

Journal of Chromatography, 382 (1986) 275—279

Biomedical Applications

Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam — Printed in The Netherlands

CHROMBIO. 3290

Note

**Determination simultanée de l'acide hippurique et des acides *o*-, *m*-,
p-méthylhippuriques urinaires par chromatographie liquide**

C. LACROIX* et F. INGER

*Laboratoire de Biochimie, Centre Hospitalier Général, 55 bis, Rue Gustave Flaubert, B.P. 24,
76083 Le Havre Cedex (France)*

et

S. MENAGER et O. LAFONT

*Laboratoire de Chimie Organique, Centre de Pharmacochimie du Madrillet, Faculté de
Médecine et de Pharmacie de Rouen, Avenue de l'Université, 76800 Saint Etienne du
Rouvray (France)*

(Reçu le 22 mai 1986; manuscrit modifié reçu le 13 juin 1986)

Les xylènes ou diméthylbenzènes comprennent trois isomères: *ortho*, *meta*, *para*. Leur mélange, obtenu par distillation des goudrons de houilles ou à partir des pétroles, constitue le xylol. Ce composé renferme 45 à 70% de *m*-xylène, 15 à 20% de *p*-xylène et 10 à 15% d'*o*-xylène, mais contient aussi différents contaminants comme le toluène et le benzène. De même le toluène peut exister sous une forme plus ou moins purifiée et comporter dans sa composition du xylène et du benzène. Après leur inhalation, toluène et xylènes subissent une oxydation donnant respectivement l'acide benzoïque et les acides *o*-, *m*-, *p*-toluiques. Ces acides se conjuguent alors à la glycine pour aboutir aux principales formes d'élimination urinaires de ces solvants, l'acide hippurique (AH) et les acides *o*-, *m*-, *p*-méthylhippuriques (*o*-, *m*-, *p*-AMHs). En pratique, il est intéressant de quantifier simultanément ces métabolites afin d'évaluer l'exposition et les risques encourus par le personnel durant son travail [1, 2].

Différentes méthodes ont été proposées pour le dosage séparé ou simultané de ces produits: des méthodes spectrophotométriques [1, 3], colorimétriques

après chromatographie sur papier [4], fluorimétriques [5], par chromatographie gazeuse [6, 7], chromatographie liquide (CLHP) [8—10] ou isotachophorèse [11].

Si la séparation de l'AH et de l'*o*-AMH ne pose guère de difficultés en CLHP, il n'en est pas de même pour les isomères *méta* et *para*. Une première approche a été rapportée par Sugihara et Ogata [9] qui utilisent la dérivation d'un extrait urinaire par la bromoacétophénone, technique nécessitant un temps de manipulation assez long. La mise en évidence des propriétés des cyclodextrines (CDs), soit après greffage sur la silice [12] soit en solution dans la phase mobile [13], a permis la séparation de composés chimiquement voisins. Sakai et al. [10] ont mis à profit ce procédé et solutionné le problème de la résolution de ces deux formes. Toutefois l'emploi de β -CD comporte quelques inconvénients: une perte de charge élevée, des risques non négligeables de colmatage du fritté d'entrée de colonne par formation de complexes d'inclusion peu solubles, provoquant ainsi des augmentations de pression et des variations du débit de la phase mobile. C'est pourquoi il nous a semblé possible, compte-tenu des performances des colonnes actuelles et à l'aide d'un solvant ternaire, de réaliser la séparation de ces trois isomères.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Appareillage et conditions chromatographiques

L'appareil utilisé comprend une pompe haute pression Type E.C. 93 (Touzard et Matignon, Vitry-sur-Seine, France), une vanne d'injection équipée d'une boucle de 5 μl (Rhéodyne 71-25, Berkeley, CA, États-Unis), un spectrophotomètre Uvikon 740 LC (Kontron, Vélizy, France) comportant une cuve de 10 μl et raccordé à un enregistreur de Type BD 40 (Touzard et Matignon).

