

Principe de validation d'une méthode de mesure de l'activité oestrogénique

Béatrice Lalère, Nathalie Guigues(LNE)



Metrology for monitoring endocrine disrupting compounds under the Water Framework Directive Juin 2019-Février 2023

LNE - Coordinator



The EMPIR initiative is co-funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme and the EMPIR Participating States

Constats en 2019

- Pas de norme EN ou ISO relative aux méthodes basées sur la spectrométrie de masse,
- Limite de quantification (LOQ) très basse nécessaire pour permettre la surveillance des œstrogènes à un niveau pertinent
- Pas méthodes basées sur les effets (EBM) doivent être utilisés dans un contexte réglementaire Manque/absence de matériaux de référence et de tests de compétence ad hoc

Objectifs

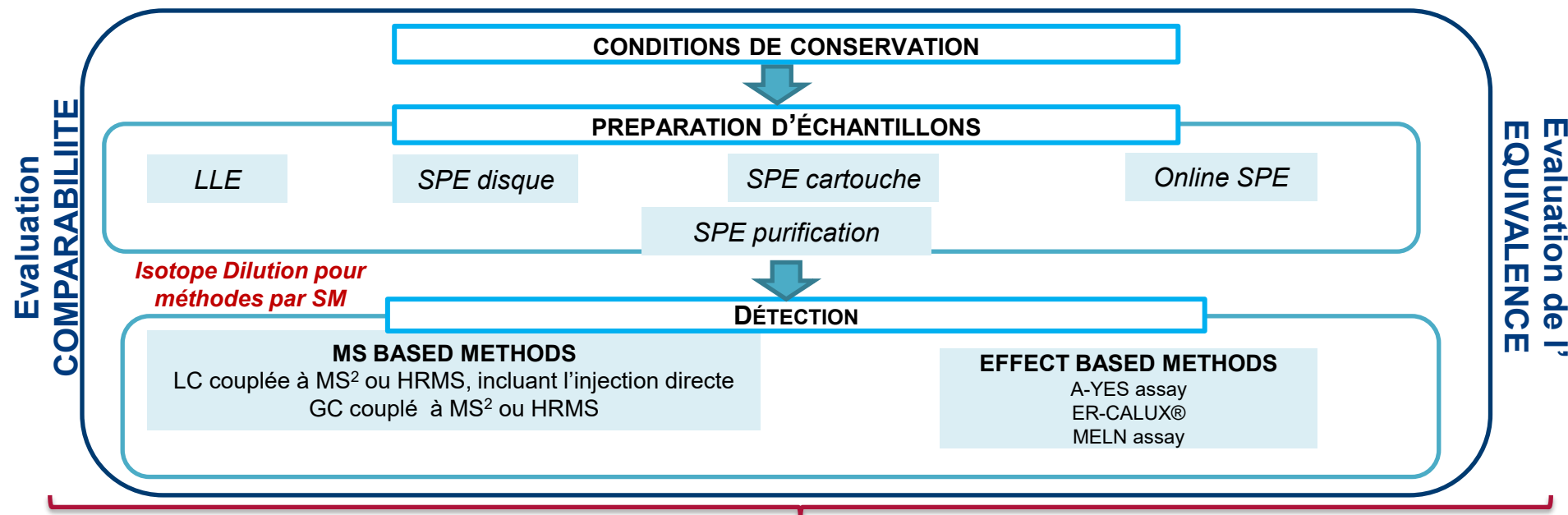
- Comparaison des techniques de préparation d'échantillons pour la détermination des œstrogènes dans l'eau brute et recommandations sur les techniques les plus appropriées et compatibles avec les exigences de la DCE ($LOQ \leq 30\% NQE$ et $U(k=2) \leq 50\% \text{ à la } NQE$)
- Recommandations visant à améliorer la comparabilité des mesures d'œstrogènes avec l'ensemble des EBM sélectionnés dans des échantillons d'eau brute aux niveaux des normes de qualité de l'eau



“Metrology support for Regulation and Standards”

- 8 partenaires de 6 pays européens
- 6 NMI/DI, 1 laboratoire académique et 1 institut de recherche

OPTIMISATION / VALIDATION DE OU DES MÉTHODES



Après accord sur les protocoles, validation de méthode :

