

Hormones stéroïdiennes (Androgènes, Estrogènes, Glucocorticoïdes, Progestatifs)

Méthode d'analyse dans les eaux – Phase solide

Généralités	2
Protocole analytique	3
— Prétraitement	3
— Analyse	4
Références de la méthode	9
Paramètres de validation de la méthode	9
Contacts	17

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.

Généralités

■ Nom de la famille de substances

Hormones stéroïdiennes

■ Nom des substances individuelles

<u>Androgènes :</u>	T : Testostérone
	AD : 4-androstène-3,17-dione
<u>Estrogènes :</u>	17αE2 : 17alpha-estradiol
	17βE2 : 17beta-estradiol
	17αEE2 : 17alpha-éthinyloestradiol
	DES : Diéthylstilbestrol
	E1 : Estrone
	E3 : Estriol
<u>Glucocorticoïdes :</u>	BET : betaméthasone
	COL : Cortisol
	COR : Cortisone
	DEX : Dexaméthasone
	PRED : Prednisolone
<u>Progestatifs :</u>	17HPT : 17alpha-hydroxyprogestérone
	21HPT : 21alpha-hydroxyprogestérone
	Ac CHLOR : acétyl-chlormadinone
	Ac CYP : acétyl-cyprotérone
	CYP : Cyprotérone
	DRO : Drospirénone
	LEV : Lévonorgestrel
	NOR : Noréthindrone

■ Code SANDRE des substances individuelles

Testostérone	[5384]	Dexaméthasone	[6574]
4-androstène-3,17-dione	[8385]	Prednisolone	[6734]
17alpha-estradiol	[5399]	17alpha-hydroxyprogestérone	NA
17beta-estradiol	[5397]	21alpha-hydroxyprogestérone	NA
17alpha-éthinyloestradiol	[2629]	acétyl-chlormadinone	NA
Diéthylstilbestrol	[2628]	acétyl-cyprotérone	NA
Estrone	[5396]	Cyprotérone	NA
Estriol	[6446]	Drospirénone	
Betaméthasone	NA	Lévonorgestrel	
Cortisol	NA	Noréthindrone	
Cortisone	NA		

■ Matrice analysée

Eau [3] :

- Eau douce de surface
- Eau souterraine
- Eau potable

■ Principe de la méthode

L'échantillon subit une extraction sur phase solide (SPE Disk) suivie d'une étape de purification sur support Aminopropyle. L'extrait analytique reconcentré est divisé en deux

aliquots. Un aliquot dédié à l'analyse des estrogènes est dérivé par dansylation avant transfert dans un mélange de solvant compatible avec son analyse par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Le second aliquot dédié à l'analyse des androgènes, glucocorticoïdes et progestatifs transféré dans un mélange de solvant compatible avec son analyse par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

- **Acronyme** : SPE DisK, DI - LC/MS²
- **Domaine d'application**
Selon le paramètre considéré : de la limite de quantification jusqu'à une dizaine ng de composé /L d'eau (sur la base de 1 litre divisé en 2 et repris dans 100 µL)
- **Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse**
Matières en Suspension (MES) : La méthode est validée jusqu'à un seuil de 50 mg L⁻¹ de MES
- **Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode** :
Les substances ciblées sont des CMR en conséquence il est indispensable de porter des EPI. Certaines de ces molécules ont démontré une instabilité à la lumière et thermique, en conséquence il est recommandé de minimiser les temps d'exposition dans des conditions non contrôlées. En outre, le recours à des flacons en verre ambré est fortement conseillé. Au regard des faibles niveaux d'occurrence, il est indispensable de mettre en œuvre des procédures de nettoyage de matériels et matériaux susceptibles d'entrer en contact avec les échantillons efficaces. Les matériaux en verre sont à privilégier.
- **Interférents (préciser la matrice)**
 - Interférents identifiés : des interférences matricielles ont été observées dans les eaux saumâtres.

Protocole analytique

— Prétraitement

- **Fraction analysée**
Eau :
 - Eau brute [23]
- **Conditionnement et conservation des échantillons**
Les échantillons doivent être extraits dans les 24 heures suivant le prélèvement (dès réception au laboratoire). Ils doivent être stockés dans des contenants en verre ambré, à l'abri de la lumière, à une température contrôlée ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$).
- **Filtration**
Pas de filtration
- **Pré-traitement des échantillons liquides**
Ajout 1 mL d'EDTA (0,1 N (0,05 M)) (0,1% (v/v)).
Ajouter les étalons internes avant extraction (milieu de gamme).

— Analyse

■ Volume ou masse de la prise d'essai (mL ou mg selon la phase analysée)

Eau :

- Eau douce de surface : 1000 mL
- Eau souterraine : 1000 mL
- Eau potable : 1000 mL

■ Extraction

Extraction automatique SPE-DEX® 4790 (Horizon Technology) sur support d'extraction Atlantic® ReadyDisk C18, (Biotage)

Etapes	Solvants	Nombres de cycle	Temps de mouillage	Temps de séchage
Rinçage	EtOAc	1	90s	30s
	MeOH	1	90s	-
	H ₂ O	1	60s	-
Chargement de l'échantillon	1 L d'échantillon			
Séchage	15min			
Elution	EtOAc	2	90s	30s
		1	90s	90s

Méthanol : MeOH, Ethyl d'Acétate : EtOAc.

Les extraits sont ensuite évaporés à sec à l'aide d'un concentrateur sous vide (45°C).

Les extraits sont repris dans 0,5 mL de MeOH. Il est possible d'interrompre la procédure d'analyse à cette étape en stockant les échantillons en méthanol, à l'abri de la lumière et à une température contrôlée (-20 ± 5 °C) pendant un mois maximum.

■ Purification

Supelclean™ LC-NH₂ SPE (500 mg, 6 mL)

Purification sur phase solide aminopropyle LC-NH₂ SUPELCO 500 mg, 6 cc

- 1- Conditionner la cartouche avec 4 mL de MeOH
- 2- Déposer les 0.5 mL de l'extrait à purifier. Rincer le flacon avec 0.5mL de MeOH et déposer sur la cartouche.
- 3- Elution avec 2*1mL de MeOH

Diviser les échantillons en deux aliquots d'environ 1,5 mL chacun (répartition volumétrique égale) dans des flacons en verre ambré de 4 mL. Transférer le premier aliquot dans un flacon en verre ambré de 4 mL, destiné à l'analyse des androgènes, glucocorticoïdes et progestatifs (nommé « libres ») et le second aliquot dans un flacon en verre ambré de 4 mL, destiné à l'analyse des estrogènes dansylés (nommé « dansylés »),

A cette étape, il est possible de conserver l'extrait : cf. Conservation de l'extrait.

