

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

QUANTIFICATION DES BIOMARQUEURS D'EXPOSITION AUX ISOCYANATES
DANS L'URINE HUMAINE PAR LC-MS/MS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ(E)
COMME EXIGENCE PARTIELLE
À LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR MAGGY LÉPINE

MARS 2020

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord à mon co-directeur de recherche de l'Université du Québec à Montréal (UQAM), professeur Jacques Lesage, qui m'a permis d'intégrer l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST). Vos conseils et votre encadrement m'ont permis d'avancer dans ce projet. Mes remerciements vont ensuite à mon superviseur de recherche à l'IRSST, M. Sébastien Gagné. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir guidée et encadrée. Tes conseils et ton expertise m'ont grandement aidée durant mes deux années de maîtrise.

Merci à tout le personnel de l'IRSST de m'avoir conseillée et aidée tout au long de ce projet de recherche. Je remercie en particulier Lucile Richard, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à discuter et travailler en laboratoire. Tes conseils, ton support et ton écoute m'ont grandement aidée. Merci également à l'IRSST pour le financement tout au long de ce projet de recherche, qui m'a ainsi permis de me concentrer sur mes études.

Je voudrais remercier ma famille et mes amis qui m'ont encouragée durant mes deux années de recherche. Je voudrais remercier particulièrement mon conjoint, qui m'a encouragée, mais également soutenue dans cet important chapitre de ma vie.

Je voudrais finalement remercier ma directrice de recherche de l'UQAM, professeur Lekha Sleno. Je suis très reconnaissante pour tous vos conseils et votre encadrement. Merci pour votre confiance et votre aide, je suis très heureuse de continuer mes études au doctorat avec vous.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES.....	ix
RÉSUMÉ.....	xi
CHAPITRE I INTRODUCTION.....	1
1.1 Les isocyanates et leurs applications.....	1
1.2 Métabolisme des isocyanates.....	3
1.3 Toxicité des isocyanates.....	6
1.3.1 Effet sur la santé.....	7
1.3.2 Asthme professionnel.....	8
1.3.3 Carcinogénicité.....	9
1.4 Exposition aux isocyanates en milieu de travail.....	10
1.4.1 Surveillance en milieu de travail.....	10
1.4.2 Valeurs règlementaires d'exposition.....	12
1.5 Méthodes analytiques en surveillance biologique.....	15
1.5.1 Méthodes développées.....	16
1.5.2 Limitations des méthodes existantes.....	18
1.6 Développement d'une méthode bioanalytique par UPLC-MS/MS.....	19
1.6.1 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	20
1.6.2 Validation d'une méthode.....	21
1.7 Objectif.....	23
CHAPITRE II ARTICLE SCIENTIFIQUE: A VALIDATED LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD FOR 4,4'-METHYLENEDIANILINE QUANTITATION IN HUMAN URINE AS A MEASURE OF 4,4'-METHYLENE DIPHENYL DIISOCYANATE EXPOSURE.....	25

2.1	Résumé	27
2.2	Abstract	28
2.3	Introduction	29
2.4	Experimental.....	31
	2.4.1 Chemicals.....	31
	2.4.2 Collection of human urine	31
	2.4.3 Creatinine and density levels	32
	2.4.4 Calibration curve solutions	32
	2.4.5 Sample preparation	32
	2.4.6 LC/MS/MS analysis	33
	2.4.7 Data analysis.....	34
	2.4.8 Analytical performance	34
2.5	Results and discussion	34
	2.5.1 Sample preparation	34
	2.5.2 LC/MS/MS method development	38
	2.5.3 Analytical parameter validation	40
2.6	Conclusions	43
2.7	References	43
CHAPITRE III ARTICLE SCIENTIFIQUE: A VALIDATED UPLC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF ALIPHATIC AND AROMATIC ISOCYANATE EXPOSURE IN HUMAN URINE.....		46
3.1	Résumé	48
3.2	Abstract	49
3.3	Introduction	50
3.4	Experimental.....	53
	3.4.1 Chemicals.....	53
	3.4.2 Collection of human urine	53
	3.4.3 Creatinine and density levels	53
	3.4.4 Calibration curve solutions.....	54
	3.4.5 Sample preparation	54
	3.4.6 LC-MS/MS analysis	55
	3.4.7 Data analysis.....	58
	3.4.8 Analytical performance	58
3.5	Results and discussion	59
	3.5.1 Sample preparation	59
	3.5.2 LC-MS/MS method development.....	63
	3.5.3 Analytical parameter validation	64

3.6	Conclusions	69
3.7	References	69
CHAPITRE IV DISCUSSION		73
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		83
BIBLIOGRAPHIE		85

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structures des diisocyanates utilisés dans l'industrie des polyuréthanes .	2
1.2 Schéma métabolique proposé suite à l'absorption des isocyanates	6
1.3 Biomarqueur d'exposition des molécules d'isocyanates	11
1.4 Schéma général d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle ..	20
1.5 Schéma de détection de réaction sélectionné dans un triple quadripôle ..	21
2.1 Structures of MDA, d ₄ -MDA (via d ₈ -MDA), d ₂ -MDA, ¹³ C ¹⁵ N ₂ -MDA and AcMDA	36
2.2 A, For each internal standard studied, the extracted ion chromatogram of the protonated precursor (measured by high-resolution mass spectrometry ±0.01 m/z units) is shown after 0, 6 and 16 h of hydrolysis time. The signal for d ₄ -MDA is seen to decrease substantially upon hydrolysis, whereas the other two IS compounds are stable. B, Mass spectra showing m/z region from d ₀ -MDA to d ₄ -MDA at 0, 6 and 16 h of hydrolysis, showing loss of deuterium labels over time. C, Relative peak areas of d ₀ - to d ₄ -MDA, exhibiting the concerted losses of deuterium labels.....	37
2.3 MDA MRM fragmentation A. MRM chromatograms of blank sample B, lowest standard (5 nM) C, mid-range standard (50 nM) D, and sample 58A from the G-EQUAS program (16.8 nM) E	39
3.1 High-resolution extracted ion chromatogram of derivatized TDA isomers, HDA and MDA (a), and mass spectra of derivatized 2,6-TDA (b), 2,4-	

	TDA (c), HDA (d), and MDA (e) showing the double acetylation product (measured by high-resolution mass spectrometry).....	60
3.2	Hydrolysis profiles of di-acetylated versions of 2,6-TDA (a), 2,4-TDA (b), HDA (c), and MDA (d) metabolites spiked into urine	61
3.3	MS/MS spectra of di-acetylated 2,6-TDA (a) 2,4-TDA (b), HDA (c), and MDA (d) showing the most intensive ion fragmentation choose for MRM transition.....	63
3.4	Representative LC-MRM chromatograms for sample 62B from the G-EQUAS inter-laboratory program	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Valeurs d'exposition réglementaire en milieu de travail lors de la surveillance environnementale des isocyanates dans l'air	14
1.2 Valeurs d'exposition admissible lors de la surveillance biologique des molécules d'isocyanates	14
2.1 Analytical parameters obtained by the method validation	40
2.2 Accuracy (%) and CV (%) values from each standard measured in three different calibration curves	41
2.3 Quantitative results from urine samples provided from the G-EQUAS program (inter-laboratory performance)	42
3.1 Structures of analytes and internal standards with MRM parameters.....	57
3.2 Recovery (%) of solid-phase extraction (SPE)	62
3.3 Analytical parameters obtained by the method validation.....	65
3.4 Accuracy (%) and CV (%) values from calibration curves of each compound.....	66
3.5 Quantitative results from samples provided by the G-EQUAS program	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

$^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2\text{-MDA}$	4,4'-Methylenedianiline- $^{15}\text{N}_2,^{13}\text{C}$
ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
AIHA	American Industrial Hygiene Association
BEI	Biological exposure indices
BGV	Biological guidance value
CE	Collision energy (<i>Énergie de collision</i>)
CID	Collision-induced dissociation (<i>Dissociation induite par collisions</i>)
CV	Coefficient of variation (<i>Coefficient de variation</i>)
d ₂ -MDA	4,4'-Methylene-d ₂ -dianiline
d ₃ -2,4-TDA	2,4-Diaminotoluene- $\alpha,\alpha,\alpha\text{-d}_3$
d ₃ -2,6-TDA	2,6-Diaminotoluene- $\alpha,\alpha,\alpha\text{-d}_3$
d ₄ -HDA	1,6-Diaminohexane-1,1,6,6-d ₄
d ₈ -MDA	4,4'-Methylene-d ₈ -dianiline
ESI	Electrospray ionisation (<i>Ionisation par électronébuliseur</i>)
FLD	Fluorescence detector
GC	Gas chromatography (<i>Chromatographie gazeuse</i>)
G-EQUAS	German External Quality Assessment Scheme
HDA	Hexaméthylènediamine
HDI	Hexaméthylène diisocyanate
HPLC	High-performance liquid chromatography (<i>Chromatographie liquide à haute performance</i>)
HRMS	High-resolution mass spectrometry (<i>Spectrométrie de masse à haute résolution</i>)
IARC	International Agency for Research on Cancer
IRSST	Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail

IS	Internal standard (<i>Standard interne</i>)
LAP	Laboratory Accreditation Programs
LC	Liquid chromatography (<i>Chromatographie liquide</i>)
LDM	Limite de détection moyenne
LLE	Liquid-liquid extraction (<i>Extraction liquide-liquide</i>)
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LQM	Limite de quantification moyenne
m/z	Mass-to-charge (<i>Masse sur charge</i>)
MDA	Méthylènedianiline
MDI	Méthylène diphényle diisocyanate
MRM	Multiple reaction monitoring (<i>Détection de réaction sélectionnée</i>)
MS	Mass spectrometry (<i>Spectrométrie de masse</i>)
MS/MS	Tandem mass spectrometry (<i>Spectrométrie de masse en tandem</i>)
OSH	Occupational safety and health
PU	Polyuréthane
RSST	Règlement sur la santé et sécurité du travail
SPE	Solid-phase extraction (<i>Extraction en phase solide</i>)
TDA	Toluènediamine
TDI	Toluène diisocyanate
TOF	Time of Flight (<i>Temps de vol</i>)
UPLC	Ultra performance liquid chromatography (<i>Chromatographie liquide ultra performante</i>)
VECD	Valeur d'exposition de courte durée
VEMP	Valeur d'exposition moyenne pondérée
VLE	Valeurs limites d'expositions

RÉSUMÉ

Le 4,4'-méthylène diphényle diisocyanate (MDI), le toluène diisocyanate (TDI) et l'hexaméthylène diisocyanate (HDI) sont des molécules hautement réactives utilisées dans la fabrication des polyuréthanes (PUs). Les travailleurs œuvrant dans l'industrie du PU sont alors susceptibles d'être exposés aux isocyanates. Leurs grandes réactivités les rendent très toxiques. Ils sont reconnus comme des puissants irritants et sensibilisants respiratoires dont la manifestation la plus sévère est l'asthme professionnel. Suite à leur absorption dans le corps humain, les isocyanates sont conjugués à des macromolécules et/ou acétylés avant d'être éliminés dans l'urine. Une hydrolyse de l'urine contenant tous les métabolites permet d'obtenir le biomarqueur d'exposition de chacun des isocyanates correspondant respectivement au 4,4'-méthylènedianiline (MDA), toluènediamine (2,4-TDA et 2,6-TDA) et hexaméthylènediamine (HDA). Dans le but d'appliquer la surveillance biologique en milieu de travail, des méthodes d'analyse pour la quantification des biomarqueurs d'exposition des isocyanates ont été optimisées considérant les valeurs recommandées établies. Deux méthodes différentes ont été développées, soit une première pour la quantification du MDA dans l'urine humaine au moyen d'une extraction liquide-liquide et une seconde pour la quantification simultanée du MDA, du HDA et des isomères de TDA au moyen d'une extraction en phase solide. Pour chacune de ces méthodes, la préparation des échantillons à l'analyse sur LC-MS/MS a été optimisée dans le but d'avoir des méthodes simples, rapides et efficaces. La validation des paramètres analytiques a ensuite permis d'obtenir des méthodes robustes et fiables permettant de détecter les molécules en dessous de 5% des valeurs de références recommandées avec une précision en dessous de 8% de variance. Le succès de ces dernières se base sur les résultats de qualités obtenus lors du programme inter-laboratoire. Ces méthodes seront par la suite implantées dans un laboratoire et couplées à la surveillance environnementale dans l'air afin d'évaluer adéquatement l'exposition en milieu de travail aux isocyanates.

Mots clés : Diisocyanates, Hexaméthylènediamine, Méthylènedianiline, Surveillance biologique, Toluènediamine

CHAPITRE I

INTRODUCTION

Les isocyanates sont des molécules largement répandues dans l'industrie des polyuréthanes. L'exposition à différents niveaux de concentration peut engendrer des effets néfastes sur la santé. Une fois absorbés dans le corps humain, les isocyanates sont transformés pour former de nombreux métabolites qui peuvent tous être hydrolysés en un biomarqueur urinaire afin de suivre la dose réelle absorbée. La surveillance biologique permet de connaître l'intensité d'une exposition. Il est alors possible de prévenir les toxicités potentielles liées à une exposition en déterminant les mesures de sécurité appropriées pour protéger les travailleurs. Les méthodes bioanalytiques utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse sont des approches largement utilisées afin de quantifier les biomarqueurs d'exposition aux isocyanates.

1.1 Les isocyanates et leurs applications

Les isocyanates sont une famille de molécule hautement réactive. Ils sont classés en fonction du nombre de groupe fonctionnel isocyanate ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$) composant leur structure. Les isocyanates sont ainsi différenciés selon les trois classes suivantes: monoisocyanate, diisocyanate ou polyisocyanate (Roberge *et al.*, 2013). Les monoisocyanates sont composés d'une seule fonction isocyanate alors que les oligomères ou polyisocyanate sont plutôt composés de trois fonctions isocyanates

ou plus. Les diisocyanates, composés de deux groupes fonctionnels $N=C=O$, sont parmi les isocyanates les plus répandus et les plus réglementés. Les isocyanates sont des molécules très réactives pouvant réagir rapidement avec différentes molécules. Ils peuvent être impliqués dans une réaction de polymérisation avec des groupements composés d'atomes d'hydrogène mobile, tel que les alcools, afin de former de l'uréthane. Ce procédé de formation de l'uréthane est largement répandu dans l'industrie du polyuréthane (PU) afin de former des polymères d'uréthanes (Cocker, 2007). Ces polymères d'uréthane sont quant à eux ensuite utilisés dans la production d'une large gamme de produits ayant des propriétés et des utilisations bien différentes les unes des autres. Les isomères de toluène diisocyanate (2,6-TDI et 2,4-TDI), le 4,4'-méthylène diphényle diisocyanate (MDI) et l'hexaméthylène diisocyanate (HDI) sont les diisocyanates parmi les plus utilisés dans cette industrie (Figure 1.1).

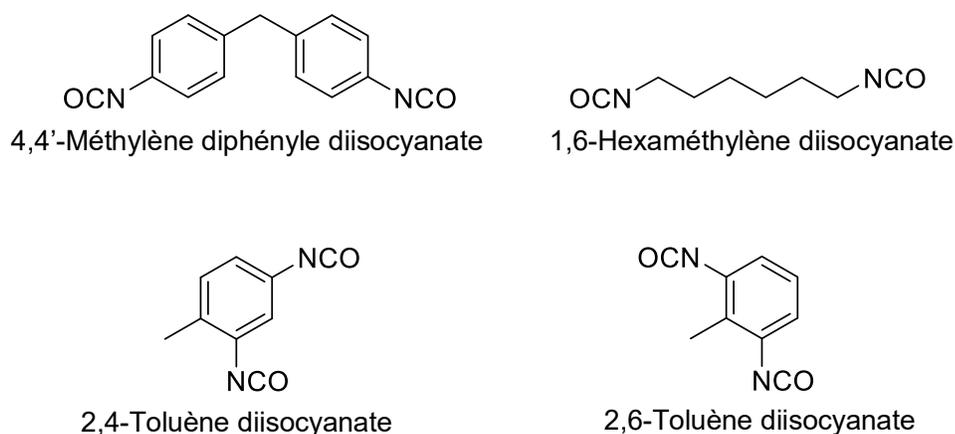


Figure 1.1 Structures des diisocyanates utilisés dans l'industrie des polyuréthanes

Bien que ces molécules soient toutes classées comme des diisocyanates, elles possèdent des propriétés physico-chimiques différentes des unes des autres. C'est pourquoi les isocyanates possèdent des applications diverses dans la fabrication des produits à base de polyuréthane. En effet, le HDI est un isocyanate de type

aliphatique retrouvé essentiellement dans la fabrication des peintures en aérosol (Brorson *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 2013; Skarping *et al.*, 1994b). Le MDI et les isomères de TDI sont quant à eux des isocyanates de type aromatique. Les isomères de TDI sont retrouvés dans la synthèse des mousses flexibles (coussin et matelas) alors que le MDI est plutôt retrouvé dans la fabrication des mousses isolantes, des colles et des adhésifs (Bhandari *et al.*, 2016; Cocker, 2007; Lind *et al.*, 1997). Il est alors possible de retrouver ces molécules d'isocyanates dans différentes industries, dont celle de la construction (isolation à base d'uréthane) et de l'automobile (Creely *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2017). Il est également possible de retrouver les isocyanates sous forme d'oligomères. Le prépolymère de MDI (pMDI) ainsi que l'oligomère de HDI sont également retrouvés dans la composition des différents produits de polyuréthane. Les travailleurs œuvrant avec ces produits sont alors susceptibles d'être exposés à de fortes concentrations en isocyanates sous forme de monomère et d'oligomère (Bello *et al.*, 2019; Rosenberg et Savolainen, 1986).

1.2 Métabolisme des isocyanates

Afin de bien comprendre le métabolisme des isocyanates, il est tout d'abord essentiel de comprendre les différentes réactions engendrées dans le corps humain suite à l'introduction d'une molécule étrangère dans l'organisme. Ainsi, lorsqu'une molécule toxique est absorbée dans le corps humain, le foie peut effectuer une série de biotransformations afin d'obtenir une molécule idéalement non toxique et inactive. Ce processus de biotransformation a pour but de favoriser l'élimination de ces molécules toxiques en les rendant plus hydrophiles (Caira et Ionescu, 2006).

Les transformations métaboliques sont généralement classées sous deux catégories, soit la phase I et la phase II. La phase I regroupe des réactions d'hydrolyse, d'oxydation ou de réduction (Lee et Zhu, 2011). Dans certains cas, ces

métabolites intermédiaires formés peuvent également subir des biotransformations de phase II. Cette dernière regroupe plutôt des réactions de conjugaison comprenant l'ajout de groupements polaires tel que des groupements glucuronidés, sulfatés et acétylés, ainsi que l'ajout d'une molécule de glutathion (Lee et Zhu, 2011). Bien que les mécanismes de biotransformation aient pour but d'éliminer les molécules toxiques de l'organisme, des métabolites intermédiaires réactifs peuvent être formés. Ces métabolites toxiques peuvent alors se lier à des protéines provoquant de la cytotoxicité ou bien se lier à l'ADN et être génotoxiques (Sabbioni *et al.*, 2010).

Les isocyanates sont des molécules toxiques pouvant être absorbées dans l'organisme au moyen de trois différentes voies d'absorption, soit par inhalation, par contact cutané ou par ingestion. L'exposition aux isocyanates en milieu de travail est essentiellement provoquée par les vapeurs et les aérosols engendrés lors de l'utilisation des produits de polyuréthane. Ainsi, les voies prédominantes les plus susceptibles d'induire une absorption chez un travailleur à la suite d'une exposition sont les voies respiratoires et cutanées (Sabbioni *et al.*, 2010).

Les isocyanates sont des molécules très réactives se métabolisant rapidement suite à leur absorption. Ils sont transformés dans l'organisme afin de former de nombreux dérivés pouvant engendrer des effets cytotoxiques et génotoxiques. L'absorption se fait tout d'abord par la circulation sanguine. Une réaction d'hydrolyse peut engendrer la transformation des isocyanates *in vivo* sous leur forme d'amine libre correspondant aux diamines (DFG, 2015). Différents adduits peuvent également se former dans le plasma incluant des adduits avec l'hémoglobine ainsi que l'albumine. Les adduits à l'albumine sont directement formés à partir des molécules d'isocyanates retrouvées dans le plasma. Les adduits d'hémoglobine sont quant à eux formés suite à une réaction intermédiaire d'oxydation de la forme diamine des isocyanates. (European Commission, 2005; Sennbro *et al.*, 2006; Sepai *et al.*, 1995) De plus, les isocyanates et les métabolites réactifs peuvent former des adduits avec l'ADN (Bolognesi *et al.*, 2001; Sabbioni *et al.*, 2010).

Les isocyanates et leurs formes diamines peuvent également être métabolisés sous forme de conjugués à des macromolécules telles que des glycoprotéines, des protéines et du glutathion (Sepai *et al.*, 1995). Comme les isocyanates réagissent rapidement une fois absorbés dans l'organisme, la réaction de conjugaison avec le groupement thiol du glutathion serait une phase de biotransformation prédominante permettant ainsi la formation d'isocyanates doublement conjugués au glutathion (adduits-bis-GS) (Pauluhn *et al.*, 2006; Reisser *et al.*, 2002). La formation d'intermédiaires mono- et diacétylé est également possible avec les formes diamines des isocyanates (Bolognesi *et al.*, 2001; Gledhill *et al.*, 2005; Sepai *et al.*, 1995). Les métabolites conjugués de faible poids moléculaire ainsi que ceux ayant été acétylés sont finalement éliminés dans l'urine (Bhandari *et al.*, 2016; Sennbro *et al.*, 2006).

Il est à considérer que peu d'information relative au métabolisme des isocyanates chez l'être humain n'est présentement disponible. Les recherches effectuées au cours des dernières années représentent essentiellement des études du métabolisme suite à l'absorption de ces molécules toxiques chez le rat. Néanmoins, les informations recueillies de ces différentes études permettent d'établir la voie métabolique possible chez l'être humain. La Figure 1.2 propose un schéma métabolique suite à l'absorption du MDI, TDI et HDI. Cette figure illustre de façon générale les différents métabolites décrits ci-haut qui seraient retrouvés dans l'organisme suite à une exposition aux isocyanates.

