Service de Toxicologie

Rapport de laboratoire - programme de Biomonitoring humain Wallon

PHASE 4 (2025)

Méthodes d'analyse des métabolites de phtalates et de retardateurs de flamme phosphorés (RFP) dans l'urine

Novembre 2025

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 METABOLITES DE PHTALATES 5
2.1.1 Extraction 5
2.1.2 Analyse par LC-MS/MS 6
2.1.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus 8
2.1.4 Limites de quantification 9
2.2. DOSAGE DES RETARDATEURS DE FLAMME PHOSPHORES 10
2.2.1 Préparation de l'échantillon 10
2.2.2 Analyse par UPLC-MS/MS 10
2.2.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus 11
2.2.4 Limites de quantification 12
3 PLANNING DE LA RÉALISATION DES MESURES 13
4 RÉSULTATS DES ANALYSES 14
4.1 CONTROLES DE QUALITE INTERNES 15
5 CONTRÔLES DE QUALITÉ EXTERNE ET CERTIFICATIOn 17
5.1 VALIDATION ANALYTIQUE 17
5.2 CONTROLES DE QUALITE EXTERNES 19
REFERENCES 21

TABLE DES ACRONYMES

HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
PCBs : polychlorobiphényls
PFAS : substances perfluorées (perfluoroalkyl substances)
RFP : retardateurs de flamme phosphorés
MEP: monoéthylphtalate
MnBP: mono-n-butylphtalate
MiBP: mono-iso-butylphtalate
5-oxo-MEHP: mono-(2-ethyl-5-oxohexyl)phtalate
5-OH-MEHP: mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phtalate
5-cx-MEPP: mono(5-carboxy-2-ethylpentyl) phtalate
MEHP: monoethylhexylphtalate
MBzP: monobenzylphtalate
cx-MiNP: 7-carboxy-(mono-methyl-heptyl) phtalate
HO-MiNP: 7-hydroxy-(mono-methyl-octyl) phtalate
6-OH-MiDP: 6-OH-Mono-propyl-heptyl phtalate
OH-MINCH: cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-hydroxy-4-methyl)octyl ester
cx-MINCH: cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-carboxylate-4-methyl)heptyl ester
oxo-MINCH: cyclohexane-1,2-dicarboxylate, mono-(4-methyl- 7-oxooctyl) ester
DEP: diéthylphtalate
DnBP di-n-butyl phtalate
DiBP: di-isobutyl phtalate
DEHP: di(2-éthylhexyl)phtalate
BBzP: butyl benzyl phtalate
DiNP: di-isononyl phtalate
DiDP: di-isodécyl phtalate
DINCH: hexahydrophtalate de di-isononyle
UPLC-MS/MS : chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem
ESI : electrospray négatif
LOQ : limite de quantification
LOL: limite de linéarité
HCl : acide chlorhydrique
SFSTP : Société Française des Sciences et Techniques Pharmaceutiques

1 INTRODUCTION

Le premier programme de Biomonitoring Humain Wallon (BMH-WAL), financé par le Gouvernement Wallon, a démarré en 2019 afin d'obtenir des données de référence sur l'exposition des Wallons à diverses substances polluantes rencontrées dans l'environnement, l'alimentation, l'eau de boisson ou les produits de la vie quotidienne. Les objectifs principaux étaient de déterminer les concentrations de référence spécifiques de la population wallonne, d'identifier des sous-groupes plus particulièrement exposés (en fonction de l'âge, du sexe, du statut tabagique, etc.), et de comparer les niveaux d'exposition de la population wallonne aux autres pays de niveau socio-économique similaire. La mise en évidence de sources d'exposition pourrait également être envisagée par la suite en cherchant des liens statistiques entre niveaux d'imprégnation et statut socio-économique des participants, lieu de résidence, ou certaines habitudes de vie.

Les substances ciblées initialement étaient des métaux et éléments traces, des plastifiants (bisphénols), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), plusieurs familles de pesticides, des polychlorobiphényles (PCBs) et des substances perfluorées (PFAS).

La phase 1 de ce programme s'était focalisée sur une population de nouveau-nés, d'adolescents (12-19 ans) et de jeunes adultes (20-39 ans), recrutés entre décembre 2019 et juillet 2020. La phase 2 s'était concentrée sur une population d'enfants de 3 à 5 ans et de 6 à 11 ans, recrutés entre décembre 2020 et juin 2021, et la phase 3 concernait la catégorie d'âge adulte de 40-59 ans, permettant ainsi à la Wallonie de disposer de valeurs de référence pour l'ensemble de la population de 3 à 59 ans, ainsi que les nouveau-nés.