Les aliquots sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur automatique (type speedvac) (45°C) puis suivant le type d'analyses :

- pour l'analyse des libres repris dans 100 µL d'un mélange eau-ACN (35/65 ; v/v)
- pour l'analyse des dansylés dans un 200 µL d'acétone afin de réaliser la réaction de dansylation.

■ Conservation de l'extrait

Il est possible d'interrompre la procédure d'analyse après l'étape de purification. Les extraits méthanoliques peuvent être stockés à -20 ± 5 °C. Aucune instabilité n'a été mise en évidence sur une période de 1 mois.

■ Dansylation

Analyse des estrogènes dansylés.

Après purification/reconcentration, l'aliquot « dansylé » est repris dans 200 µL d'acétone. 500 µL de tampon bicarbonate de sodium (100 mM, pH=10,5) sont ajoutés. Le mélange est agité par vortex pendant 1 min. 500 µL de la solution de chlorure de dansyl à environ 1 mg.g⁻¹ dans l'acétone sont ajoutés. Le mélange est agité par vortex pendant 1 min avant d'être chauffé à 60°C pendant 6 min. Le mélange est ensuite évaporé à sec (45°C). L'extrait est ensuite repris par 2*600 µL de MeOH qui sont transférés dans un autre flacon afin d'éliminer les sels insolubles. Cet extrait est ensuite évaporé à sec avant d'être repris par 100 µL d'un mélange eau-acétonitrile (ACN) (35/65 ; v/v).

■ Volume ou masse finale avant analyse

2 aliquots de 100 µL eau-ACN (35/65 ; v/v)

■ Méthode analytique utilisée

Analyse des « libres » : androgènes, glucocorticoïdes et progestatifs

Paramètres chromatographiques

- Colonne : Accucore™ Biphenyl (2,6 µm, 2,1x100 mm, Thermo Scientific)
- Pré-colonne : Accucore™ Biphenyl (2,6 µm, 2,1x10 mm)
- Préfiltre : 0,2 µm
- Eluant A : eau ULC-MS grade acidifiée avec 0,1% d'acide acétique (v/v)
- Eluant B : ACN (HPLC grade) acidifié avec 0,1% d'acide acétique (v/v)
- Débit : 0,6 mL/min
- Température de la colonne : 40°C
- Gradient d'élution :

Temps (min)	Composition (%)	
	A	B
0,0	90	10
0,5	75	25
2,0	75	25
4,5	70	30
4,6	40	60
6,0	30	70
6,5	30	70
7,0	90	10
9,0	90	10

- Volume d'échantillon injecté : 10 µL
- Température de l'autosampler : 10°C

Paramètres spectrométriques

Le run d'analyse est divisé en deux segments :

- 0 à 5 min, pour l'analyse des glucocorticoïdes en mode ESI négatif
- 5 à 9 min, pour l'analyse des androgènes et des progestatifs en mode ESI positif

Paramètres de la source, de 0 à 5 min :

- Mode d'ionisation : ESI⁻
- Tension du capillaire : 2,00 kV
- Température de désolvatation : 650°C
- Débit du gaz de désolvatation : 1000 L/Hr
- Débit du gaz de cône : 50 L/Hr
- Débit du gaz de collision : 0,25 mL/min
- Température de la source: 150°C

Analyse en mode MRM

Composés	Temps de rétention (min) indicatif	Transition quantification (u.m.a.)	Transition confirmation (u.m.a.)
PRED-d8	2,7	427,3 > 337,3	427,3 > 367,3
PRED	2,8	419,4 > 329,4	419,4 > 359,4
COL	2,9	421,2 > 331,4	421,2 > 361,4
COR	3,3	419,4 > 329,3	419,4 > 359,4
BET	4,0	451,2 > 361,2	451,2 > 391,2
DEX-d5	4,1	456,3 > 364,3	456,3 > 396,2
DEX	4,1	451,2 > 361,2	451,2 > 391,4

Paramètres de la source, de 5 à 9 min :

- Mode d'ionisation : ESI⁺
- Tension du capillaire : 3,00 kV
- Température de désolvatation : 650°C
- Débit du gaz de désolvatation : 1000 L/Hr
- Débit du gaz de cône : 50 L/Hr
- Débit du gaz de collision : 0,25 mL/min
- Température de la source : 150°C

Analyse en mode MRM

Composés	Temps de rétention (min) indicatif	Transition quantification (u.m.a.)	Transition confirmation (u.m.a.)
T	5,6	289,3 > 97,0	289,3 > 109,1
T ¹³ C3	5,6	292,3 > 100,1	292,3 > 112,1
NOR-d6	5,7	305,3 > 237,2	305,3 > 113,1
NOR	5,7	299,2 > 108,9	299,2 > 83,0
17HPT	5,7	331,0 > 97,1	331,0 > 109,0
17HPT ¹³ C3	5,7	334,3 > 100,1	334,3 > 112,1
21HPT	5,8	331,2 > 97,0	331,2 > 109,0
AD	5,8	287,3 > 97,1	287,3 > 109,1
AD ¹³ C3	5,8	290,2 > 100,1	290,2 > 112,1

Composés	Temps de rétention (min) indicatif	Transition quantification (u.m.a.)	Transition confirmation (u.m.a.)
CYP	5,8	375,2>321,2	375,2>357,2
LEV-d6	5,9	319,3>251,4	319,3>115,2
LEV	5,9	313,2>109,0	313,2>245,0
DRO	6,1	367,2>97,0	367,2>83,0
DRO ¹³ C3	6,1	370,2>97,0	370,2>83,1
Ac CYP	6,1	417,1>357,2	417,1>279,2
Ac CHLOR	6,2	405,2>309,3	405,2>345,2

Analyse des « dansylés » : estrogènes

Conditions chromatographiques :

- Colonne : Accucore™ Biphenyl (2,6 µm, 2,1x100 mm, Thermo Scientific)
- Pré-colonne : Accucore™ Biphenyl (2,6 µm, 2,1x10 mm)
- Préfiltre : 0,2 µm
- Eluant A : eau ULC-MS grade acidifiée avec 0,01% d'acide formique (v/v)
- Eluant B : ACN acidifié avec 0,01% d'acide formique (v/v)
- Débit : 0,6 mL/min
- Température de la colonne : 40°C
- Gradient d'élution :

Temps (min)	Composition (%)	
	A	B
0,0	50	50
0,5	50	50
0,6	40	60
1,0	40	60
1,5	35	65
3,5	35	65
3,6	10	90
6,0	10	90
6,1	50	50
8,0	50	50