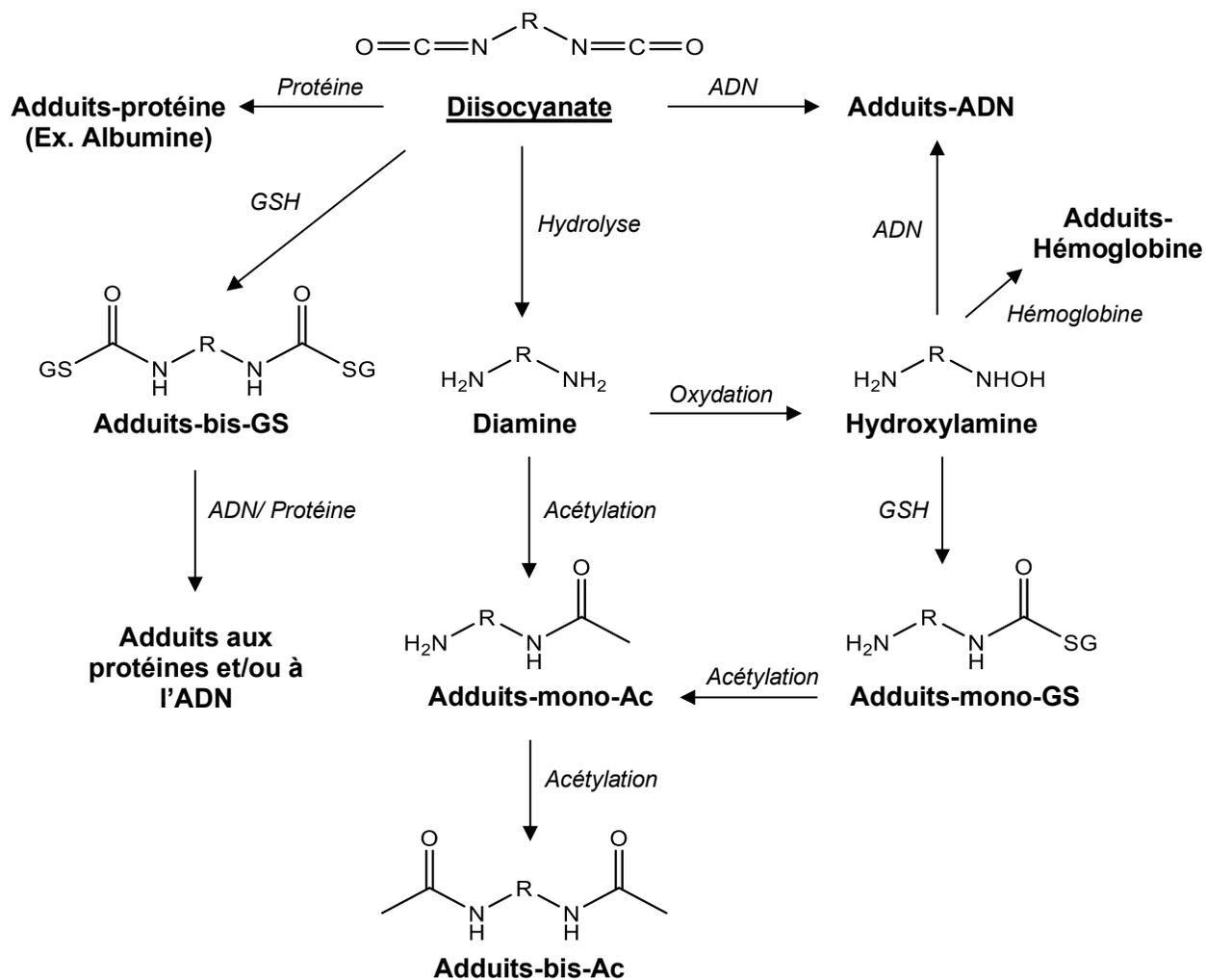


Figure 1.2 Schéma métabolique proposé suite à l'absorption des isocyanates

1.3 Toxicité des isocyanates

Les isocyanates sont des molécules hautement toxiques pouvant induire différents effets aigus et chroniques chez une personne exposée à différentes concentrations en isocyanates. Les dommages engendrés par ces molécules peuvent être

irréversibles et par le fait même provoquer de graves dommages et conséquences sur la santé et la qualité de vie d'un travailleur exposé.

1.3.1 Effet sur la santé

Les isocyanates sont considérés comme des molécules très toxiques dues à leurs grandes réactivités. Ils sont reconnus pour être des puissants irritants des muqueuses des voies respiratoires, de la peau, des yeux ainsi que de la voie gastro-intestinale. Les isocyanates sont également de puissants sensibilisants respiratoires et cutanés (Cocker, 2007). Différents effets néfastes sur la santé peuvent être causés suite à une exposition de ces molécules. Ces effets incluent des maladies inflammatoires bénignes de la peau et des voies respiratoires tels que les dermatites et les rhinites (Jones *et al.*, 2017; Rosenberg *et al.*, 2002) de même que des conjonctivites lors d'irritation oculaire. Des brûlures et des rougeurs au niveau de la peau sont également observées suite à une irritation cutanée (Reh et Weber, 2004; Roberge *et al.*, 2013).

Une exposition à de très fortes concentrations en isocyanates peut provoquer le syndrome d'irritation bronchique aiguë (Reactive Airway Dysfunction Syndrome (RADS)) qui se reflète par une brûlure au niveau des bronches. La pneumonite est également un effet engendré par une exposition aiguë aux isocyanates. Elle se manifeste par une inflammation des alvéoles qui peut dans certains cas s'aggraver et mener à un œdème pulmonaire combiné à une détresse respiratoire (Roberge *et al.*, 2013). Des impacts graves sur la santé peuvent également être causés par l'exposition chronique aux isocyanates. La pneumopathie d'hypersensibilité est une maladie engendrée par une inflammation des bronchioles terminales et des alvéoles (Bhandari *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2002). Elle est fréquemment diagnostiquée suite à l'inhalation chronique et aiguë des isocyanates (Bello *et al.*, 2007). Un déclin de la fonction pulmonaire (Cocker, 2007) ainsi que l'asthme professionnel peuvent également être engendrés (Cocker, 2011; Labrecque *et al.*, 2011). Néanmoins,

parmi les multiples effets produits suite à l'exposition au isocyanates, l'asthme professionnel correspond au syndrome le plus préoccupant.

1.3.2 Asthme professionnel

L'exposition aux isocyanates est la cause la plus fréquente du développement de la maladie de l'asthme professionnel (Cocker, 2011; Jones *et al.*, 2017; Marand *et al.*, 2004). Cette maladie est largement diagnostiquée chez les travailleurs œuvrant dans l'industrie du PU. Les isocyanates sont en effet classés, selon plusieurs institutions gouvernementales, comme étant un des agents sensibilisants les plus communs pouvant provoquer l'asthme professionnel (Cocker, 2011; Kreis *et al.*, 2019; Meredith *et al.*, 2000). Au Québec, environ 25% des cas d'asthme professionnel seraient engendrés suite à l'exposition de ces molécules (Roberge *et al.*, 2013).

L'asthme professionnel est une maladie causée par une inflammation des bronches. Le travailleur ne développe pas la maladie suite à une seule exposition, elle est habituellement induite par une exposition chronique à l'agent sensibilisant. En effet, le type d'asthme provoqué par les isocyanates induit généralement une période de latence avant une sensibilisation allergique au niveau des voies respiratoires. Un travailleur peut alors être exposé pendant plusieurs mois et années avant d'avoir des symptômes. Cette période de latence est ainsi considérée comme asymptomatique. Les symptômes se manifestent ensuite essentiellement par de la toux, une respiration sifflante et des irritations des yeux, du nez et de la gorge. Le travailleur alors sensibilisé développe la maladie qui est à ce point-ci considérée comme irréversible (Roberge *et al.*, 2013).

Un travailleur atteint d'asthme professionnel doit éviter d'être exposé de nouveau à l'agent sensibilisant. Plus il sera exposé à cet agent et plus les symptômes seront sévères et incommodants. En outre, l'exposition respiratoire à une faible concentration, même en dessous des valeurs d'exposition d'admissible en isocyanate, peut provoquer de graves crises d'asthme (CNESST, 2016). Par ailleurs,

il a été rapporté que certains travailleurs sensibilisés seraient morts suite à une sévère crise d'asthme (NIOSH, 1978; Roberge *et al.*, 2013).

Les répercussions engendrées par une exposition aux isocyanates sont importantes. En plus d'apporter de graves effets sur la santé provoquant des dommages importants aux poumons, l'asthme professionnel peut engendrer plusieurs inconvénients au travailleur. Ces inconvénients pouvant découler en une perte d'emploi et de salaire (Meredith *et al.*, 2000) peuvent également mener à une réduction de la qualité de vie. Un travailleur sensibilisé peut présenter des symptômes de la maladie toute sa vie même s'il n'est plus exposé aux isocyanates. Le diagnostic précoce de l'asthme professionnel est donc essentiel afin d'éviter tous les effets néfastes et ainsi protéger les travailleurs exposés à ces molécules (Roberge *et al.*, 2013).

1.3.3 Carcinogénicité

Bien que les isocyanates soient hautement néfastes pour la santé, l'agence internationale de la recherche sur le cancer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) ne les classe pas comme étant cancérigène pour l'homme. En effet, selon l'IARC le MDI est classé de groupe 3, soit inclassable chez l'être humain alors que le TDI est plutôt classé selon le groupe 2B, soit possiblement cancérigène chez l'être humain. Le HDI quant à lui ne contient aucune donnée concernant sa cancérigénicité (International Agency for Research on Cancer (IARC), 1979). Le toluène diisocyanate serait donc potentiellement carcinogène chez l'homme. Néanmoins, L'ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) ne classe aucun isocyanate comme étant cancérigène chez l'humain et classe plutôt le TDI dans le groupe A3, soit comme étant un cancérigène confirmé chez l'animal, mais de pertinence inconnue pour l'humain (ACGIH, 2017). Selon les recherches effectuées par ces institutions reconnues, le méthylène diphenyle diisocyanate et l'hexaméthylène diisocyanate ne seraient pas considérés actuellement comme étant des agents cancérigènes.

1.4 Exposition aux isocyanates en milieu de travail

Les isocyanates peuvent engendrer différents effets néfastes pour la santé de la personne exposée. Les personnes susceptibles d'être surexposées à ces molécules sont principalement les travailleurs œuvrant dans l'industrie ou avec des produits de polyuréthane. Il est alors essentiel de surveiller l'exposition professionnelle. C'est pourquoi diverses stratégies de préventions et de sécurités sont établies par les entreprises et les industries afin d'évaluer l'exposition aux isocyanates dans le but de limiter les impacts sur la santé et ainsi protéger adéquatement les travailleurs.

1.4.1 Surveillance en milieu de travail

Différentes approches expérimentales ont été élaborées au cours des dernières années afin d'évaluer l'exposition des travailleurs à des molécules toxiques telles que les isocyanates. Jusqu'à aujourd'hui, la méthode la plus utilisée permettant d'effectuer une évaluation de l'exposition en milieu de travail est la surveillance environnementale dans l'air (Tinnerberg et Mattsson, 2008). Cette approche permet de quantifier les isocyanates qui se retrouvent dans l'air au moyen de techniques d'échantillonnage développées précisément pour le prélèvement de ces molécules. L'institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST) mène depuis plusieurs années des recherches avancées afin d'élaborer des méthodes pour le dosage des différents isocyanates dans l'air. Grâce à ces recherches, l'IRSST est devenu une référence internationale pour l'évaluation des isocyanates en milieu de travail. Bien que ces méthodes soient hautement efficaces pour l'évaluation environnementale dans l'air, cette approche ne permet pas d'évaluer la dose totale absorbée par un travailleur suite à une exposition selon toutes les voies d'expositions (cutanée et digestive).

La surveillance biologique est une méthode développée depuis peu afin d'évaluer l'exposition via toutes les routes possibles d'absorption dans le corps humain (Cocker, 2007; Pauluhn *et al.*, 2006). Cette approche permet d'évaluer la contribution de l'absorption cutanée et respiratoire des isocyanates lors d'une

exposition. En effet, comme ces deux voies correspondent aux voies prédominantes d'absorption (Sabbioni *et al.*, 2010), il est essentiel de quantifier la dose totale absorbée par ces dernières. La surveillance biologique en milieu de travail permet également de déterminer l'efficacité des équipements de protection individuelle portée par les travailleurs en plus d'évaluer l'effet de l'augmentation de la charge de travail suite à des heures supplémentaires d'exposition ou une augmentation de l'intensité de la tâche de travail. Cette approche est basée sur la quantification de biomarqueur permettant une évaluation adéquate de l'exposition aux isocyanates. Le biomarqueur d'exposition du MDI, HDI et des isomères de TDI (2,4-TDI et 2,6-TDI) est respectivement le 4,4'-méthylènedianiline (MDA), l'hexaméthylènediamine (HDA) et le toluènediamine (2,4-TDA et 2,6-TDA) (Figure 1.3). Ces derniers correspondent à la forme d'amine libre de chacun des isocyanates (Cocker, 2007). Ils sont obtenus par l'hydrolyse de tous les métabolites éliminés dans l'urine ou par l'hydrolyse des adduits de protéines provenant du plasma (Pauluhn *et al.*, 2006; Sennbro *et al.*, 2006; Sepai *et al.*, 1995). L'étape d'hydrolyse est essentielle afin de cliver la liaison entre les isocyanates et les différentes molécules biologiques ou groupements ajoutés lors des réactions produites suite à l'absorption dans le corps humain.

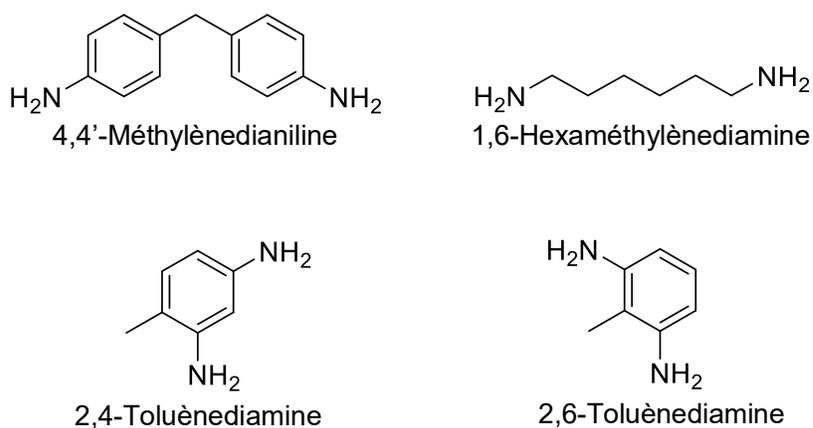


Figure 1.3 Biomarqueur d'exposition des molécules d'isocyanates

Bien que la surveillance environnementale dans l'air ne permette pas de quantifier les doses totales absorbées dans l'organisme, elle permet tout de même d'évaluer plusieurs aspects de l'exposition qui précèdent l'absorption. En effet, elle a pour avantage d'évaluer les différentes concentrations faibles ou élevées se retrouvant dans l'air pouvant être produites lors des différentes opérations (Tinnerberg *et al.*, 1997). Cette approche permet également d'évaluer l'exposition à un effet local, tel qu'une brûlure, pour lequel il n'y aura pas nécessairement une absorption dans le corps humain. La surveillance environnementale dans l'air permet aussi de déterminer l'exposition lors des modifications dans un milieu de travail ainsi que lors des modifications des réactions métaboliques, soit une interaction induisant une inhibition ou induction des réactions pouvant influencer la biotransformation des métabolites. Ainsi, la combinaison de la surveillance environnementale dans l'air avec la surveillance biologique est donc essentielle afin d'obtenir une évaluation adéquate de l'exposition aux isocyanates en milieu de travail (Roberge *et al.*, 2013). Ces méthodes combinées permettent d'évaluer tous les aspects de l'exposition aux molécules d'isocyanates et ainsi d'assurer la sécurité des travailleurs.

1.4.2 Valeurs règlementaires d'exposition

Les valeurs règlementaires d'expositions sont établies afin d'évaluer la conformité de l'exposition à des molécules toxiques en milieu de travail. Ces valeurs sont adoptées et prescrites selon la législation sur la santé et la sécurité par des institutions reconnues internationalement. Il existe plusieurs limites de référence établies pour la surveillance environnementale dans l'air ainsi que des limites recommandées pour la surveillance biologique.

Les valeurs limites d'expositions (VLE) sont des valeurs règlementaires utilisées en milieu de travail afin de déterminer adéquatement le risque associé à l'exposition aux isocyanates dans l'air. La valeur limite d'exposition se définit comme la valeur de concentration maximale d'une substance toxique retrouvée dans l'air pour laquelle un travailleur peut être exposé sans subir des conséquences néfastes sur la santé.

Au Québec, les normes d'exposition sont émises par le règlement sur la santé et sécurité du travail (RSST) (Éditeur officiel du Québec, 2019).

Il existe plusieurs types de valeurs limites disponibles afin d'évaluer l'exposition à une molécule toxique selon différents critères d'exposition. Parmi les diverses VLE, il est possible de retrouver la valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP), la valeur d'exposition de courte durée (VECD) ainsi que la valeur plafond. Il est à noter que malgré l'exposition des travailleurs aux monomères et aux oligomères d'isocyanates, les normes d'expositions sont proposées uniquement pour les monomères d'isocyanates. Toutefois, au Québec, l'article 42 sur la qualité de l'air du RSST impose une réduction au minimum de l'exposition aux diisocyanates ou aux oligomères d'isocyanates (Éditeur officiel du Québec, 2019). Ainsi même si aucune valeur n'est proposée pour les oligomères, l'article 42 apporte une protection en imposant une exposition minimale à ces molécules.

La valeur d'exposition moyenne pondérée correspond à la valeur moyenne d'exposition à une molécule toxique dans l'air pour un quart de travail de huit heures pour une semaine de 40 heures de travail. Le RSST fixe la VEMP à 0.051 mg/m^3 pour le MDI, 0.036 mg/m^3 pour les isomères de TDI et 0.034 mg/m^3 pour le HDI (Éditeur officiel du Québec, 2019). La valeur d'exposition de courte durée représente plutôt la valeur d'exposition de courte durée pour une molécule toxique retrouvée dans l'air. Cette valeur est pondérée sur 15 minutes pour une journée de travail de huit heures, soit un quart de travail régulier. Aucune valeur n'est fixée pour les diisocyanates selon le RSST. Enfin, la valeur plafond indique quant à elle la valeur d'exposition qui ne doit jamais être dépassée à n'importe quel moment de la journée de travail. Elle est également considérée comme une valeur d'exposition de courte durée. Le RSST propose une valeur plafond uniquement pour les isomères de TDI à 0.14 mg/m^3 (Éditeur officiel du Québec, 2019). Le Tableau 1.1 regroupe ces différentes valeurs limites d'expositions disponibles pour le MDI, les isomères de TDI et le HDI émises par le règlement sur la santé et sécurité du travail.

Tableau 1.1 Valeurs d'exposition réglementaire en milieu de travail lors de la surveillance environnementale des isocyanates dans l'air

Valeurs d'exposition	MDI	TDI (Isomère)	HDI
VEMP	0.051 mg/m ³	0.036 mg/m ³	0.034 mg/m ³
VECD	-	-	-
Valeur plafond	-	0.14 mg/m ³	-

Des limites d'exposition recommandées sont également proposées lors de la surveillance biologique. Ces valeurs sont établies afin d'évaluer les biomarqueurs d'exposition des isocyanates dans l'urine après un quart de travail de huit heures. Elles représentent des niveaux de concentration pour lesquels un travailleur peut être exposé à répétition sans avoir des effets néfastes sur la santé (ACGIH, 2017). Le Tableau 1.2 résume les valeurs d'exposition admissibles lors de la surveillance biologique des molécules de diisocyanates étudiées. Ces valeurs sont émises par deux institutions internationales reconnues, soit la fondation allemande pour la recherche (DFG) et l'ACGIH (ACGIH, 2017; DFG, 2016).

Tableau 1.2 Valeurs recommandées lors de la surveillance biologique des molécules d'isocyanates

Valeurs d'exposition	MDI	TDI (Isomères)	HDI
BGV	10 µg/mL	-	-
BEI	-	5 µg/g créatinine	15 µg/g créatinine

La fondation allemande pour la recherche propose la *biological guidance value* (BGV) afin d'évaluer l'exposition au MDI. La BGV est une valeur établie pour les molécules carcinogènes, les allergènes, les agents sensibilisants ou bien les substances pour lesquelles des informations toxicologiques sont limitées (DFG, 2016). Cette valeur est fixée à 10 µg/L (~50 nM) pour le MDA hydrolysé retrouvé dans l'urine, correspondant ainsi au biomarqueur d'exposition du MDI (DFG, 2016). Le HDI et les isomères de TDI sont quant à eux plutôt régis par la *biological exposure indices* (BEI) proposée par l'ACGIH. La BEI est une valeur proposée représentant les niveaux de concentration les plus susceptibles d'être observés dans un échantillon de travailleur en bonne santé, mais exposé à une concentration équivalente au *Threshold Limit Value* (TLV). Ces valeurs sont établies à 5 µg/g créatinine (~20–125 nM) pour les isomères de TDA (2,4-TDA et 2,6-TDA) et à 15 µg/g créatinines (~60–400 nM) pour la HDA (ACGIH, 2017). Ces biomarqueurs d'exposition correspondant respectivement à ceux des isomères de TDI (2,4-TDI et 2,6-TDI) et du HDI retrouvés dans l'urine hydrolysée.

1.5 Méthodes analytiques en surveillance biologique

La surveillance biologique combinée à la surveillance environnementale dans l'air sont des approches essentielles afin d'évaluer adéquatement l'exposition aux molécules d'isocyanates en milieu de travail. Depuis plusieurs années, des travaux de recherche menés par l'IRSST ont permis d'établir des méthodes d'analyses efficaces pour l'évaluation des isocyanates dans l'air. Néanmoins, la surveillance biologique est plutôt une approche récente toujours en développement au Québec, c'est pourquoi aucune méthode n'est présentement disponible pour évaluer les travailleurs. Au cours des 30 dernières années, quelques méthodes ont été développées dans la littérature afin de quantifier les biomarqueurs d'exposition des isocyanates dans l'urine dans le but d'effectuer une surveillance biologique efficace de ces molécules. Ces différentes méthodes impliquent des stratégies de

préparations d'échantillons, mais également des stratégies d'analyses de ces échantillons différentes afin d'évaluer la dose réelle absorbée suite à une exposition en milieu de travail. Toutefois, ces dernières possèdent certaines limitations nécessitant des ajustements afin qu'elles soient implantées au Québec.

1.5.1 Méthodes développées

Au cours des dernières années, différents groupes de recherche se sont concentrés sur le développement de méthodes permettant la surveillance biologique des isocyanates en milieux de travail. En 1986, le *Health and Safety Laboratory* (HSL), fut un des premiers à publier une méthode afin d'évaluer l'exposition aux isocyanates au moyen des biomarqueurs d'exposition retrouvés dans l'urine (Cocker, 1986). L'HSL est une institution reconnue dans le domaine de la santé et la sécurité au travail au Royaume-Uni. Cocker *et al* développa une méthode d'analyse du MDA dans l'urine par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (*gas chromatography-mass spectrometry*, GC-MS) avec une source d'ionisation NCI (*Negative chemical ionization*) afin d'évaluer l'exposition au MDI en milieu de travail (Cocker, 1986). Cette méthode implique une hydrolyse basique de 60 minutes des métabolites retrouvés dans l'urine afin d'obtenir le biomarqueur d'exposition, le MDA. L'hydrolyse est suivie d'une extraction liquide-liquide par diéthyl d'éther afin d'extraire le biomarqueur avant de subir, finalement, une étape de dérivation. Cette dernière étape est nécessaire afin que le MDA soit analysé par GC-MS.

Skarping *et al.* développa ensuite une méthode utilisant plutôt la chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (*high performance liquid chromatography-mass spectrometry*, HPLC-MS) afin d'analyser le MDA dans l'urine humaine (Skarping *et al.*, 1994a). Quelques années plus tard, cette même méthode fut également utilisée pour la surveillance biologique de plusieurs diisocyanates incluant les isomères de TDI, le MDI et le HDI dans une même analyse (Marand *et al.*, 2004). Cette dernière est basée sur une hydrolyse acide des

métabolites retrouvés dans un échantillon d'urine afin d'obtenir le biomarqueur d'exposition correspondant à l'isocyanate d'intérêt. Ces derniers sont ensuite extraits au moyen d'une extraction liquide-liquide avec du toluène suivi d'une dérivation nécessitant également une étape d'extraction afin de retirer l'excès de réactif. De prime abord, cette méthode fut développée pour l'évaluation de l'exposition au MDI. Un temps d'hydrolyse de 16 heures avait été fixé afin d'analyser le MDA dans les urines.