Cette quatrième phase consiste en le dosage des métabolites de phtalates dans l'ensemble des échantillons d'urine collectés au cours des 3 phases précédentes (3-11 ans, 12-19 ans, 20-39 ans et 40-59 ans), et le dosage des retardateurs de flamme phosphorés (RFP) dans l'urine des enfants (3-11 ans) qui représentent une population particulièrement exposée à ce type de polluants.

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 METABOLITES DE PHTALATES

Les métabolites de phtalates suivants (ainsi que leur parent correspondant) qui ont été dosés dans l'urine sont repris dans le tableau ci-dessous:

Abbréviation	Marqueurs	Phtalates parents
MEP	Monoéthylphtalate	Diéthylphtalate (DEP)
MnBP	Mono-n-butylphtalate	Di-n-butyl phtalate (DnBP)
MiBP	Mono-iso-butylphtalate	Di-isobutyl phtalate (DiBP)
5-oxo-MEHP	Mono-(2-ethyl-5-oxohexyl)phtalate	Di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP)
5-OH-MEHP	Mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phtalate	
5-cx-MEPP	Mono(5-carboxy-2-ethylpentyl) phtalate	
MEHP	Monoethylhexylphtalate	
MBzP	Monobenzylphtalate	Butyl benzyl phtalate (BBzP)
cx-MiNP	7-Carboxy-(mono-methyl-heptyl) phtalate	Di-isononyl phtalate (DiNP)
HO-MiNP	7-hydroxy-(mono-methyl-octyl) phtalate	
6-OH-MiDP	6-OH-Mono-propyl-heptyl phtalate	Di-isodécyl phtalate (DiDP)
OH-MINCH	cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-hydroxy-4-methyl)octyl ester	Hexahydrophtalate de di-isononyle (DINCH)
cx-MINCH	cyclohexane-1,2-dicarboxylate-mono-(7-carboxylate-4-methyl)heptyl ester	
oxo-MINCH	Cyclohexane-1,2-dicarboxylate, mono-(4-methyl- 7-oxooctyl) ester	

Ce dosage a été réalisé par une extraction en phase solide après hydrolyse enzymatique, et une injection en chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (UPLC-MS/MS). Cette méthode initialement développée et validée pour 7 métabolites de phtalates (Dewalque et al., 2014) a été appliquée et étendue à l'ensemble des métabolites ciblés.

2.1.1 Extraction

Trois millilitres d'échantillon d'urine sont hydrolysés une nuit à 40°C au moyen de 25 µL de β-glucuronidase (Helix Pomatia) dans 750 µL de tampon acétate de sodium 1M ajusté à pH=5 et 20 µL de standard interne. Après ajout de 200 µL d'acide formique et centrifugation (5 min à 3000 rpm), l'hydrolysat est déposé sur une cartouche SPE Bond Elut Certify 130 mg (Agilent) préalablement conditionnée avec 1.5 mL d'acétonitrile et 1.5 mL d'acide acétique 0.5%. La cartouche est lavée par 1 mL d'acide acétique 0.5% et éluée par 2x1.5 mL d'acétonitrile. L'éluat

est évaporé à sec à 40°C maximum sous un léger flux d'azote, repris par 70 µL d'une solution 70/30 d'eau/acétonitrile chacun acidifié à 0.1% d'acide acétique, et centrifugés 5 min à 18000 tours/min. Le surnageant est ensuite transféré 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 un système UHPLC Acquity (Waters) équipé d'une colonne Kinetex Phenyl-Hexyl (2.1x100mm, 1.7 µm), et couplé à un spectromètre de masse Quattro Premier (Waters) opérant en electrospray négatif (ESI-).

Programme LC

- Colonne : Kinetex Phenyl-Hexyl (2.1x100mm, 1.7 µm)
- Température de la colonne : 35°C
- Volume d'injection : 10 µL
- Phase mobile A : acide acétique 0.1% dans l'eau
- Phase mobile B : acide acétique 0.1% dans l'acétonitrile

	Temps (min)	**Débit (ml/min)**	**Composition A (%)**	**Composition B (%)**
Initiale		0.55	91	9
Rampe 1	5.00	0.55	85	15
Rampe 2	7.00	0.55	74	26
Rampe 3	8.00	0.55	74	26
Rampe 4	14.00	0.55	49	51
Rampe 5	15.00	0.55	20	80
Rampe 6	16.00	0.55	91	9
Rampe 7	18.00	0.55	91	9

Programme MS/MS

- Mode d'ionisation : électrospray négatif (ESI-)
- Voltage du capillaire : 3 kV
- Température de la source : 120°C
- Température de désolvatation : 350°C
- Débit du gaz de désolvatation (N_2) : 800 l/h
- Débit du gaz de collision : 0.2 ml/min
- Mode d'acquisition : MRM

