

Hormones estrogéniques

Méthode d'analyse dans les matières en suspension et les boues

Références de la méthode

La méthode qui suit est dérivée de la publication suivante	Gabet-Giraud V., Miège C., Herbreteau B., Hernandez-Raquet G. et Coquery M. Development and validation of an analytical method by LC-MSMS for the quantification of estrogens in sewage sludge. <i>Analytical and bioanalytical chemistry</i> . 2010 , 396 (5), 1841-1851.
Norme dont est tirée la méthode	Sans objet
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1
Code SANDRE de la méthode (suivant niveau de validation)	Sans objet

Généralités

Nom de la famille de substances	Hormones estrogéniques.
Nom des substances individuelles	Estrone (E1), alpha et beta estradiol (17 α -E2 et 17 β -E2), estriol (E3), alpha éthinylestradiol (EE2).
Code(s) SANDRE des substances individuelles	Estrone : 5396 Alpha estradiol : 5399 Beta estradiol : 5397 Estriol : 6446 Alpha éthinylestradiol : 2629
Matrice analysée	Matières en suspension et boues
Acronyme	PFE/SPE/LC/MS-MS
Principe de la méthode	Extraction à l'ASE, puis sur phase solide. Purification sur phase solide, analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Domaine d'application	Limite inférieure : LQ Limite supérieure : dépend du dernier point de gamme injecté et de la dilution de l'échantillon (à titre d'indication pour un dernier point de gamme à 100 µg/L, un volume de reprise de 200 µL et sans dilution de l'échantillon : 40 µg/kg pour les boues).
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	MES : taux de MES de l'eau considérée. Boues : taux humidité
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®).

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 particulaire Boues
Conditionnement et conservation des échantillons - Protocole : - Nature du contenant de stockage : - Lavage du contenant : - Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	MES : la filtration doit être effectué le plus rapidement possible (moins de 24 heures à 4°C conseillé). Le volume d'eau filtré doit être noté précisément : le résultat est donné en fonction du volume d'eau filtré et du taux de MES (et non en fonction de la masse sur le filtre). Filtres : Whatman® fibre de verre de diamètre de 45 mm ; porosité 0,7 µm (préalablement calcinés 1 heure à 450°C). Support de filtration : Sartorius® avec fritté en verre. Les MES sont ensuite congelées. MES (sur filtre) : papier aluminium. Boues : pot en verre ambré. Lavage en machine puis rinçage à l'acétone. MES : <i>En cours</i> . Boues : après centrifugation le cas échéant, séchage et lyophilisation, conservation pendant 7 mois à température ambiante dans des flacons de verre ambré.
Filtration : - Type de filtre et méthode de nettoyage : - Type de support de filtration :	

Pré-traitement des échantillons liquide ou solide

Les filtres contenant les MES sont broyés.
Les échantillons de boue sont lyophilisés, broyés et homogénéisés (les boues liquides sont centrifugées au préalable).

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

Eau : phase particulaire entre 200 et 2500 mL en fonction du volume disponible et du taux de MES.
Boues 0,5 g

Dérivation

- Conditions (réactifs, solvants, pH, température et durée)

S/O

Extraction

- Liquide / Liquide (préciser la nature et le volume du solvant)

Une extraction par PFE puis par SPE et enfin une purification par SPE sont effectuées :
Sans objet

- Micro-onde (préciser la nature et le volume du solvant ainsi que les paramètres d'utilisation de l'appareil)

Sans objet

- PFE (T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush)

Extraction ASE avec un Dionex ASE® 200 et des cellules de 33 mL.
Les échantillons sont dopés dans la cellule (25 µL d'une solution d'acétone contenant les 4 traceurs deutériés à 500 µg/L : Estrone-D4, β-Estradiol-D2, Estriol-D2, α-Ethynilestradiol-D4) après homogénéisation et homogénéisés avec du sable de Fontainebleau. Une autre couche de sable puis un filtre en entrée de cellule sont ensuite additionnés.
Les cellules comportent également 2 filtres en sortie afin d'éviter le colmatage.