En 2002, Sakai *et al.* développa plutôt une méthode afin d'évaluer les isomères de TDA dans l'urine de travailleur sans l'utilisation de la dérivation (Sakai *et al.*, 2002). La méthode optimisée implique une hydrolyse acide de 90 minutes pour obtenir les biomarqueurs suivis d'une extraction liquide-liquide au moyen du dichlorométhane. Les échantillons sont directement analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (*liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS).

Plus récemment le *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), publia deux nouvelles méthodes afin de quantifier l'exposition des isocyanates dans la population en général. Une première méthode a été développée afin d'analyser les diisocyanates aromatiques (Bhandari *et al.*, 2016) et une seconde afin d'évaluer les diisocyanates plutôt de type aliphatiques (Bhandari *et al.*, 2018). Ces deux méthodes se basent sur une extraction en phase solide (*Solid-Phase Extraction*, SPE) des biomarqueurs hydrolysés dans l'urine. Les deux méthodes nécessitent une hydrolyse acide de 4 heures des échantillons d'urine afin d'obtenir les différents biomarqueurs d'expositions. Les échantillons sont ensuite analysés directement sur chromatographie liquide ultra performante couplée à la spectrométrie de masse (*ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry*, UPLC-MS). Ces méthodes développées et optimisées ont également été validées afin d'établir les différents critères analytiques.

Finalement, en 2019, Sun *et al.* développa une méthode d'analyse des biomarqueurs d'exposition du MDI et des isomères de TDI par chromatographie

liquide couplée à la détection par fluorescence (*liquid chromatography fluorescence detector*, LC-FLD) (Sun *et al.*, 2019). Leur méthode utilise la même préparation d'échantillon que la méthode publiée par Bhandari *et al.* en 2016. Toutefois, la méthode développée par Sun *et al.* nécessite une dérivation avec un chromophore fluorescent afin que les biomarqueurs soient analysés par le détecteur à fluorescence. Les différents critères analytiques de la méthode ont également été validés selon l'*International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH).

1.5.2 Limitations des méthodes existantes

Les différentes méthodes décrites ci-haut proposent des stratégies différentes afin d'évaluer les biomarqueurs d'exposition aux isocyanates dans l'urine humaine. La préparation des échantillons allant de l'obtention des biomarqueurs d'exposition à l'extraction puis l'analyse peut ainsi varier d'une méthode à une autre. Ces méthodes, parfois développées depuis quelques années, comportent néanmoins des aspects ou des limitations nécessitant une optimisation de la méthode.

Le temps d'hydrolyse des échantillons d'urine est une étape essentielle afin d'obtenir tous les métabolites retrouvés suite à une exposition aux isocyanates sous leurs formes de diamine correspondants au biomarqueur. Selon les différentes méthodes publiées, le temps d'hydrolyse peut varier et être relativement court, soit 1 heure, ou être plutôt une longue période d'hydrolyse de 16 heures. Une grande partie des méthodes publiées comportent également une étape de dérivation des molécules afin que les biomarqueurs soient analysés par GC-MS, HPLC-MS ou LC-FLD. Ces étapes de dérivation nécessitent soit une longue étape de chauffage (Cocker, 1986), une étape d'extraction supplémentaire afin de retirer l'excédent de réactif (Marand *et al.*, 2004; Skarping *et al.*, 1994a) ou être plus complexe nécessitant une série de plusieurs étapes de manipulation afin que les composés soient dérivés adéquatement pour l'analyse (Sun *et al.*, 2019).

Les méthodes existantes ne sont pas développées en considérant les limites d'expositions recommandées en milieu de travail pour les différentes molécules d'isocyanates, soit la BGV ou l'BEI. De plus, certaines de ces méthodes proposent des concentrations pour les courbes de calibration ne couvrant pas une gamme permettant l'évaluation de ces valeurs recommandées. Ces valeurs établies par des institutions reconnues internationalement sont essentielles afin d'évaluer le risque associé à une exposition aux isocyanates en milieu de travail.

De plus, parmi les différentes méthodes développées, seulement les méthodes provenant des groupes de Bhandari et al. ainsi que Sun et al. possèdent des données de validation de méthodes complètes. Quant aux autres méthodes publiées, elles ne mentionnent que certains critères de validation d'une méthode soit la limite de détection (LDM), la limite de quantification (LQM) ou la précision. La validation d'une méthode est un aspect essentiel permettant de confirmer la bonne reproductibilité, la sensibilité et la précision d'une méthode analytique. Elle permet de démontrer les performances et les limitations analytiques d'une méthode.

Finalement, aucune des méthodes publiées n'utilise un programme inter-laboratoire afin de vérifier l'efficacité et l'exactitude de la méthode. Ce test est primordial, il représente une référence permettant d'évaluer la méthode développée au moyen d'échantillon réel. Ce programme permet de certifier le succès de la méthode tant au niveau de la préparation de l'échantillon, à l'analyse puis la quantification des échantillons.

1.6 Développement d'une méthode bioanalytique par UPLC-MS/MS

Lors du développement d'une méthode bioanalytique, bien que le traitement de l'échantillon soit essentiel, le choix de l'instrument pour l'analyse de l'échantillon est également un aspect à prendre en compte. Ensuite, une fois la méthode optimisée

et développée, la validation de celle-ci permet d'une part de déterminer les limitations de la méthode, mais également d'assurer la fiabilité et robustesse de cette dernière.

1.6.1 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

La UPLC-MS/MS est une approche largement utilisée dans l'analyse de molécules organiques dans un échantillon biologique. La chromatographie liquide en phase inverse permet une séparation de petites molécules organiques non volatiles, selon leur polarité, les plus hydrophobes étant plus retenues (Hoffmann et Stroobant, 2007). La détection par spectrométrie de masse en tandem apporte ensuite une bonne sensibilité ainsi qu'une bonne sélectivité pour la quantification de ces molécules dans une matrice biologique complexe telle que l'urine. Cette technique permet de détecter des molécules d'intérêt par la mesure de leur rapport masse sur charge (m/z) (Gross, 2011). Les échantillons sont tout d'abord introduits dans le système par chromatographie gazeuse ou, comme dans le cas présent, par chromatographie liquide. La Figure 1.4 représente le schéma général d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle.

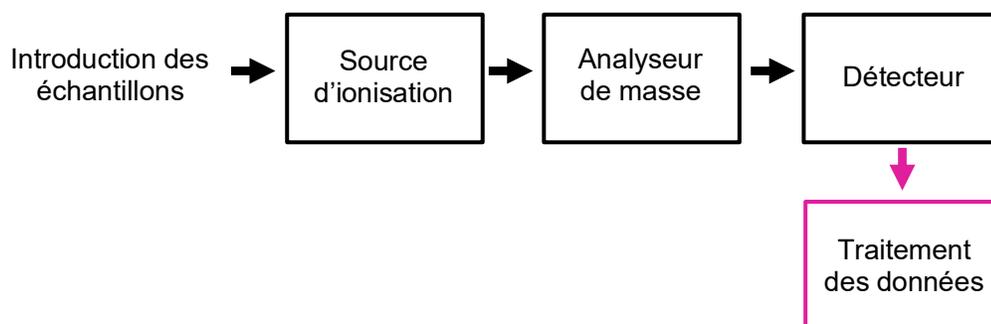


Figure 1.4 Schéma général d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle

L'utilisation d'un analyseur de type triple quadripôle permet le mode d'acquisition par détection de réaction sélectionnée (*multiple reaction monitoring*, MRM). Le mode

MRM est très utilisé pour l'analyse quantitative, en raison de sa haute sélectivité et sensibilité (Gross, 2011). Ce type d'acquisition a pour principe de sélectionner dans le premier quadripôle (Q1) le précurseur (M) protoné $[M+H]^+$ ou déprotoné $[M-H]^+$ suite à l'ionisation. Une fois sélectionné, il est alors fragmenté par dissociation induite par collisions (CID), avec un gaz neutre présent dans le deuxième quadripôle (q2, ou cellule de collision). L'énergie de collision (CE) appliquée est déterminée par une différence de potentiel (V) dans cette cellule de collision. Cette fragmentation permet ainsi d'obtenir plusieurs ions qui entrent dans le troisième quadripôle (Q3) où un ion produit est sélectionné, qui sera ensuite envoyé au détecteur (Gross, 2011; Hoffmann et Stroobant, 2007). La Figure 1.5 illustre le mode d'acquisition MRM décrit précédemment.

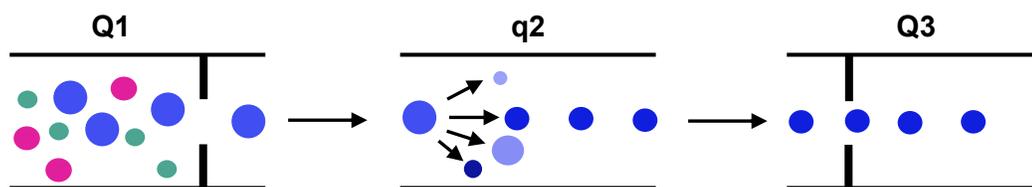


Figure 1.5 Schéma de détection de réaction sélectionné dans un triple quadripôle

1.6.2 Validation d'une méthode

La validation d'une méthode analytique permet d'assurer la fiabilité d'une méthode ainsi que sa robustesse. En général, ce processus se base sur des critères établis par des programmes d'accréditation en laboratoire reconnus internationalement. L'*American Industrial Hygiene Association Laboratory Accreditation Programs* (AIHA-LAP, LLC) est un programme d'accréditation permettant d'assurer les performances et les exigences analytiques en laboratoire. Les critères d'une validation de méthode se basent sur l'évaluation des différents paramètres analytiques. Ces différents paramètres correspondent à la limite de détection (LDM), la limite de quantification (LQM), la réplicabilité, la répétabilité, la justesse/exactitude et finalement la désorption ou récupération.

La LDM ainsi que la LQM correspondent aux limites de la méthode. La limite de détection représente la plus basse concentration détectée pour un analyte dans une matrice alors que la limite de quantification correspond plutôt à la concentration la plus basse pouvant être quantifiée pour l'analyte avec la méthode. Ces deux paramètres sont déterminés par l'analyse de 10 répliques de la concentration du standard le plus petit. L'écart-type calculé pour cette série de mesure permet alors d'estimer la LDM représentant 3 fois l'écart-type et la LQM représentant quant à elle 10 fois l'écart-type.

La précision d'une méthode analytique est ensuite déterminée par la répétabilité et la réplicabilité. Ces paramètres de précision sont calculés par une série de mesure pour des niveaux de concentration différents pour lesquels l'écart est déterminé. Les échantillons de réplicabilité doivent être effectués sur une même journée, par une même personne et analysés sur le même appareil alors que les échantillons de répétabilité peuvent être mesurés sur une journée, par une personne ou sur un appareil différent. Les valeurs d'écart mesurées pour chacun des niveaux de concentration pour une méthode utilisant une matrice biologique telles que l'urine doivent être moins de 15%.

La capacité d'une méthode à produire des résultats le plus près de la valeur cible se définit par l'exactitude et la justesse. Pour ce faire, il est possible d'utiliser des échantillons pour lesquels la concentration est connue ou d'évaluer la méthode au moyen d'un programme d'assurance qualité intra-laboratoire ou inter-laboratoire. L'écart obtenu entre les valeurs permet d'établir la justesse et l'exactitude de la méthode.

Finalement, le dernier paramètre déterminé par la validation d'une méthode consiste à l'évaluation de la désorption ou de la récupération. Ce paramètre permet de mesurer le pourcentage d'analyte récupéré avec et sans matrice dans le cas d'une méthode qui s'applique à des échantillons biologiques.

1.7 Objectif

Les isocyanates sont des molécules très toxiques pouvant avoir des effets néfastes chez les travailleurs œuvrant dans l'industrie du PU. La surveillance biologique des isocyanates est une approche adéquate afin de quantifier la dose réelle absorbée par les travailleurs suite à une exposition en milieu de travail. Couplées à la surveillance environnementale dans l'air déjà existante, ces deux approches permettraient d'évaluer adéquatement l'exposition à ces molécules toxiques et ainsi assurer la protection des travailleurs.

Bien que la surveillance environnementale possède des méthodes hautement efficaces pour l'évaluation des isocyanates dans l'air, les méthodes plutôt développées pour la surveillance biologique, au cours des dernières années, comportent néanmoins des limitations empêchant leurs applications. En effet, tel que mentionné dans ce chapitre, les méthodes retrouvées dans la littérature ne sont pas développées considérant les valeurs d'expositions recommandées. Aucune de ces méthodes ne participe à des programmes inter-laboratoire afin d'assurer l'efficacité de la méthode. De plus, certaines de ces méthodes ne sont développées que pour la surveillance biologique de la population en général.

L'IRSST procède actuellement à la surveillance environnementale des travailleurs œuvrant dans l'industrie du PU au Québec. Aucune méthode n'est toutefois disponible pour effectuer une surveillance biologique face à ces molécules. C'est pourquoi une nouvelle méthode pour l'évaluation de la surveillance biologique des isocyanates serait nécessaire afin d'offrir une évaluation adéquate de l'exposition à ces molécules. L'objectif de ce projet vise donc à développer une méthode d'analyse pour la quantification des biomarqueurs d'exposition des isocyanates dans l'urine au moyen de la UPLC-MS/MS.

Pour ce faire, tous les aspects du développement d'une méthode analytique efficace et robuste allant de la préparation des échantillons à l'analyse puis la quantification des échantillons seront optimisés par :

- Évaluation du temps d'hydrolyse des métabolites retrouvés dans l'urine afin d'obtenir les isocyanates sous leurs formes de diamine.
- Optimisation d'une préparation d'échantillons dans l'optique d'avoir une méthode simple, rapide et n'utilisant pas une grande quantité de solvant. Cette étape inclut également la bonne extraction des biomarqueurs provenant d'une matrice d'urine.
- Développement d'une méthode d'analyse par MRM sur UPLC-MS/MS incluant l'optimisation de la séparation chromatographique des composés.
- Validation de la méthode complète incluant l'évaluation de la méthode auprès d'un programme inter-laboratoire.
- Implantation de la méthode développée à l'IRSST afin qu'elle soit accessible pour la surveillance biologique des travailleurs.

Dans un premier abord, une première méthode sera développée pour la quantification du méthylènedianiline dans l'urine humaine (Chapitre 2). Une seconde méthode sera ensuite développée pour la quantification simultanée des isocyanates aromatiques et aliphatiques dans un échantillon d'urine humaine (Chapitre 3).

CHAPITRE II

ARTICLE SCIENTIFIQUE: A VALIDATED LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM
MASS SPECTROMETRY METHOD FOR 4,4'-METHYLENEDIANILINE
QUANTITATION IN HUMAN URINE AS A MEASURE OF 4,4'-METHYLENE
DIPHENYL DIISOCYANATE EXPOSURE

Maggy Lépine, Lekha Sleno, Jacques Lesage and Sébastien Gagné

Article published in:

Rapid Communications in Mass Spectrometry 2019;33:600–606.

Copyright © 2019 John Wiley & Sons, Ltd.

A VALIDATED LIQUID CHROMATOGRAPHY/TANDEM MASS SPECTROMETRY
METHOD FOR 4,4'-METHYLENEDIANILINE QUANTITATION IN HUMAN URINE
AS A MEASURE OF 4,4'-METHYLENE DIPHENYL DIISOCYANATE EXPOSURE

Maggy Lépine^{1,2}, Lekha Sleno^{1*}, Jacques Lesage¹ and Sébastien Gagné^{2*}

- 1) *Université du Québec à Montréal*, Chemistry department, PO Box 8888
Downtown Station, Montréal, H3C 3P8, Canada, sleno.lekha@uqam.ca
- 2) *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail*, 505
boul. De Maisonneuve Ouest, Montréal, Québec, H3A 3C2, Canada, (514)
288-1551, sebastien.gagne@irsst.qc.ca

*co-corresponding authors

Maggy Lépine est l'auteure principale de cet article. Elle a effectué la recherche bibliographique, la réalisation de toutes les manipulations, la réalisation des tableaux et des figures en plus de la rédaction de l'article. Lekha Sleno, Sébastien Gagné et Jacques Lesage sont les co-auteurs de cet article. Ils ont encadré et supervisé le projet en plus de réviser et finaliser le manuscrit.

2.1 Résumé

Justification: Le 4,4'-méthylène diphényle diisocyanate (MDI) est un isocyanate hautement réactif utilisé dans la production de polyuréthanes. Les travailleurs exposés à ces produits peuvent développer une sensibilisation aux composés de diisocyanate, entraînant l'asthme professionnel. La quantification des niveaux de MDI est nécessaire afin d'assurer la sécurité en milieu de travail. Le MDI est métabolisé par acétylation et/ou conjugaison à des macromolécules afin d'être excrété dans l'urine. Tous les métabolites peuvent être hydrolysés chimiquement pour former la diamine libre 4,4'-méthylènedianiline (MDA) en tant que biomarqueur urinaire de l'exposition au MDI. Les méthodes actuelles impliquent une longue préparation des échantillons ou ont été conçues en utilisant une automatisation coûteuse. Il est donc nécessaire de mettre au point une nouvelle méthode pratique pour l'évaluation de l'exposition au MDI.

Méthodes: Les échantillons d'urine ont été acidifiés puis chauffés afin de former du MDA, pour ensuite subir une neutralisation et une extraction liquide-liquide. Les extraits ont été séparés par chromatographie en phase inverse sur une colonne HSS T3, suivie d'une analyse sur un spectromètre de masse de type triple quadripôle en mode *multiple reaction monitoring* (MRM).

Résultats: Le $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -MDA a été choisi comme standard interne (IS) à la suite d'une étude de la stabilité de l'étalon interne. L'efficacité d'hydrolyse, de la formation du MDA libre à partir de métabolites conjugués *in vivo*, a été évaluée à l'aide de 4,4'-méthylènebis (acétanilide) injecté dans l'urine et une hydrolyse complète est survenue au bout d'une heure. Une gamme de concentration de 5 à 500 nM a été atteinte et s'est révélée utile pour surveiller l'exposition au MDI, compte tenu de la valeur de référence biologique (BGV) de 10 µg/L (~50 nM) proposée par la fondation allemande de la recherche (DFG). La limite de détection (LDM) et la limite de quantification (LQM) de la méthode étaient respectivement de 0.8 et 2.7 nM. Les précisions intra et inter jours étaient respectivement de 4.33% et 4.27%. Enfin, la

méthode a été testée avec des échantillons inter-laboratoires du programme allemand G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme) et les résultats présentés ont tous été dans les limites de la plage de tolérance autorisée.

Conclusions: Une méthode pratique et validée pour l'analyse de lots d'échantillons de taille petite à moyenne a été mise au point pour la surveillance biologique de l'exposition au MDI dans l'urine humaine.

2.2 Abstract

Rationale: 4,4'-Methylene diphenyl diisocyanate (MDI) is a highly reactive isocyanate used in the production of polyurethanes. Workers exposed to these products may develop sensitization to the diisocyanate compounds, leading to occupational asthma. Quantifying MDI levels is necessary to ensure workplace safety. MDI is metabolized by acetylation and/or conjugation to macromolecules for excretion into urine. All metabolites can be chemically hydrolyzed to form the free diamine 4,4'-methylenedianiline (MDA) as a urinary biomarker of MDI exposure. Current methods involve long sample preparation, or have been designed using costly automation. There is therefore a need to develop a new practical method for assessing exposure to MDI.

Methods: Urine samples were acidified and heated to form MDA, followed by neutralization and liquid-liquid extraction. Extracts were separated by reversed-phase chromatography on a HSS T3 column followed by analysis on a triple quadrupole mass spectrometer in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

Results: $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ -MDA was selected as the internal standard (IS) of choice following an investigation of internal standard stability. The hydrolysis efficiency, forming free MDA from conjugated metabolites *in vivo*, was evaluated using 4,4'-

methylenebis(acetanilide) spiked into urine and complete hydrolysis occurred after 1h. A dynamic range of 5 to 500 nM was achieved, and was useful for monitoring MDI exposure considering the biological guidance value (BGV) of 10 µg/L (~50 nM) proposed by the German Research Foundation (DFG). The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the method were 0.8 and 2.7 nM, respectively. The intra-day and inter-day precisions were 4.33% and 4.27%, respectively. Finally, the method was tested with inter-laboratory samples from the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) program and the results submitted were all within the allowable tolerance range.

Conclusions: A practical and validated method for the analysis of small-to medium-sized batches of samples has been developed for the biological monitoring of MDI exposure in human urine.

2.3 Introduction

4,4'-Methylene diphenyl diisocyanate (MDI) is a highly reactive isocyanate used in the manufacture of polyurethanes (PURs) (Creely *et al.*, 2006). PURs composed of MDI are found in various materials such as insulating foam, glue and adhesives (Sabbioni *et al.*, 2010). Workers using these products can therefore be exposed to isocyanates. The high reactivity of isocyanates makes them toxic, with acute or chronic effects. MDI is an irritant and an important respiratory sensitizer, which can cause severe respiratory diseases such as occupational asthma (Cocker, 2007; Jones *et al.*, 2017; Marand *et al.*, 2004), hypersensitivity pneumonitis or alveolitis (Rosenberg *et al.*, 2002). MDI is also a skin (Thorne *et al.*, 1987) and eye irritant (European Commission, 2005).

MDI can be absorbed in the body by inhalation or by dermal contact as predominant routes of exposure (DFG, 2015). After being absorbed, MDI is conjugated to

biomolecules (forming protein and glutathione adducts) (Bhandari *et al.*, 2016; Cocker, 2007; Cocker, 2011; Gaines *et al.*, 2010; Gledhill *et al.*, 2005; Sabbioni *et al.*, 2010) and/or acetylated (Bolognesi *et al.*, 2001; DFG, 2015; Gledhill *et al.*, 2005; Sabbioni *et al.*, 2010; Sepai *et al.*, 1995). The low molecular weight conjugates and acetylated metabolites are eliminated in urine (Bhandari *et al.*, 2016; Peterson *et al.*, 1991). To analyze these metabolites in a urine sample, hydrolysis is performed to release free MDA, as the biological biomarker of MDI exposure (Cocker, 2011; DFG, 2015; Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a).

Various strategies have been adopted by industries to better protect workers from isocyanates and to comply with governmental regulations. To assess the adequacy of exposure control, exposure measurements for the various work operations are taken and compared with occupational exposure limits (OELs). The approach most commonly used for the evaluation of MDI exposure is environmental air monitoring. Most countries have adopted an occupational exposure limit of 5 ppb in air for an eight-hour work shift (American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), 2017; National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), 1978). However, this approach does not allow the evaluation of the real dose absorbed and biological monitoring is therefore necessary to properly monitor exposure (Rosenberg *et al.*, 2002). A recommended value of 10 µg/L (50 nM) (DFG, 2016) for hydrolyzed MDA has been proposed by the German Research Foundation (DFG). This value is established for carcinogens, sensitizers and allergens, or substances with limited toxicological information based on occupational-medical information and can be used for exposure assessment or controlling hygienic measures (DFG, 2016).