Plage	Composé	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Voltage du cône (V)	Énergie collision (eV)	Dwell time (s)
2.8 – 6.5 min	MEP	192.98	**77.05**	17	18	0.11
			121.00	17	12	0.11
	MEP $^{13}C_4$	197.00	**79.11**	17	18	0.11
			123.02	17	12	0.11
7.5-10.0 min	MnBP	221.00	**77.07**	18	20	0.08
			177.15	18	10	0.08
	MnBP $^{13}C_4$	225.07	**79.11**	18	20	0.08
	MiBP	221.00	**77.07**	18	20	0.08
			134.02	18	13	0.08
	MiBP D4	225.00	**81.00**	18	20	0.08
	5-cx-MEPP	307.10	**113.00**	20	30	0.08
			159.00	20	15	0.08
	5-cx-MEPP $^{13}C_4$	311.10	**159.10**	20	15	0.08
	5-oxo-MEHP	291.06	**121.00**	19	20	0.08
			143.08	19	14	0.08
	5-oxo-MEHP $^{13}C_4$	295.06	**124.02**	19	20	0.08
	5-OH-MEHP	293.06	**121.00**	21	20	0.08
			145.10	21	15	0.08
	5-OH-MEHP $^{13}C_4$	297.08	**124.02**	21	20	0.08
9.7-12.4 min	MBzP	255.00	**77.09**	19	20	0.06
			183.09	19	10	0.06
	MBzP $^{13}C_4$	259.01	**79.11**	19	20	0.06
	HO-MiNP	307.10	**121.00**	30	20	0.08
			77.00	30	35	0.08
	HO-MiNP $^{13}C_4$	311.10	**124.00**	30	20	0.08
	cx-MiNP	321.00	**173.00**	20	15	0.08
			121.10	20	28	0.08
	cx-MiNP $^{13}C_4$	325.00	**173.00**	20	15	0.08

	6-OH-MiDP	321.00	**121.00**	20	20	0.08
			173.10	20	15	0.08
	6-OH-MiDP $^{13}C_4$	325.00	**124.00**	20	20	0.08
	OH-MINCH	313.20	**152.90**	25	20	0.08
			109.00	25	28	0.08
	OH-MINCH $^{13}C_4$	317.20	**156.90**	25	20	0.08
	cx-MINCH	327.20	**173.20**	25	18	0.08
			152.90	25	25	0.08
	cx-MINCH $^{13}C_4$	331.20	**173.10**	25	18	0.08
	oxo-MINCH	311.10	**153.00**	20	15	0.08
			109.10	20	25	0.08
	oxo-MINCH $^{13}C_4$	315.20	**157.00**	20	15	0.08
13.2-14.2 min	MEHP	277.06	**134.03**	20	15	0.125
			77.10	20	23	0.125
	MEHP $^{13}C_4$	281.11	**137.04**	20	15	0.125

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification

Pour les métabolites cx-MiNP, OH-MiDP, OH-MINCH et cx-MINCH, la fenêtre d'acquisition a été élargie (1 min de part et d'autre du temps de rétention) pour inclure tous les pics correspondant aux mélanges d'isomères.

2.1.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

La quantification est réalisée par dilution isotopique en utilisant pour chacun des métabolites son homologue marqué au carbone 13 (au deutérium pour le MiBP).

La courbe de calibration est constituée de 9 points, et construite dans de l'urine synthétique enrichie à des concentrations croissantes allant de 0.5 à 200 µg/L. 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 10 et 100 µg/L), 3 matériels provenant d'anciens programmes de Contrôles Externes (G EQUAS 20A et 20B organisé par the Institute and Out-Patient Clinic for Occupational, Social and Environmental Medicine of the University Erlangen-Nuremberg), et 86 échantillons inconnus. Pour les métabolites cx-MiNP, OH-MiDP, OH-MINCH et cx-MINCH, les solutions de standard utilisées ainsi que les contrôles de qualité maison et G EQUAS contiennent uniquement l'isomère principale, tandis que l'ensemble des isomères est quantifié dans les échantillons réels (comme conseillé lors du programme qualité ICI/EQUAS du projet HBM4EU). Les échantillons présentant des concentrations supérieures à 200 µg/L ont été

réextraits et analysés après dilution dans de l'urine synthétique d'un facteur 3 à 20 selon la concentration initialement mesurée.

2.1.4 Limites de quantification

Métabolites	LOQ (µg/L)	LOL (µg/L)
MEP	0.94	200
MnBP	0.99	200
MiBP	1.23	200
5-oxo-MEHP	0.53	200
5-OH-MEHP	0.43	200
5-cx-MEPP	1.14	200
MEHP	0.62	200
MBzP	0.61	200
cx-MiNP	1.21	200
HO-MiNP	1.00	200
6-OH-MiDP	1.00	200
OH-MINCH	1.00	200
cx-MINCH	1.00	200
oxo-MINCH	1.00	200

2.2. DOSAGE DES RETARDATEURS DE FLAMME PHOSPHORES

Le dosage des métabolites de retardateurs de flamme phosphorés est réalisé dans l'urine par extraction liquide-liquide après hydrolyse enzymatique. L'extrait est ensuite injecté en UPLC-MS/MS. Les métabolites cibles ainsi que leur parent correspondant sont repris dans le tableau ci-dessous.

