

Hormones estrogéniques

Méthode d'analyse dans l'eau – Phase dissoute

Généralités

Nom de la famille de substances	Hormones estrogéniques libres et totales (fraction libres + conjugués)
Nom des substances individuelles	Estrone (E1), alpha et beta estradiol (17a-E2 et 17b-E2), estriol (E3), alpha éthinylestradiol (EE2)
Code SANDRE des substances individuelles	Estrone : 5396 Alpha estradiol : 5399 Beta estradiol : 5397 Estriol : 6446 Alpha éthinylestradiol : 2629
Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]	Eau [3] : Eau douce de surface Eau souterraine Eau résiduaire
Principe de la méthode	Extraction sur phase solide suivie d'une étape de purification sur phase solide et puis analyse en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.
Acronyme	SPE-LC-MS-MS
Domaine d'application	Limite inférieure : LQ Limite supérieure : dépend du dernier point de gamme injecté, du volume de reprise dans l'étalon interne et de la dilution de l'échantillon (à titre d'indication pour un dernier point de gamme à 500 µg/L, un volume de reprise de 200 µL et sans dilution de l'échantillon : 1000 ng/L)
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	La verrerie de laboratoire lavée est rincée à l'acétone Tous les solvants sont de qualité « pour analyse de pesticides » (l'eau utilisée est de l'eau Milli-Q®)
Interférents (préciser la matrice)	Interférents identifiés : aucun Matrices testées : eau de rivière, influent, effluent.

AVERTISSEMENT : Il convient que l'utilisateur de cette méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Cette méthode n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur. Certains des solvants utilisés dans le mode opératoire sont toxiques et dangereux. Les manipuler avec précaution.

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :	Eau : Phase dissoute [3]
Conditionnement et conservation des échantillons - Protocole : - Nature du contenant de stockage : - Lavage du contenant : - Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	Echantillonnage grâce à matériel en téflon ou/et en verre. Verre ambré Lavage en machine puis rinçage à l'acétone Eau brute : 24 heures à 4°C
Filtration : - Type de filtre et méthode de nettoyage : - Type de support de filtration :	- Filtres Whatman fibre de verre de diamètre de 45 mm ; porosité 0,7 µm (préalablement calcinés 1 heure à 450°C) - Support Sartorius avec fritté en verre
Pré-traitement des échantillons liquide ou solide	Déconjugaison, dans le cas du dosage des fractions libres et conjuguées (hormones totales) : Le pH des échantillons est amené à 5,2 par ajout d'acide acétique glacial (99%). La béta-glucuronidase (l'enzyme de déconjugaison) est ajoutée à prise d'essai de l'échantillon à la proportion de 1/1000 v/v. Le tout est mis à incuber pendant une nuit (15 heures) à 52 ± 2°C (voir la publication pour plus de détails)

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai (mL or mg selon la phase analysée)	Eau : Eau douce de surface 250 mL Eau souterraine 250 mL Effluent de STEP 250 mL Influent de STEP 100mL (diluée 2,5 fois par eau d'Evian®)
Extraction - SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'élution)	SPE sur autotrace Zymark® sur cartouche OASIS (Waters®) HLB 6mL, 200 mg : - conditionnement de la colonne par 6 mL de méthanol et 6 mL d'eau milliQ® - percolation de l'échantillon (250 mL) - rinçage de la colonne par 6 mL d'eau milliQ® - séchage sous azote pendant 30 min - élution par 4 mL d'acétate d'éthyle/méthanol 70/30 v/v L'éluat se conserve 3 jours à température ambiante Evaporation sous azote et reprise dans 1 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50 v/v)

Purification

(type de purification, paramètres de purification, méthode de concentration)

SPE en manuel sur manifold sur Florisil (Supelco®) 6mL, 1g
 - conditionnement de la phase par 2 mL d'heptane/dichloromethane 50/50 v/v
 - percolation échantillon (1 mL dans heptane/dichloromethane 50/50 v/v)
 - rinçage par 2 mL d'heptane/dichloromethane 50/50 v/v
 - séchage sous vide
 - élution par 5.5 mL d'acétone/heptane 75/25 v/v
 L'éluat se conserve une nuit (15 heures) à 4°C.
 Evaporation sous azote et reprise dans 200 µL d'une solution d'étalon interne (E2-acétate) à 40 µg/L préparée dans eau/acétonitrile 60/40 v/v.
 La solution se conserve à -20°C pendant 1 mois (la gamme d'étalonnage est préparée la même jour et également congelée)

Conservation de l'extrait

Pas d'étude effectuée, purifier l'extrait tout de suite après l'extraction.