Over the years, different experimental approaches have been developed for the determination of MDA as a urinary biomarker of exposure. Ideally, a method not involving derivatization (Sakai *et al.*, 2002) is favored in order to simplify sample preparation. Current methods are either not measuring free MDA (Dalene *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2017; Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*,

1994a) or are designed to analyze large numbers of samples using costly automation (Bhandari *et al.*, 2016). The majority of methods involve a long hydrolysis step of over 16 hours (Dalene *et al.*, 1990; Marand *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a). There is therefore a need to develop a novel method for the analysis of small to medium batches of samples, while ideally considering the need to be environmentally-friendly. For this purpose, we have validated a novel method for MDA determination in human urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) in multiple reaction monitoring (MRM) mode.

2.4 Experimental

2.4.1 Chemicals

4,4'-Methylenedianiline (MDA) and 4,4'-methylenebis(acetanilide) (AcMDA) were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). 4,4'-Methylene- d_8 -dianiline (d_8 -MDA), and 4,4'-Methylene- d_2 -dianiline (d_2 -MDA) were purchased from C/D/N isotopes (Pointe-Claire, Qc, Canada). 4,4'-Methylenedianiline- $^{15}\text{N}_2,^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA) was obtained from IsoScience (Ambler, PA, USA). Methanol (MeOH), toluene and water were purchased from Fisher Scientific (St-Laurent, Qc, Canada) and were all HPLC grade. Sodium hydroxide (NaOH), sulfuric acid (H_2SO_4) and acetic acid, all ACS grade, were also obtained from Sigma-Aldrich.

2.4.2 Collection of human urine

Human urine of control subjects (not exposed to isocyanates) was obtained by anonymous donation and kept at 4°C for less than 30 days. Inter-laboratory urine samples came from the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) for analyses in biological materials (Erlangen, Germany).

2.4.3 Creatinine and density levels

Urinary creatinine was analyzed by a spectrometric method based on Jaffe's reaction (Sauve *et al.*, 2015) using an Architect c4000 system spectrophotometer from Abbott (Abbott Park, IL, USA). The density measurements were determined by refractometry (Sauve *et al.*, 2015) using a Densitometer DMA 38 from Anton-Paar (Saint-Laurent, Qc, Canada). Both measurements were performed on the same day.

2.4.4 Calibration curve solutions

Stock solutions of 1 mM MDA and 500 μM $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA were prepared in water. Seven working standard solutions of MDA were prepared in water at 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 μM . An internal standard (IS) working solution ($^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA) was made at 1 μM . Calibration samples were prepared by adding 10 μL of standard working solution and 10 μL of IS working solution in 180 μL of urine. The final concentrations of MDA were 5, 10, 25, 50, 100, 250 and 500 nM while the final concentration of the IS was 50 nM.

2.4.5 Sample preparation

The following general workflow was applied for all samples including the calibration curve standards. The working IS solution (10 μL) was spiked into 190 μL of urine, followed by the addition of 20 μL of 18 M sulfuric acid and incubation of the resulting solution at 100°C for 1 h. The sample was then neutralized with 140 μL of 10 N NaOH prior to extraction with 400 μL of toluene. During extraction, the samples were mixed vigorously and then centrifuged for 20 min at 14,500 rpm before the organic layer (approximately 315 μL) was transferred to a clean tube. The extracts were evaporated to dryness in a Speedvac at 50°C and reconstituted with 200 μL of water.

The internal standard degradation test was performed using solutions of 1 μM for each isotope-labeled MDA compound in water. Samples (1 mL) were treated with 1.5 mL of 3 M H_2SO_4 at 100°C, and aliquots were taken for 0, 1, 2, 4, 6 and 16 h

time points. The samples were neutralized with NH_4OH to obtain an approximate pH of 7.

2.4.6 LC/MS/MS analysis

Samples were injected (5 μL) onto an Acquity UPLC HSS T3 column (1.8 μm , 2.1 \times 50 mm; Waters, Dublin, Ireland) using a Waters ACQUITY I-class ultra-performance liquid chromatography (UPLC) system. Elution was performed at 40°C at a flow rate of 0.6 mL/min using a gradient of water (A) and methanol (B), both containing 0.1% acetic acid. The gradient started at 5% B (held for 0.5 min) followed by an increase to 90% in 3 min and was held at 90% for one additional minute. The LC/MS/MS spectra were then acquired on a Xevo TQ triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) in electrospray positive ion mode, where MDA and the IS yielded $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions at m/z 199 and 202, respectively. The source parameters were as follows: source temperature of 150°C, cone voltage of 35 V, desolvation temperature of 500°C and desolvation flow of nitrogen gas at a rate of 1000 L/h. The monitored MRM transitions were m/z 199.0 \rightarrow 106.0 (quantitation ion) and m/z 199.0 \rightarrow 79.0 (qualifier ion) for the MDA and m/z 202.1 \rightarrow 108.1 for the IS with a collision energy (CE) of 25 eV.

For the internal standard degradation test, samples (2 μL) were injected onto the same column as described above using a Nexera UHPLC system (Shimadzu, Columbia, MD, USA). An elution at 40°C at a flow rate of 0.5 mL/min was performed using the same mobile phases and gradient. A TripleTOF 5600 (quadrupole-time-of-flight) mass spectrometer from Sciex (Concord, ON, Canada) with a DuoSpray ion source in positive mode was used for high-resolution mass spectrometry (HRMS) analysis of internal standard samples. The ion source parameters were as follows: nebulizer (nitrogen) and drying (dry air) gases (GS1 and GS2) at 50 psi pressure curtain gas (CUR) pressure at 35 psi, source temperature of 450°C and ionspray voltage of 5000 V. TOF-MS data was acquired between m/z 80 and 925 with an accumulation time of 600 ms and information dependent acquisition (IDA) was used

to acquire TOF MS/MS data of the three highest intensity ions after each TOF-MS spectrum, with an accumulation time of 150 ms. The total cycle time was 1.1 s.

2.4.7 Data analysis

LC/MS/MS data from samples and calibration standards were processed using Masslynx 4.1 (Waters), with automatic peak integration. For the internal standard degradation test, Analyst TF 1.7.1 (Sciex) was used for data acquisition and data was processed using PeakView 2.2 software (Sciex).

2.4.8 Analytical performance

Limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) measurements were based on a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 and 10, respectively. The intra-day precision was calculated by analyzing six different samples of four concentrations (5, 25, 50 and 500 nM) analyzed within the same day (n = 24). The inter-day precision was calculated by analyzing four concentrations (5, 25, 50 and 500 nM) analyzed on six different days (n = 24). Method accuracy was evaluated by analyzing reference urine samples from the G-EQUAS program. Finally, matrix effect and recovery were investigated by comparing six replicates at four concentrations levels (5, 25, 50 and 500 nM) spiked in urine with replicates spiked in water.

2.5 Results and discussion

2.5.1 Sample preparation

2.5.1.1 Internal standard stability tests

Three different internal standards (ISs) were evaluated to test their stability during the hydrolysis step: d₈-MDA, d₂-MDA and ¹³C¹⁵N₂-MDA (Figure 2.1). For the d₈-MDA, there is a loss of deuterium labels on the amine groups and, therefore, this internal

standard is rapidly converted into d₄-MDA in solution. Hydrolysis was performed over a time course of 16 h (Figure 2.2A). Interestingly, it was found that the deuterium labels on the ring carbons of d₄-MDA were lost during the hydrolysis step; however, d₂-MDA and ¹³C¹⁵N₂-MDA were found to be stable. ¹³C¹⁵N₂-MDA was chosen as the better choice due to the 3Da mass difference in molecular weight from the analyte molecule, therefore offering less potential for interference or cross-talk in the mass spectrometer.

The degradation of d₄-MDA was investigated (Figures 2.2B and 2.2C). The hypothesis for this loss of deuterium label is related to the protonation of the amine during the hydrolysis step. This IS has four deuterium atoms located ortho to the two amino groups on the aromatic rings (Figure 2.1). Due to the strong hydrolysis step with sulfuric acid at 100°C, 50% of the IS was degraded after 6 h of hydrolysis and we see eventual loss of all four deuterium labels, down to the unlabeled MDA compound, which would also interfere directly with the analyte to be measured in this assay.

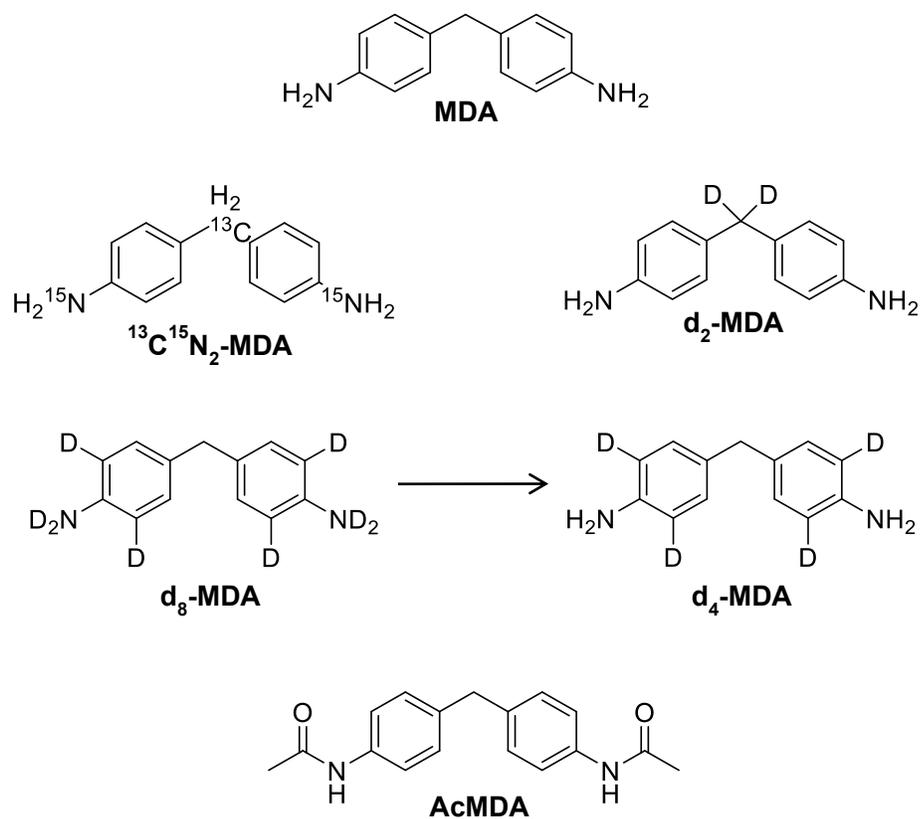


Figure 2.1 Structures of MDA, d_4 -MDA (via d_8 -MDA), d_2 -MDA, $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA and AcMDA

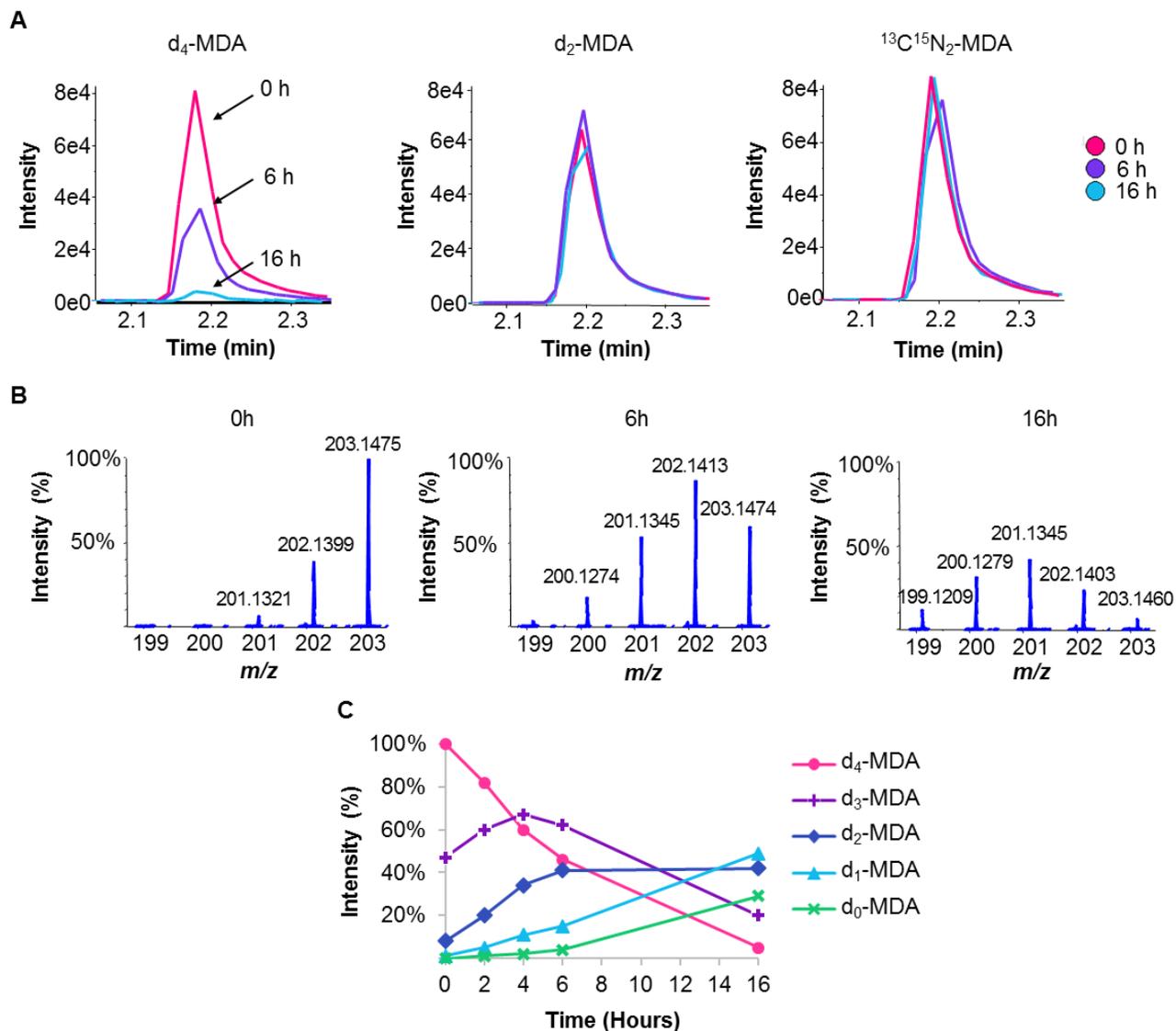


Figure 2.2 A, For each internal standard studied, the extracted ion chromatogram of the protonated precursor (measured by high-resolution mass spectrometry ± 0.01 m/z units) is shown after 0, 6 and 16 h of hydrolysis time. The signal for d_4 -MDA is seen to decrease substantially upon hydrolysis, whereas the other two IS compounds are stable. B, Mass spectra showing m/z region from d_0 -MDA to d_4 -MDA at 0, 6 and 16 h of hydrolysis, showing loss of deuterium labels over time. C, Relative peak areas of d_0 - to d_4 -MDA, exhibiting the concerted losses of deuterium labels

2.5.1.2 Hydrolysis efficiency

Biological monitoring is important for the determination of the real dose of MDI absorbed in humans. Since the metabolites formed are eliminated, urine samples containing those metabolites must be hydrolyzed to form free MDA. To provide an efficient and sensitive method, the hydrolysis needed to be optimized. The hydrolysis efficiency was evaluated using 4,4'-methylenebis(acetanilide) (AcMDA) (Figure 2.1), a commercially available metabolite found in urine (Bolognesi *et al.*, 2001; DFG, 2015; Sabbioni *et al.*, 2010; Sepai *et al.*, 1995). The time of hydrolysis was varied from 1 to 16 h. After 1 h of hydrolysis, only MDA (hydrolysis product) was detected. It was established that in this case complete hydrolysis of MDI metabolites in urine occurred after 1 h.

2.5.1.3 Liquid-liquid extraction

A liquid-liquid extraction procedure has been optimized for small to medium batches of samples while limiting solvent volumes, to be more environmentally friendly than previous methods (Marand *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 1991; Robert *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a). The use of toluene rather than dichloromethane (Sakai *et al.*, 2002) as the extraction solvent is a major advantage as it allows the collection of the top layer. Extraction was efficient for the MDA according to the LOD and LOQ being measured. By reducing the starting volume of urine, we were able to limit solvent usage so that only 400 μL per sample was used for extraction, as well as making the procedure more practical by using 1.5-mL polypropylene tubes instead of larger glass tubes or vials.

2.5.2 LC/MS/MS method development

The MRM method was developed using the protonated molecule ($[\text{M}+\text{H}]^+$) as the precursor ion, which fragments by the loss of an aniline molecule (Figure 2.3A). A chromatographic separation was developed using acetic acid in both aqueous and organic mobile phases with a gradient elution in 3 min. The overall run time including the equilibration period was 6 min (Table 2.1).

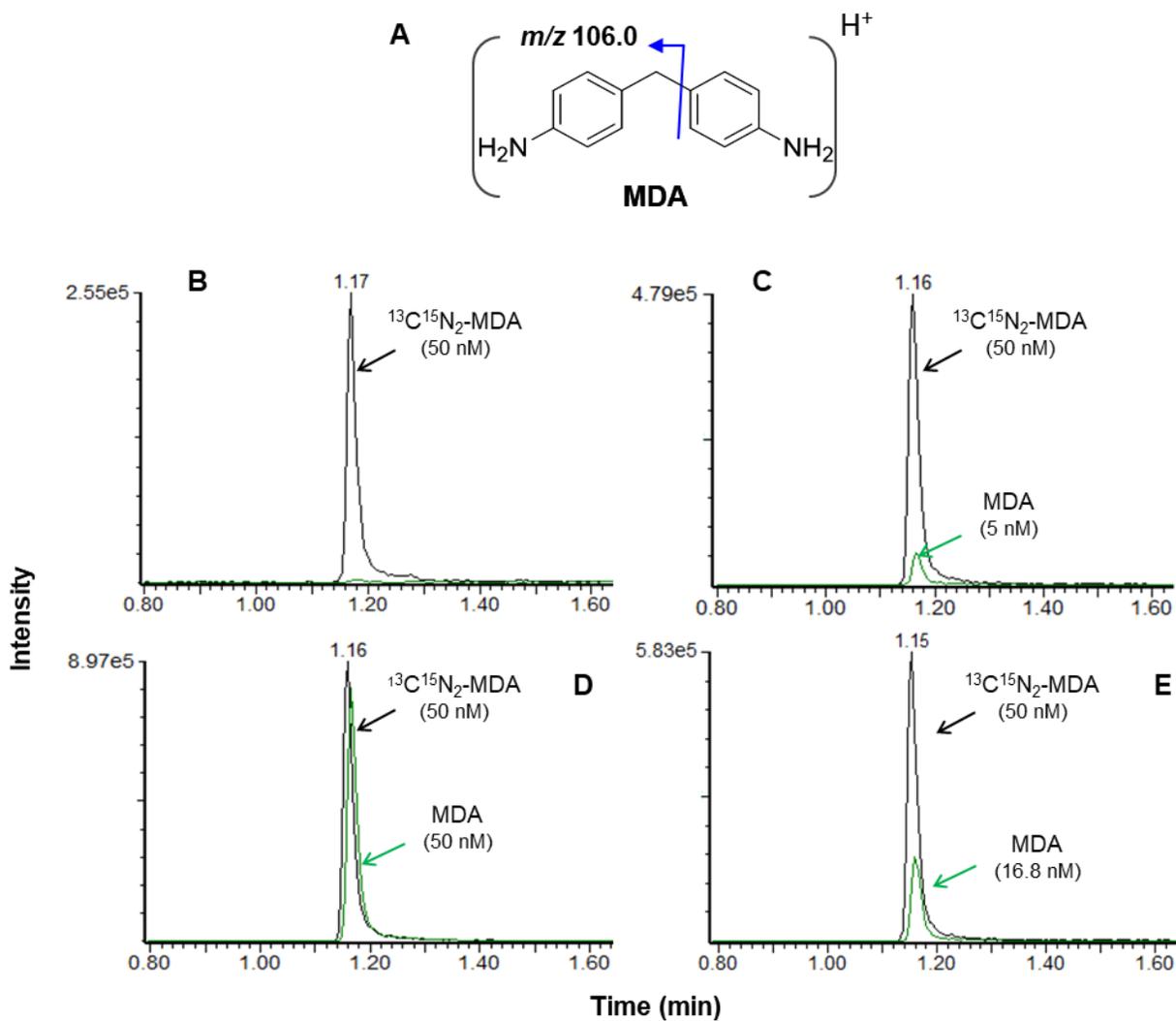


Figure 2.3 MDA MRM fragmentation A. MRM chromatograms of blank sample B, lowest standard (5 nM) C, mid-range standard (50 nM) D, and sample 58A from the G-EQUAS program (16.8 nM) E

2.5.3 Analytical parameter validation

2.5.3.1 Dynamic range, LOD/LOQ and precision

The method was applied to samples of known concentrations of MDA to determine various validation parameters. The dynamic range was adjusted to cover 10% to 1000% of the biological guidance value (BGV) of 10 µg/L (DFG, 2016) (~50 nM (Figure 2.3D)) corresponding to concentrations between 5 nM (Figure 2.3C) and 500 nM. Coefficients of determination (R^2) >0.998 were obtained for all calibration curves (Table 2.1). The % accuracy and % CV values for each concentration level, shown in Table 2.2, confirm the reliability of our results. Acceptable sensitivities of 0.8 nM (1.6% of BGV) and 2.7 nM (5.4% of BGV) were obtained for the LOD and LOQ, respectively (Table 2.1). These results show that, in this method, derivatization was not necessarily required to provide the necessary sensitivity based on the BGV. Indeed, this method measuring free MDA allows the evaluation of a low exposure that corresponds to 5.4% of the target value. The intra-day and inter-day precisions shown are approximately 4% and also show the robustness of the method (Table 2.1).

Table 2.1 Analytical parameters obtained by the method validation

Biological guidance value (BGV)	50 nM
Dynamic range	5 - 500 nM
Coefficient of determination (R^2)	>0.998
Limit of detection (LOD) (n = 10)	0.8 nM
Limit of quantitation (LOQ) (n = 10)	2.7 nM
Intra-day precision (n = 24)	4.33%
Inter-day precision (n = 24)	4.27%
Recovery (%)	95 ± 5.6

Table 2.2 Accuracy (%) and CV (%) values from each standard measured in three different calibration curves

Levels of concentration (nM)	% accuracy			% CV (n= 3)
	Curve 1	Curve 2	Curve 3	
5	106.8	103.4	106.8	1.9
10	94.3	101.4	93.9	4.4
25	99.2	97.3	100.6	1.7
50	98.2	94.2	98.3	2.4
100	101.6	104.1	100.0	2.0
250	99.9	99.7	100.8	0.5
500	100.0	100.0	99.8	0.1

2.5.3.2 Recovery and matrix effect

A liquid–liquid extraction step was employed in order to reduce potential variability of the method resulting from the biological matrix (Schlittenbauer *et al.*, 2015). The method used to evaluate the matrix effect is inspired by the AIHA-LAP, LLC accreditation program (American Industrial Hygiene Association Laboratory Accreditation Programs). The matrix effect was studied by comparing peak areas in urine and water. A total recovery of 95% was obtained (Table 2.1). The use of an internal standard helps to minimize variability of results from sample preparation and ionization efficiencies.