Marqueurs	RFP parents
Diphénylphosphate (DPP)	Triphénylphosphate (TPP)
Di-n-butyl phosphate (DBP)	Tri-n-butyl phosphate (TBP)
bis(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (BDCPP)	Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP)
1-hydroxy-2-propyl bis(1-chloro-2-propyl) phosphate (BCPHPP)	Tris(2-chloroisopropyl) phosphate (TCIPP)

2.2.1 Préparation de l'échantillon

A 3 mL d'échantillon d'urine sont ajoutés 40 µL de standard interne, 1 mL de tampon acétate d'ammonium 1M ajusté à pH=5, et 25 µL de β-glucuronidase. L'échantillon est laissé une nuit à 40°C pour hydrolyse. L'hydrolysat est acidifié à l'aide de 75 µL d'HCl concentré, puis extrait 2 fois avec 3 mL d'acétate d'éthyle (agitation pendant 10 minutes, centrifugation à 5000 rpm). Les 2 phases organiques récupérées sont combinées et évaporées à 40°C sous un faible flux d'azote, et reprises par 100 µL d'un mélange acétate d'ammonium 5 mM /méthanol (v/v 50/50). Après centrifugation à 18000rpm, le surnageant est transvasé dans un vial avec réducteur pour UPLC/MS.

2.2.2 Analyse par UPLC-MS/MS

Les extraits sont injectés sur un système UHPLC 1290 Infinity II (Agilent) équipé d'une colonne Acquity BEH C18 de 50 mm, et couplé à un spectromètre de masse Triple Quadrupôle 6495C (Agilent) opérant en ESI- sauf pour le BCPHPP qui est ionisé en ESI+.

Programme LC

- Colonne : Acquity BEH C18 50 x 2.1 mm, 1.7 µm
- Température de la colonne : 45°C
- Volume d'injection : 10 µL
- Phase mobile A : acétate d'ammonium 5 mM
- Phase mobile B : Méthanol

	Temps (min)	Débit (ml/min)	Composition A (%)	Composition B (%)
Initiale		0.400	75	25
Rampe 1	0.50	0.400	75	25
Rampe 2	5.00	0.400	50	50
Rampe 3	5.10	0.400	10	90
Rampe 4	6.50	0.400	10	90
Rampe 5	6.60	0.400	75	25
Rampe 6	8.00	0.400	75	25

Programme MS/MS

- Mode d'ionisation : électrospray négatif et positif selon le métabolite
- Voltage du capillaire : 2000 V en ESI+, 2350 V en ESI-
- Température de la source : 220°C
- Température de désolvatation (sheet gas) : 370°C
- Débit du gaz de désolvatation (N_2) : 12 l/min
- Mode d'acquisition : dMRM

Temps de rétention (fenêtre)	Composé	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Énergie de collision (V)	Polarité	Cycle time (ms)
3 min (+/-1 min)	DPP	249.1	**93.0**	32	-	500
			154.9	23	-	500
3 min (+/-1 min)	DPP-D10	259.1	**98.1**	32	-	500
3.4 min (+/- 1min)	DBP	209.1	**78.9**	28	-	500
			153.0	12	-	500
3.4 min (+/- 1min)	DBP-D18	227.1	78.9	28	-	500
3.6 min (+/- 1min)	BDCPP	**319.0**	**35.1**	10	-	500
		317.0	35.1	10	-	500
3.6 min (+/- 1min)	BDCPP-D8	327	**35.2**	10	-	500
4.5 min (+/- 1min)	BCPHPP	**309.2**	**99.0**	20	+	500
		311.2	99.0	20	+	500
4.5 min (+/- 1min)	BCPHPP-D6	315.2	**99.0**	20	+	500

Les transitions en gras sont utilisées pour la quantification
La fenêtre d'acquisition du BCPHPP est suffisamment large pour couvrir l'ensemble des diastéréoisomères.

2.2.3 Détermination des concentrations dans les échantillons inconnus

La quantification est réalisée par dilution isotopique en utilisant pour chacun des métabolites son homologue deutéré.

La courbe de calibration est constituée de 7 points, et construite dans de l'eau fortifiée à des concentrations croissantes allant de 0.05 à 25 µg/L. Ces points de calibration sont extraits comme des échantillons réels. Chaque séquence inclut la courbe de calibration, un blanc réactif (eau), 2 matériels provenant d'anciens programmes de Contrôles Externes (AMAP

provenant de l'Institut National de Santé Publique du Québec – INSPQ), et 50 à 75 échantillons inconnus.

