

Hormones : Estrone et Norethindrone

Méthode d'analyse dans les matières en suspension (MES) et les sédiments

Généralités

Nom de la famille de substances	Hormones
Nom des substances individuelles	Estrone (E1) Norethindrone
Code SANDRE des substances individuelles	Estrone (5396) Norethindrone (5400)
Matrice analysée	Sédiments [6] Matières en suspension recueillis par piège à sédiments[7]
Principe de la méthode	Extraction QuEChERS suivie d'une étape de purification par dispersive SPE et d'une analyse en chromatographie en phase liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem
Acronyme	QuEChERS-UHPLC-MS/MS
Domaine d'application	Limite inférieure : 0,01µg/g de MS (matière sèche) Limite supérieure : 0,2µg/g de MS (matière sèche)
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Granulométrie et COP (Carbone Organique Particulaire)
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	La verrerie de laboratoire lavée est rincée à l'acétone (verrerie jaugée) et/ou passée au four à 500°C. Tous les solvants sont de qualité ULC-MS (l'eau utilisée est de l'eau Milli-Q® LC-Pack®)

Interférents (préciser la matrice) Pas d'interférent identifié

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 :	Matières en suspension : Phase particulaire de l'eau [156] Sédiments : fraction analysée inférieure à 2 mm [32]
Conditionnement et conservation des échantillons - Protocole : - Nature du contenant de stockage :	Echantillonnage grâce à matériel en téflon, acier inox ou/et en verre. Verre ambré

<p>- Lavage du contenant :</p> <p>- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :</p>	<p>Lavage en machine puis calcination à 500°C</p> <p>Non réalisée.</p> <p>Les échantillons sont transportés dans des flacons en verre ambré dans des glacières réfrigérées (4°C) puis prétraités à réception.</p>
<p>Pré-traitement des échantillons</p>	<p>Les échantillons de MES et sédiments sont congelés (-18°C) puis lyophilisés. Ils sont ensuite tamisés à 2mm puis broyés.</p>
<p>Analyse</p>	
<p>Volume ou masse de la prise d'essai</p>	<p>MES 0,5 g (poids sec) Sédiments 0,5 g (poids sec)</p>
<p>Extraction QuEChERS</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Peser 0,5 g de sédiments ou MES dans un tube de 50mL pour la centrifugation en PP. • Doper ces sédiments ou MES avec 50 µL d'une solution en traceurs deutérés (Estrone D4 et Androstenedione D7) à 2 mg/L dans l'acétone et laisser évaporer l'acétone pendant 1h. • Ajouter 10mL d'eau milliQ et vortexer pendant 1 min. • Ajouter 10mL d'acétonitrile acidifié à 1% avec acide acétique (v/v) et vortexer pendant 1 min. • Ajouter des sels d'extraction : 2g MgSO₄ + 1,5g sodium acétate (pas de kit prêt à l'emploi disponible). • Agiter au vortex pendant quelques secondes + 1 min au bain à ultrasons. • Centrifuger pendant 5 min à 5000 tours/min à 10°C. • Placer à -18°C pendant 1 heure. • Transférer le surnageant dans un tube de 50 mL en PP pour la centrifugation .
<p>Purification : dispersive SPE (d-SPE)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Ajouter le kit de d-SPE : 1200mg MgSO₄ + 400mg PSA + 400mg C18-E (ref : KS0-8926, Phenomenex). • Agiter au vortex pendant quelques secondes + 1 min au bain à ultrasons. • Centrifuger pendant 5 min à 5000 tours/min à 10°C. • Récupérer un aliquot de 1mL du surnageant dans un tube verre de 10 mL. • Evaporer à sec sous azote. • Ajouter 50 µL d'une solution contenant du diuron D6 (traceur d'injection) à 200 µg/L dans l'acétone. • Ajouter 950 µL d'une solution eau/méthanol (65/35, v/v). • Filtrer sur filtre seringue (13mm GDX Whatman 0.45µm).
<p>Conservation de l'extrait</p>	<p>Non évaluée, conservation de l'extrait à -18°C si analyse différée</p>

