Hormones estrogéniques
Méthode d'analyse dans l'eau – Phase dissoute

Références de la méthode

La méthode qui suit 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. Trends in Analytical Chemistry. Sous presse.
Norme française et/ou européenne dont est tirée la méthode	*Sans objet*

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 éthynilestradiol (EE2)
Matrice analysée	Eau : Eau douce de surface Eau souterraine Eau résiduaire
Nom de la méthode	SPE-LC-MS-MS
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.

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)
Autres paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	*Sans objet*
Précautions générales à suivre lors de l'analyse	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®)

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :	Eau : Phase dissoute
Conditionnement et conservation des échantillons	
- Protocole :	Echantillonnage grâce à matériel en téflon ou/et en verre.
- Nature du contenant de stockage :	Verre ambré
- Lavage du contenant :	Lavage en machine puis rinçage à l'acétone
- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,…) :	Eau brute : 24 heures à 4°C
Filtration :	
- Type de filtre et méthode de nettoyage :	- Filtres Whatman fibre de verre de diamètre de 45 mm ; porosité 0,7 µm (préalablement calcinés 1 heure à 450°C)
- Type de support de filtration :	- Support Sartorius avec fritté en verre
Pré-traitement des échantillons solide ou liquide	Déconjuguaison, 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 ou 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)**

Dérivation[N10] - Conditions (réactifs, solvants, pH, température et durée)	*S/O*
Extraction - Liquide / Liquide (préciser la nature et le volume du solvant)	*Sans objet*
- Micro-onde (préciser la nature et le volume du solvant ainsi que les paramètres d'utilisation de l'appareil)	*Sans objet*
- 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)
- ASE (T°c, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush)	*Sans objet*
- Autre (préciser)	*Sans objet*
Purification (type de purification, paramètres de purification, méthode d'évaporation)	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)
Minéralisation Type d'appareil utilisé Durée et température et de minéralisation : Réactifs utilisés :	*Sans objet*

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 <u>Analyse en masse :</u> 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
Equipement (modèles utilisés) :	Chromatographie liquide haute performance Agilent 1100 Spectromètre de masse Applied Biosystem API 4000 (triple quadrupole linéaire)
Type d'étalonnage	Interne
Modèle utilisé **Etalons / Traceurs utilisés** **Domaine de concentration**	Linéaire Traceurs d'injection : Estrone-D4, β -Estradiol-D2 (pour quantifier l' α et la β estradiol), Estriol- D2, α-Ethynilestradiol-D4. Traceur interne : E2-acétate 0,2-500 µg/L
Méthode de calcul des résultats	Correction par le rendement : Oui (correction par le rendement des deutérés)

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée : NF XPT 90-210 (1999)

Modèle utilisé : Linéaire

Domaine de validation : 0,2-100µg/L

Niveau de validation selon Norman : Niveau 2
COST-636

Matériaux de référence certifiés utilisés : *Sans objet*

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

Moyennes journalières des rendements (R, %, n=5) et des écart-types (RSD, %, n=5)

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 détection (LD)
Limite de quantification (LQ)
(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
17α-E2	0.4	0.8	0.4
17β-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
Spécificité de la méthode (préciser la matrice)	Testée : Oui (selon NF XPT90-210 (1999)) sur eau de rivière, influent, effluent.
Incertitudes (%) sur les résultats **- par type de matrice** **- par niveau de concentration** **- par molécule** (reproductibilité avec méthode de détermination)	*En cours selon NF 90-220*

Contacts

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