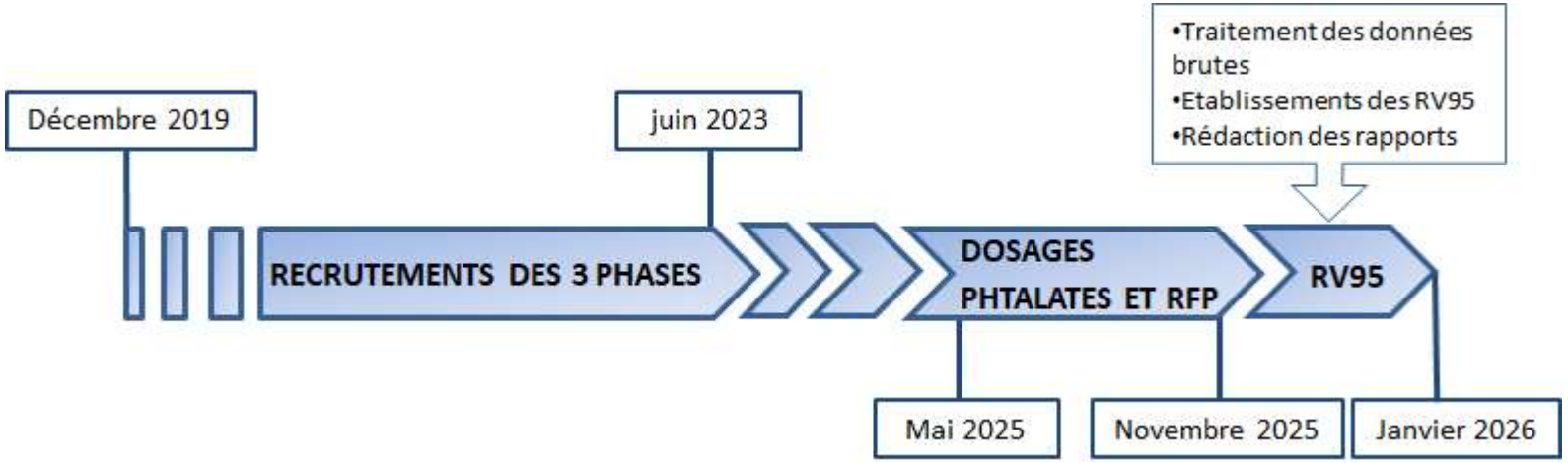
Le BCPHPP est présent dans les solutions standard et dans les échantillons réels sous forme de mélange de diastéréoisomères. L'ensemble des pics du mélange a été intégré pour la quantification.

2.2.4 Limites de quantification

Métabolites	LOQ (µg/L)	LOL (µg/L)
DPP	0.05	25.0
DBP	0.10	25.0
BDCPP	0.10	25.0
BCPHPP	0.10	25.0

3 PLANNING DE LA REALISATION DES MESURES

Les prélèvements de BMHWAL-2 et -3 sont arrivés au laboratoire fin mai 2025, tandis que ceux de BMH-WAL1 ont été transférés fin juin. Les dosages de phtalates ont débutés sur les prélèvements de BMHWAL-3. Ensuite, les phtalates et retardateurs de flamme phosphorés ont été mesurés sur les échantillons de BMHWAL-2, avant de terminer par les dosages de phtalates sur les échantillons de BMHWAL-1.



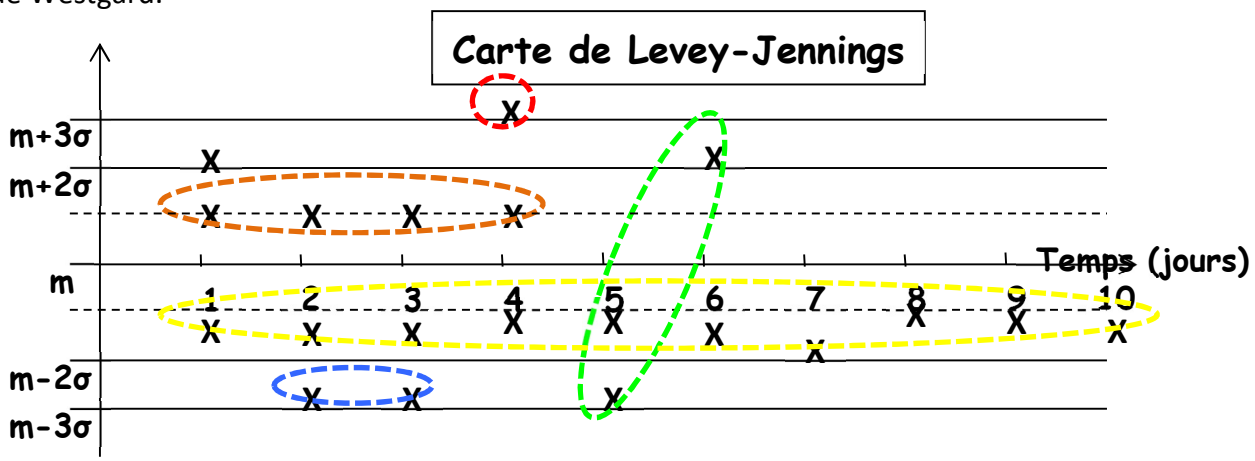
4 RESULTATS DES ANALYSES

Les résultats sont exprimés en µg/L (et µg/ g créatinine en annexe) pour les dosages dans l'urine.