Temps (min.)	Etapes
0 - 5	Préchauffage
5 - 10	Chauffage à 100 °C
10 - 25	Phase statique avec 80/20 v/v H ₂ O/MeOH (100°C, 100 bars) pendant 5 minutes puis vidange (100 % du volume de la cellule). Cycle répété 3 fois.
120 s	Purge

- SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'élution)

SPE sur Autotrace Caliper® sur cartouche OASIS (Waters®) HLB 6 mL, 500 mg :

- conditionnement de la colonne par 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau milliQ®
- percolation de l'extrait provenant de l'ASE (environ 30 mL) à 10 mL/min
- rinçage de la colonne par 10 mL d'eau milliQ®
- séchage sous azote pendant 45 min
- élution par 6 mL d'acétate d'éthyle

Evaporation sous courant d'azote et reprise dans 1 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50 v/v)

Sans objet

- Micro extraction (support, durée d'exposition, température, sel)

- Autre (préciser)

Sans objet

Purification

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

SPE non automatisée sur manifold sur Florisil (Supelco®) 6 mL, 1 g
 - conditionnement de la phase par 2 mL d'un mélange heptane/dichloromethane 50/50 v/v
 - percolation de l'échantillon (1 mL dans le mélange heptane/dichloromethane 50/50 v/v)
 - rinçage par 2 mL du mélange heptane/dichloromethane 50/50 v/v
 - séchage sous vide
 - élution par 5 mL d'un mélange acétone/heptane 75/25 v/v
 Evaporation sous courant d'azote et reprise dans 200 µL d'une solution d'eau/acétonitrile 90/10 v/v. La solution se conserve à -20°C pendant 1 mois (la gamme d'étalonnage est préparée le même jour et également congelée)

Conservation de l'extrait

Pas d'étude effectuée.

Minéralisation

Type d'appareil utilisé
 Durée et température et de minéralisation :
 Réactifs utilisés :

Sans objet

Volume ou masse finale avant analyse :

200 µL (150 µL analysés directement et 50 µL dilués par 10 dans un mélange eau/acétonitrile 90/10 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) Pour la détection par masse : mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation

Séparation HPLC :

- ☐ Colonne : Xbridge Waters© C18 (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 : eau qualité HPLC (A) / acétonitrile (B)
- ☐ Durée d'analyse (y compris équilibrage) : 51 minutes
- ☐ Débit : 0,2 mL/min

Gradient :

Temps (min.)	Composition (%)
-8 - 0	90% (A) / 10% (B)
0 - 4	90% (A) / 10% (B)
4 - 37	90% (A) / 10% (B) → 100% (B)
37 - 42	100% (B)
42 - 43	100% (B) → 90% (A) / 10% (B)

Analyse par spectrométrie de masse :

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

Composés	Transition de quantification (u.m.a.)	Transition de confirmation (u.m.a.)
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	

Equipement ¹(modèles utilisés) :	Chromatographie liquide haute performance Agilent® 1100 Spectromètre de masse Applied Biosystem® API 4000 (triple quadrupole linéaire)
Type d'étalonnage	Externe
Modèle utilisé	Linéaire
Etalons / Traceurs utilisés	Traceurs de méthode : Estrone-D4, β -Estradiol-D2, Estriol-D2, α -Ethinylestradiol-D4.
Domaine de concentration	Gamme comprise entre 0,25 et 100 $\mu\text{g/L}$.
Méthode de calcul des résultats	
Rendement	Utilisation du rendement : oui, traceurs deutérés utilisés pour une correction systématique des concentrations (la β -Estradiol-D2 est utilisée pour quantifier l' α et la β estradiol)
Blancs	Les blancs solvants (étape d'analyse) sont vérifiés toutes les 3 injections et ne doivent pas dépasser la valeur de la LQ pour chaque composé sinon ils sont soustraits.

