

Mise au point et validation d'une méthode de dosage du Méthanol dans le sang par Chromatographie en Phase Gazeuse avec injecteur « Headspace » couplée à un Détecteur à Ionisation de Flamme

[Validation of a quantitative determination method of methanol in blood using Gas Chromatography with Flame Ionization detection after a Headspace sampling]

Narjis BADRANE¹, Fatima Zahra AMRI², Mostafa KHAYA³, Mohamed GHANDI¹⁻³, Seloua ELMRABEH⁴, Naima AIT DAOUD¹⁻⁴, Mouncef IDRISSE¹, Fouad OUAZZANI CHAHDI², Youssef KANDRI RODI², Rachida SOULAYMANI BENCHEIKH¹

¹Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacologie,
Centre Anti-Poison et de Pharmacovigilance du Maroc,
Rabat, Maroc

²Faculté des Sciences et Techniques, Fès, Maroc

³Faculté des Sciences Agdal, Rabat, Maroc

⁴Laboratoire de Génétique et Biométrie,
Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc

Copyright © 2014 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: *Introduction:* Methanol is a commonly used organic solvent that, because of its toxicity, can cause metabolic acidosis, neurologic sequelae, and even death, when ingested. It is a constituent of many commercially available industrial solvents and of poorly adulterated alcoholic beverages. The management of acute human methanol intoxication needs methanol dosage. The aim of our study is to validate a method in the order to determinate the amount of blood methanol, using gas chromatography with flame ionization detection (FID), after a Headspace sampling.

Methods: We used butanol as an internal standard. The validation procedure was performed according to the guidelines of the French Society of Analytical Toxicology and the French Committee of Accreditation (COFRAC; LABGTA04).

Results: Our method is specific and linear at the range amount from 0g/L to 1 g/L. the coefficient of correlation was 0.99868. The intra- and inter-day precision and relative bias were less than 15 %. The limit of detection was 0.060 g/L. In the same conditions, limit of quantification was 0.09 g/L. The storage's and transport's samples were at +4°C for one week as a maximum.

Conclusion: The overall results show that the proposed bio-analytical procedure is acceptable and it is purpose for which it is intended, determination of methanol in plasma.

KEYWORDS: toxicity, methanol, dosage, validation, chromatography, headspace.

1 INTRODUCTION

Le méthanol est un monoalcool organique utilisé comme solvant, carburant ou matière première dans de nombreuses industries [1]. Les intoxications aiguës sont accidentelles ou à but suicidaire [2]. Les intoxications collectives sont possibles dans les cas d'utilisation abusive de méthanol dans la fabrication d'alcool frelaté. En Estonie, par exemple, 111 cas

d'intoxication collective au méthanol ont été hospitalisés avec 25 décès [3]. Dans notre contexte marocain, l'intoxication par le méthanol est surtout liée à la consommation d'alcool frelaté de contrebande vendu à un prix bas [4].

Le foie métabolise la plus grande partie du méthanol absorbé. La première étape conduit du méthanol au formaldéhyde sous l'action principalement de l'alcool déshydrogénase, dont le cofacteur est le nicotinamide adénine dinucléotide. La deuxième étape aboutit rapidement à la formation d'acide formique. Cette oxydation met en jeu l'aldéhyde-déshydrogénase cytosolique utilisant le glutathion. L'étape finale conduit à la production de dioxyde de carbone [5].

L'intoxication par le méthanol est responsable de l'apparition d'une acidose métabolique avec élévation du trou anionique, due à l'acide formique. Les intoxications graves peuvent se compliquer de coma et d'atteintes visuelles pouvant conduire à une cécité irréversible, en raison de la toxicité propre à l'acide formique sur la rétine et le nerf optique [6]. L'analyse toxicologique du méthanol dans le sang permet de confirmer le diagnostic d'intoxication, d'orienter le choix de la prise en charge adéquate et de suivre l'évolution afin d'adapter le traitement [7]. Il existe des méthodes colorimétriques qui dosent l'aldéhyde formique obtenu par oxydation au permanganate de potassium [8]. Le méthanol peut aussi être dosé par chromatographie gazeuse (CPG) éventuellement avec espace de tête « Headspace », parfois couplée à un détecteur à ionisation de flamme (FID) après recueil du prélèvement sur gel de silice et désorption à l'eau [9, 10].