La créatinine urinaire a été mesurée précédemment lors des premiers dosages sur les échantillons, soit sur un ARCHITECT ci 4100 (ABBOTT, Illinois, USA), par test colorimétrique cinétique fondé sur la méthode de Jaffé, soit sur ALINITY-c (ABBOTT) par méthode enzymatique en fonction de la période de recrutement (Jaffé pour les phases 1 et 2, enzymatique pour la phase 3).

Le laboratoire de Toxicologie du CHU Liège est accrédité selon les normes ISO17025 et 15189 par Belac pour plusieurs dosages. Si le laboratoire n'est pas accrédité pour les dosages de phtalates et RFP, 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 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. La droite de calibration suivant le même cheminement que les échantillons 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.

De plus, une séquence est validée si les QCI inclus dans cette séquence respectent les règles de Westgard.



Règles de Westgard :

1_{2s} : la valeur dépasse m ± 2σ → alerte
1_{3s} : la valeur dépasse m ± 3σ → rejet
2_{2s} : 2 QC consécutifs situés à plus de 2 σ du même coté de la moyenne →rejet
R_{4s} : Différence entre la valeur la + élevée et la valeur la + basse dépasse 4 σ → alerte
4_{1s} : 4 QC consécutifs situés à plus de 1 σ du même côté de la moyenne → alerte
10_{m} : 10 QC consécutifs du même côté de la moyenne → alerte

4.1 CONTROLES DE QUALITE INTERNES

Les valeurs des différents contrôles de qualité internes ainsi que les écarts acceptables sont reprises dans le tableau ci-dessous pour chaque marqueur mesuré.