- CEN/TS 16800:2020 : approche visant à valider les méthodes d'analyse physico-chimiques applicables aux matrices solides et à l'eau dans le domaine de l'environnement
- Application de la NF T90-210
- Incertitudes selon la NF ISO 11352

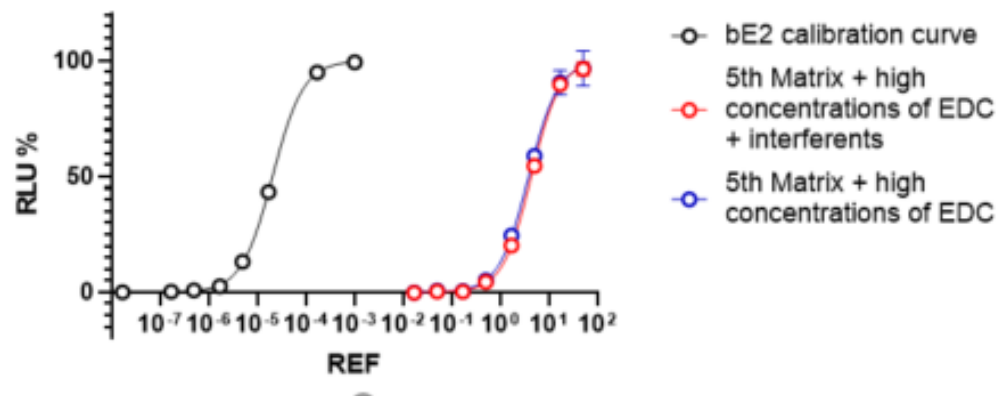
Batch	Matrix	EDC (ng/L)	Performance Characteristic
0	Calibration verification	Calibration Solutions (8 solutions measured in triplicate) obtained by CRMs dilution	Calibration verification
		1st Verification Calibration Solution corresponding to approximately EC50.	
		2nd Verification Calibration Solution corresponding to approximately the highest calibration level .	
1	EVIAN+DOC 1 mg/L	EVIAN water as Procedural Blank	reagents check
		EVIAN + DOC 1 mg/L without the addition of hormones	"Background"
		*Milli-Q + 10 LOQ-V E2 eq	Matrix Effect
		*EVIAN +DOC 1 mg/L + 10 LOQ-V E2 eq +interferents	Interferents effect
		EVIAN +DOC 1 mg/L +10 LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness, LOQ _v
		EVIAN +DOC 1 mg/L + 3LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness
2	EVIAN+DOC 7 mg/L	EVIAN +DOC 1 mg/L + 10 LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness, DOC effect
		EVIAN water as Procedural Blank	reagents check
		EVIAN + DOC 7 mg/L without the addition of hormones	"Background"
		*Milli-Q + 10 LOQ-V E2 eq	Matrix Effect
		*EVIAN +DOC 7 mg/L + 10 LOQ-V E2 eq +interferents	Interferents effect
		EVIAN +DOC 7 mg/L +LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness, LOQV
		EVIAN +DOC 7 mg/L + 3 LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness
		EVIAN +DOC 7 mg/L + 10 LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness, DOC effect
		EVIAN + DOC 14 mg/L without the addition of hormones	"Background" in DOC effect
		EVIAN +DOC 14 mg/L + 10 LOQ-V E2 eq	DOC effect