2.5.3.3 Control urine samples

Urine samples obtained by eleven anonymous donations from people not known to be exposed to MDI were evaluated as a negative control. Creatinine and density levels were first measured to confirm that the urine samples were in the tolerance range between 4.4 and 26.5 mM and between 1.010 and 1.030 g/mL, respectively (ACGIH, 2017). All the control urine samples were analyzed using the developed

method and no signal above the LOD signal-to-noise threshold of 3 was obtained. These results demonstrate that no interference is present at the retention time of the analyte.

2.5.3.4 Accuracy (G-EQUAS program)

The inter-laboratory performance was used to evaluate the accuracy of the method after development and optimization. The method was used to test ten reference samples purchased from the G-EQUAS program. All measured values were within the tolerated ranges provided by the program. The results show the reliability of the method for urine samples (Table 2.3). A representative LC-MRM trace from sample 58A is shown as an example of a real sample analysis (Figure 2.3E).

Table 2.3 Quantitative results from urine samples provided from the G-EQUAS program (inter-laboratory performance)

Sample	Reference values (tolerance range) (nM)	Measured values (nM)
57A	28.7 (20.2 – 37.2)	21.1
57B	118.4 (90.4 – 146.4)	106.0
58A	14.9 (10.5 – 19.3)	16.8
58B	103.7 (80.3 – 126.9)	106.4
59A	31.2 (23.5 – 38.9)	30.7
59B	62.8 (49.2 – 76.4)	67.9
60A	7.6 (5.0 – 10.2)	6.7
60B	68.0 (50.8 – 85.4)	65.2
61A	14.3 (9.4 – 19.1)	15.8
61B	69.3 (54.5 – 84.2)	72.8

2.6 Conclusions

A practical and validated method has been developed to determine MDA levels in human urine, the urinary biomarker of MDI exposure. The developed method has been optimized in terms of hydrolysis time, accuracy, robustness and reliability according to the biological guidance values established by the DFG. The sample preparation was simplified and shortened to obtain analytical results more quickly than with current methods which involve analyte derivatization (Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a) and/or longer hydrolysis (Bhandari *et al.*, 2016; Marand *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a). All possible routes of exposure to MDI are measured with this biological monitoring method. Moreover, this method could be combined with environmental monitoring (in air) and used by professionals to evaluate exposure to MDI in the workplace.

2.7 References

- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (2017) *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices*. Cincinnati, OH.
- Bhandari D, Ruhl J, Murphy A, McGahee E, Chambers D et Blount BC (2016) Isotope Dilution UPLC-APCI-MS/MS Method for the Quantitative Measurement of Aromatic Diamines in Human Urine: Biomarkers of Diisocyanate Exposure. *Anal Chem* 88: 10687-10692.
- Bolognesi C, Baur X, Marczyński B, Norppa H, Sepai O et Sabbioni G (2001) Carcinogenic risk of toluene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate: epidemiological and experimental evidence. *Crit Rev Toxicol* 31: 737-772.
- Cocker J (2007) Biological monitoring for isocyanates. *Occup Med (Lond)* 57: 391-393.
- Cocker J (2011) Biological monitoring for isocyanates. *Ann Occup Hyg* 55: 127-131.

- Creely KS, Hughson GW, Cocker J et Jones K (2006) Assessing isocyanate exposures in polyurethane industry sectors using biological and air monitoring methods. *Ann Occup Hyg* 50: 609-621.
- Dalene M, Skarping G et Brorson T (1990) Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines. IV. Determination of 1,6-hexamethylenediamine in human urine using capillary gas chromatography and selective ion monitoring. *J Chromatogr* 516: 405-413.
- DFG (2015) *4,4'-Methylene diphenyl diisocyanate (MDI) [101 - 68 - 8] and "deutschepolymeric" MDI (PMDI) [9016 - 87 - 9]* [MAK Value Documentation, 2008]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,
- DFG (2016) *List of MAK and BAT values 2016: Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area.*
- European Commission (2005) *European Union Risk Assessment Report: Methylenediphenyl diisocyanate (MDI)*. Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy.
- Gaines LG, Fent KW, Flack SL, Thomasen JM, Ball LM, Richardson DB, Ding K, Whittaker SG et Nylander-French LA (2010) Urine 1,6-hexamethylene diamine (HDA) levels among workers exposed to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Ann Occup Hyg* 54: 678-691.
- Gledhill A, Wake A, Hext P, Leibold E et Shiotsuka R (2005) Absorption, distribution, metabolism and excretion of an inhalation dose of [¹⁴C] 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate in the male rat. *Xenobiotica* 35: 273-292.
- Jones K, Cocker J et Piney M (2013) Isocyanate exposure control in motor vehicle paint spraying: evidence from biological monitoring. *Ann Occup Hyg* 57: 200-209.
- Jones K, Johnson PD, Baldwin PEJ, Coldwell M, Cooke J, Keen C, Harding AH, Smith D et Cocker J (2017) Exposure to Diisocyanates and Their Corresponding Diamines in Seven Different Workplaces. *Ann Work Expo Health* 61: 383-393.
- Marand A, Karlsson D, Dalene M et Skarping G (2004) Determination of amines as pentafluoropropionic acid anhydride derivatives in biological samples using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analyst* 129: 522-528.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (1978) *Criteria for a recommended standard occupational exposure to diisocyanates*. US Department of Health, Education, and Welfare, Cincinnati, OH.

- Peterson JC, Estiva EC, Lyttle DS et Harris RM (1991) High-performance liquid chromatographic determination of 4,4'-methylenedianiline in human urine. *J Chromatogr* 564: 205-212.
- Robert A, Ducos P et Francin JM (1995) Determination of urinary 4,4'-methylenedianiline and its acetylated metabolites by solid-phase extraction and HPLC analysis with UV and electrochemical detection. *Int Arch Occup Environ Health* 68: 44-51.
- Rosenberg C, Nikkila K, Henriks-Eckerman ML, Peltonen K et Engstrom K (2002) Biological monitoring of aromatic diisocyanates in workers exposed to thermal degradation products of polyurethanes. *J Environ Monit* 4: 711-716.
- Sabbioni G, Dongari N et Kumar A (2010) Determination of a new biomarker in subjects exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Biomarkers* 15: 508-515.
- Sakai T, Morita Y, Kim Y et Tao YX (2002) LC-MS determination of urinary toluenediamine in workers exposed to toluene diisocyanate. *Toxicology letters* 134: 259-264.
- Sauve JF, Levesque M, Huard M, Drolet D, Lavoue J, Tardif R et Truchon G (2015) Creatinine and specific gravity normalization in biological monitoring of occupational exposures. *J Occup Environ Hyg* 12: 123-129.
- Schlittenbauer L, Seiwert B et Reemtsma T (2015) Matrix effects in human urine analysis using multi-targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1415: 91-99.
- Sepai O, Henschler D et Sabbioni G (1995) Albumin adducts, hemoglobin adducts and urinary metabolites in workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 16: 2583-2587.
- Skarping G, Dalene M et Brunmark P (1994) Liquid-Chromatography and Mass-Spectrometry Determination of Aromatic-Amines in Hydrolyzed Urine from Workers Exposed to Thermal-Degradation Products of Polyurethane. *Chromatographia* 39: 619-623.
- Thorne PS, Hillebrand JA, Lewis GR et Karol MH (1987) Contact sensitivity by diisocyanates: potencies and cross-reactivities. *Toxicology and Applied Pharmacology* 87: 155-165.

CHAPITRE III

ARTICLE SCIENTIFIQUE: A VALIDATED UPLC-MS/MS METHOD FOR DETERMINATION OF ALIPHATIC AND AROMATIC ISOCYANATE EXPOSURE IN HUMAN URINE

Maggy Lépine, Lekha Sleno, Jacques Lesage and Sébastien Gagné

Article published in:

Analytical and Bioanalytical Chemistry 2019;412:753-762

Copyright © 2019 Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature

A VALIDATED UPLC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF
ALIPHATIC AND AROMATIC ISOCYANATE EXPOSURE IN HUMAN URINE

Maggy Lépine^{1,2}, Lekha Sleno^{1*}, Jacques Lesage¹ and Sébastien Gagné^{2*}

- 1) *Université du Québec à Montréal*, Chemistry department, PO Box 8888
Downtown Station, Montréal, H3C 3P8, Canada, sleno.lekha@uqam.ca
- 2) *Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail*, 505
boul. De Maisonneuve Ouest, Montréal, Québec, H3A 3C2, Canada, (514)
288-1551, sebastien.gagne@irsst.qc.ca

*co-corresponding authors

Maggy Lépine est l'auteure principale de cet article. Elle a effectué la recherche bibliographique, la réalisation de toutes les manipulations, la réalisation des tableaux et des figures en plus de la rédaction de l'article. Lekha Sleno, Sébastien Gagné et Jacques Lesage sont les co-auteurs de cet article. Ils ont encadré et supervisé le projet en plus de réviser et finaliser le manuscrit.

3.1 Résumé

Le 4,4'-méthylène diphényle diisocyanate (MDI), le toluène diisocyanate (2,4-TDI et le 2,6-TDI) et le 1,6'-hexaméthylène diisocyanate (HDI) sont tous des isocyanates couramment utilisés dans la production de matériaux à base de polyuréthane. Les travailleurs exposés professionnellement à ces composés peuvent développer une sensibilisation pouvant entraîner l'asthme professionnel. Les isocyanates sont métabolisés *in vivo* par conjugaison en macromolécules et/ou par acétylation avant d'être éliminés dans l'urine. L'hydrolyse des échantillons d'urine libère des composés diamines libres de ces métabolites correspondant aux biomarqueurs d'exposition spécifiques pour chacun des isocyanates : le 4,4'-méthylènedianiline (MDA), le toluènediamine (2,4-TDA et la 2,6-TDA) et l'hexaméthylènediamine (HDA). Pour répondre au besoin, une méthode validée pouvant être utilisée pour la détermination simultanée de biomarqueurs d'isocyanates aliphatiques et aromatiques afin de surveiller l'exposition professionnelle en fonction des valeurs limite d'exposition recommandées doit être développée. C'est pourquoi nous avons développé une méthode par UPLC-MS/MS pour la quantification du MDA, des isomères TDA et du HDA. Cette méthode implique une hydrolyse acide, une extraction en phase solide et une dérivation des échantillons d'urine. Les composés diamines libres ont été dérivés avec de l'anhydride acétique pour augmenter la rétention chromatographique et l'intensité du signal. La méthode a été mise au point en tenant compte de la biological guidance value (BGV) du MDA à $10 \mu\text{g L}^{-1}$ et des biological exposure indices (BEI) des isomères de TDA et du HDA à $5 \mu\text{g g}^{-1}$ et à $15 \mu\text{g g}^{-1}$ de créatinine, respectivement. Les limites de détection permettent de surveiller jusqu'à 6% de la BGV/BEI, avec une précision inférieure à 8%. À l'aide des échantillons de référence inter-laboratoire, la précision et la fiabilité de la méthode ont été évaluées et jugées acceptables sur la base de trois séries de mesures effectuées. Cette nouvelle méthode a permis de prouver son utilité pour l'évaluation de la sécurité et de la santé au travail.

3.2 Abstract

4,4'-Methylenediphenyldiisocyanate (MDI), toluenediisocyanate (2,4-TDI and 2,6-TDI), and 1,6'-hexamethylenediisocyanate (HDI) are all commonly used in the production of polyurethane-containing materials in different application areas. Workers exposed occupationally to these compounds may develop sensitization with the potential to lead to asthma. Isocyanates are metabolized *in vivo* by conjugation to macromolecules and/or by acetylation prior to being eliminated in urine. The hydrolysis of urine samples releases free amine compounds from these metabolites as biomarkers of exposure, specific to each parent isocyanate: 4,4'-methylenedianiline (MDA), toluenediamine (2,4-TDA and 2,6-TDA), and hexamethylenediamine (HDA). To address the need for a validated method that could be used for the simultaneous determination of biomarkers of aliphatic and aromatic isocyanates to monitor occupational exposure based on recommended thresholds, we have developed an UPLC-MS/MS method for the quantitation of MDA, TDA isomers, and HDA following acid hydrolysis, solid-phase extraction, and derivatization of urine samples. Free amine compounds were derivatized with acetic anhydride to augment chromatographic retention and signal intensity. The method was developed considering the biological guidance value (BGV) of MDA at $10 \mu\text{g L}^{-1}$, and biological exposure indices (BEI) of TDA isomers and HDA at $5 \mu\text{g g}^{-1}$ and $15 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinine, respectively. Limits of detection allowed monitoring down to 6% of BGV/BEI, with precision within 8%. The accuracy and reliability of the method were assessed using inter-laboratory reference samples and deemed acceptable based on three rounds of measurements. This novel method has therefore been proven as useful for occupational safety and health assessments.

3.3 Introduction

Isocyanates are reactive molecules used in the manufacturing of polyurethanes (PURs). PURs are used in a large variety of applications and therefore found in various materials. Aromatic isocyanates, such as toluenediisocyanate (TDI) and 4,4-methylenediphenyldiisocyanate (MDI), are mainly used in the production of insulating foams, flexible foams, glues, and adhesives (Brorson *et al.*, 1991; Cocker, 2007; European Commission, 2005) while aliphatic isocyanates, such as hexamethylenediisocyanate (HDI), are often found in paints (Brorson *et al.*, 1990; Gaines *et al.*, 2010). MDI, TDI, and HDI contain two isocyanate groups ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$) in their structures (Kreis *et al.*, 2019). Isocyanates have the ability of forming polyisocyanate molecules, especially for MDI and HDI. The high reactivity of isocyanate makes them toxic, causing adverse health effects. These compounds can cause skin and eye irritation (Sekizawa et Greenberg, 2000), as well as respiratory sensitization (Cocker, 2007; Thorne *et al.*, 1987) Different acute and chronic effects ranging from dermatitis and irritation of mucous membranes (Cocker, 2007; Rosenberg *et al.*, 2002) to more severe effects on the respiratory system, such as occupational asthma (Bello *et al.*, 2019; Cocker, 2011; Creely *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2017; Marand *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2002), hypersensitivity pneumonitis (Bello *et al.*, 2019; Bhandari *et al.*, 2016; Rosenberg *et al.*, 2002) and reduced lung function (Cocker, 2007) may result from isocyanate exposure.

In order to ensure workplace safety, it is important to properly monitor the exposure to isocyanates by using environmental air monitoring combined with biological monitoring. Environmental monitoring does not allow the real absorbed dose in the body (or exposure) to be evaluated, while biological monitoring can measure all possible routes of exposure. Biological monitoring is essential for the evaluation of personal protective equipment and the contribution of dermal and oral absorption, and also to assess if the workload can be increased for a given individual. It allows

isocyanate exposure to be measured using the known urinary metabolites of each isocyanate as biomarkers of exposure (Cocker, 2011).

Isocyanates absorbed in the body, mainly by inhalation and skin contact, are metabolized through bimolecular conjugation (forming protein and glutathione adducts) or acetylation reactions. The low molecular weight conjugates and acetylated metabolites formed are eliminated into urine (Bhandari *et al.*, 2016; Bolognesi *et al.*, 2001; Gledhill *et al.*, 2005; Sabbioni *et al.*, 2010). Urine samples containing these metabolites must be hydrolyzed to release free amine compounds as biomarkers of exposure (Cocker, 2007; Marand *et al.*, 2004) corresponding to 4,4'-methylenedianiline (MDA), 2,4-toluenediamine (2,4-TDA), 2,6-toluenediamine (2,6-TDA) and hexamethylenediamine (HDA) for MDI, 2,4-TDI, 2,6-TDI, and HDI, respectively.

Recommended values have been established by internationally recognized institutions to evaluate biological biomarkers of exposure to TDI (isomers), MDI, and HDI in urine after an 8-h work shift. The German Research Foundation (DFG) has fixed a biological guidance value (BGV) of hydrolyzed MDA at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\approx 50 \text{ nM}$) for monitoring MDI exposure (DFG, 2016). The American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) has established TDI and HDI biological exposure indices (BEI) values of hydrolyzed TDA (2,4-TDA and 2,6-TDA) and hydrolyzed HDA at $5 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinine ($\approx 20\text{--}125 \text{ nM}$ for a range of 4.4-26.5 mM creatinine) and $15 \mu\text{g g}^{-1}$ creatinine ($\approx 60\text{--}400 \text{ nM}$ for a range of 4.4-26.5 mM creatinine) respectively (ACGIH, 2017).

Multiple methods have been developed for the determination of isocyanate biomarkers using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (Bhandari *et al.*, 2018; Bhandari *et al.*, 2016; Sakai *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (Cocker, 1986). The use of mass spectrometry for detection gives good selectivity and acceptable sensitivity for the analysis of these biomarkers in a complex matrix, such as urine. Various published

methods suggest different strategies to evaluate biomarkers of exposure to isocyanates in human urine. The hydrolysis time proposed can be relatively short, for example 1 h (Cocker, 1986), or rather much longer (16 h) (Marand *et al.*, 2004; Skarping *et al.*, 1994a). The extraction of hydrolyzed compounds in urine samples can be performed using a liquid-liquid extraction (LLE) with toluene (Marand *et al.*, 2004; Skarping *et al.*, 1994a), dichloromethane (Sakai *et al.*, 2002), or ethyl ether (Cocker, 1986), or using a solid-phase extraction (SPE) (Bhandari *et al.*, 2018; Bhandari *et al.*, 2016). Some of these methods also use derivatization of the molecules followed by analysis by GC-MS or LC-MS. These derivatization steps require either a long heating step (Cocker, 1986) or an additional extraction step to remove excess reagent (Marand *et al.*, 2004; Skarping *et al.*, 1994a). To be able to evaluate adequately the biological exposure to isocyanates in the workplace, a method needs to be reliable but also developed considering the recommended values based on worker exposure levels. Published analytical methods have not previously allowed the simultaneous measurement of these four isocyanates biomarkers to monitor occupational exposure based on recommended threshold values (Marand *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a), or have only been developed to assess exposure in the general population (Bhandari *et al.*, 2018; Bhandari *et al.*, 2016). In addition, the published methods have not assessed their performance with an inter-laboratory proficiency program in order to ensure the reliability of the method for occupational safety and health (OSH) requirements. For this purpose, a new and validated quantitative assay has been developed in human urine using a simple solid phase extraction (SPE) and derivatization followed by UPLC-MS/MS analysis, employing multiple reaction monitoring on a triple quadrupole instrument, for assessing isocyanate exposure. The newly developed method was tested with reference samples from the inter-laboratory program provided from the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS).

3.4 Experimental

3.4.1 Chemicals

4,4'-Methylenedianiline (MDA), 1,6-hexamethylenediamine (HDA), 2,4-toluenediamine (2,4-TDA), 2,6-toluenediamine (2,6-TDA), 1,6-diaminohexane-1,1,6,6-d₄ (d₄-HDA), and N,N'-hexamethylene bis(acetamide) (diacetyl-HDA) were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). 2,6-Diaminotoluene- α,α,α -d₃ (2,6-d₃-TDA) and 2,4-Diaminotoluene- α,α,α -d₃ (2,4-d₃-TDA) were purchased from C/D/N isotopes (Pointe-Claire, Canada). 4,4'-Methylenedianiline-[¹⁵N₂, ¹³C] (¹³C¹⁵N₂-MDA) was obtained from IsoScience (Ambler, PA, USA). Acetonitrile (ACN), methanol (MeOH) and water, all LC-MS grade, and ammonium hydroxide (30%, NH₄OH) were all purchased from Fisher Scientific (St-Laurent, Canada) with. Sodium hydroxide (NaOH), sulfuric acid (H₂SO₄), sodium tetraborate decahydrate, acetic anhydride, and LC-MS grade formic acid were also obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA).

3.4.2 Collection of human urine

Non-occupationally exposed human urine was obtained by anonymous donation and kept at 4 °C for less than 30 days as control urine. Inter-laboratory urine samples were provided from the German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS) for analyses in biological materials (Erlangen, Germany). All urine samples used in this work were collected in accordance with IRSST's Research Ethics Committee-validated procedures. Humans were not directly involved in the present study.

3.4.3 Creatinine and density levels

Measurement of creatinine and density levels were evaluated in urine samples the same day. Urinary creatinine was measured by the spectrometric method based on Jaffe's reaction (Sauve *et al.*, 2015). An Architect c4000 system spectrophotometer from Abbott (Abbott Park, IL, USA) was used to perform the analysis. The density

measurements were determined by refractometry (Sauve *et al.*, 2015) with a Densitometer DMA 38 from Anton-Paar (Saint-Laurent, Canada).

3.4.4 Calibration curve solutions

Stock solutions of 500 μM of MDA, $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA, 2,4-TDA, 2,6-TDA, 2,4- d_3 -TDA, and 2,6- d_3 -TDA were prepared in 100% acetonitrile. HDA and d_4 -HDA stocks were prepared in water. Seven working standard solutions of MDA, 2,4-TDA, 2,6-TDA, and HDA were prepared from stocks in water. The first working solution were at 0.2 μM and contained MDA and TDA isomers only. The six other solutions at 0.5, 1, 2, 5, 10, and 20 μM contained all analyte compounds. An internal standard (IS) working solution was prepared at 2 μM for $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA, 2,4- d_3 -TDA, 2,6- d_3 -TDA, and d_4 -HDA. Calibration samples were prepared by adding 10 μL of standard working solution and 10 μL of IS working solution in 180 μL of urine. Final concentrations of MDA and TDA isomers were 10, 25, 50, 100, 250, 500, and 1000 nM (2 - 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MDA and 1.2 - 122 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TDA isomers) while the final concentration for HDA were 25, 50, 100, 250, 500, and 1000 nM (2.9 - 116 $\mu\text{g L}^{-1}$). The final concentration of IS was 100 nM for all compounds (19.8 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MDA, 12.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TDA isomers, and 11.6 $\mu\text{g L}^{-1}$ for HDA).

3.4.5 Sample preparation

IS working solution (10 μL) was spiked into 190 μL of urine, followed by the addition of 200 μL of 3 M sulfuric acid. The mixture was heated at 80 $^\circ\text{C}$ for overnight (≥ 16 h) using a Eppendorf thermomixer (Fisher Scientific, Nepean, Canada) and cooled to room temperature followed by the addition of 200 μL of 5 N NaOH and centrifuge with a Sorvall Legend Micro 21 centrifuge (Fisher Scientific, St-Laurent, Canada) at 20,215 $\times g$ (14,500 rpm) for 3 minutes to remove any insoluble material prior to solid-phase extraction (SPE). SPE were performed using an extraction manifold (with 20 cartridge positions) (Waters, Mississauga, Canada). MCX (30 mg, 1 mL) mixed-mode cation exchange cartridges from Waters (Waters, Dublin, Ireland) were first conditioned with 1 mL of methanol followed by equilibration with 1 mL of water.