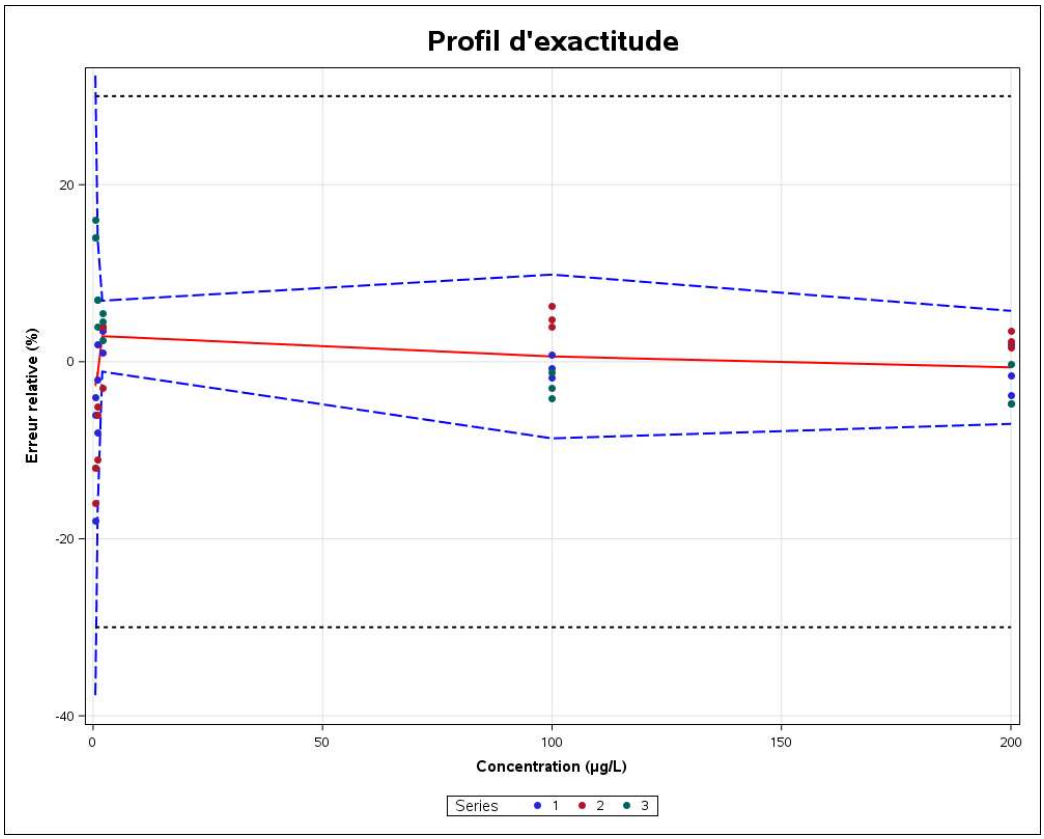
Phtalates (µg/L)												
G EQUAS	73				74				75			
Niveaux	20A		20B		20A		20B		20A		20B	
	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles
MEP	32.64	25.8 - 39.5	132.43	109.6 - 155.3	20.92	16.2 - 25.6	100.92	84.0 - 117.9	10.49	7.76 - 13.2	42.44	34.3 - 50.6
MnBP	3.31	2.20 - 4.42	24.87	18.00 - 31.74	5.55	3.66 - 7.44	16.03	11.5 - 20.6	11.70	8.16 -15.2	27.40	20.5 - 34.3
MiBP	5.01	3.45 - 6.57	64.62	52.20 - 77.04	3.36	2.40 - 4.32	30.32	23.7 - 37.0	10.74	8.22 - 13.3	50.45	42.0 - 58.9
5-oxo-MEHP	1.70	1.25 - 2.15	20.68	16.84 - 24.52	1.79	1.28 - 2.30	12.69	10.1 - 15.2	2.40	1.74 - 3.06	7.81	5.92 - 9.70
5-OH-MEHP	3.60	2.61 - 4.59	40.57	32.17 - 48.97	4.42	3.25 - 5.59	26.91	21.0 - 32.8	5.06	3.71 - 6.41	16.18	13.0 - 19.4
5-cx-MEPP	3.53	2.33 - 4.73	34.41	27.30 - 41.52	3.53	2.60 - 4.46	22.95	18.2 - 27.7	4.10	3.20 - 5.00	11.81	9.41 - 14.2
MEHP	0.60	0.39 - 0.81	3.28	2.41 - 4.15	1.04	0.65 - 1.43	1.98	1.38 - 2.58	0.90	0.60 - 1.20	1.40	0.95 - 1.85
MBzP	1.50	1.05 - 1.95	1.84	1.36 - 2.32	0.69	0.48 - 0.90	3.22	2.47 - 3.97	1.18	0.91 - 1.45	4.59	3.81 - 5.37
HO-MiNP	10.01	6.92 - 13.1	171.93	127.1 - 216.8	2.77	1.96 - 3.58	37.10	27.0 - 47.2	3.43	2.41 - 4.45	51.57	38.0 - 65.2
cx-MiNP	5.14	2.62 - 7.66	57.66	35.70 - 79.62	4.25	2.60 - 5.90	51.22	34.2 - 68.3	2.09	1.34 - 2.84	27.80	18.8 - 36.8
OH-MINCH	3.37	2.11 - 4.63	7.45	5.05 - 9.85	1.95	1.38 - 2.52	7.82	5.84 - 9.80	2.38	1.72 - 3.04	5.45	4.01 - 6.89
oxo-MINCH	1.46	0.95 - 1.97	3.56	2.51 - 4.61	0.87	0.57 - 1.17	4.99	3.58 - 6.40	1.55	1.01 - 2.09	3.88	2.74 - 5.02
cx-MINCH	2.25	1.50 - 3.00	5.38	3.85 - 6.91	1.27	0.82 - 1.72	7.39	5.50 - 9.28	1.69	1.15 - 2.23	3.81	2.85 - 4.77
Retardateurs de flamme phosphorés (µg/L)												
OSEQAS	B2401		B2403		B2405		B2501		B2502		B2504	
	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles	Cibles	Intervalles
DPP	1.60	1.21 - 1.99	3.00	2.28 - 3.72	2.12	1.59 - 2.65	1.80	1.25 - 2.35	2.69	1.99 - 3.39	1.39	0.96 - 1.82
BDCPP	2.18	1.58- 2.78	3.49	2.59 - 4.39	0.96	0.59 - 1.32	2.03	1.47 - 2.59	1.29	0.82 - 1.76	2.47	1.56 - 3.38