Batch	Matrix	EDC (ng/L)	Performance Characteristic
3	EVIAN+DOC 7 mg/L + TSS 50 mg/L	EVIAN water as Procedural Blank	reagents check
		EVIAN + DOC 7 mg/L +TSS without the addition of hormones	"Background"
		*Milli-Q + 10 LOQ-V E2 eq	Matrix Effect
		*EVIAN +DOC 7 mg/L + TSS + 10 LOQ-V E2 eq +interferents	Interferents effect
		EVIAN +DOC 7 mg/L + TSS + LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness, LOQ _v
		EVIAN +DOC 7 mg/L + TSS + 3LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness
4	1st Natural/syntetic sample spiked at three different level of concentration (partner choice)	EVIAN +DOC 7 mg/L +TSS + 10LOQ-V E2 eq	Precision, Trueness
		EVIAN water as Procedural Blank	reagents check
		Natural sample without the addition of hormones	"Background"
		*Milli-Q + 10 LOQ-V E2 eq	Matrix Effect
		*Natural sample + 10 LOQ E2-V eq + interferents	Interferents effect
		EDC at LOQ E2-V eq	Precision, Trueness, LOQV
5	2nd Natural/syntetic sample spiked at three different level of concentration (partner choice)	EDC at 3 LOQ E2-V eq	Precision, Trueness
		EDC at 10 LOQ E2-V eq	Precision, Trueness
		EVIAN water as Procedural Blank	reagents check
		Natural sample without the addition of hormones	"Background"
		*Milli-Q + 10 LOQ E2 eq	Matrix Effect
		*Natural sample + 10 LOQ E2 eq + interferents	Interferents effect
6	3rd Natural/syntetic sample spiked at three different level of concentration (partner choice)	EDC at LOQ level each	Precision, Trueness, LOQ _v
		EDC at 3 LOQ level each	Precision, Trueness
		EDC at 10 LOQ level each	Precision, Trueness
		EVIAN water as Procedural Blank	reagents check
		Natural sample without the addition of hormones	"Background"
		*Milli-Q + 10 LOQ E2 eq	Matrix Effect
		*Natural sample + 10 LOQ E2 eq + interferents	Interferents effect
		EDC at LOQ level each	Precision, Trueness, LOQV
		EDC at 3 LOQ level each	Precision, Trueness
		EDC at 10 LOQ level each	Precision, Trueness

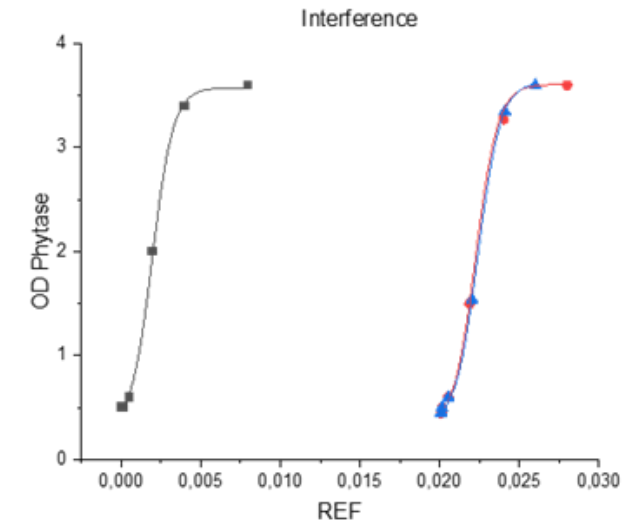
Ajout à l'échantillon d'œstrogènes, du bisphénol A et du 4-nonylphénol à une concentration élevée
(0,59 µg/L de BPA et 0,46 µg/L de 4NP)

Comparaison des courbes observées (c'est-à-dire celles de l'échantillon et celles de l'échantillon + interférents)

Laboratoire 1 : CALUX



Laboratoire 2 : A-YES



Les courbes sont similaires ➡ les résultats ne présentent pas de différence significative, les interférents n'ont pas d'incidence sur les résultats.

Ajout à l'échantillon (concentration fixe en œstrogènes) d'une solution de COD

Comparaison de la variation de EC_{50} et le coefficient de Hill

Laboratoire 1 : CALUX

Matrix (DOC mg/L)	EC50 [REF]	Hill's slope
1	3.45	1.29
7	3.94	1.49
14	3.58	1.38
Mean [REF]	3.66	1.39
RSD %	6.95	7.10

Laboratoire 2 : A-YES

Matrix (DOC mg/L)	EC50 [REF]	Hill's slope
1	0.32	2.71
7	0.25	2.58
14	0.23	2.51
Mean [REF]	0.27	2.60
RSD %	17	4

Dispersions faibles ➡ pas d'effets du COD

Matrix	EDC levels of concentration tested (ng/L)
In-house reference materials containing EVIAN+DOC 1 mg L ⁻¹ as matrix. Three levels, each spiked with different amount of estrogens	LOQ-V
	3LOQ-V
	10LOQ-V
In-house reference materials containing EVIAN+DOC 7 mg L ⁻¹ as matrix. Three levels, each spiked with different amount of estrogens	LOQ-V
	3LOQ-V
	10LOQ-V
In-house reference materials containing EVIAN+DOC 7 mg L ⁻¹ + SPM 50 mg L ⁻¹ as matrix. Three levels, each spiked with different amount of estrogens	LOQ-V
	3LOQ-V
	10LOQ-V
1st Natural sample spiked at three different levels of concentration	LOQ-V
	3LOQ-V
	10LOQ-V
2nd Natural sample spiked at three different levels of concentration	LOQ-V
	3LOQ-V
	10LOQ-V
3rd Natural sample spiked at three different levels of concentration	LOQ-V
	3LOQ-V
	10LOQ-V