La colonne analytique employée est une Ultrasphère ODS ($75 \times 4,6$ mm, 3 μm , Beckman Instruments, Berkeley, CA, États-Unis). Le solvant d'élution est constitué d'un mélange ternaire d'acétate de sodium (10 mmol/l, pH 3) de méthanol et de tétrahydrofurane (90,5:7:2,5), circulant à un débit de 1,2 ml/min sous une pression de 13 MPa. La détection se fait à 254 nm et la quantification est basée sur la mesure des hauteurs de pics.

Réactifs

Les solvants (tétrahydrofurane, méthanol) sont de qualité CLHP. L'AH est fourni par Aldrich-Chimie (Strasbourg, France). Les acides *o*-, *m*-, *p*-AMHs ont été synthétisés à partir des acides *o*-, *m*-, *p*-méthylbenzoïques correspondants. Ceux-ci ont été transformés en chlorure d'acide par action du chlorure de thionyle, puis condensés avec la glycine, selon la technique décrite pour l'acide hippurique [14]. La pureté des composés obtenus après recristallisation dans l'eau a été contrôlée par chromatographie sur couches minces. L'identité des produits a été déterminée par ^1H RMN dmso-d_6 sur appareil Varian T60, la microanalyse CHN, effectuée sur microanalyseur Perkin-Elmer 240, a donné des résultats en accord avec la théorie à $\pm 0,3\%$.

Prélèvements, étalonnage

Les échantillons urinaires sont recueillis chez des ouvriers exposés aux

vapeurs de toluène et de xylène, les urines témoins proviennent de patients hospitalisés depuis plusieurs jours, donc à l'abri de toute exposition à ces solvants. Les échantillons sont tout d'abord centrifugés (2000 g), dilués au quart avec de l'eau distillée, puis filtrés sur Millex HV4 (0,45 µm, Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) et 5 µl sont finalement injectés dans le chromatographe. L'étalonnage consiste en un mélange des quatre acides de façon à obtenir des concentrations de 500 mg/l ou 1 g/l en chacun des composés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La Fig. 1 montre, à une sensibilité de travail identique, les chromatogrammes d'une solution étalon, d'une urine témoin et d'un échantillon surchargé. La linéarité a été vérifiée sur des urines auxquelles ont été ajoutées des quantités d'AH et d'*o*-, *m*-, *p*-AMHs de façon à obtenir des concentrations allant respectivement jusqu'à 4 et 2,5 g/l. Les gammes aqueuses et urinaires sont superposables pour les AMHs ($y = 1,00x$; $r = 1,00$) et parallèles pour l'AH ($y = 1,00x + 68,5$; $r = 1,00$) (composé endogène urinaire).

La reproductibilité intrasérielle, évaluée entre 125 mg/l et 2 g/l pour les quatre produits, figure dans le Tableau I. Les limites de détection, compte-tenu d'un rapport signal sur bruit égal à 3, sont de 45 mg/l (AH), 30 mg/l (*o*-AMH) et 12 mg/l (*p*-, *m*-AMHs), valeurs compatibles avec une surveillance d'ex-