Volume ou masse finale avant analyse :

50µL acétone + 950µL eau/méthanol (65/35, v/v)

Méthode analytique utilisée :

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

Séparation UHPLC

- Colonne : ACQUITY UPLC BEH C18 Waters© (100 mm * 2.1 mm * 1.7 µm)
- Température de colonne : 40°C
- Volume d'injection : 20 µL
- Gradient : phase mobile en NH4F 0,2mM dans l'eau MilliQ® LC-PAK® (A) / méthanol (B)
- Gradient :

Temps (min)	Débit (mL/min)	% Eau/NH4F 0,2 mmol/L	% MeOH
0	0,3	65	35
1,5	0,3	65	35
3	0,3	55	45
10	0,3	37	63
11	0,3	0	100
12	0,3	0	100
12,1	0,3	65	35
15	0,3	65	35

- Durée d'analyse : 15 minutes

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

Analyse en masse :

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

Molécule	Transition de quantification	Transition de confirmation
Estrone	271,2 > 253,3	271,2 > 133,1
Estrone D4	275,2 > 257,3	275,2 > 135,2
Norethindrone	299,2 > 109,1	299,2 > 91,0
Androstenedione D7	294,2 > 100,0	294,2 > 113,1
Diuron D6	239,1 > 78,0	239,1 > 52,1

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

Equipements¹ (modèles utilisés) :

Chromatographie liquide Ultra Haute Performance Acquity H-Class Waters
Spectromètre de masse Xevo-TQ-XS Waters (tandem quadripôle)

Type d'étalonnage

Interne

Modèle utilisé

Quadratique pondérée 1/x

Etalons / Traceurs utilisés

Traceurs internes d'extraction : Estrone D4 et Androstenedione D7
Traceur d'injection : Diuron D6.
Le suivi de l'aire du traceur d'injection permet de vérifier le bon déroulement de l'analyse. Si une variation supérieure à +/-30% de

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

	l'aire moyennée du DIU D6 sur toutes les injections est constatée, la série d'analyse sera réinjectée.
Domaine de concentration	0,1 à 50 µg/L
Méthode de calcul des résultats	Le rendement est corrigé pour chaque échantillon par l'Estrone D4 (pour l'Estrone) et par l'Androstenedione D7 (pour la Norethindrone).
Rendement	
Blancs	Blanc QuEChERS : le protocole analytique est réalisé sans sédiment et sans dopage pour vérifier que les kits utilisés n'apportent pas de contamination. Dans le cas où les blancs seraient contaminés 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 la concentration mesurée dans le blanc est élevée par rapport à la concentration dans l'échantillon)