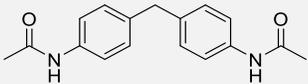
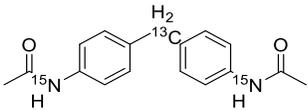
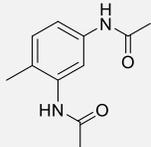
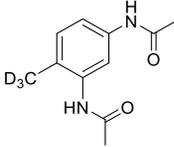
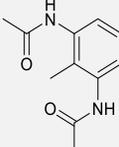
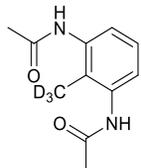
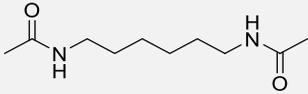
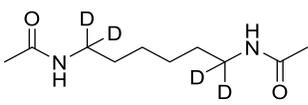
Samples were then loaded on the cartridge, then 1 mL of 2% FA in water followed by 1 mL of methanol were added to wash the cartridge. Samples were eluted using 500 μ L of 5% NH_4OH in 83% methanol and 2 x 500 μ L of 15% NH_4OH in 50% methanol. Eluents were then evaporated to dryness under nitrogen at 60 °C with a TurboVap LV evaporation system (Biotage, Charlotte, NC, USA). Extracts were reconstituted with 198 μ L of borate buffer (50 mM, pH 8.5) and instantly derivatized with the addition of 2 μ L of pure acetic anhydride at room temperature. Samples were finally centrifuged at 20,215 x g (14,500 rpm) for 3 minutes to remove any insoluble material and transferred to a HPLC vial with insert. A hydrolysis test was performed using diacetyl-HDA (commercially available) while diacetyl-MDA and diacetyl-TDA isomers were produced using anhydride acetic derivatization of the free amine versions of each. Urine sample spiked with double acetylated MDA, TDA and HDA, and IS at 5 μ M as final concentration were treated with 200 μ L of 3 M sulfuric acid at 80 °C. Aliquots were taken at 0, 1, 2, 4, 6, and 24 h time points for TDI isomers and MDI metabolites while aliquots were taken at 0, 1, 2, 4, 6, 8, 16, and 24 h for HDI metabolites. Sodium hydroxyde (200 μ L, 5 N) was added to each aliquot prior to the SPE step described above.

3.4.6 LC-MS/MS analysis

Samples were injected (5 μ L) onto an Acquity UPLC HSS T3 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm column (Waters, Dublin, Ireland) using a Waters ACQUITY I-class UPLC. Elution was performed at 40 °C with a flow rate of 0.6 mL min^{-1} using a gradient of water (A) and acetonitrile (B), both containing 0.1% formic acid. The gradient started at 2% B for 1 min, increased first to 17% in 3 min, to 40% in 1.5 min and to 90% in 0.5 min, and held for 1 min. MRM was performed on a Waters Xevo TQ triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) in electrospray positive ion mode. Source parameters were as follows: source and desolvation temperature, respectively of 150 °C and 500 °C, and desolvation flow of nitrogen gas at 1000 L hr^{-1} . MRM transitions and conditions for each compound and internal standard are listed in Table 3.1.

For the hydrolysis, acetylation and extraction efficiency tests, samples (5 μL) were injected onto the same LC conditions described above using a Nexera UHPLC system (Shimadzu, Columbia, MD, USA). A TripleTOF 5600 (quadrupole–time-of-flight) mass spectrometer from Sciex (Concord, Canada) was employed in positive electrospray mode for high-resolution mass spectrometry (HRMS) analysis. Source conditions were as follows: ionspray voltage at 5000 V, temperature of 450 °C, and source gases (GS1 and GS2) both at 50 psi with curtain gas at 30 psi. The general method procedure has been described in previous work published by our group (Lepine *et al.*, 2019).

Table 3.1 Structures of analytes and internal standards with MRM parameters

Analytes	Structure	Cone voltage (V)	Ions transitions, m/z (Collision energy, eV)
MDA-di-Ac		25	283.1 → 106.0 (25) 283.1 → 148.0 (15)
$^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA-di-Ac		25	286.3 → 108.0 (25) 286.3 → 150.0 (15)
2,4-TDA-di-Ac		25	207.1 → 123.0 (25) 207.1 → 165.0 (15)
2,4-d ₃ -TDA-di-Ac		25	210.1 → 126.0 (25) 210.1 → 168.0 (15)
2,6-TDA-di-Ac		25	207.1 → 123.0 (25) 207.1 → 165.0 (15)
2,6-d ₃ -TDA-di-Ac		25	210.1 → 126.0 (25) 210.1 → 168.0 (15)
HDA-di-Ac		20	201.1 → 100.0 (20) 201.1 → 142.0 (15)
d ₄ -HDA-di-Ac		20	205.1 → 104.0 (20) 205.1 → 146.1 (15)

3.4.7 Data analysis

Data were processed using Masslynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA), with automatic peak integration. Curve calibration used a quadratic equation with a weighting of $1/x$. For hydrolysis, acetylation, and extraction efficiency tests, Analyst TF 1.7.1 (Sciex, Framingham, MA, USA) was used for data acquisition and data were processed using PeakView 2.2 (Sciex, Framingham, MA, USA) and MultiQuant 3.0.2 (Sciex, Framingham, MA, USA).

3.4.8 Analytical performance

Analytical performance has been evaluated for each measured isocyanate biomarker. Analytical parameters included limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), precision, accuracy, and recovery. They all have been validated according to the criteria established by the accreditation organization of the American Industrial Hygiene Association (AIHA-LAP LLC). The estimation of LOD and LOQ measurements were based on a signal-to-noise (S/N) ratio of 3 and 10, respectively, using the measurement of 10 replicates of the lowest standard for each compound. The intra-day precision was calculated by analysing on the same day six different samples of four concentrations of 25, 50, 250, and 500 nM ($n = 24$) for MDA and TDA isomers (9.9, 19.8, 49.5, and 99 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MDA, and 3, 6.1, 30.5, and 61 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TDA isomers) and 50, 100, 250, and 500 nM ($n = 24$) for HDA (5.8, 11.6, 29, and 58 $\mu\text{g L}^{-1}$). The inter-day precision was measured on six different days by the analysing of four concentrations of 25, 50, 250, and 500 nM ($n = 24$) for MDA and TDA isomers (9.9, 19.8, 49.5, and 99 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MDA and 3, 6.1, 30.5, and 61 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TDA isomers) and 50, 100, 250, and 500 nM ($n = 24$) for HDA (5.8, 11.6, 29, and 58 $\mu\text{g L}^{-1}$). Method accuracy was evaluated by analysing reference urine samples from the G-EQUAS program. Finally, recovery and matrix effect were evaluated by comparing six replicates at four concentrations levels spiked in urine with replicates spiked in water. The concentrations were set at 25, 50, 250, and 500 nM ($n = 24$) for MDA and TDA isomers (9.9, 19.8, 49.5, and 99 $\mu\text{g L}^{-1}$ for MDA and 3, 6.1, 30.5, and

61 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TDA isomers) and 50, 100, 250, and 500 nM ($n = 24$) for HDA (5.8, 11.6, 29, and 58 $\mu\text{g L}^{-1}$).

3.5 Results and discussion

3.5.1 Sample preparation

3.5.1.1 Acetylation efficiency

A recent method from our lab showed the possibility to determine MDA levels in human urine without derivatization (Lepine *et al.*, 2019). However, 2,4-TDA, 2,6-TDA, and HDA are more polar molecules, making their analysis by reverse-phase LC-MS challenging, especially in a complex matrix as urine. With the objective to simultaneously measure MDA, TDA, and HDA in the same sample, derivatization was necessary to have appropriate chromatographic retention and sensitivity for TDA isomers and HDA. Derivatization also yielded more specific MRM transitions, than would be possible with the underivatized compounds. The reaction with acetic anhydride was investigated since it was known to yield a simple and fast reaction with free amines (Baker *et al.*, 1994), without the need to remove excess of reagent. Analytes were derivatized in a borate buffer pH 8.5 using acetic anhydride. The efficiency of derivatization was evaluated to ensure that all compounds were quantitatively doubly acetylated. High-resolution extracted ion chromatograms, in Figure 3.1, show that only di-acetylated analyte was observed, confirming the efficiency of the derivatization step. No underivatized or mono-derivatized analytes were detected.

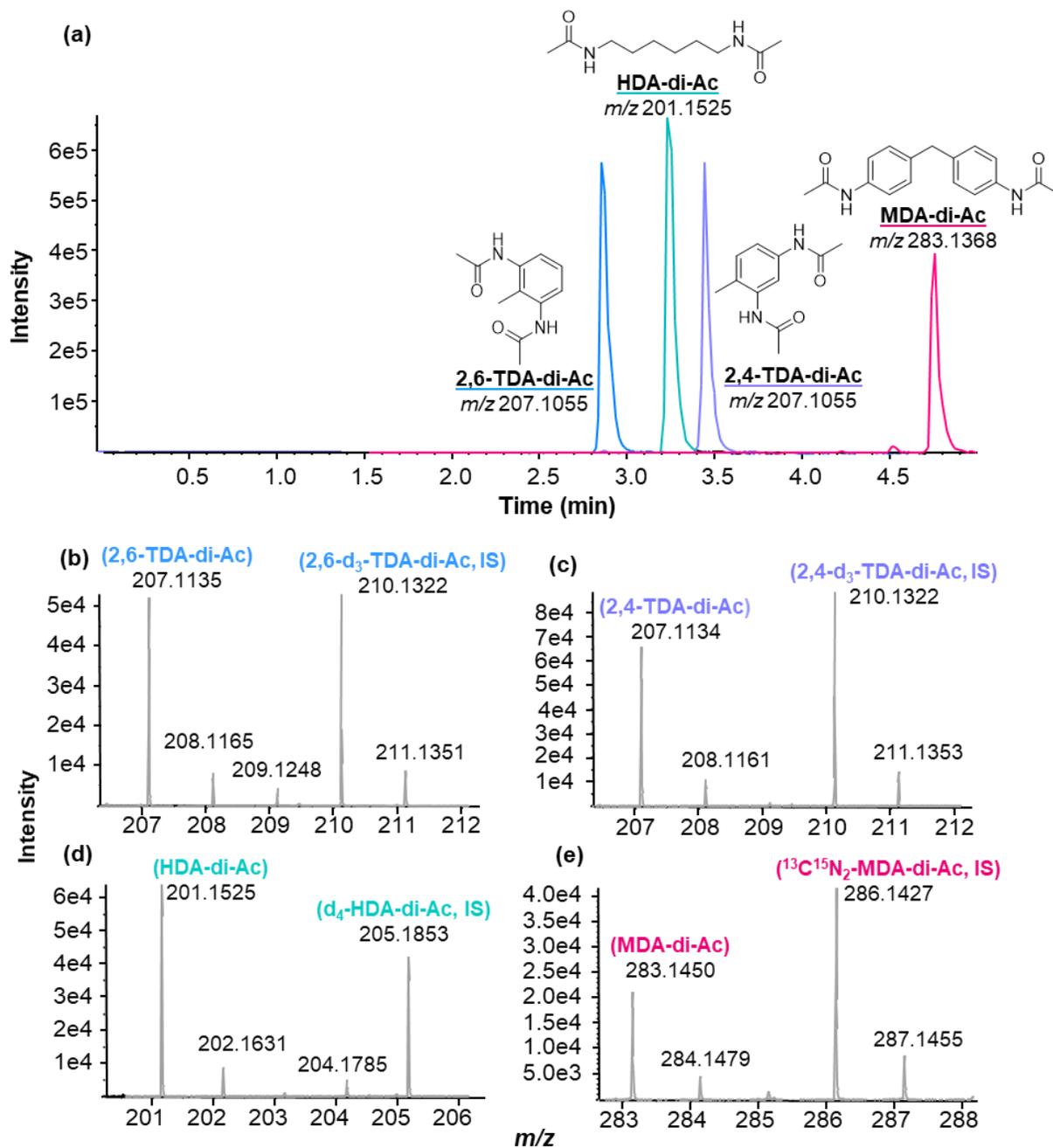


Figure 3.1 High-resolution extracted ion chromatogram of derivatized TDA isomers, HDA and MDA (a), and mass spectra of derivatized 2,6-TDA (b), 2,4-TDA (c), HDA (d), and MDA (e) showing the double acetylation product (measured by high-resolution mass spectrometry)

3.5.1.2 Hydrolysis efficiency

In order to assess isocyanate exposure, biological monitoring is necessary to evaluate the amount absorbed into the body. The conjugates and acetylated metabolites formed *in vivo* after exposure are eliminated in urine. The free amines released after acid hydrolysis serve as biological biomarkers to determine the level of exposure of the parent isocyanate. Hydrolysis efficiency was evaluated using metabolites found in urine after exposure to MDI, HDI, and TDI corresponding to: diacetyl-MDA, diacetyl-HDA, and diacetyl-TDA (Bolognesi *et al.*, 2001; DFG, 2015; Gledhill *et al.*, 2005; Sabbioni *et al.*, 2010; Sepai *et al.*, 1995). The hydrolysis time was varied from 1 to 24 h. After 4 h of hydrolysis at 80 °C, MDI and TDI metabolites were completely hydrolyzed, while 16 h of hydrolysis at 80 °C was necessary to completely hydrolyze HDI metabolites (Figure 3.2). With the objective to have a method to simultaneously measure MDI, TDI isomers, and HDI exposure biomarkers, the hydrolysis step was set at 80 °C for 16 h in order to allow sufficient time to run the method within an 8-h working day for a lab technician; however it is noted here that 4 h would be sufficient for MDI and TDI isomers.

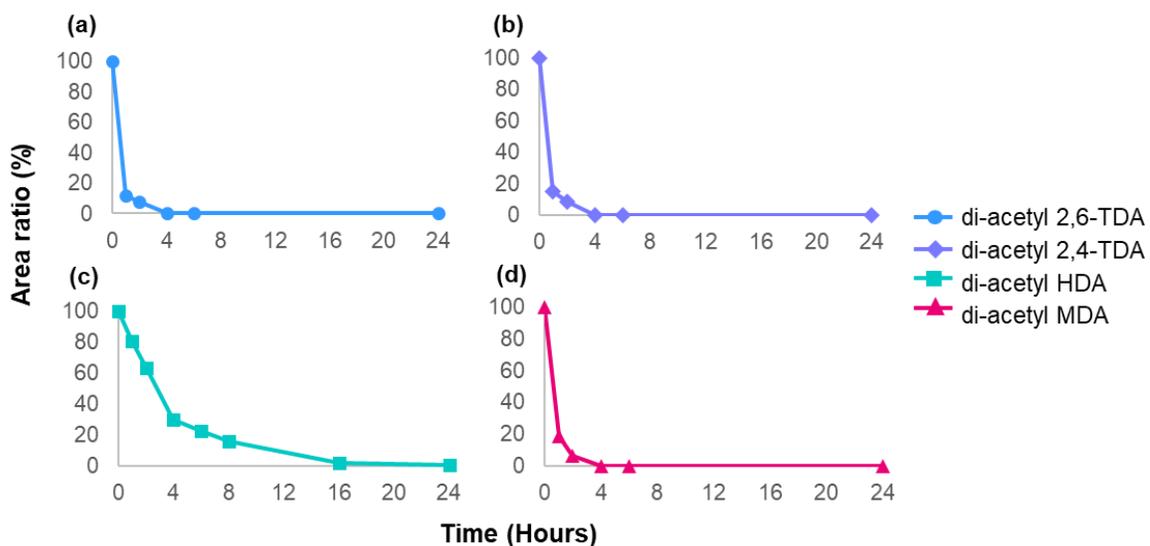


Figure 3.2 Hydrolysis profiles of di-acetylated versions of 2,6-TDA (a), 2,4-TDA (b), HDA (c), and MDA (d) metabolites spiked into urine

3.5.1.3 Extraction efficiency

To extract isocyanate biomarkers from hydrolyzed urine samples, liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) were compared for the four compounds. These preliminary results showed that SPE allowed better extraction efficiency than LLE with toluene for all analytes, especially for HDA with a 50% intensity increase in urine samples. Solid-phase extraction was therefore selected. Elution conditions were tested using a mixed-mode cation exchange polymer-based cartridge (Oasis MCX) with first a relatively low concentration of NH_4OH corresponding to 5% NH_4OH in 83% MeOH. MDA and TDA were well eluted, but only 32% were recovery for HDA (Table 3.2). Increasing the percentage of NH_4OH gave a better recovery for HDA with an increase of 33% but led to a decrease in the recovery for MDA. Indeed, MDA need a higher ratio of organic solution to be well eluted while HDA need a higher ration of basic solution. A double elution has then investigated to provide a compromise for each compound. Analytes were eluted with 500 μL of 5% NH_4OH :83% MeOH followed by 2 x 500 μL 15% NH_4OH :50% MeOH. This double elution allows all analytes to be well recovered in the same extract. A good recovery for MDA, 2,6-TDA, 2,4-TDA, and HDA of 96%, 88%, 83%, and 73% were obtained, respectively (Table 3.2).

Table 3.2 Recovery (%) of solid-phase extraction

Analytes	% Recovery (average \pm SD)		
	5% NH_4OH , 83% MeOH (1.0 mL)	15% NH_4OH , 50% MeOH (1.0 mL)	5% NH_4OH , 83% MeOH + 15% NH_4OH , 50% MeOH (0.5 + 1.0 mL)
MDA	99.3 \pm 4.6	65.7 \pm 3.8	95.5 \pm 0.6
2,6-TDA	82.0 \pm 0.1	83.8 \pm 4.0	87.7 \pm 0.4
2,4-TDA	72.1 \pm 0.1	75.2 \pm 1.7	83.3 \pm 2.4
HDA	32.2 \pm 2.2	65.3 \pm 3.8	73.4 \pm 4.2

3.5.2 LC-MS/MS method development

MRM parameters were optimized for the doubly acetylated MDA, TDA, and HDA protonated molecules as precursor ions. The most intense product ion was chosen for quantitation, and a secondary ion was used for confirmation (Figure 3.3). Chromatographic separation was optimized to ensure retention and minimize matrix effects for the four derivatized analytes. The HSS T3 column showed good chromatographic separation and all analytes were well separated in less than 5 min with a total run time of 8 min including column re-equilibration time (Figure 3.4).

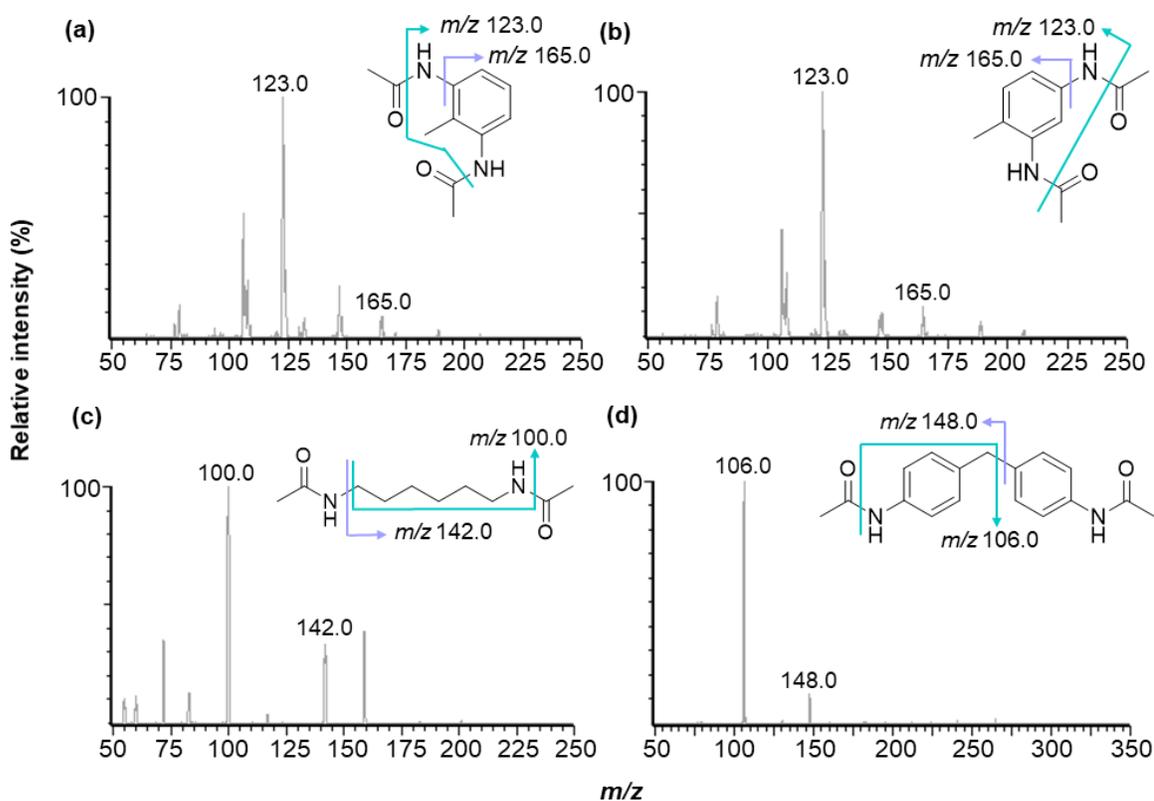


Figure 3.3 MS/MS spectra of di-acetylated 2,6-TDA (a) 2,4-TDA (b), HDA (c), and MDA (d) showing the most intensive ion fragmentation choose for MRM transition

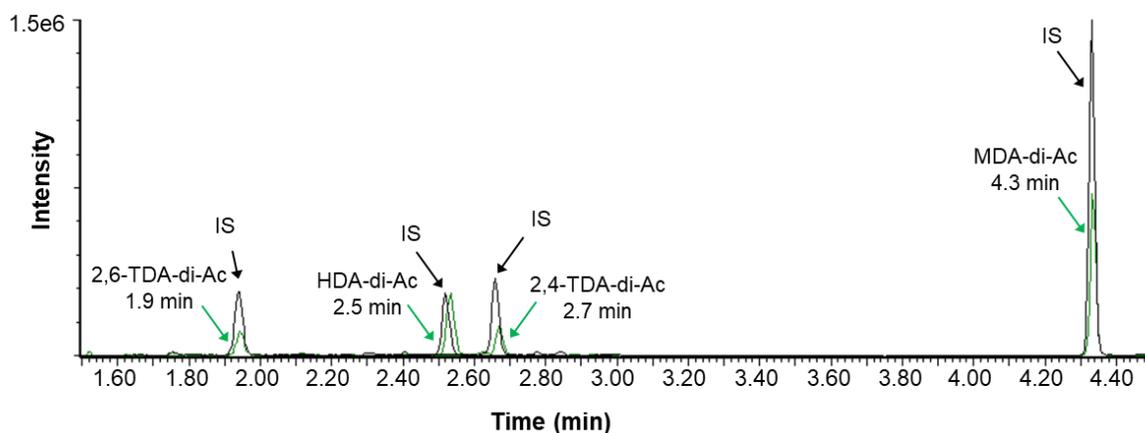


Figure 3.4 Representative LC-MRM chromatograms for sample 62B from the G-EQUAS inter-laboratory program

3.5.3 Analytical parameter validation

3.5.3.1 Dynamic range, LOD/LOQ, and precision

According to the reference exposure values (BGV or BEI) for each compound, the dynamic range was set from 10 to 1000 nM for MDA and TDA isomers, and 25 to 1000 nM for HDA (Table 3.3). Validation parameters were evaluated by using reference samples with known concentrations of MDA, TDA isomers, and HDA. Considering the fact that TDA isomers and HDA have BEI values according to urinary creatinine concentration, a level corresponding to an average creatinine of 12.3 mM was used to evaluate all analytical parameters (Sauve *et al.*, 2015). This value corresponds to an average found for women and men representative of a working population. Coefficients of determination (R^2) for all calibration curves were > 0.99 for each compound. The % accuracy and % CV values of each concentration level for each compound shown in Table 3.4 insured the good reliability of all result. The sensitivity was determined by evaluating the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), based on the method of the AIHA-LAP, LLC accreditation program (American Industrial Hygiene Association Laboratory Accreditation

Programs). Good LOD and LOQ values of less than 5% and 20% BGV/BEI, respectively, were obtained for each of the measured analytes (Table 3.3). Finally, the robustness of the method was also evaluated by the measurement of intra-day and inter-day precisions (Table 3.3).