Au Maroc, le Laboratoire de Toxicologie et de Pharmacologie du CAPM contribue à l'orientation du médecin clinicien dans les différentes situations d'intoxication auxquelles il est confronté ; à travers l'élaboration de protocoles de détection et de dosage de xénobiotiques [11]. Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude dont l'objectif était de mettre au point et de valider une méthode de dosage du méthanol dans le sang par CPG avec injecteur « Headspace » couplée à un FID.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 RÉACTIFS

On a utilisé du méthanol pur (SIGMA-ALDRICH 0.790g/ml) et de l'éthanol (Reide-deHaen 0,788g/ml). L'étalon interne utilisé était du Butanol-1 (Probus de 0,807 g/ml). Le plasma vierge était procuré par le Centre National Marocain de Transfusion.

2.2 APPAREIL ET CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Le dosage était réalisé au niveau de CPG Agilent 6890N avec injecteur « Headspace » 7694E couplée à FID en utilisant une colonne capillaire HP5 30m*0.32 ID 0.25um. Le système d'acquisition et de traitement de données étaient obtenus en utilisant un ordinateur équipé du logiciel Chemstation REV A.10.02. Les conditions chromatographiques sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Conditions chromatographiques et conditions Headspace pour le dosage du méthanol

Conditions chromatographiques			
Débit Azote	0.4 ml/min (2,05 psi)	Température Injecteur	140°
Débit Hydrogène	30 ml/min	Température Détecteur FID	250 °C
Débit Air	300 ml/min	Température Four	Isotherme à 40°C (6min)
Volume d'injection	0,5 ml	Mode	split 10 : 1
Conditions Headspace			
GC cycle time	13.5min	Température Vial (four)	70°C
Vial Eq. Time	20min	Température Loop (Boucle)	80°C
Temps de pression et Loopfill time	0.15min	Température Ligne de transfert	90°C
Loopeq time	0.05min	Pression Vial pressure	15 Psi
Temps d'injection	0.50min	Pression Carrier gas pressure	2,2 Psi

2.3 MODE OPÉRATOIRE

2.3.1 PRÉPARATION DES SOLUTIONS MÈRES

La solution mère du Méthanol à 2 g/l a été préparée par deux personnes différentes à partir de 126 µl de méthanol pur et de l'eau distillée (50ml), la solution d'étalon interne (Buthanol-1) à 4g/l à partir de 244 µl de butanol-1 et de l'eau distillée (50ml) et par la suite conservées au réfrigérateur à +4°C. Le dopage du plasma a été effectué pour préparer la gamme d'étalonnage et les contrôles qualité.

2.3.2 PRÉPARATION DE LA GAMME D'ÉTALONNAGE

La Gamme d'étalonnage a été préparée dans des flacons en verre pour Headspace à sertir selon les concentrations décrites dans le tableau 2

2.3.3 PRÉPARATION DES CONTRÔLES QUALITÉ INTERNE

Trois contrôles de qualité interne (CQI) ont été préparés dans des flacons en verre pour Headspace à sertir selon les concentrations décrites dans le tableau 2

Tableau 2 : Préparation de gamme d'étalonnage (GE) contrôles qualité interne (CQI)

Concentration (g/l)	0	0.1	0.2	0.5	1	0.15	0.3	0.75
	GE	GE	GE	GE	GE	CQI	CQI	CQI
Méthanol 2g/l (µl)	0	50	100	250	500	75	150	375
Plasma vierge (µl)	1000	950	900	750	500	925	850	625

2.3.4 APPLICATION

Avec chaque échantillon, une gamme d'étalonnage et 3 CQI ont été réalisés. On a traité les échantillons un par un, dans un flacon en verre pour Headspace, où on avait introduit : 1 ml de l'échantillon; 150 µl d'étalon interne à 4g/l. Les vials ont été sertis immédiatement après l'ajout de l'EI. On a procédé à l'injection automatique avec Headspace.