- Volume d'échantillon injecté : 10 µL
- Température de l'autosampler : 10°C

Paramètres spectrométriques

- Mode d'ionisation : ESI+ (span 0,2 Da)
- Tension du capillaire : 3,00 kV
- Température de désolvatation : 650°C
- Débit du gaz de désolvatation : 1000 L/Hr
- Débit du gaz de cône : 50 L/Hr
- Débit du gaz de collision : 0,25 mL/min
- Température de la source: 150°C

Analyse en mode MRM

Composés	Temps de rétention (min) indicatif	Transition quantification (u.m.a.)	Transition confirmation (u.m.a.)
E3	2,0	522,2>171,1	522,2>156,1
17βE2-d5	3,4	511,3>171,1	511,3>156,1
17βE2	3,5	506,2>171,1	506,2>156,1
17αE2	3,6	506,2>171,1	506,2>156,1
17αEE2-d4	3,7	534,1>171,1	534,1>156,0
17αEE2	3,7	530,1>171,1	530,1>156,1
E1	4,3	504,0>171,1	504,0>156,0
E1 ¹³ C3	4,4	507,3>171,2	507,3>156,1
DES-d8	5,2	743,1>171,1	743,1>156,3
DES	5,2	734,9>171,1	734,9>156,0

- **Equipements¹ (modèles utilisés)**

ACQUITY UPLC XEVO TQ MS H Class Waters

- **Type d'étalonnage**

Interne

11 étalons internes ont été utilisés. Le tableau précise les EI associés aux composés qu'ils quantifient.

Composés	Etalon interne	Composés	Etalon interne
AD	AD ¹³ C3	E1	E1 ¹³ C3
T	T ¹³ C3	E3	17βE2-d5
17HPT	17HPT ¹³ C3	17αE2	17βE2-d5
DRO	DRO ¹³ C3	17bE2	17βE2-d5
CYP	LEV-d6	17αEE2	17αEE2-d4
Ac CYP	LEV-d6	DES	DES-d8
NOR	NOR-d6	COR	DEX-d5
LEV	LEV-d6	COL	DEX-d5
Ac CHLOR	LEV-d6	BET	DEX-d5
21HPT	17HPT ¹³ C3	PRED	PRED-d8
DEX	DEX-d5		

- **Modèle utilisé**

Linéaire

| Domaine de concentration : De la LQ à 10 ng/L (ou au-delà si dilution) selon la molécule

- **Méthodes de calcul des résultats**

| Rendement :

- Utilisation du rendement : non

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

| Blancs :

- Matrice utilisée : eau Evian (méthode)
- Appareillage : solvant eau-ACN (35/65 ;v/v)
- Soustraction du blanc : non

Références de la méthode

■ La méthode est dérivée de la publication suivante

Développements de méthodes de quantification par spectrométrie de masse d'hormones stéroïdiennes et de composés apparentés dans des matrices environnementales et biologiques par Elodie Mirmont. Thèses de doctorat en Chimie analytique en préparation à l'Université de Paris (2019-2021), dans le cadre de ED 563 Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries.

Mirmont E., Boeuf A., Charmel M., Vaslin-Reimann S., Lalère B., Laprévotte O., Lardy-Fontan S., Development and implementation of an analytical method for the quantification of natural and synthetic steroid hormones in whole surface waters, J Chromatogr B., 2021 Jun 15;1175:122732. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122732.

■ Norme dont est tirée la méthode

NA

■ Niveau de validation selon Norman

Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

■ Norme utilisée

NF T90 :210 (2009)

NF ISO 11352 (2012)

| Domaine de validation : De la LQ à 10 ng L⁻¹

■ Matériaux de référence utilisés

Il n'existe pas de matériaux de référence à matrice pour ces substances.

■ Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)

Blancs méthodes <LQ/2

■ Rendement

Sept matrices (naturelles et synthétiques) présentant des propriétés physico-chimiques larges et représentatives du domaine d'application visé : eau Evian®, eau de la Rance, de la Saône, de l'Yvette, du lac de Créteil ainsi que de l'eau Evian® dopée en MES ou en Composés Organiques Dissous (COD) ont été utilisées.

Des eaux synthétiques de laboratoire ont été incluses dans cette étude pour leur praticité d'emploi et, plus particulièrement, afin de répondre à la difficulté d'obtention de matrices naturelles blanches (c'est-à-dire exemptes des composés d'intérêt). Les matrices blanches sont, en effet, essentielles pour valider l'exactitude de la méthode à faibles niveaux de concentration. C'est pourquoi, en plus de l'eau Evian® qui a servi de matrice modèle lors des développements méthodologiques, deux matrices synthétiques mimant des eaux naturelles ont été utilisées : une eau Evian® supplémentée en MES à 50 mg.L⁻¹ ainsi qu'une eau Evian® supplémentée en COD à 5 mg.L⁻¹.

Selon le composé, le premier niveau de concentration correspond à la LQ instrumentale, le deuxième et le troisième à une concentration 2 à 10 fois plus élevée que la LQ instrumentale, et le quatrième au niveau haut du domaine d'application.

Pour chaque matrice et chaque niveau de concentration, six essais en duplicat (répétabilité) ont été réalisés dans des conditions de fidélité intermédiaire (temps : 6 jours). Les rendements ont été évalués sur l'ensemble des matrices et des 12 mesures.

Substances	Toutes matrices	R	Toutes matrices	R	Toutes matrices	R	Toutes matrices	R
	(ng L ⁻¹)	%	(ng L ⁻¹)	%	(ng L ⁻¹)	%	(ng L ⁻¹)	%
AD	0,1	155%	0,5	119%	1	108%	10	113%
T	0,1	200%	0,5	118%	1	105%	10	105%
E3	0,05	75%	0,1	79%	0,5	92%	5	100%
E1	0,1	123%	0,4	112%	1	97%	10	108%
17aEE2	0,035	102%	0,05	102%	0,1	100%	1	106%
17bE2	0,1	111%	0,4	106%	1	98%	5	97%
17aE2	0,1	100%	0,4	91%	1	93%	5	100%
DES	0,5	100%	1	95%	2,5	95%	5	89%
DRO	0,25	109%	0,5	102%	1	96%	5	102%
DEX	0,1	113%	0,5	98%	1	95%	10	101%
CYP	0,5	118%	1	99%	2,5	102%	5	94%
COR	0,1	108%	0,5	97%	1	92%	10	94%
COL	0,1	165%	0,5	97%	1	87%	10	84%
LEV	0,5	110%	1	108%	5	111%	10	108%
PRED	0,1	118%	0,5	111%	1	108%	10	112%
NOR	0,5	148%	1	143%	5	105%	10	106%
BET	0,1	108%	0,5	91%	1	98%	10	95%
Ac CYP	0,5	106%	1	103%	2,5	104%	5	103%
Ac CHLOR	0,5	76%	1	80%	2,5	81%	5	79%
21-HPT	0,25	121%	0,5	108%	1	102%	5	102%
17-HPT	0,25	128%	0,5	105%	1	106%	5	103%

■ Limite de quantification (LQ) et Limite de détection (LD)

L'étude de la limite de quantification a été réalisée sur les 7 matrices décrites précédemment. Le critère d'acceptabilité de l'EMA a été fixé à 60%.