Table 3.3 Analytical parameters obtained by the method validation

Parameters	MDA	2,6-TDA	2,4-TDA	HDA
Biological guidance value (BGV) or Biological exposure indices (BEI)	10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (≈ 50 nM)	5 $\mu\text{g g}^{-1}$ cr (≈ 20 –125 nM)	5 $\mu\text{g g}^{-1}$ cr (≈ 20 –125 nM)	15 $\mu\text{g g}^{-1}$ cr (≈ 60 –400 nM)
Dynamic range (nM)	10 – 1000	10 – 1000	10 – 1000	25 – 1000
Coefficient of determination (R^2)	> 0.99	> 0.99	> 0.99	> 0.99
Limit of detection (LOD) (n = 10)	2.0 (4.0% BGV)	3.2 (5.6% BEI)	1.8 (3.2% BEI)	5.0 (2.8% BEI)
Limit of quantitation (LOQ) (nM) (n = 10)	6.7 (13.4% BGV)	10.7 (18.8% BEI)	6.2 (10.9% BEI)	16.7 (9.3% BEI)
Intra-day precision (% CV) (n = 24)	1.2	2.5	5.2	3.2
Inter-day precision (% CV) (n = 24)	2.2	5.0	7.5	7.6
% Recovery (average \pm CV)	100.8 \pm 2.6	99.8 \pm 4.6	103.9 \pm 4.6	96.6 \pm 7.1

cr creatinine

Table 3.4 Accuracy (%) and CV (%) values from calibration curves of each compound

Standards (nM)	% accuracy (%CV) (n = 3)			
	MDA	2,6-TDA	2,4-TDA	HDA
10	97.0 (0.3)	94.7 (0.3)	105.3 (0.2)	-
25	99.6 (1.0)	98.7 (2.4)	91.3 (1.5)	116.5 (1.2)
50	102.3 (1.0)	97.5 (2.8)	96.5 (1.3)	87.4 (1.9)
100	102.0 (2.5)	109.9 (6.3)	109.1 (8.9)	91.3 (6.1)
250	100.2 (5.1)	101.1 (10.9)	97.4 (8.8)	97.9 (0.6)
500	98.9 (4.1)	97.1 (6.0)	99.2 (6.4)	103.5 (0.7)
1000	100.2 (1.1)	100.6 (1.8)	100.2 (2.8)	99.4 (1.7)

3.5.3.2 Recovery and matrix effect

It's important to consider the complexity and variability of human urine, as well as all potential interferences during the analysis. Creatinine and density levels were measured to confirm that urine samples were in the acceptance range between 4.4 and 26.5 mM for creatinine and 1.010 and 1.030 g mL⁻¹ for density (ACGIH, 2017). Solid-phase extraction followed by derivatization was employed to reduce potential variability resulting from the biological matrix. An isotopically labeled internal standard was also used for each analyte to minimize the variability in sample preparation and instrumental sensitivity. The matrix effect was evaluated by comparing peak areas in spiked urine and water samples with the same sample preparation (see "Experimental" section). This method is based on the requirement of the AIHA-LAP, LLC accreditation program. A total recovery of 100.8%, 103.9%, 99.8%, and 96.6%, average date of four concentrations levels (see "Experimental" section) was obtained for MDA, 2,4-TDA, 2,6-TDA, and HDA, respectively (Table 3.3).

3.5.3.3 Accuracy (G-EQUAS program)

The accuracy of the method was evaluated using an inter-laboratory reference program provided by the German External Quality Assessment Scheme. The success of this program makes it possible to certify the performances of the sample preparation method, the analysis, and then the quantification of the samples. Three rounds of duplicate control urine samples provided from the G-EQUAS were evaluated. All measured values were in the tolerance range provided by the program (Table 3.5).

LC-MRM chromatograms of a representative control sample (62B) showed the good separation and accuracy obtained for real samples (Figure 4). The success in this test confirms the reliability of our newly developed method. No current published method (Bhandari *et al.*, 2018; Bhandari *et al.*, 2016; Marand *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a) has used this inter-laboratory test to evaluate their method. This step is necessary for OSH requirements, to ensure the method is adequate for OSH practitioners conducting workplace investigations.

Table 3.5 Quantitative results from samples provided by the G-EQUAS program

Samples	MDA		HDA	
	Reference values (tolerance range) (nM)	Measured values (nM)	Reference values (tolerance range) (nM)	Measured values (nM)
59A	31.2 (23.5 – 38.9)	27.8	36.9 (21.9 – 54.2)	34.9
59B	62.8 (49.2 – 76.4)	58.7	75.4 (58.1 – 92.7)	81.7
61A	14.3 (9.4 – 19.1)	11.2	20.3 (10.0 – 30.6)	25.2
61B	69.3 (54.5 – 84.2)	62.9	94.1 (71.2 – 117.1)	98.1
62A	26.7 (19.1 – 34.3)	25.2	37.2 (24.0 – 50.3)	33.0
62B	105.9 (79.6 – 132.3)	107.0	105.0 (83.6 – 126.4)	119.7

Samples	2,6-TDA		2,4-TDA	
	Reference values (tolerance range) (nM)	Measured values (nM)	Reference values (tolerance range) (nM)	Measured values (nM)
59A	15.4 (10.2 – 20.5)	16.8	32.7 (23.4 – 42.1)	40.1
59B	40.8 (29.5 – 52.1)	40.8	72.1 (57.4 – 86.8)	71.4
61A	14.7 (9.2 – 20.1)	14.6	10.1 (6.4 – 20.1)	6.5
61B	72.4 (48.8 – 94.9)	82.0	53.8 (35.9 – 71.7)	45.7
62A	42.8 (30.8 – 58.0)	50.3	44.2 (30.4 – 58.0)	51.6
62B	78.1 (55.3 – 100.9)	91.9	80.1 (59.5 – 100.8)	92.8

3.6 Conclusions

A new method has been developed for the determination of simultaneous aliphatic and aromatic isocyanate exposure in human to evaluate occupationally relevant exposure levels. This method is based on the quantification of urinary biomarkers of MDI, TDI (2,4 and 2,6) and HDI exposure, corresponding to MDA, (2,4- and 2,6-) TDA, and HDA, respectively, and can evaluate all possible route of exposure. The developed method has been validated in order to monitor the biological guidance values established by the DFG for MDA and the biological exposure indices by the ACGIH for TDA isomers and HDA. Sample preparation has been optimized to provide a method with good accuracy, robustness, and reliability. This biological monitoring method is based upon recommended threshold values and can be combined with environmental (air) monitoring to ensure workplace safety.

3.7 References

- ACGIH (2017) *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices*. Cincinnati, OH.
- Baker GB, Coutts RT et Holt A (1994) Derivatization with acetic anhydride: applications to the analysis of biogenic amines and psychiatric drugs by gas chromatography and mass spectrometry. *J Pharmacol Toxicol Methods* 31: 141-148.
- Bello A, Xue Y, Gore R, Woskie S et Bello D (2019) Assessment and control of exposures to polymeric methylene diphenyl diisocyanate (pMDI) in spray polyurethane foam applicators. *Int J Hyg Environ Health* 222: 804-815.
- Bhandari D, Bowman BA, Patel AB, Chambers DM, De Jesus VR et Blount BC (2018) UPLC-ESI-MS/MS method for the quantitative measurement of aliphatic diamines, trimethylamine N-oxide, and beta-methylamino-l-alanine in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1083: 86-92.

- Bhandari D, Ruhl J, Murphy A, McGahee E, Chambers D et Blount BC (2016) Isotope Dilution UPLC-APCI-MS/MS Method for the Quantitative Measurement of Aromatic Diamines in Human Urine: Biomarkers of Diisocyanate Exposure. *Anal Chem* 88: 10687-10692.
- Bolognesi C, Baur X, Marczyński B, Norppa H, Sepai O et Sabbioni G (2001) Carcinogenic risk of toluene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate: epidemiological and experimental evidence. *Crit Rev Toxicol* 31: 737-772.
- Brorson T, Skarping G et Nielsen J (1990) Biological monitoring of isocyanates and related amines. II. Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Int Arch Occup Environ Health* 62: 385-389.
- Brorson T, Skarping G et Sango C (1991) Biological monitoring of isocyanates and related amines. IV. 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed plasma and urine after test-chamber exposure of humans to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 63: 253-259.
- Cocker J (2007) Biological monitoring for isocyanates. *Occup Med (Lond)* 57: 391-393.
- Cocker J (2011) Biological monitoring for isocyanates. *Ann Occup Hyg* 55: 127-131.
- Cocker JG, W. and Wilson, H. K. (1986) Assessment of occupational exposure to 4,4'-diaminophenylmethane (methylene dianiline) by gas chromatography-mass spectrometry analysis of urine. *British Journal of Industrial Medicine* 43: 620-625.
- Creely KS, Hughson GW, Cocker J et Jones K (2006) Assessing isocyanate exposures in polyurethane industry sectors using biological and air monitoring methods. *Ann Occup Hyg* 50: 609-621.
- DFG (2015) *4,4'-Methylene diphenyl diisocyanate (MDI) [101 - 68 - 8] and “ polymeric ” MDI (PMDI) [9016 - 87 - 9]* [MAK Value Documentation, 2008]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,
- DFG (2016) *List of MAK and BAT values 2016: Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area.*
- European Commission (2005) *European Union Risk Assessment Report: Methylenediphenyl diisocyanate (MDI)*. Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy.

- Gaines LG, Fent KW, Flack SL, Thomasen JM, Ball LM, Richardson DB, Ding K, Whittaker SG et Nylander-French LA (2010) Urine 1,6-hexamethylene diamine (HDA) levels among workers exposed to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Ann Occup Hyg* 54: 678-691.
- Gledhill A, Wake A, Hext P, Leibold E et Shiotsuka R (2005) Absorption, distribution, metabolism and excretion of an inhalation dose of [¹⁴C] 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate in the male rat. *Xenobiotica* 35: 273-292.
- Jones K, Johnson PD, Baldwin PEJ, Coldwell M, Cooke J, Keen C, Harding AH, Smith D et Cocker J (2017) Exposure to Diisocyanates and Their Corresponding Diamines in Seven Different Workplaces. *Ann Work Expo Health* 61: 383-393.
- Kreis K, Aumann-Suslin I, Ludeke A, Wegewitz U, Zeidler J et Graf von der Schulenburg JM (2019) Costs of isocyanate-related occupational diseases: A systematic review. *J Occup Environ Hyg* 16: 446-466.
- Lepine M, Sleno L, Lesage J et Gagne S (2019) A validated liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for 4,4'-methylenedianiline quantitation in human urine as a measure of 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate exposure. *Rapid Commun Mass Spectrom* 33: 600-606.
- Marand A, Karlsson D, Dalene M et Skarping G (2004) Determination of amines as pentafluoropropionic acid anhydride derivatives in biological samples using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analyst* 129: 522-528.
- Rosenberg C, Nikkila K, Henriks-Eckerman ML, Peltonen K et Engstrom K (2002) Biological monitoring of aromatic diisocyanates in workers exposed to thermal degradation products of polyurethanes. *J Environ Monit* 4: 711-716.
- Sabbioni G, Dongari N et Kumar A (2010) Determination of a new biomarker in subjects exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Biomarkers* 15: 508-515.
- Sakai T, Morita Y, Kim Y et Tao YX (2002) LC-MS determination of urinary toluenediamine in workers exposed to toluene diisocyanate. *Toxicology letters* 134: 259-264.
- Sauve JF, Levesque M, Huard M, Drolet D, Lavoue J, Tardif R et Truchon G (2015) Creatinine and specific gravity normalization in biological monitoring of occupational exposures. *J Occup Environ Hyg* 12: 123-129.
- Sekizawa J et Greenberg MM (2000) *Diphenylmethane diisocyanate (MDI)*. World Health Organization, Geneva.

- Sepai O, Henschler D et Sabbioni G (1995) Albumin adducts, hemoglobin adducts and urinary metabolites in workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 16: 2583-2587.
- Skarping G, Dalene M et Brunmark P (1994) Liquid-Chromatography and Mass-Spectrometry Determination of Aromatic-Amines in Hydrolyzed Urine from Workers Exposed to Thermal-Degradation Products of Polyurethane. *Chromatographia* 39: 619-623.
- Thorne PS, Hillebrand JA, Lewis GR et Karol MH (1987) Contact sensitivity by diisocyanates: potencies and cross-reactivities. *Toxicology and Applied Pharmacology* 87: 155-165.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La surveillance biologique est une approche complémentaire à la surveillance environnementale dans l'air afin d'évaluer adéquatement l'exposition aux isocyanates. Dans cette étude, des méthodes analytiques pour la quantification des biomarqueurs d'exposition aux isocyanates ont été développées permettant l'évaluation de l'exposition par la surveillance biologique de ces molécules toxiques. Dans un premier temps, une première méthode a été développée afin de quantifier le MDA dans l'urine, soit le biomarqueur d'exposition du MDI (chapitre 2). Une deuxième méthode a ensuite été développée afin de quantifier simultanément les biomarqueurs d'exposition du MDI, HDI et des isomères de TDI, correspondant respectivement aux MDA, HDA et TDA dans l'urine (chapitre 3). Pour ces deux méthodes, un processus de développement de méthode similaire fut appliqué passant par l'optimisation de la préparation des échantillons à l'analyse des échantillons sur UPLC-MS/MS et terminant par une validation de méthode robuste.

Méthode d'analyse du MDA dans l'urine

Lors du développement de cette première méthode (chapitre 2) pour l'analyse du MDA comme biomarqueur d'exposition du MDI, la préparation de l'échantillon a tout d'abord été simplifiée et réduite, comparée aux méthodes analytiques actuelles qui utilisent la dérivation de l'analyte (Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a) ainsi qu'une longue étape d'hydrolyse (Bhandari *et al.*, 2016; Marand *et al.*, 2004;

Peterson *et al.*, 1991; Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a). Le développement de la méthode sur UPLC-MS/MS puis finalement la validation de la méthode a permis l'obtention d'une méthode efficace et robuste pour la quantification du MDA dans l'urine humaine.

L'hydrolyse de tous les métabolites retrouvés dans l'urine suite à une exposition aux isocyanates permet d'obtenir le biomarqueur d'exposition, soit le MDA. Cette étape est donc essentielle et doit être adéquatement optimisée lors de la préparation des échantillons. Toutefois, l'optimisation de cette dernière a révélé la dégradation du standard interne choisi initialement correspondant au d_8 -MDA (Figure 2.1). Dans cette méthode d'analyse, l'utilisation d'un standard interne est nécessaire puisqu'il permet de corriger le recouvrement et ainsi permettre une quantification adéquate de l'analyte présent dans l'échantillon (Zhang et Zhou, 2007). Comme le standard interne permet d'obtenir de meilleurs résultats, il représente donc une composante essentielle dans le développement de cette méthode.

La stabilité de trois différents standards interne, soit-le: d_8 -MDA, d_2 -MDA et $^{13}C^{15}N_2$ -MDA (Figure 2.1), a donc été évaluée afin de choisir le bon standard interne pour la méthode. La figure 2.2A révèle la bonne stabilité du d_2 -MDA et du $^{13}C^{15}N_2$ -MDA alors qu'une perte des deutériums sur le cycle aromatique est plutôt observée pour le d_8 -MDA. Différents tests ont permis d'émettre une hypothèse sur le phénomène de dégradation observé pour le standard interne d_8 -MDA (figures 2.2B et 2.2C). En effet, la perte de deutérium serait liée à la protonation de l'amine lors de l'étape d'hydrolyse. Ce standard interne possède quatre atomes de deutérium situés en position ortho des groupes amines sur les cycles aromatiques (Figure 2.1). En condition acide, les deutériums deviendraient labiles et par effet de résonance seraient remplacés par des atomes d'hydrogène. L'étape d'hydrolyse nécessite de fortes conditions acides afin d'assurer l'hydrolyse de tous les métabolites retrouvés dans l'urine. Toutefois, dans ces conditions, le standard d_8 -MDA n'est pas stable et se dégrade jusqu'à la perte complète de ces deutériums pour ainsi former du MDA. Ce phénomène peut alors causer de l'interférence directement avec l'analyte lors de

cette analyse. Comme le choix d'un bon standard interne est primordial, le $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ -MDA a été choisi en raison de la différence de masse de 3 Da de son poids moléculaire avec l'analyte d'intérêt, le MDA, offrant ainsi moins de potentiel d'interférence.

La sélection d'un standard interne stable a permis ensuite d'optimiser le temps d'hydrolyse. Dans le but d'évaluer adéquatement cette étape, le 4',4'-méthylènebis (acetanilide) (Figure 2.1), un métabolite retrouvé dans l'urine et commercialement disponible a été utilisé afin de fournir une méthode efficace et sensible à l'analyse du MDA. Contrairement aux différentes méthodes publiées dans la littérature qui proposent un temps d'hydrolyse entre 4 heures et 16 heures (Bhandari *et al.*, 2016; Skarping *et al.*, 1994a), il a plutôt été établi qu'une hydrolyse complète des métabolites du MDI dans l'urine se produit après une heure à 100°C.

Suite à l'hydrolyse, le MDA et son standard interne doivent être extraits de l'urine afin d'être analysés sur UPLC-MS/MS. L'étape d'extraction a donc également été optimisée afin d'extraire efficacement ces molécules de l'urine dans le but d'obtenir une bonne sensibilité. L'utilisation du toluène comme solvant d'extraction est un avantage en comparaison au dichlorométhane lors d'une extraction liquide-liquide, puisqu'il se retrouve à la phase supérieure. Le transfert de la phase organique se fait alors plus aisément. Cet aspect est à prendre en considération sachant que la méthode sera appliquée à l'analyse de petits à de moyens lots d'échantillons.

Cette méthode a finalement été optimisée afin de faciliter les manipulations tout en ayant une méthode plus écologique que celles précédentes (Marand *et al.*, 2004; Peterson *et al.*, 1991; Robert *et al.*, 1995; Sakai *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a). En réduisant le volume initial de l'urine de 1 mL à 200 μL , il a été possible de limiter l'utilisation de solvant de sorte que l'extraction se fait au moyen de 400 μL au lieu de 2 mL. De plus, il a également été possible de rendre la méthode plus pratique en utilisant des tubes en polypropylène de 1,5 mL au lieu de tubes en verre plus grand. La préparation des échantillons a ainsi été optimisée de sorte qu'elle soit rapide,

efficace et facile d'utilisation considérant son application pour une analyse routinière en laboratoire.

Le développement de la méthode sur le UPLC-MS/MS est un aspect tout aussi important que la préparation des échantillons. Une bonne séparation chromatographique ainsi qu'une bonne méthode MRM permettent de bien analyser et de quantifier le MDA contenu dans les échantillons. La Figure 2.3A illustre l'ion précurseur choisi pour la méthode MRM, ce fragment se résulte par la perte d'un groupement aniline sur la molécule de MDA. Cette fragmentation est spécifique au MDA et apporte ainsi une bonne sélectivité pour l'analyse des échantillons. La séparation chromatographique avec l'utilisation de l'acide acétique dans la phase organique (méthanol) et la phase aqueuse (eau) permet quant à elle l'obtention d'une élution du MDA à 1.17 min. La méthode développée par UPLC-MS/MS est à la fois efficace et rapide pour l'analyse du MDA.

Afin d'assurer la fiabilité et la robustesse de la méthode, cette dernière a été validée selon des critères bien précis émis par le programme d'accréditation de l'AIHA-LAP, LLC. Les différents paramètres analytiques ont ainsi été déterminés afin d'évaluer la sensibilité, la précision, la justesse et l'exactitude ainsi que la récupération. Dans l'optique d'évaluer la surveillance biologique suite à une exposition au MDI, la méthode a tout d'abord été développée en considérant la BGV de 50 nM (Figure 2.3D) émise par la fondation allemande pour la recherche (DFG, 2016). La gamme de concentration entre 5 nM (Figure 2.3C) et 500 nM établis permet ainsi de couvrir adéquatement des concentrations allant de 10 à 1000% de la BGV. Il est alors possible d'évaluer par rapport à cette valeur cible de très faibles concentrations, mais également des concentrations plus élevées. Pour chacun des standards de concentration utilisés pour la courbe de calibration, les coefficients de variance et la précision ont été évalués afin de démontrer la fiabilité des résultats (Tableau 2.2). De plus, les courbes de calibration mesurées avec cette méthode obtiennent toutes un bon coefficient de détermination (R^2) supérieur à 0.998, soit supérieur au critère d'acceptabilité émis par l'IRSST de 0,990 (Tableau 2.1).

Une LDM de 0.8 nM (1.6% de la BGV) ainsi qu'une LDQ de 2.7 nM (5.4% de la BGV) obtenus permettent de confirmer la bonne sensibilité de la méthode (Tableau 2.1). Cette sensibilité permet également de confirmer qu'il est possible d'analyser le MDA sans l'utilisation de la dérivation contrairement à certaines méthodes publiées dans la littérature (Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a). La dérivation est en général une approche utilisée permettant de donner une meilleure sensibilité. Dans le cas présent, la sensibilité obtenue permet de quantifier une concentration en MDA correspondant à 5,4% de la BGV ce qui est largement suffisant pour l'évaluation de l'exposition biologique (Tableau 2.1). Les mesures de répétabilité et de réplicabilité ont permis de confirmer la précision de cette méthode analytique en révélant un faible coefficient de variance correspondant à environ 4%. De plus, lors de l'évaluation de la récupération, une valeur de 95% fut obtenue (Tableau 2.1).

Finalement afin d'assurer l'exactitude et la justesse de la méthode, cette dernière a été soumise à un programme inter-laboratoire, le G-EQUAS. La Figure 2.3D est un exemple d'analyse représentant un échantillon de ce programme. Ce programme a permis de révéler la fiabilité de la méthode pour des échantillons d'urine (Tableau 2.3).

Méthode d'analyse du MDA, HDA et des isomères de TDA dans l'urine

La deuxième méthode développée (chapitre 3) permet plutôt l'analyse simultanément des isocyanates aromatiques et aliphatiques dans l'urine. Tous les paramètres analytiques ont été optimisés pour l'analyse du MDA, HDA et des isomères de TDA. L'utilisation de la dérivation en plus d'une extraction en phase solide étaient essentielle pour le développement d'une méthode sensible et spécifique pour chacune des molécules. Le développement de la méthode sur le UPLC-MS/MS a été optimisé pour les quatre molécules d'intérêts. La validation de la méthode, également pour chacune des molécules, a finalement permis l'obtention

d'une méthode efficace et robuste pour la quantification du MDA, HDA et des isomères de TDA comme biomarqueur d'exposition du MDI, HDI et des isomères de TDI, respectivement.