2.4 PROCÉDURE DE VALIDATION

On s'est basé sur les guidelines de validation des méthodes en biologie moléculaire de COFRAC (LAB GTA 04) et de la Société Française de Toxicologie Analytique [12,13]. On a étudié la sélectivité, la linéarité, l'exactitude, la justesse, la reproductibilité, la répétabilité et la stabilité. On a également déterminé la limite de quantification (LOQ) et de détection (LOD).

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 SÉLECTIVITÉ ET SPÉCIFICITÉ

La résolution entre les deux pics de méthanol et d'éthanol obtenus après injection de l'échantillon composé du méthanol, et d'éthanol avec un débit de 0,4 ml/min de la phase mobile était de $R= 3,06$ (Fig.1). Le tableau 3 montre les résultats du calcul du facteur de sélectivité qui était supérieur à 1 avec une résolution entre les deux pics supérieure à 1,5 ce qui confirme que la méthode est sélective.

Tableau 3 : facteur de sélectivité et de résolution pour le dosage du méthanol

	tR	ω	α	R
Méthanol	1,609	0,0211	1,04	3,06
Ethanol	1,677	0,0232		

tR : Temps de rétention, α : facteur de sélectivité = tR_2/tR_1 , ω : Largeur à la base du pic, R : Résolution = $2 \times (tR_2 - tR_1) / (\omega_2 + \omega_1)$

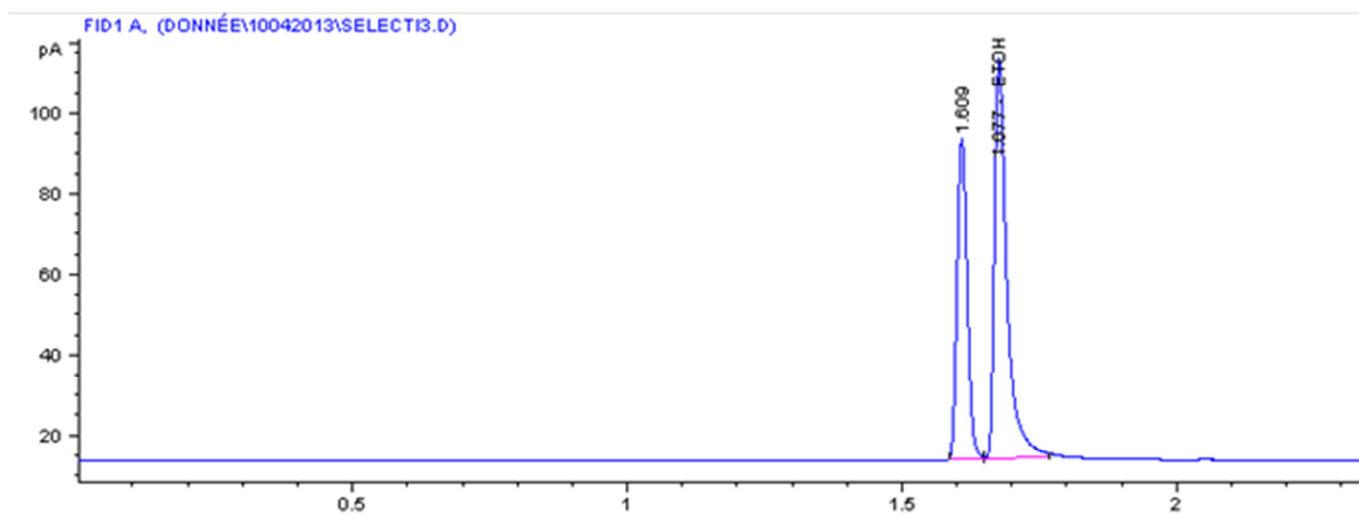


Fig .1: Chromatogramme d'échantillon composé d'éthanol et de méthanol montrant la sélectivité de la méthode de dosage du méthanol