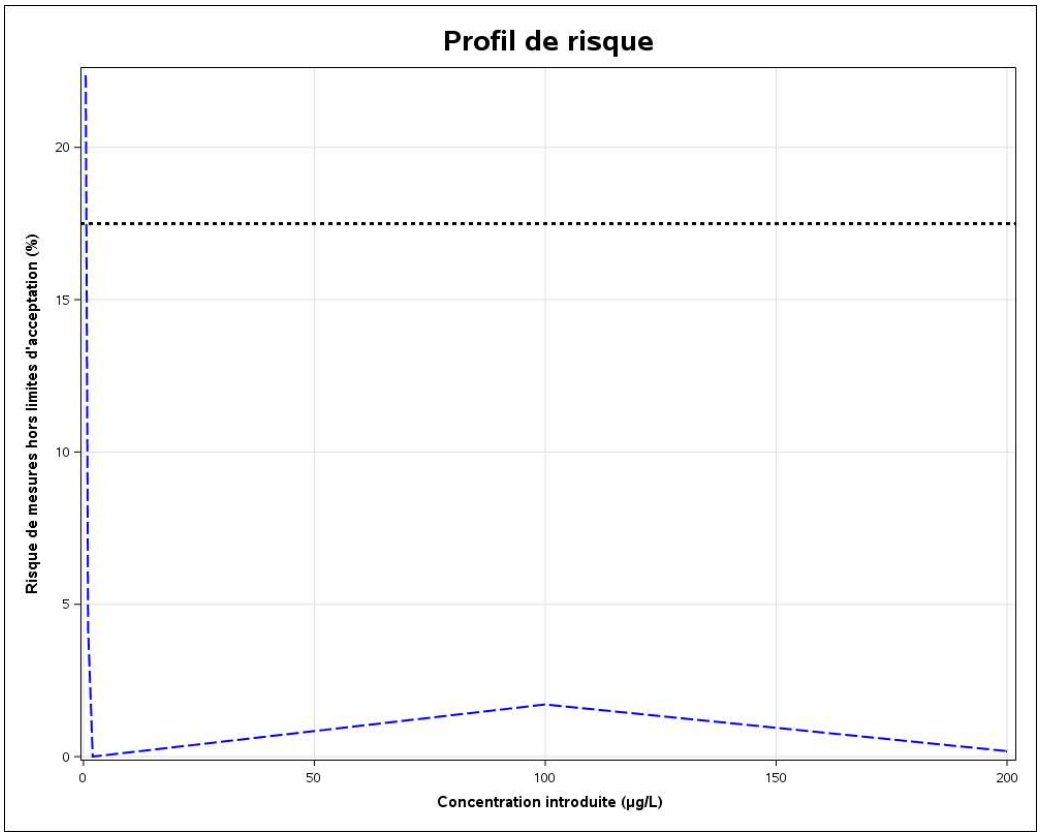
5 CONTROLES DE QUALITE EXTERNE ET CERTIFICATION

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). Une droite de calibration a été réalisée lors de chaque jour de validation.

La justesse est définie comme l'étroitesse d'accord entre la valeur considérée comme vraie et la valeur mesurée. On l'exprime en termes de biais relatif. La fidélité exprime l'étroitesse d'accord 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 ± 30% autour de la valeur moyenne de la mesure. Le profil d'exactitude reporte le biais relatif (en %) en fonction de la concentration (en µg/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 profile d'exactitude, et correspondent à l'intersection entre l'intervalle de tolérance et les limites d'acceptation. Un exemple de profile d'exactitude et de profil de risque sont représentés ci-dessous pour le HO-MINCH. Dans cet exemple, les LOQ inférieure et supérieure sont respectivement égales à 1.00 et 200 µg/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, les CV de la répétabilité intra-jours et de la variabilité inter-jours (fidélité intermédiaire) doivent être inférieurs à 20% aux concentrations proches de la LOQ et 15% dans le reste de l'intervalle de

dosage. L'incertitude de mesure doit être inférieure à 30% dans le domaine de concentrations validé, 40% aux concentrations proches de la LOQ.

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 phtalates** :

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 (BPA)

- **Pour le dosage des retardateurs de flamme phosphorés** :

OSEQAS (External Quality Assessment Scheme for Organic Substances in Urine): 4 échantillons 3x/an pour le DPP et le BDCPP.

Le laboratoire a également passé avec succès les différents rounds du programme QA/QC organisé en 2019-2020 dans le cadre de HBM4EU pour les phtalates. Le certificat se trouve ci-dessous.

Le laboratoire est reconnu comme « qualifié » par la cellule QA/QC du projet PARC (dans la continuité de HBM4EU) pour le MEP, MnBP, MiBP, 5-oxo-MEHP, 5-OH-MEHP, MEHP, MBzP, cx-MiNP, OH-MINCH, et cx-MINCH lors de l'édition de la version 2 de la liste PARC des laboratoires qualifiés (en date du 13/10/2025).



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:

MEP, MBzP, MiBP, MnBP, MCHP, MnPeP, MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP, MnOP, cx-MiNP and OH-MiDP in human urine

RIKILT – Wageningen University & Research

Organiser of the Phthalates exercise

Argelia Castaño
Marta Esteban López

WP9 leaders

Thomas Göen

Task 9.4 leader

On behalf of the
HBM4EU Quality Assurance Unit

REFERENCES

Dewalque, L.; Pirard, C.; Dubois, N.; Charlier, C. Simultaneous determination of some phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in urine by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 949– 950 (2014) 37– 47