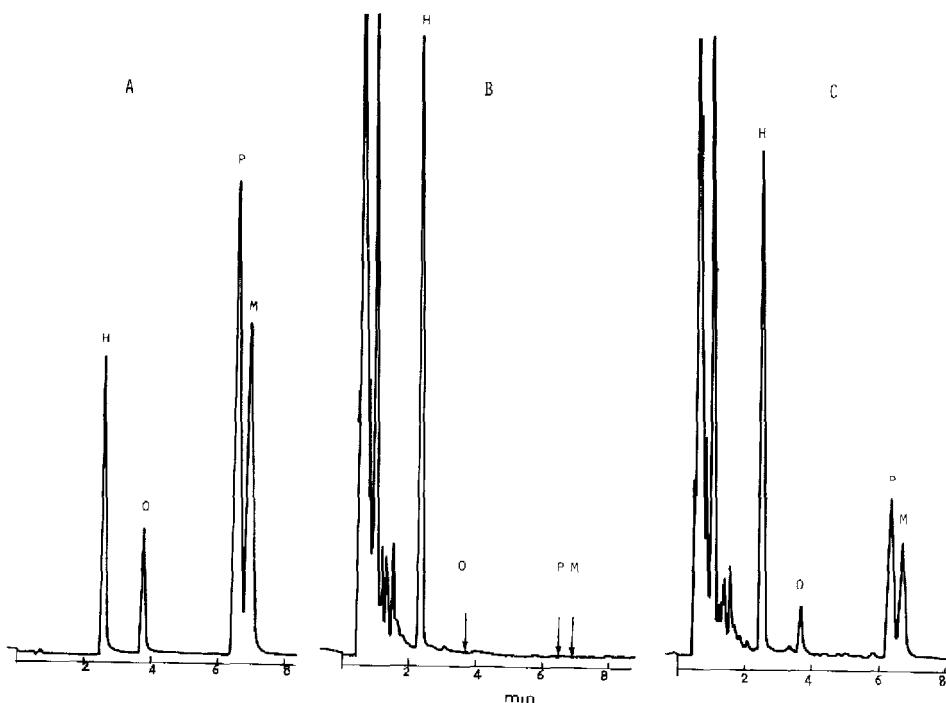


Fig. 1. Chromatogramme illustrant la séparation des quatre métabolites urinaires. (A) Mélange étalon ($H = AH$ à 500 mg/l, $O = o\text{-AMH}$ à 1 g/l, $P = p\text{-AMH}$ à 500 mg/l, $M = m\text{-AMH}$ à 1 g/l). (B) Urine d'un sujet non exposé aux solvants. (C) Urine surchargée par les *o*-, *m*-, *p*-AMHs.

TABLEAU I

ÉTUDE DE LA REPRODUCTIBILITÉ

Six déterminations par niveau.

Concentration (mg/l)	Coefficient de variation (%)			
	AH	<i>o</i> -AMH	<i>p</i> -AMH	<i>m</i> -AMH
2000	1,8	1,5	2,3	1,7
1000	2,9	2,8	1,8	2,4
500	4,4	2,8	5,7	8,7
250	3,1	3,4	2,6	4
125	2,9	10	5,1	4,8

TABLEAU II

CONCENTRATIONS URINAIRES EN AMH_s CHEZ DES OUVRIERS MANIPULANT DES XYLÈNES PURS (SUJETS 1 À 4) OU DU XYLOL (SUJETS 5 À 8)

N.D. = non détecté.

Sujet	Concentration (mg/l)		
	<i>o</i> -AMH	<i>m</i> -AMH	<i>p</i> -AMH
1.	N.D.	104	23
2.	N.D.	N.D.	48
3.	51	73	N.D.
4.	46	32	N.D.
5.	52	104	202
6.	72	126	262
7.	64	153	226
8.	49	63	167

position au toluène et xylène. A titre d'exemple, Ogata et collaborateurs [2, 15] donnent des concentrations urinaires de 2390 mg/l (*m*-AMH), 2500 mg/l (*p*-AMH), 900 à 1400 mg/l (*o*-AMH) pour des expositions chez des volontaires de respectivement: 100 ppm de *m*- et *p*-xylènes pendant 7 h et 100 ppm d'*o*-xylène durant 3 h. Dans le Tableau II sont indiquées, à titre d'exemple, les valeurs d'AMH_s obtenues à l'occasion de la surveillance de deux populations ouvrières différentes. La partie supérieure (sujets 1 à 4) réunie des concentrations urinaires trouvées chez des travailleurs affectés au remplissage en plein air, de citernes par des solvants variés et notamment des xylènes purs. Dans la partie inférieure (sujets 5 à 8) figurent des valeurs obtenues chez les employés d'une fabrique de peintures utilisant du xylol. Dans les deux cas, les taux urinaires montrent l'existence d'une imprégnation, même si elle reste peu élevée, et cela malgré le travail à l'air libre pour les uns ou la ventilation des locaux pour les autres.