La spécificité de la méthode a été étudiée pour déterminer l'effet de la matrice sur la détection du méthanol. On a injecté du blanc composé du plasma non chargé de méthanol et du butanol, aucun pic significatif n'a été obtenu au niveau du temps de rétention du Méthanol à 1,609.

3.2 LINÉARITÉ

La linéarité a été étudiée sur trois jours en effectuant l'analyse de cinq points de gamme (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,5 et 1g/L). On a calculé les rapports d'air (Raire) entre le méthanol et le butanol (concentration de 0,6 g/L). On a procédé à la détermination de la courbe d'étalonnage à régression linéaire avec ses paramètres (ordonnée à l'origine a_0 , pente a_1 et coefficient de corrélation R2). La probabilité d'erreur de a_0 est de 33,8 % donc le test est non significatif et a_0 va être égale à 0 alors que la probabilité d'erreur de a_1 est de 7,7795 E-16 donc la pente est significative (inférieure à 5%) et l'équation sera de type $y = a_1 x$ ($Y = Raire (MeOH / BuOH)$ et $x = R ([MeOH] / [BuOH])$). Après avoir tracer les droites à régression linéaire des rapports d'air en fonction des rapports de concentrations pour chaque série d'analyse en effectuant l'intersection nous avons obtenu les résultats schématisé dans la figure 2 :

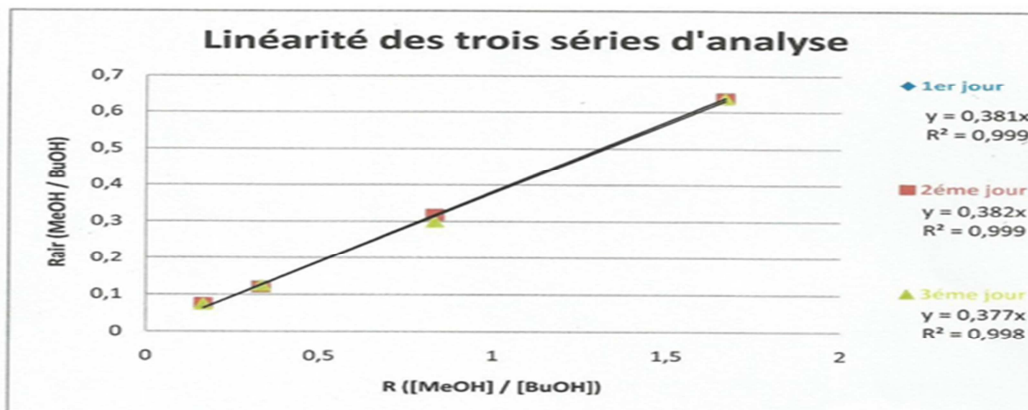


Fig.2 : Courbe d'étalonnage des analyses réalisées sur trois jours pour le dosage du méthanol

Ces résultats montrent que la méthode présente une bonne linéarité entre 0 et 1 g/l de méthanol dans le plasma.

3.3 JUSTESSE

On a effectué les analyses sur trois échantillons de contrôle qualité (QC) qui ont des concentrations de 0,15 ; 0,3 ; 0,75. On a déterminé le Raire, les concentrations (Ccal) pour chaque QC et on a calculé la justesse (biais) et l'exactitude (taux de recouvrement, TR) (Tableau 4). Le biais était inférieur à 15 % ainsi que le TR était compris entre 85 % et 115 %. L'intervalle de confiance calculé était de [97,188 ; 108,285]. La méthode est juste puisque l'intervalle de confiance inclut la valeur 100 %.