Volume ou masse finale avant analyse :

200 µL

Méthode analytique utilisée :

Indiquer les paramètres complets de la méthode (exemple pour la chromatographie : gradient, phase mobile, débit, T °C, colonne, mode de détection)

Pour la détection par masse : mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation

Séparation HPLC :

- ☐ Colonne : Xbridge Waters© (150 mm * 2.1 mm * 3.5 µm) ; précolonne de même phase (10 mm * 2.1 mm * 3.5 µm)
- ☐ Température de colonne : 30°C
- ☐ Volume d'injection : 10 µL
- ☐ Gradient : phase mobile en eau qualité HPLC (A) / acétonitrile (B)
- ☐ Gradient :
 - -8 - 0 mn : 60% (A) / 40% (B)
 - 0 - 2 mn : 60% (A) / 40% (B)
 - 4,5 mn : 20% (A) / 80% (B)
 - 4,5 – 7 mn : 20% (A) / 80% (B)
 - 8,25 mn : 100% (B)
 - 8,25 – 15 mn : 100% (B)
- ☐ Durée d'analyse : 23 minutes
- ☐ Débit : 0,2 mL/min

Analyse en masse :

Ionisation electrospray en mode négatif (ESI(-)) ; analyse MS-MS en mode MRM (multiple reaction monitoring)

Molécule	Transition de quantification	Transition de confirmation
Estrone	268.9>145.2	268.9>142.9
α & β - Estradiol	270.9>145.1	270.9>182.9
Estriol	287.1>145.2	287.1>171.0
α – Ethynilestradiol	294.4>145.1	294.4>158.9
Estrone – D4	273.0>147.0	
α – Estradiol – D2	273.0>185.0	
Estriol – D2	289.3>147.0	
α – Ethynilestradiol – D4	299.2>147.0	

- La procédure de confirmation est basée sur la décision de la commission européenne n° [2002/657/CE](#)

Equipements¹ (modèles utilisés) :	Chromatographie liquide haute performance Agilent 1100 Spectromètre de masse Applied Biosystem API 4000 (triple quadrupole linéaire)
Type d'étalonnage	Interne
Modèle utilisé	Linéaire
Etalons / Traceurs utilisés	Traceurs d'injection : Estrone-D4, β -Estradiol-D2 (pour quantifier l' α et la β estradiol), Estriol- D2, α -Ethinylestradiol-D4. Traceur interne : E2-acétate
Domaine de concentration	0,2-500 $\mu\text{g/L}$
Méthode de calcul des résultats Rendement Blancs	Utilisation du rendement : Oui (correction par le rendement des deutérés)

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante	Miège C., Bados P., Brosse C. et Coquery M. Method validation for the analysis of estrogens including conjugated compounds in various aqueous matrices. <i>Trends in Analytical Chemistry</i> . 2009 , 28 (2), 237-244.
Norme dont est tirée la méthode	Sans objet
Niveau de validation selon Norman	Niveau 2 COST-636

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	NF XP T90-210 (1999)
Domaine de validation	0,2-100 $\mu\text{g/L}$
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	Les blancs solvants sont vérifiés régulièrement et ne doivent pas dépasser la valeur de la LQ pour chaque composé. Dans le cas où les blancs sont compris entre la LD et la LQ, c'est à l'analyste de déterminer si ceux-ci doivent être retranchés ou non (cas par exemple lorsque les blancs sont contaminés de façon systématique ou s'ils sont proches de la LQ ou encore lorsque la concentration de l'échantillon est élevée par rapport à la contamination)
Rendement - par niveau de concentration	Moyennes journalières des rendements (R, %, n=5) et des écart-types (RSD, %, n=5)

¹ Les matériels cités ici constituent des exemples d'application satisfaisante. Ces mentions ne constituent pas une recommandation exclusive, ni un engagement quelconque de la part du rédacteur ou d'AQUAREF

- par molécule
(si moyenne préciser le nombre
de répétitions et l'écart-type)

Hormones	Eau de rivière			
	Dopage : 10 ng/L		Dopage : 40 ng/L	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
E1	87	3	106	6
17a-E2	91	9	88	8
17b-E2	84	8	89	5
EE2	82	10	110	20
E3	88	14	104	5

Hormones	Influent de STEP				Effluent de STEP			
	Dopage : 20 ng/L		Dopage : 80 ng/L		Dopage : 15 ng/L		Dopage : 60 ng/L	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
E1	115	19	84	8	112	11	110	4
17a-E2	105	22	106	6	100	7	97	4
17b-E2	103	21	95	11	95	10	96	4
EE2	96	21	105	15	105	16	128	4
E3	91	17	75	36	111	12	97	7

Limite de quantification(LQ)
Limite de détection (LD)
(indiquez la méthode de
détermination en précisant la
matrice testée)

Limites de quantification (ng/L) observées selon les matrices :

Hormones	Eau de rivière ¹	Influent ²	Effluent ²
E1	0.4	1.0	0.4
17 α -E2	0.4	0.8	0.4
17 β -E2	0.6	1.4	0.6
E3	0.8	2.6	0.8
EE2	1.2	3.0	1.2

¹: obtenues par vérification avec n=5 dopages

²: non vérifiées par des dopages car ces matrices contiennent naturellement des hormones

Incertitudes (%) sur les résultats
- par type de matrice

Selon NF XP T90-220 (2003)

Eau minérale d'Evian

Molécule	niveau de dopage (ng/L)	Incertitude élargie, k=2 (%)
Estrone	2	14%
	30	7%
17 alpha estradiol	2	23%
	30	11%
17 beta estradiol	2	22%
	30	6%
17 alpha ethynilestradiol	2	36%
	30	7%

Contacts

Auteurs	Cécile Miege
Institut	Irstea (Cemagref) (Lyon)
Contact	cecile.miege@irstea.fr