Le choix d'une colonne de courte longueur (75 mm) et de fine granulométrie (3 µm) permet de réduire de façon appréciable le temps d'analyse. Pour obtenir

une résolution comparable sur une colonne plus classique (Zorbax ODS, 5 µm, 250 × 4,6 mm, Dupont de Nemours) il suffit d'utiliser la même phase mobile au même débit. La sélectivité (α) passe de 1,07 (Ultrasphère) à 1,05 (ODS) mais le temps d'élution triple (20 min au lieu de 7,5) ce qui constitue un handicap important pour un dépistage à grande échelle.

CONCLUSION

La méthode proposée permet sur un échantillon urinaire dilué et filtré de séparer les principaux métabolites témoins d'une inhalation de toluène ou de xylènes. Or la séparation des AMHs, métabolites de ces derniers, apparaît absolument nécessaire si l'on veut effectuer une surveillance correcte du personnel exposé à ce type d'intoxication et ce pour trois raisons différentes: (1) La toxicité des xylènes n'est pas identique. Il convient donc d'en déterminer l'imprégnation respective. (2) Les échantillons urinaires peuvent être d'origines variées et recueillis après exposition au xylol s'il s'agit, par exemple, de fabrications de peintures ou après l'utilisation d'un xylène pur dans le cas d'une industrie chimique. (3) L'absorptivité molaire des trois isomères à 254 nm n'est pas identique. Un pic unique pour un mélange des formes *m*- et *p*-AMHs entraînera une lourde erreur de quantification.

Par ailleurs, l'élution rapide des composés (7,5 min) autorise un débit d'analyses important compatible avec la surveillance du personnel à l'échelle d'une entreprise industrielle.

REMERCIEMENT

Nous remercions vivement le Docteur P. Derrien (Médecine du Travail, Atochem) pour son aimable coopération.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 L.D. Pagnotto et L.M. Liebermann, Am. Ind. Hyg. Ass. J., 28 (1967) 129.
- 2 M. Ogata, K. Tomokuni et Y. Takatsuka, Br. J. Ind. Med., 27 (1970) 43.
- 3 C.J. Umberger et F.F. Fiorese, Clin. Chem., 9 (1963) 91.
- 4 M. Ogata, K. Tomokuni et Y. Takatsuka, Br. J. Ind. Med., 26 (1969) 330.
- 5 G.L. Ellman, A. Burkhalter et J. La Dou, J. Lab. Clin. Med., 57 (1961) 813.
- 6 J.P. Buchet et R. Lauwerys, Br. J. Ind. Med., 30 (1973) 125.
- 7 K. Engström, K. Husman et J. Rantanen, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 36 (1976) 153.
- 8 H. Matsui, M. Kasao et S. Imamura, J. Chromatogr., 145 (1978) 231.
- 9 R. Sugihara et M. Ogata, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 41 (1978) 281.
- 10 T. Sakai, Y. Niinuma, S. Yanagihara et K. Ushio, J. Chromatogr., 276 (1983) 182.
- 11 J. Sollenberg, F.C. Phipps, B. Stringer et L.K. Lowry, J. Chromatogr., 343 (1985) 419.
- 12 K. Fujimura, M. Kitagawa, H. Takayanagi et T. Ando, J. Chromatogr., 350 (1985) 371.
- 13 D. Sybilska, J. Lipkowski et J. Woycikowski, J. Chromatogr., 253 (1982) 95.
- 14 Organic Synthèses, Collective Vol. 2, Wiley, New York, 1955, p. 328.
- 15 M. Ogata, Y. Yamazaki, R. Sugihara, Y. Shimada et T. Meguro, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 46 (1980) 127.