Bien que le HDA, le MDA et les isomères de TDA soient tous classés comme des diisocyanates, ils possèdent respectivement des propriétés physico-chimiques différentes. Le développement de la première méthode d'analyse (chapitre 2) a permis de démontrer la possibilité d'analyser le MDA sans l'utilisation de la dérivation. Néanmoins, le HDA et les isomères de TDA sont des molécules plus polaires que le MDA rendant ainsi leurs analyses sur UPLC-MS/MS très difficile et encore plus considérant qu'ils seront analysés dans une matrice complexe telle que l'urine. Comme ils possèdent également des poids moléculaires plus petits que le MDA, la détection par spectrométrie de masse est moins spécifique pouvant ainsi entraîner une perte d'intensité lors de l'analyse. Dans le but d'avoir une méthode regroupant l'analyse des biomarqueurs d'exposition du MDI, TDI et HDI dans un même échantillon, la dérivation des composés est nécessaire afin d'obtenir une bonne sensibilité ainsi qu'une bonne séparation chromatographique sur le UPLC-MS/MS. Les différentes méthodes dans la littérature, basant leur analyse sur la dérivation des biomarqueurs, proposent de longues étapes de dérivation pour l'analyse par chromatographie liquide du MDA, HDA et des isomères de TDA. En effet, ces étapes nécessitent toutes une étape d'extraction supplémentaire afin de retirer l'excédent de réactif (Marand *et al.*, 2004; Rosenberg *et al.*, 2002; Skarping *et al.*, 1994a). C'est pourquoi la réaction avec de l'anhydride acétique a plutôt été investiguée afin de dériver les composés par l'ajout d'un groupement acétyle sur chacun des deux amines (Baker *et al.*, 1994). Cette réaction n'implique qu'une seule étape, soit l'ajout du réactif à l'échantillon, permettant ainsi une dérivation simple et rapide des analytes. Afin de garantir la bonne efficacité de la dérivation, cette étape a été évaluée. Il a été montré que les analytes étaient tous doublement acétylés et qu'aucune molécule mono-acétylée ou non dérivé n'est observée (Figure 3.1).

L'hydrolyse est une étape clé afin de quantifier les biomarqueurs d'exposition aux isocyanates dans l'urine. L'optimisation du temps d'hydrolyse a été effectuée au moyen des métabolites retrouvés dans l'urine après une exposition au MDI, HDI et TDI correspondant respectivement au diacétyle-MDA, au diacétyle-HDA ainsi qu'au diacétyle-TDA. Un temps d'hydrolyse de 4 heures à 80°C a été mesuré pour le TDA et le MDA alors que 16 heures à 80°C ont plutôt été observées pour le HDA. Dans l'optique d'avoir une méthode qui sera utilisée dans le cadre d'analyse routinière en laboratoire, le temps d'hydrolyse a été fixé à 16 heures afin de laisser suffisamment de temps au technicien de réaliser les manipulations dans un quart de travail de 8 heures.

Afin d'extraire les biomarqueurs hydrolysés de l'urine, l'extraction en phase solide a été sélectionnée. La SPE apporte une meilleure efficacité d'extraction que l'extraction liquide-liquide spécifiquement pour le TDA et le HDA. En effet, comme ces composés sont plus polaires, l'extraction au moyen de solvant organique est moins efficace. Ainsi, l'optimisation par SPE a permis d'obtenir une bonne récupération pour tous les analytes correspondant à 96%, 88%, 83% et 73% respectivement pour le MDA, 2,6-TDA, 2,4-TDA et HDA (Tableau 3.2). Au cours de ce processus d'optimisation, il a été démontré que le MDA nécessite un ratio plus élevé de solution organique pour être bien élué, alors que le HDA nécessite plutôt un ratio plus élevé en solution basique (Tableau 3.2). C'est pourquoi les analytes sont élués au moyen d'une double élution afin d'obtenir un bon compromis pour chacune des molécules. L'élution se fait tout d'abord avec un ratio plus élevé en solution organique correspondant à une solution de méthanol basique composé de 5% NH₄OH: 83% MeOH suivi d'une seconde solution en méthanol basique toutefois composé d'un ratio en solution basique plus élevé correspondant à 15% NH₄OH: 50% MeOH.

Une bonne séparation chromatographique ainsi qu'une méthode MRM spécifique à chacune des molécules permettent une analyse et une quantification adéquate des analytes. Cette partie du développement d'une méthode analytique est un aspect

très important notamment lorsque plus d'un composé est analysé dans une même méthode. Le Tableau 3.1 et la Figure 3.2 révèlent les fragments produits les plus intenses choisis pour le développement de la méthode MRM. Pour chacun des ions précurseurs, soit le TDA, le HDA et le MDA dérivés par acétylation, l'ion produit le plus intense est choisi pour la quantification alors que le deuxième ion le plus intense pour la confirmation. La séparation chromatographique a ensuite été optimisée afin de donner un bon temps de rétention pour chacune des molécules permettant ainsi de réduire les effets de matrice pouvant être engendrés par l'urine. L'utilisation de la colonne HSS T3 ainsi que de l'acide formique dans la phase aqueuse (eau) et la phase organique (acétonitrile) a permis de séparer tous les analytes en moins de 5 minutes.

Dans le but d'assurer la fiabilité et la robustesse de la méthode, la validation de cette dernière a été effectuée pour chacune des molécules analysées, soit le MDA, le HDA, le 2,6-TDA ainsi que le 2,4-TDA. Les différents paramètres analytiques ont été validés selon des critères précis émis par le programme d'accréditation de l'AIHA-LAP, LLC d'une méthode. Les résultats obtenus pour chacun des paramètres ont permis de confirmer l'efficacité de la méthode développée.

Afin d'avoir une méthode qui sera employée pour l'évaluation de l'exposition aux isocyanates en milieu de travail, il est important que cette dernière soit développée considérant les différentes limites d'exposition recommandées (BGV et BEI). Il est essentiel de considérer que la valeur cible pour les isomères de TDA et le HDA, soit la BEI, sont donnés en fonction de la créatinine. Ainsi, puisque la méthode est développée dans le but d'évaluer la surveillance biologique suite à une exposition aux isocyanates, la valeur cible doit être bien prise en considération. Lors de l'analyse des différents paramètres analytiques, un niveau correspondant à une créatinine moyenne de 12,3 mM a été utilisé. Ce niveau de créatinine est une moyenne pour les hommes et les femmes représentant une population de travailleur (Sauve *et al.*, 2015). Une gamme de concentration allant de 10 à 1000 nM a donc été choisie pour les isomères de TDA et pour le MDA alors qu'une gamme de

concentration de 25 nM à 1000 nM a plutôt été sélectionnée pour le HDA. Le Tableau 3.2 regroupe les différents paramètres analytiques obtenus pour chacun des composés. Toutes les courbes de calibration mesurées pour chacun des différents analytes ont obtenu un coefficient de détermination (R^2) supérieur à 0.990 correspondant au critère d'acceptabilité de l'IRSST (Tableau 3.2). De plus, pour démontrer la fiabilité des résultats, les coefficients de variance et la précision ont été évalués pour chacune des concentrations standard (Tableau 3.4).

Une quantification précise et pouvant aller à de faibles concentrations par rapport aux valeurs d'exposition recommandées est nécessaire afin de permettre une bonne évaluation des concentrations en isocyanates absorbées. La sensibilité de la méthode a été montrée par la mesure de la LDM et de la LDQ. Ces paramètres analytiques ont révélé une quantification de moins de 20% de la valeur recommandée (BEI/BGV) et une détection des analytes de moins de 5% de cette même valeur (Tableau 3.3). Les mesures de précision dans une même journée et sur plusieurs jours ont quant à eux permis de confirmer la bonne précision analytique pour tous les analytes avec un faible coefficient de variance en dessous de 8% pour chacun (Tableau 3.3). La méthode permet de mesurer des échantillons avec précision pouvant aller à des concentrations nettement plus faibles que les valeurs recommandées.

Dans ce développement de méthode, il est également important de considérer la grande complexité et la variabilité retrouvée dans les différents échantillons d'urine. Cet aspect est à prendre en considération puisqu'il peut provoquer une mauvaise analyse des composés. Pour réduire le potentiel d'interférence lors des analyses, il est essentiel de mesurer les niveaux de créatinine afin de confirmer que ces derniers sont dans les limites tolérées. La valeur de créatinine doit être entre 4.4 et 26.5 mM alors que le niveau de densité doit être entre 1.010 et 1.030 g/mL (ACGIH, 2017). Cette méthode est basée sur une extraction en phase solide suivie d'une dérivation des biomarqueurs. Ces préparations d'échantillons choisis permettent de réduire la variabilité des échantillons d'urine. De plus, l'utilisation d'un standard interne

respectif à chacun des composés permet de minimiser la variabilité lors de la préparation des échantillons. Avec les différentes précautions utilisées, il est possible d'assurer la stabilité des échantillons. Une bonne récupération de 100.8 %, 103.9 %, 99.8 % et 96.6 % respectivement pour le MDA, le 2,4-TDA, le 2,6-TDA et le HDA a été obtenue (Tableau 3.3).

Finalement, la robustesse de cette méthode se base sur l'évaluation des échantillons provenant du programme inter-laboratoire G-EQUAS (Tableau 3.5). Les résultats obtenus permettent de montrer l'exactitude et la justesse de la méthode. Il est alors possible d'assurer des résultats de qualité lors de la quantification des biomarqueurs d'exposition du MDI, HDI et des isomères de TDI simultanément dans un échantillon d'urine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les isocyanates sont des molécules très toxiques pouvant avoir de graves répercussions sur la santé des travailleurs œuvrant dans l'industrie du PU. Il est donc essentiel d'avoir une méthode adéquate pour l'évaluation de la dose réelle absorbée dans l'organisme. L'objectif de ce projet vise le développement d'une méthode d'analyse pour la quantification des biomarqueurs d'exposition des isocyanates dans l'urine.

Au cours de cette étude, deux méthodes robustes et efficaces ont été développées pour la surveillance biologique des isocyanates. Ces méthodes reposent sur la quantification des biomarqueurs urinaires de l'exposition au MDI, au TDI (2,4 et 2,6) et au HDI, correspondant respectivement au MDA, au TDA (2,4 et 2,6) et au HDA, permettant d'évaluer toutes les voies d'absorption possible dans le corps humain. Une première méthode a été développée permettant l'analyse du MDA comme biomarqueur d'exposition du MDI dans l'urine et une seconde pour l'analyse des biomarqueurs d'exposition des isocyanates aromatiques et aliphatiques (TDA, MDA et HDA) dans l'urine humaine.

En se basant sur les différentes méthodes publiées dans la littérature, il a été possible d'optimiser une nouvelle préparation d'échantillon et une analyse sur UPLC-MS/MS simple, rapide et efficace pour la quantification des biomarqueurs d'exposition aux isocyanates. La validation de chacune des deux méthodes a permis de démontrer la robustesse et l'efficacité de ces méthodes développées. Ces dernières se sont révélées sensibles, précises et fiables pour l'analyse du MDA, HDA et des isomères de TDA dans une matrice complexe telle que l'urine. L'utilisation d'un programme inter-laboratoire dans le processus de validation de ces

deux méthodes est un avantage puisqu'il permet de démontrer la capacité de ces méthodes à produire des résultats de qualité afin de quantifier adéquatement les biomarqueurs d'exposition biologique des isocyanates dans l'urine.

L'IRSST procède depuis plusieurs années à différente analyse en milieu de travail afin d'évaluer la surveillance environnementale dans l'air des isocyanates. Toutefois, au Québec, aucune méthode n'est disponible afin d'évaluer la surveillance biologique des isocyanates. Il est alors présentement impossible d'évaluer adéquatement tous les aspects d'une exposition aux isocyanates. Ces nouvelles méthodes développées pour l'évaluation de l'exposition biologique sont basées sur les valeurs limites d'exposition recommandées par des institutions reconnues internationalement. C'est donc un avantage puisqu'il est possible de les appliquer à l'évaluation de l'exposition professionnelle en milieu de travail.

Ces deux méthodes validées et publiées seront ainsi implantées à l'IRSST afin d'offrir un service d'évaluation de la surveillance biologique en milieu de travail. Les professionnels de la santé pourront alors évaluer adéquatement le risque engendré par chacun des travailleurs lors d'une exposition. Il est important de considérer qu'au Québec, environ 25% des cas d'asthme professionnel sont causés par l'exposition aux isocyanates en plus de plusieurs autres effets néfastes sur la santé. Il est donc très important d'évaluer tous les aspects de l'exposition à ces différentes molécules toxiques. La combinaison de la surveillance biologique à la surveillance environnementale va permettre d'assurer la protection des travailleurs. Il sera alors possible de s'assurer que les travailleurs sont bien protégés et dans le cas contraire d'implanter de nouvelles stratégies de protection afin de réduire les impacts engendrés sur la santé suite à une exposition aux isocyanates.

BIBLIOGRAPHIE

- ACGIH (2017) *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices*. Cincinnati, OH.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (2017) *Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices*. Cincinnati, OH.
- Baker GB, Coutts RT et Holt A (1994) Derivatization with acetic anhydride: applications to the analysis of biogenic amines and psychiatric drugs by gas chromatography and mass spectrometry. *J Pharmacol Toxicol Methods* 31: 141-148.
- Bello A, Xue Y, Gore R, Woskie S et Bello D (2019) Assessment and control of exposures to polymeric methylene diphenyl diisocyanate (pMDI) in spray polyurethane foam applicators. *Int J Hyg Environ Health* 222: 804-815.
- Bello D, Herrick CA, Smith TJ, Woskie SR, Streicher RP, Cullen MR, Liu Y et Redlich CA (2007) Skin exposure to isocyanates: reasons for concern. *Environ Health Perspect* 115: 328-335.
- Bhandari D, Bowman BA, Patel AB, Chambers DM, De Jesus VR et Blount BC (2018) UPLC-ESI-MS/MS method for the quantitative measurement of aliphatic diamines, trimethylamine N-oxide, and beta-methylamino-L-alanine in human urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1083: 86-92.
- Bhandari D, Ruhl J, Murphy A, McGahee E, Chambers D et Blount BC (2016) Isotope Dilution UPLC-APCI-MS/MS Method for the Quantitative Measurement of Aromatic Diamines in Human Urine: Biomarkers of Diisocyanate Exposure. *Anal Chem* 88: 10687-10692.
- Bolognesi C, Baur X, Marczynski B, Norppa H, Sepai O et Sabbioni G (2001) Carcinogenic risk of toluene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate: epidemiological and experimental evidence. *Crit Rev Toxicol* 31: 737-772.

- Brorson T, Skarping G et Nielsen J (1990) Biological monitoring of isocyanates and related amines. II. Test chamber exposure of humans to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Int Arch Occup Environ Health* 62: 385-389.
- Brorson T, Skarping G et Sango C (1991) Biological monitoring of isocyanates and related amines. IV. 2,4- and 2,6-toluenediamine in hydrolysed plasma and urine after test-chamber exposure of humans to 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 63: 253-259.
- Caira MR et Ionescu C (2006) *Drug metabolism: current concepts*. Springer Science & Business Media,
- Cocker J (2007) Biological monitoring for isocyanates. *Occup Med (Lond)* 57: 391-393.
- Cocker J (2011) Biological monitoring for isocyanates. *Ann Occup Hyg* 55: 127-131.
- Cocker JG, W. and Wilson, H. K. (1986) Assessment of occupational exposure to 4,4'-diaminophenylmethane (methylene dianiline) by gas chromatography-mass spectrometry analysis of urine. *British Journal of Industrial Medicine* 43: 620-625.
- Creely KS, Hughson GW, Cocker J et Jones K (2006) Assessing isocyanate exposures in polyurethane industry sectors using biological and air monitoring methods. *Ann Occup Hyg* 50: 609-621.
- Dalene M, Skarping G et Brorson T (1990) Chromatographic determination of amines in biological fluids with special reference to the biological monitoring of isocyanates and amines. IV. Determination of 1,6-hexamethylenediamine in human urine using capillary gas chromatography and selective ion monitoring. *J Chromatogr* 516: 405-413.
- DFG (2015) 4,4' - Methylene diphenyl diisocyanate (MDI) [101 - 68 - 8] and “ polymeric ” MDI (PMDI) [9016 - 87 - 9] [MAK Value Documentation, 2008]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA,
- DFG (2016) *List of MAK and BAT values 2016: Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area.*
- European Commission (2005) *European Union Risk Assessment Report: Methylenediphenyl diisocyanate (MDI)*. Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy.
- Gaines LG, Fent KW, Flack SL, Thomasen JM, Ball LM, Richardson DB, Ding K, Whittaker SG et Nylander-French LA (2010) Urine 1,6-hexamethylene diamine

- (HDA) levels among workers exposed to 1,6-hexamethylene diisocyanate (HDI). *Ann Occup Hyg* 54: 678-691.
- Gledhill A, Wake A, Hext P, Leibold E et Shiotsuka R (2005) Absorption, distribution, metabolism and excretion of an inhalation dose of [¹⁴C] 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate in the male rat. *Xenobiotica* 35: 273-292.
- Gross JH (2011) *Mass Spectrometry- A Textbook*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Hoffmann ED et Stroobant V (2007) *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, England.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) (1979) *Some monomers, plastics and synthetic elastomers, and acrolein*. Lyon : International Agency for Research on Cancer, France.
- Jones K, Cocker J et Piney M (2013) Isocyanate exposure control in motor vehicle paint spraying: evidence from biological monitoring. *Ann Occup Hyg* 57: 200-209.
- Jones K, Johnson PD, Baldwin PEJ, Coldwell M, Cooke J, Keen C, Harding AH, Smith D et Cocker J (2017) Exposure to Diisocyanates and Their Corresponding Diamines in Seven Different Workplaces. *Ann Work Expo Health* 61: 383-393.
- Kreis K, Aumann-Suslin I, Ludeke A, Wegewitz U, Zeidler J et Graf von der Schulenburg JM (2019) Costs of isocyanate-related occupational diseases: A systematic review. *J Occup Environ Hyg* 16: 446-466.
- Labrecque M, Malo JL, Alaoui KM et Rabhi K (2011) Medical surveillance programme for diisocyanate exposure. *Occup Environ Med* 68: 302-307.
- Lee MS et Zhu M (2011) *Mass spectrometry in drug metabolism and disposition*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Lepine M, Sleno L, Lesage J et Gagne S (2019) A validated liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for 4,4'-methylenedianiline quantitation in human urine as a measure of 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate exposure. *Rapid Commun Mass Spectrom* 33: 600-606.
- Lind P, Dalene M, Tinnerberg H et Skarping G (1997) Biomarkers in hydrolysed urine, plasma and erythrocytes among workers exposed to thermal degradation products from toluene diisocyanate foam. *Analyst* 122: 51-56.

- Marand A, Karlsson D, Dalene M et Skarping G (2004) Determination of amines as pentafluoropropionic acid anhydride derivatives in biological samples using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analyst* 129: 522-528.
- Meredith SK, Bugler J et Clark RL (2000) Isocyanate exposure and occupational asthma: a case-referent study. *Occup Environ Med* 57: 830-836.
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) (1978) *Criteria for a recommended standard occupational exposure to diisocyanates*. US Department of Health, Education, and Welfare, Cincinnati, OH.
- NIOSH (1978) *Criteria for a recommended standard occupational exposure to diisocyanates*. US Department of Health, Education, and Welfare, Cincinnati, OH.
- Pauluhn J, Brown WE, Hext P, Leibold E et Leng G (2006) Analysis of biomarkers in rats and dogs exposed to polymeric methylenediphenyl diisocyanate (pMDI) and its glutathione adduct. *Toxicology* 222: 202-212.
- Peterson JC, Estiva EC, Lyttle DS et Harris RM (1991) High-performance liquid chromatographic determination of 4,4'-methylenedianiline in human urine. *J Chromatogr* 564: 205-212.
- Reisser M, Schmidt BF et Brown WE (2002) Synthesis, characterization, and solvolysis of mono- and bis-S-(glutathionyl) adducts of methylene-bis-(phenylisocyanate) (MDI). *Chem Res Toxicol* 15: 1235-1241.
- Robert A, Ducos P et Francin JM (1995) Determination of urinary 4,4'-methylenedianiline and its acetylated metabolites by solid-phase extraction and HPLC analysis with UV and electrochemical detection. *Int Arch Occup Environ Health* 68: 44-51.
- Rosenberg C, Nikkila K, Henriks-Eckerman ML, Peltonen K et Engstrom K (2002) Biological monitoring of aromatic diisocyanates in workers exposed to thermal degradation products of polyurethanes. *J Environ Monit* 4: 711-716.
- Rosenberg C et Savolainen H (1986) Determination in urine of diisocyanate-derived amines from occupational exposure by gas chromatography-mass fragmentography. *Analyst* 111: 1069-1071.
- Sabbioni G, Dongari N et Kumar A (2010) Determination of a new biomarker in subjects exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Biomarkers* 15: 508-515.

- Sakai T, Morita Y, Kim Y et Tao YX (2002) LC-MS determination of urinary toluenediamine in workers exposed to toluene diisocyanate *Toxicology letters* 134: 259-264.
- Sauve JF, Levesque M, Huard M, Drolet D, Lavoue J, Tardif R et Truchon G (2015) Creatinine and specific gravity normalization in biological monitoring of occupational exposures. *J Occup Environ Hyg* 12: 123-129.
- Schlittenbauer L, Seiwert B et Reemtsma T (2015) Matrix effects in human urine analysis using multi-targeted liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1415: 91-99.
- Sekizawa J et Greenberg MM (2000) *Diphenylmethane diisocyanate (MDI)*. World Health Organization, Geneva.
- Sennbro CJ, Lindh CH, Mattsson C, Jonsson BA et Tinnerberg H (2006) Biological monitoring of exposure to 1,5-naphthalene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Int Arch Occup Environ Health* 79: 647-653.
- Sepai O, Henschler D et Sabbioni G (1995) Albumin adducts, hemoglobin adducts and urinary metabolites in workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate. *Carcinogenesis* 16: 2583-2587.
- Skarping G, Dalene M et Brunmark P (1994a) Liquid-Chromatography and Mass-Spectrometry Determination of Aromatic-Amines in Hydrolyzed Urine from Workers Exposed to Thermal-Degradation Products of Polyurethane. *Chromatographia* 39: 619-623.
- Skarping G, Dalene MD et Tinnerberg H (1994b) Biological monitoring of hexamethylene- and isophorone-diisocyanate by the determination of hexamethylene- and isophorone-diamine in hydrolysed urine using liquid chromatography and mass spectrometry. *Analyst* 119: 2051-2055.
- Sun Z, Jin Q, Yu Y, Cheng J, Ji Z, Li G et You J (2019) A highly sensitive and selective method for analysis of biomarkers of diisocyanate exposure in human urine by high-performance liquid chromatography with intramolecular excimer-forming fluorescence derivatization. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 41: 982-991.
- Thorne PS, Hillebrand JA, Lewis GR et Karol MH (1987) Contact sensitivity by diisocyanates: potencies and cross-reactivities. *Toxicology and Applied Pharmacology* 87: 155-165.
- Tinnerberg H, Dalene M et Skarping G (1997) Air and biological monitoring of toluene diisocyanate in a flexible foam plant. *American Industrial Hygiene Association Journal* 58: 229-235.

- Tinnerberg H et Mattsson C (2008) Usage of air monitoring and biomarkers of isocyanate exposure to assess the effect of a control intervention. *Annals of Occupational Hygiene* 52: 187-194.
- Zhang ZL et Zhou JL (2007) Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1154: 205-213.