LD = 1/3 LQ

Substances	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)	Substances	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)
17αEE2	0,035	0,01	Ac CHLOR	1	0,3
17βE2	0,1	0,03	Ac CYP	0,5	0,15
E1	0,1	0,03	CYP	1	0,3
17αE2	0,1	0,03	LEV	1	0,3
E3	0,1	0,03	NOR	5	1,5
DES	0,5	0,15	DRO	0,25	0,08
T	0,5	0,15	17HPT	0,5	0,15
AD	0,5	0,015	21HPT	0,25	0,08
BET	0,1	0,03	COR	0,5	0,15
DEX	0,1	0,03	PRED	0,5	0,15
COL	0,5	0,15	/	/	/

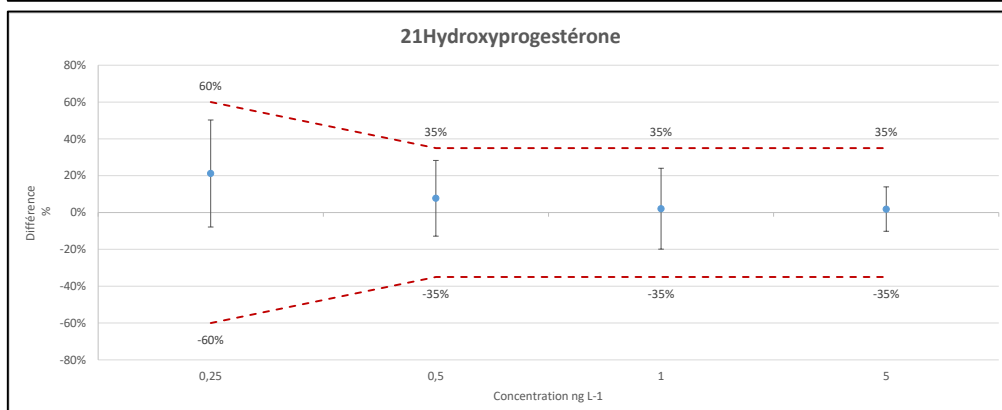
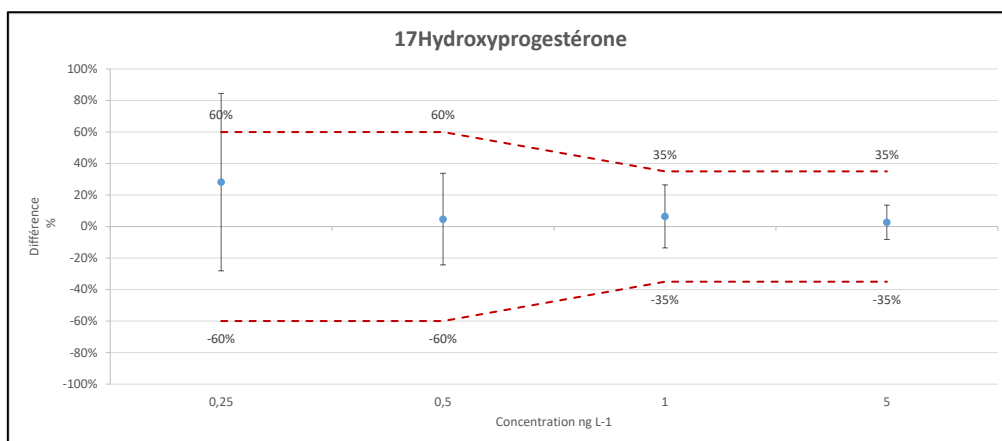
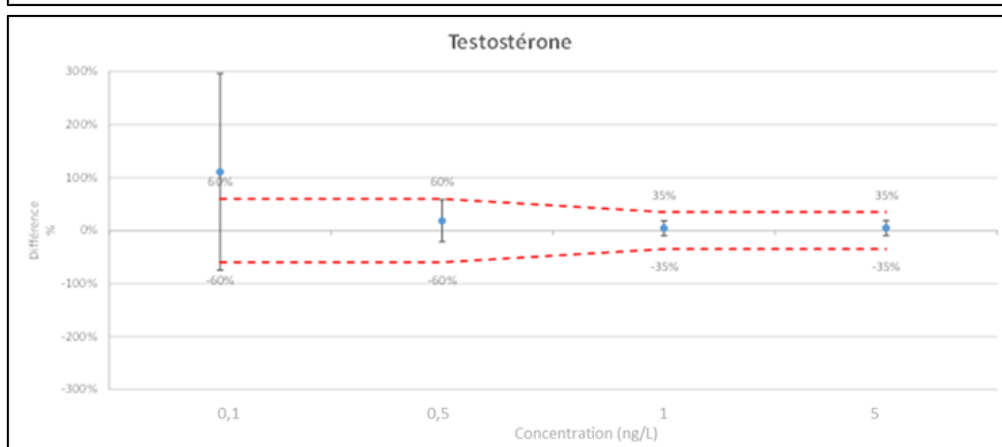
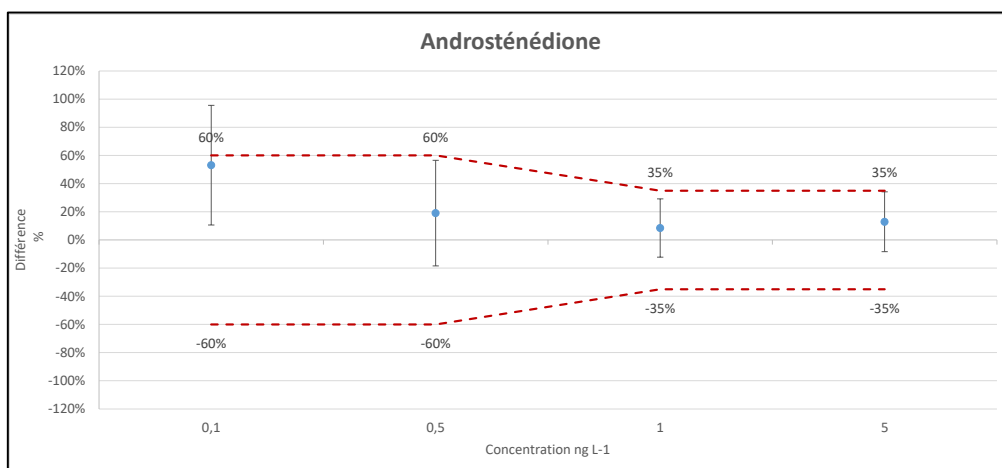
■ Incertitudes (%) sur les résultats