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	Des test de répétabilité, reproductibilité, spécificité et rendements (étude de la justesse) ont été effectués sur des boues comportant des teneurs en matière organique variable. Les MES étant des matrices moins chargées, on considère que la validation réalisée sur les boues est valable aussi pour les MES.																																		
Modèle utilisé	Linéaire																																		
Domaine de validation	De 0,25 à 100 µg/L.																																		
Matériaux de référence certifiés utilisés	Sans objet																																		
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	Blancs méthode : les blancs méthode (sable de Fontainebleau) n'ont pas montré de contamination (<LD).																																		
Rendement - par type de matrice - par niveau de concentration	Répétabilité : Sur boues dopées : dopage bas : 10 ng/g (sauf pour E1 : 20 ng/g) et dopage haut : 60 ng/g. n = 5 <table><tr><th rowspan="2">Substances</th><th colspan="2">Dopage bas</th><th colspan="2">Dopage haut</th></tr><tr><th>R (%)</th><th>CV (%)</th><th>R (%)</th><th>CV (%)</th></tr><tr><td>E1</td><td>95</td><td>27</td><td>116</td><td>2</td></tr><tr><td>αE2</td><td>126</td><td>16</td><td>105</td><td>2</td></tr><tr><td>βE2</td><td>89</td><td>11</td><td>95</td><td>3</td></tr><tr><td>E3</td><td>103</td><td>13</td><td>111</td><td>7</td></tr><tr><td>EE2</td><td>86</td><td>17</td><td>109</td><td>6</td></tr></table>	Substances	Dopage bas		Dopage haut		R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)	E1	95	27	116	2	αE2	126	16	105	2	βE2	89	11	95	3	E3	103	13	111	7	EE2	86	17	109	6
Substances	Dopage bas		Dopage haut																																
	R (%)	CV (%)	R (%)	CV (%)																															
E1	95	27	116	2																															
αE2	126	16	105	2																															
βE2	89	11	95	3																															
E3	103	13	111	7																															
EE2	86	17	109	6																															

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

Sur boues non dopées :

Substances	n	Concentration (ng/g)			CV (%)		
		Moyenne	Min	Max	Moyenne	Min	Max
E1	12	27,7	3,8	63,0	11	1	36
αE2	5	9,6	4,2	15,5	12	5	22
βE2	9	12,5	4,5	22,1	15	9	39
E3	10	8,2	5,3	13,1	7	1	16
EE2	0	/	/	/	/	/	/

n : nombre d'échantillons quantifiés

/ : molécule non quantifiée

Reproductibilité, sur boues non dopées. n=4 :

Substances	Concentration (ng/g)	CV (%)
E1	27,7	18
αE2	5,4	68
βE2	10,3	14
E3	6,9	20
EE2	< LQ	/

Le CV élevé de l' αE2 se justifie par le fait que sa concentration soit proche de la LQ.

- par molécule

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

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

(indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)

N'ayant pas de matrice non contaminée pour effectuer les tests, les LQ données sont à titre indicatif. Elles sont obtenues à partir du 1^{er} point de gamme confirmé corrigé par le rendement des deutérés associé à chaque échantillon.

1 ng/g pour E1

de 2 à 4 ng/g pour αE2, βE2 et E3

5 ng/g pour EE2

Spécificité de la méthode (préciser la matrice)

Matrices testées : 8 boues différentes, provenant de procédés de traitement différents.

8 dopages de 10 à 160 ng/g sauf pour EE2 6 dopages de 10 à 100 ng/g.

Test de Student avec un risque de 5 % (comparaison entre les concentrations ajoutées et les concentrations mesurées).

Droite de régression : conc mesurée = f(conc ajoutée). L'ordonnée à l'origine a été comparée à 0 et la pente à 1. La spécificité a été validée pour chacun des analytes.

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

(reproductibilité avec méthode de détermination)

Résultats donnés avec un facteur d'élargissement de 1 (données obtenues avec N=4 répétitions en reproductibilité, voir paragraphe « Rendement ») : <20%
Attente de résultats d'un EIL pour préciser les incertitudes.

Contacts

Auteurs	Cécile Miegé
Institut	Cemagref (Lyon)
Adresses mail	cecile.miege@cemagref.fr