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante	Note d'application Phenomenex TN-0096 Note d'application Waters 720006030en
Norme dont est tirée la méthode	Sans objet
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	NF T90-210 (2018)															
Domaine de validation	0,01µg/g à 0,2µg/g (MS)															
Matériaux de référence utilisés	Pas de matériau de référence disponible. Les essais sont réalisés sur un échantillon composite avec un COP (Carbone Organique Particulaire) à 2,28 g/kg. Cet échantillon est un mélange de sédiments du Gier (à Givors, bassin versant du Rhône) et du lac Léman.															
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	Les blancs solvants sont vérifiés régulièrement et ne doivent pas dépasser la valeur de la LQ instrumentale pour chaque composé.															
Rendement	L'étude de rendement est réalisée par ajout des composés dans un sédiment avec réalisation de 2 répliqués pendant 6 jours différents à 4 niveaux de concentration. Le sédiment utilisé est un échantillon composite de sédiments.															
- par niveau de concentration et par molécule	<p style="text-align: center;">Rendement relatif moyen et écart-type en % (n=12 par niveau)</p> <table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>Composé</th> <th>0,01µg/g (MS)</th> <th>0,04µg/g (MS)</th> <th>0,1µg/g (MS)</th> <th>0,16µg/g (MS)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Estrone</td> <td>78 ± 23</td> <td>59 ± 11</td> <td>77 ± 12</td> <td>54 ± 3</td> </tr> <tr> <td>Norethindrone</td> <td>87 ± 18</td> <td>92 ± 15</td> <td>96 ± 14</td> <td>99 ± 14</td> </tr> </tbody> </table>	Composé	0,01µg/g (MS)	0,04µg/g (MS)	0,1µg/g (MS)	0,16µg/g (MS)	Estrone	78 ± 23	59 ± 11	77 ± 12	54 ± 3	Norethindrone	87 ± 18	92 ± 15	96 ± 14	99 ± 14
Composé	0,01µg/g (MS)	0,04µg/g (MS)	0,1µg/g (MS)	0,16µg/g (MS)												
Estrone	78 ± 23	59 ± 11	77 ± 12	54 ± 3												
Norethindrone	87 ± 18	92 ± 15	96 ± 14	99 ± 14												

Dans le cas de l'estrone, les rendements observés sont généralement entre 50 et 80%. Nous préconisons de réaliser un dopage (à un niveau de 0,04µg/g, concentration rarement dépassée) par série d'analyse afin de vérifier le rendement obtenu et l'efficacité de la correction avec le traceur deutéré.

Il est également possible de réaliser des gammes extraites afin de mieux compenser les effets matrices.

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

0,01µg/g pour l'estrone et la norethindrone
Validation selon la norme NF T 90-210
Les essais sont réalisés par dopage sur un échantillon composite avec un COP (Carbone Organique Particulaire) à 2,28 g/kg. Cet échantillon est un mélange de sédiments du Gier (à Givors, bassin versant du Rhône) et du lac Léman.