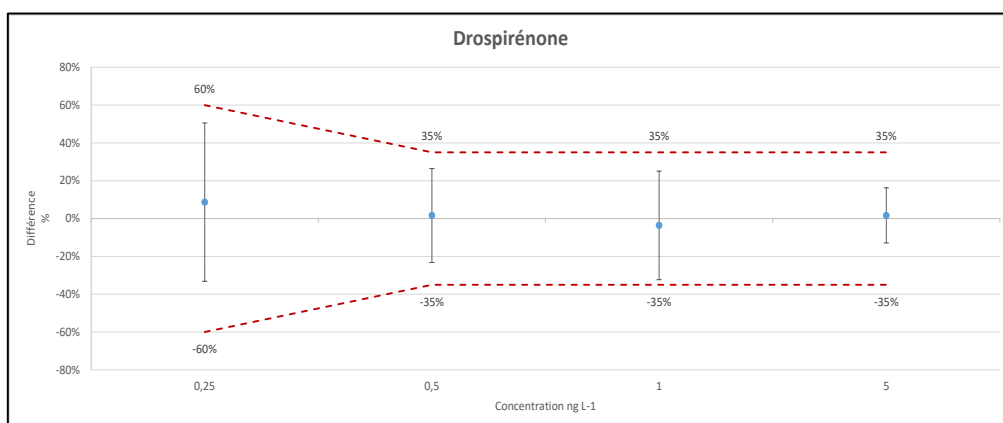
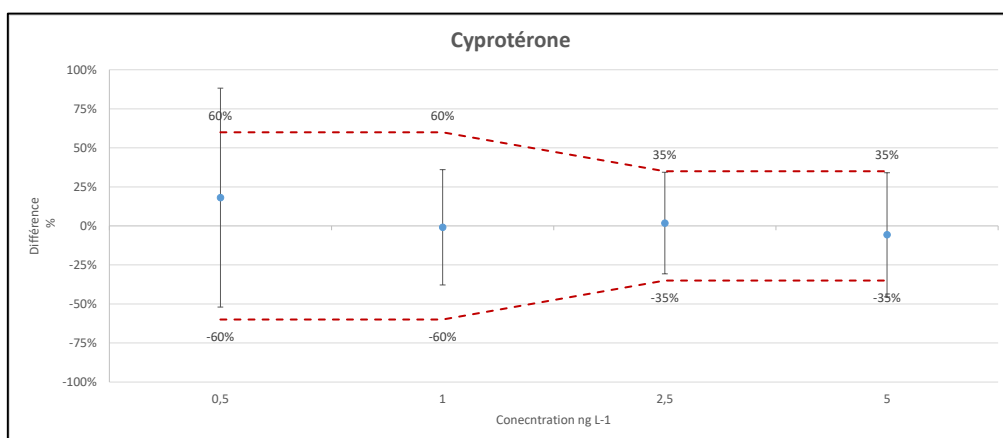
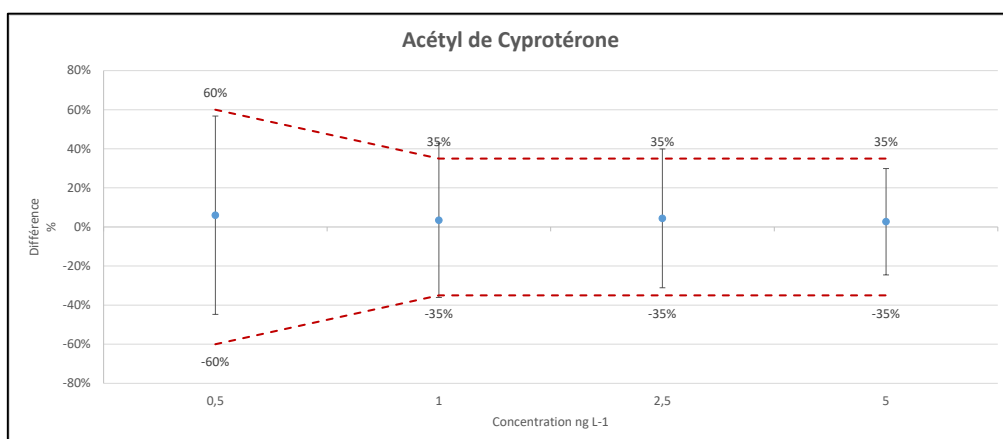
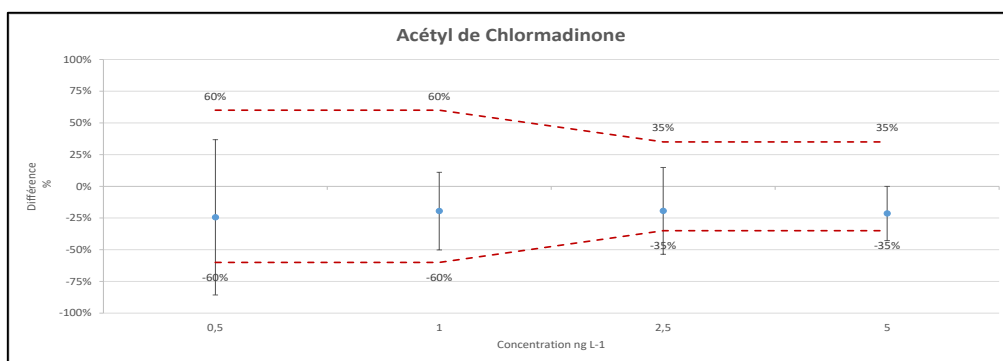
Méthode d'évaluation : NF EN ISO 11352

