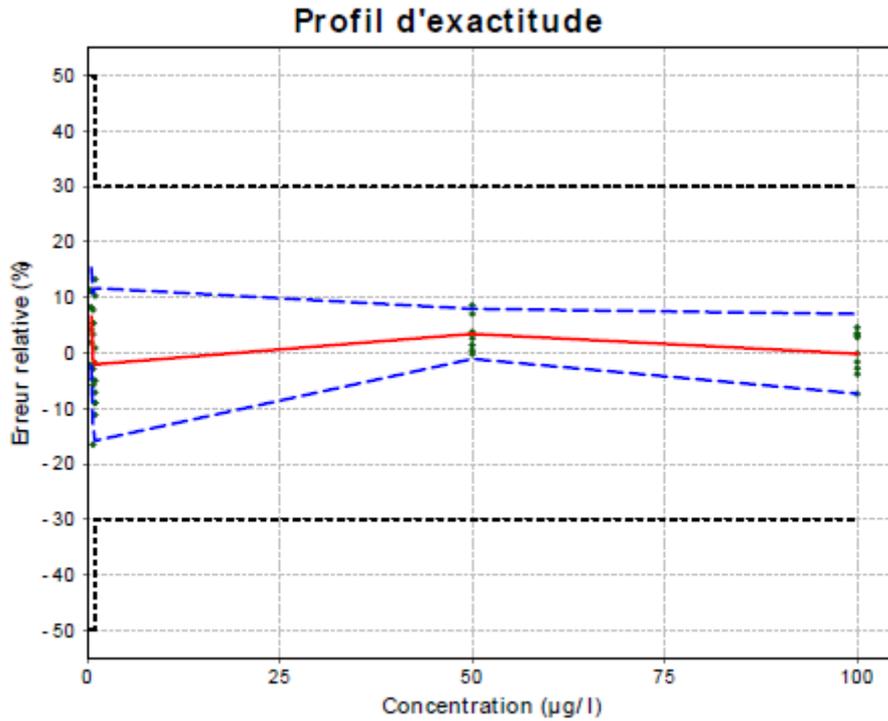
*Le contrôle AM-W-2003 a été systématiquement dilué deux fois.

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 (Dubois et al., 2012).

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. Le profil d'exactitude reporte le biais relatif (en %) en fonction de la concentration (en $\mu\text{g/L}$). 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 β -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 PFOA. Dans cet exemple, les LOQ inférieure et supérieure sont respectivement égales à 0.50 et 100 $\mu\text{g/L}$.



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.

Pour les PCBs, les LOQs ont été déterminées selon des méthodes dédiées aux dioxines et PCBs dioxin-like (L'Homme et al., 2015 ; Sjodin et al., 2004). La LOQ pour les PCBs est définie comme la plus petite concentration injectée pour laquelle un rapport signal-sur-bruit (S/N) est supérieur à 10 et un biais par rapport à la concentration ciblée inférieur à 20%. Pour les congénères présents dans les blancs réactifs, la LOQ est définie comme la valeur moyenne détectée dans les blancs (N = 10) plus 6 fois la déviation standard (L'Homme et al., 2015).

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 des PFAS :**

G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme for Analyses in Biological Materials) organisé par the Institute and Out-Patient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine of the University Erlangen-Nuremberg : 2 échantillons 1 à 2x/an

AMAP Ring Test for Persistent Organic Pollutants in Human Serum organisé par l'Institut national de Santé Publique du Québec : 3 échantillons 3x/an

- **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

- **Dosage des PCBs :**

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

AMAP Ring Test for Persistent Organic Pollutants in Human Serum organisé par l'Institut national de Santé Publique du Québec : 3 échantillons 3x/an

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 obtenus pour les PFAS et les PBDEs sont repris ci-dessous.



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



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

RÉFÉRENCES

Dubois N, Paccou AP, De Backer BG, Charlier CJ. Validation of the quantitative determination of tetrahydrocannabinol and its two major metabolites in plasma by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry according to the total error approach. *J Anal Toxicol* 2012;36:25–9.

Dufour, P., Pirard, C., Seghaye, M.-C., Charlier, C. Association between organohalogenated pollutants in cord blood and thyroid function in newborns and mothers from Belgian population. *Environmental Pollution* 238 (2018) 389e396

L'Homme, B., Scholl, G., Eppe, G., Focant, J.-F. Validation of a gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method for confirmatory analysis of dioxins and dioxin-like polychlorobiphenyls in feed following new EU Regulation 709/2014. *Journal of Chromatography A*, 1376 (2015) 149–158.

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, Charlier, C. Simple and fast method for the measurement of legacy and novel brominated flame retardants in human serum. *Chemosphere* 211 (2018) 918e925

Sjödin, A., Jones, R.S., Lapeza, C.R., Focant, J.F., McGahee, E.E., Patterson, D.G. Semiautomated High-Throughput Extraction and Cleanup Method for the Measurement of Polybrominated Diphenyl Ethers, Polybrominated Biphenyls, and Polychlorinated Biphenyls in Human Serum. *Anal. Chem.* 2004, 76, 7, 1921–1927