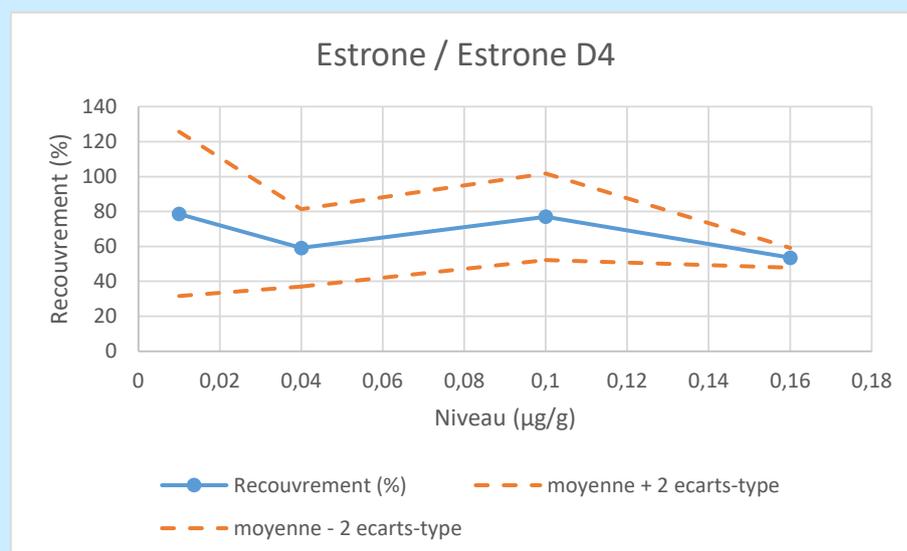
Incertitudes (%) sur les résultats

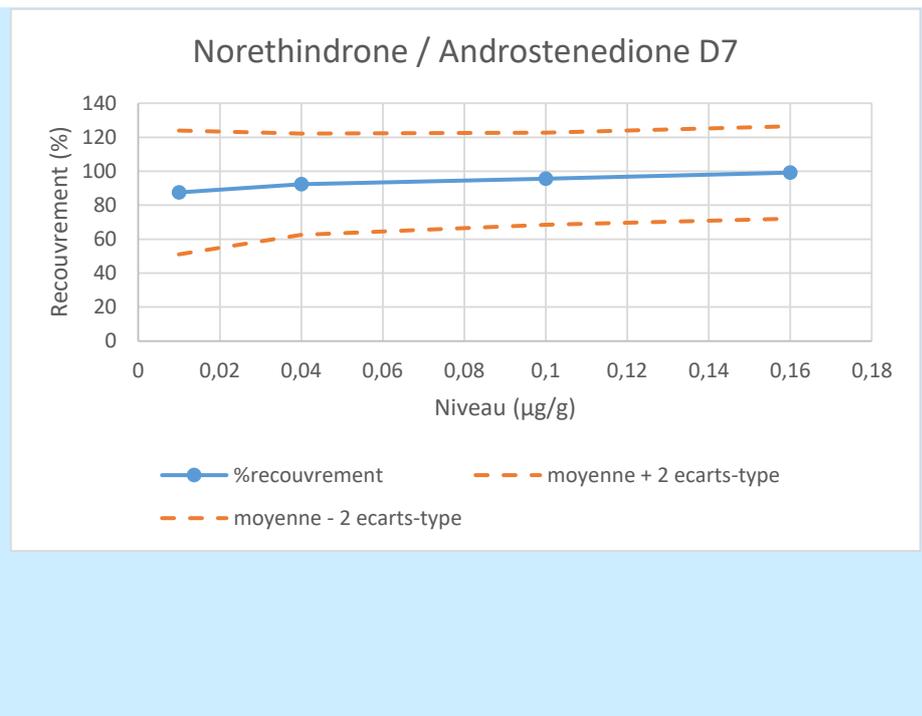
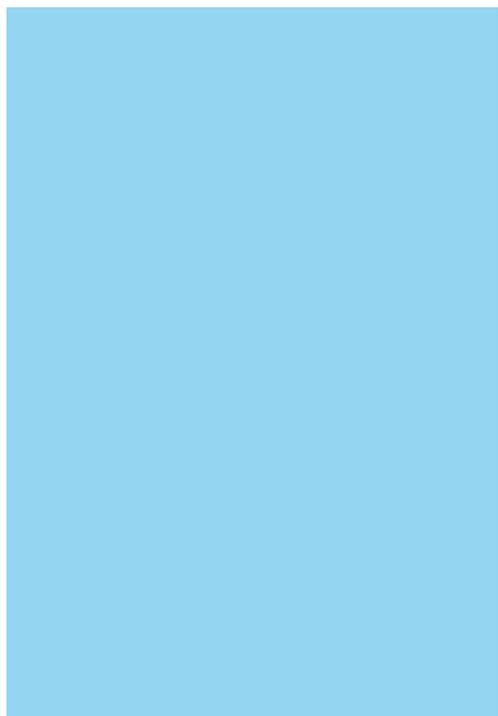
L'évaluation des incertitudes est réalisée en utilisant la norme NF ISO 11352, par ajout des composés dans un sédiment avec réalisation de 2 répliquats pendant 6 jours différents à 4 niveaux de concentration. Elle prend en compte l'incertitude liée au biais et l'incertitude liée à la fidélité.

Elle est exprimée avec un facteur d'élargissement : k=2.

- par niveau de concentration et par molécule
(reproductibilité avec méthode de détermination)

Composé	<u>Incertitude élargie % (k=2)</u>			
	0,01µg/g (MS)	0,04µg/g (MS)	0,1µg/g (MS)	0,16µg/g (MS)
Estrone	64	37	33	18
Norethindrone	48	34	30	29





Contacts

Auteurs	Céline Guillemain, Amandine Daval, Cécile Miège
Institut	INRAE
Contact	cecile.miege@inrae.fr