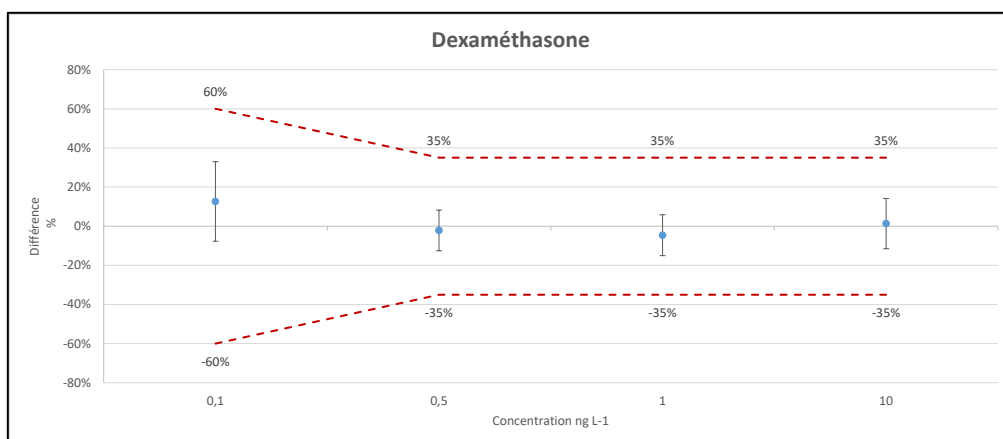
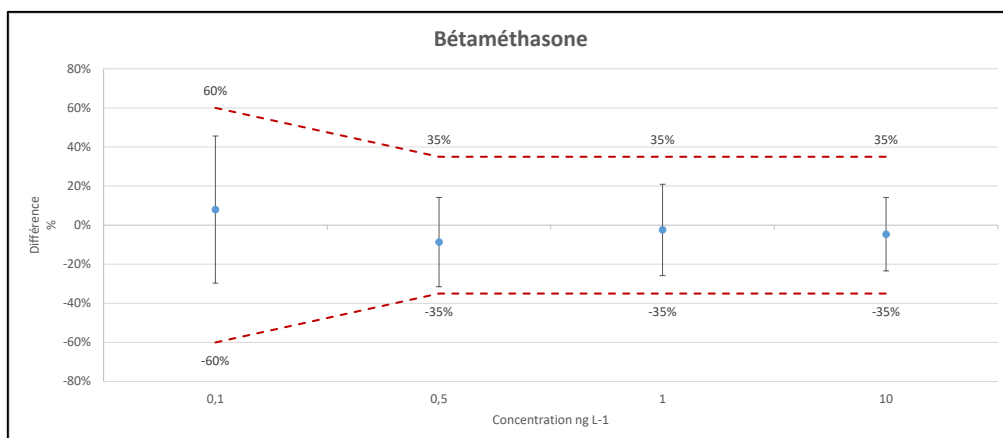
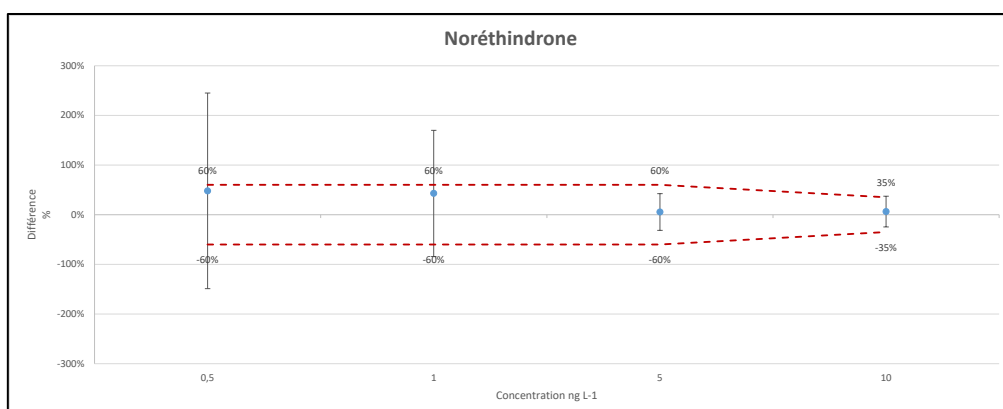
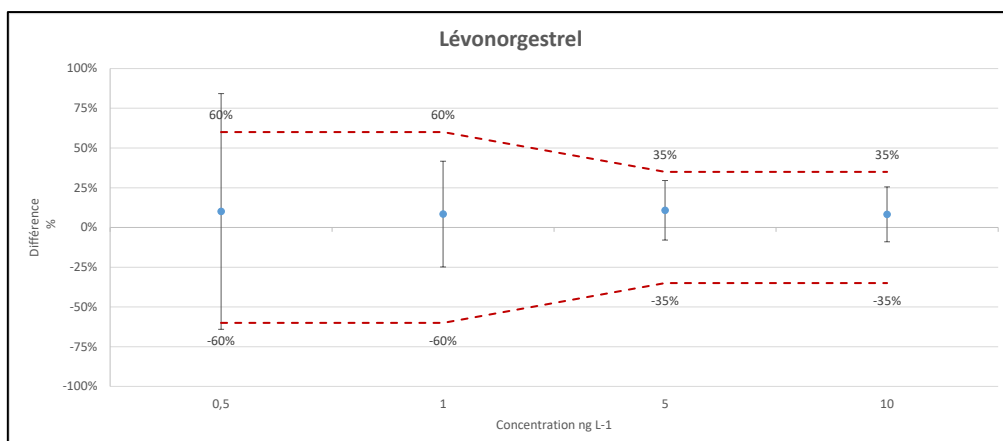
Facteur d'élargissement : K=2