Tableau 4 : Taux de recouvrement et de justesse pour le dosage du méthanol

Cth	Ccal	Moyenne (m)	Biais %	TR %
0,15	0,154	0,164	9,35	109,347
	0,166			
	0,172			
0,3	0,306	0,294	-1,99	98,011
	0,309			
	0,267			
0,75	0,742	0,756	0,85	100,851
	0,749			
	0,778			

Cth : concentrations théoriques, Ccal : concentrations calculées, biais = $(m - Cth) * 100 / Cth$, TR% = $Ccal * 100 / Cth$

3.4 RÉPÉTABILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ

On a étudié un seul point de gamme de concentration 0,5 g/L en changeant un facteur sur trois jours. Après avoir calculer les concentrations (CMeOH) à partir des Raire, on a analysé la variance sur un seul facteur le jour à partir des CMeOH. Les résultats de calcul de l'écart type et le coefficient de variance sont inférieur à 15 % ce qui confirme que la méthode est reproductible (Tableau 5).

Tableau 5 : Ecarts type et coefficients de variabilités pour étude de la répétabilité et reproductibilité

Jour	Jour 1	Jour 2	Jour 3
Concentrations calculées g/L	0,505	0,392	0,514
	0,449	0,425	0,443
	0,499	0,437	0,439
	0,453	0,439	0,411
	0,439	0,456	0,422
	0,484	0,440	0,472
σ L(Répétabilité)	0,028	--	
CVL (Répétabilité)	5,95		
σ R (Reproductibilité)	0,032		
CVR(Reproductibilité)	7,24		

3.5 LOD ET LOQ

L'analyse a été faite sur 20 blancs contenant l'étalon interne. La LOD était de 0,060 g/L et la LOQ de 0,09 g/L

3.6 STABILITÉ

La stabilité a été déterminée par le dosage d'échantillons préparés au préalable à un seul niveau de concentration de 0,5 g/l puis après différents temps de conservation à différentes températures : Température ambiante (+23 °C), 4 °C et -20°C. Ces échantillons ont été répétés 5 fois espacés sur une période d'un mois. Le test d'ANOVA pour étudier la variation des concentrations en fonction des températures de conservation et du temps était non significatif ($p= 0,889$) donc il n'y a pas d'effets du facteur de la température (fig.3). Les conditions optimales de conservation sont une température de conservation de 4 °C et une durée d'une semaine au maximum.