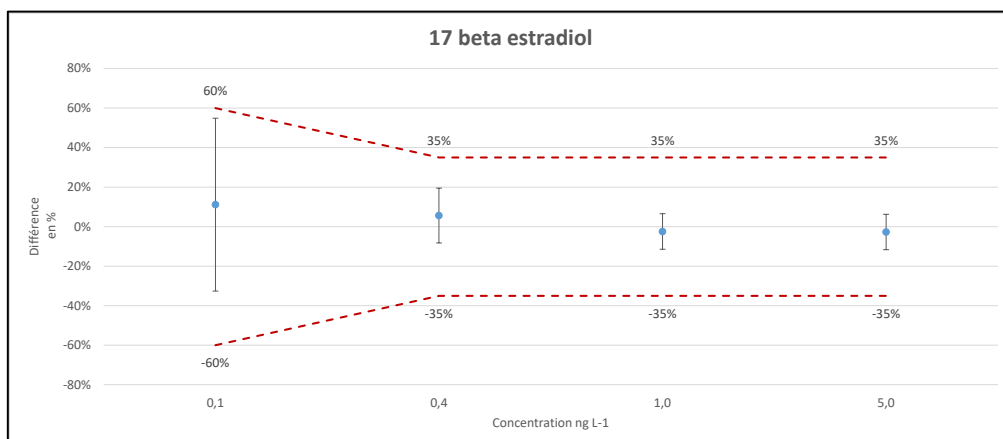
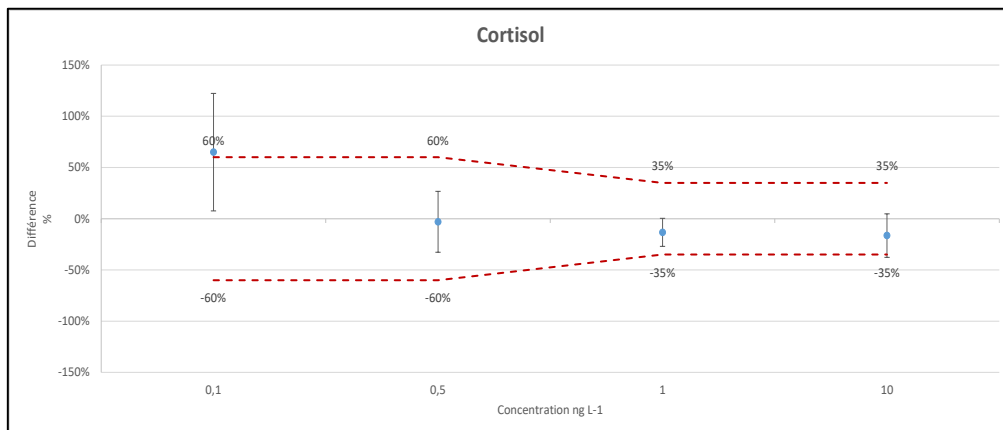
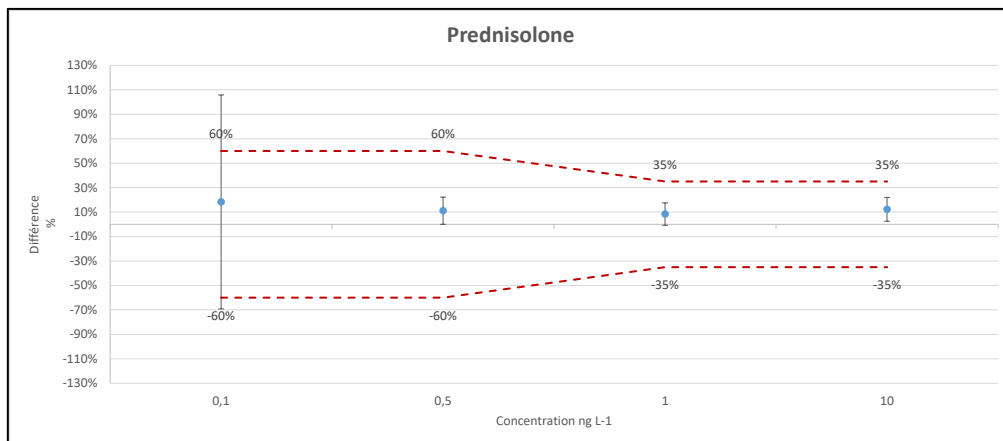
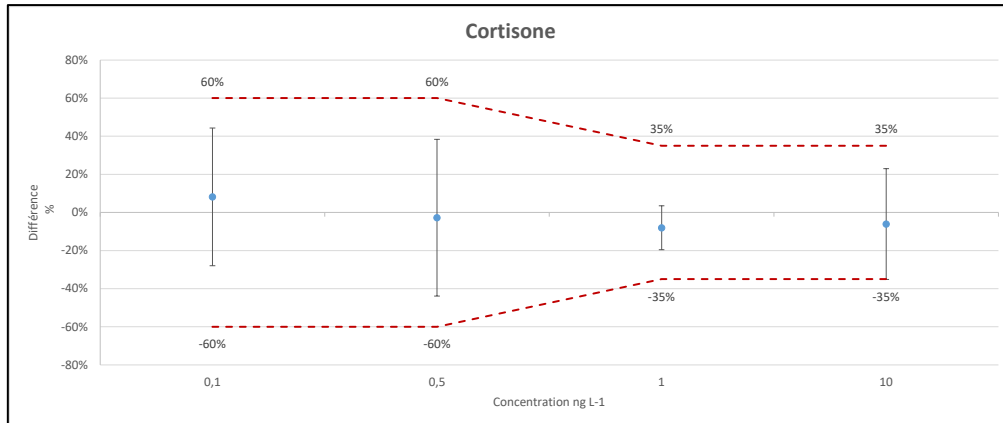
Les incertitudes ont été évaluées sur l'ensemble des matrices que celles utilisés pour le rendement.