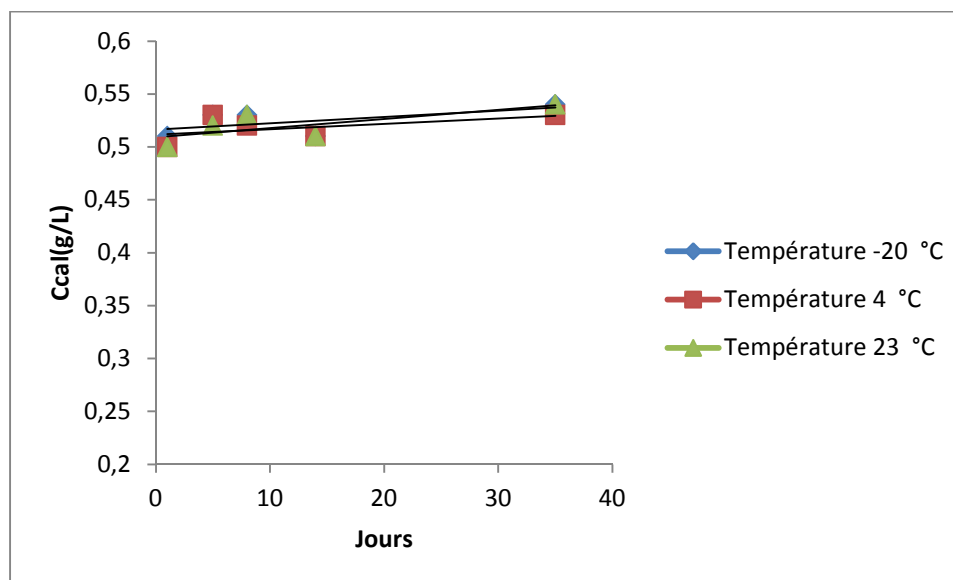


Fig. 3 : Variations des concentrations calculées du méthanol selon la température

4 CONCLUSION

Cette étude a permis d'optimiser et de valider une méthode simple pour la mesure quantitative du méthanol dans le plasma en utilisant une méthode de Chromatographie en Phase Gazeuse avec Injecteur Headspace et Détecteur à Ionisation

de Flamme. Cette méthode pourrait être utilisée pour le dosage du méthanol en toxicologie d'urgence afin d'orienter le médecin dans la prise en charge thérapeutique, en toxicologie médico-légale et en recherche médicale.

REFERENCES

- [1] Frédéric Baud, Philippe Hantson, Hafedh Thabet, Intoxications aiguës. Springer Science & Business Media, 2013.
- [2] B. Mégarbane, N. Brahmi and F. Baud, "Intoxication aiguë par les glycols et alcools toxiques : diagnostic et traitement," *Réanimation*, vol. 10, no. 4, pp. 426-434, 2001.
- [3] R .Paasma , KE .Hovda, A.Tikkerberi and D.Jacobsen . "Methanol mass poisoning in Estonia: outbreak in 154 patients," *Clinical Toxicology (Phila)*. vol. 45, no. 2, pp. 152-157, 2007.
- [4] H. Chaoui, " L'intoxication aiguë au méthanol: un risque méconnu ?," *Toxicologie MAROC*, vol. 1, no. 4, pp. 15, 2010.
- [5] F. Conso, C.Mignée, "Monoalcools autres que l'alcool éthylique," *Encyclopédie médico-chirurgicale*, 1984.
- [6] R.Loza and D.Rodriguez , " A case of methanol poisoning in a child," *Case Reports in Nephrology*. vol. 2014, pp. 3, 2014.
- [7] DG. Barceloux, GR .Bond, EP.Krenzelok, H.Cooper, JA.Vale. , "American academy of clinical toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning," *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*. , vol. 40, pp. 415–46.
- [8] R.Fabre, R .Truhaut, Précis de toxicologie. Société d'édition d'enseignement supérieur, 1971.
- [9] DG. Fer, WA. Temple and E. McQueen, "Methanol monitoring: comparison of urinary methanol concentration with formic acid excretion rate as a measure of occupational exposure," *International Archives of Occupational and Environmental Health* vol. 47, pp. 155-163, 1980.
- [10] RL. Kane, W. Talbert, J. Harlan, G. Sizemove and S. Cataland , " A methanol poisoning outbreak in Kentucky : a clinical epidemiologic study," *Archives of Environmental Health* vol. 17, pp. 119-129, 1968.
- [11] S .Achour, L .Aït Moussa, M. Idrissi, " Le laboratoire du Centre AntiPoison et de Pharmacovigilance du Maroc fonctionnement et utilité," *Toxicologie MAROC*, vol. 4, pp. 8-13, 2010.
- [12] Groupe de travail « Accréditation » de la Société Française de Toxicologie Analytique, "Aide à la validation des méthodes en Toxicologie et Suivi Thérapeutique Pharmacologique,". *Annales de Toxicologie Analytiques*. vol. 17, no. 3, pp. 1–20, 2005.
- [13] Document LAB GTA 04, Guide de validation des méthodes en biologie médicale, 2011. [Online] Available: <http://www.cofrac.fr/documentation/LAB-GTA-04> (Avril, 2011).