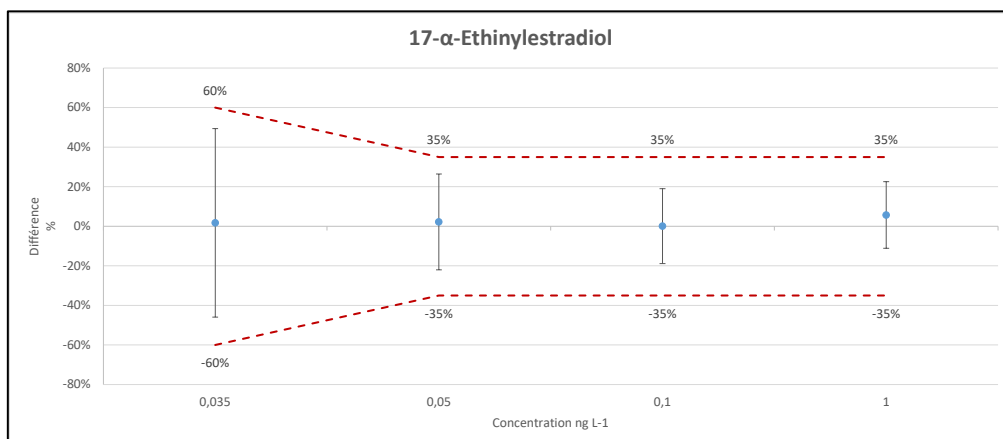
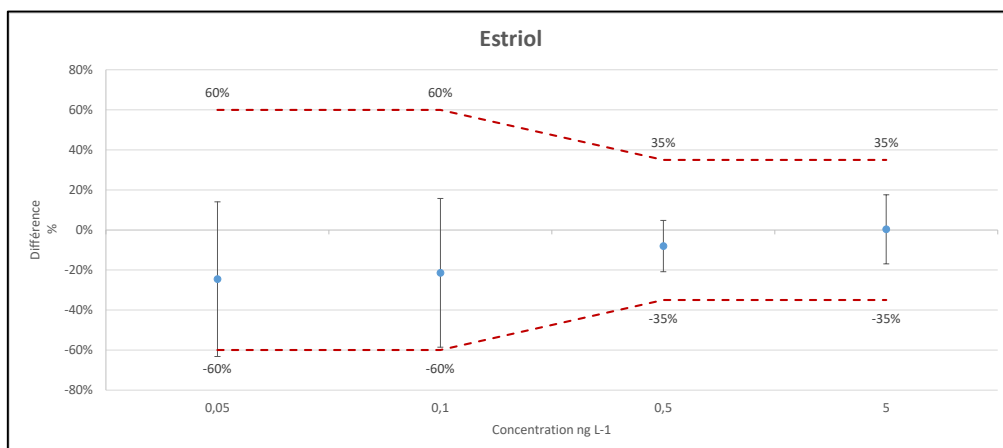
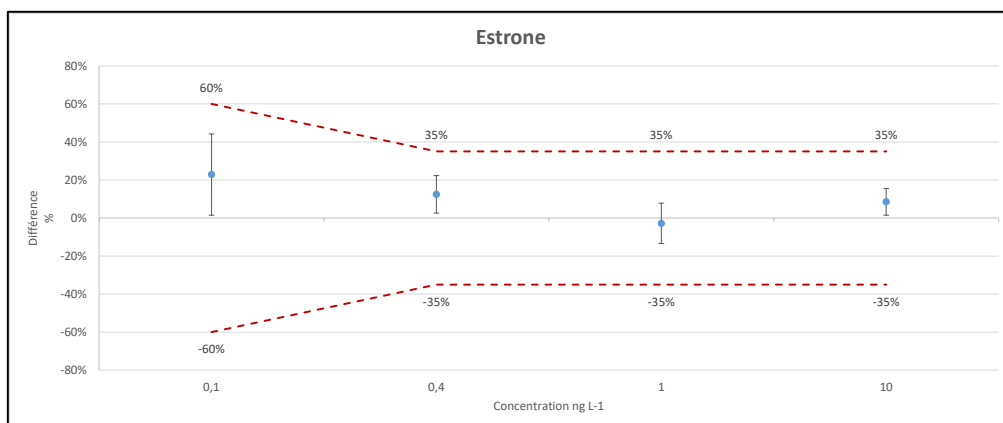
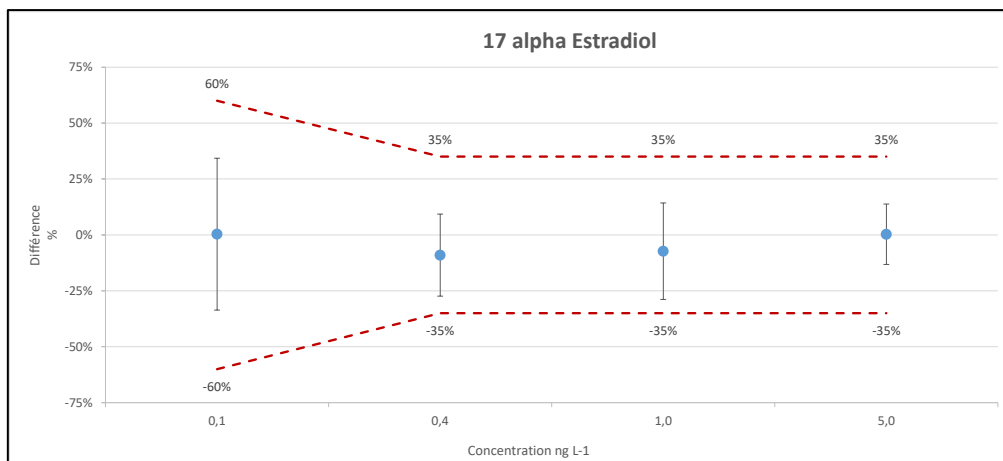
Composé	Niveau bas		Niveau haut	
	C (ng L ⁻¹)	U% (k=2)	C (ng L ⁻¹)	U% (k=2)
17αEE2	0,035	64%	1	25%
17βE2	0,1	59%	5	14%
E1	0,1	52%	10	19%
17αE2	0,1	46%	5	18%
E3	0,1	71%	5	23%
DES	0,5	68%	5	45%
T	0,5	58%	10	20%
AD	1	30%	5	36%
BET	0,1	52%	1	33%
DEX	0,1	37%	10	18%
COL	0,5	42%	10	46%
COR	0,5	57%	10	43%
PRED	0,5	27%	10	28%
Ac CHLOR	1	62%	5	55%
Ac CYP	0,5	68%	5	37%
CYP	1	51%	5	57%
LEV	1	47%	10	28%
DRO	0,25	57%	5	20%
17HPT	0,5	41%	5	16%
21HPT	0,25	56%	5	17%
NOR	5	50%	10	43%

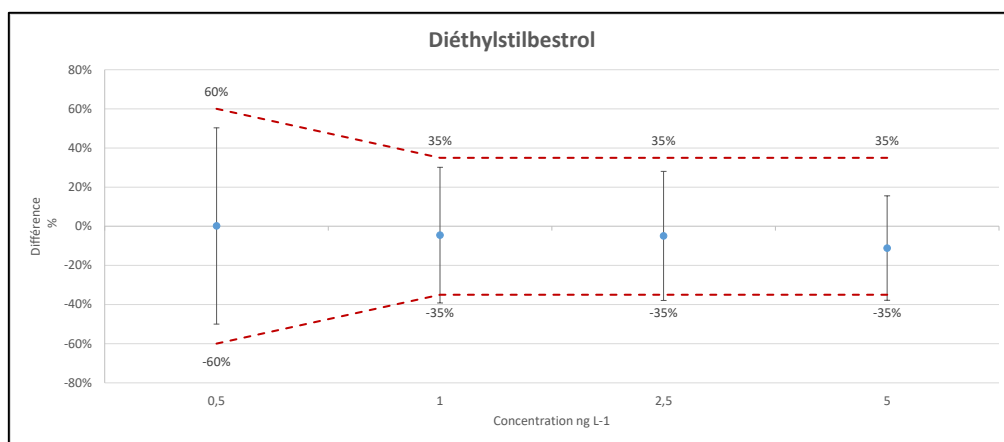
Représentations graphiques de type profil d'exactitude :











Contacts

- **Auteurs**

Sophie Lardy-Fontan, Elodie Mirmont, Melissa Charmel, Béatrice Lalere (LNE)

- **Contact**

Beatrice.lalere@lne.fr