1	Eau minérale EVIAN + 1 mg/L COD
2	Eau minérale EVIAN + 7 mg/L COD
3	Eau minérale EVIAN + 7 mg/L COD + 50 mg/L MES
4	Eau du robinet BAM – Adlerhof (COD 10 mg/L, pH 7.1)
5	Canal Teltow canal (COD 12 mg/L, pH 6.8)
6	Eau minérale Saskia - Source Leissling (DE) COD 3 mg/L, pH 6.5)

	Compound Concentration level	17 β -estradiol			17 α -estradiol			17 α -ethinyl estradiol			Estrone			Estriol		
		LOQ	3 LOQ	10 LOQ	LOQ	3 LOQ	10 LOQ	LOQ	3 LOQ	10 LOQ	LOQ	3 LOQ	10 LOQ	LOQ	3 LOQ	10 LOQ
Partner 1	C (ng/L)	0,123	0,275	0,958	0,111	0,247	0,859	0,008	0,017	0,060	0,134	0,298	1,037	0,112	0,250	0,869
	Bias (%)	15	8	10	17	13	10	31	26	20	13	10	14	69	33	12
	Precision (%)	20	11	10	11	17	12	20	15	12	14	12	11	22	8	10
	U (k=2) (%)	50	26	29	41	43	32	74	60	47	37	31	35	140	68	32
Partner 2	C (ng/L)	0,117	0,303	1,011	0,124	0,320	1,070	0,132	0,342	1,141	0,153	0,396	1,321	0,126	0,326	1,088
	Bias (%)	15	13	13	13	7	5	15	7	6	24	19	17	25	8	6
	Precision (%)	6	3	2	13	2	0	5	2	1	7	1	1	12	4	2
	U (k=2) (%)	32	26	26	37	14	9	33	14	13	51	38	34	56	19	12
Partner 3	C (ng/L)	0,099	0,274	0,931	0,094	0,267	0,909	0,849	2,455	8,349	0,096	0,280	0,951	0,948	2,764	9,397
	Bias (%)	23	17	18	22	31	28	28	30	32	23	24	20	20	15	16
	Precision (%)	13	5	13	7	10	7	9	6	3	9	5	5	9	2	4
	U (k=2) (%)	53	35	44	47	65	57	58	61	63	48	49	41	43	31	34
Partner 4	C (ng/L)	0,056	0,163	0,560	0,057	0,165	0,567	0,016	0,047	0,161	0,114	0,332	1,139	0,113	0,331	1,133
	Bias (%)	18	22	29	8	13	14	39	14	22	25	31	31	10	9	8
	Precision (%)	23	16	15	9	4	6	21	15	17	9	6	7	9	6	7
	U (k=2) (%)	59	55	65	24	28	31	89	41	56	53	62	64	27	22	20
Partner 5	C (ng/L)	0,120	0,364	1,331	0,122	0,370	1,353	0,087	0,265	0,969	0,128	0,387	1,414	0,183	0,553	2,023
	Bias (%)	40	15	6	26	11	12	11	11	5	95	86	14	109	29	6
	Precision (%)	40	8	3	18	6	3	6	3	3	30	30	3	96	18	3
	U (k=2) (%)	110	34	14	63	26	25	24	22	11	200	180	29	290	69	14

=> Utilisation d'un tableur commun par tous les participants

CALUX

		Precision Component	Bias Component	Total Combined Std Uncertainty	
Compound	Concentration Level (ng/L)	%	%	%	Rounded Relative Expanded Uncertainty (%)
EEQ bio	0.12-0.38	18.0	24.8	30.6	61
	0.38-1.2	15.8	29.7	33.6	67
	>1.2	24.0	26.0	35.4	71

A-YES

		Precision Component	Bias Component	Total Combined Std Uncertainty	
Compound	Concentration Level (ng/L)	%	%	%	Rounded Relative Expanded Uncertainty (%)
EEQ bio	0.14-0.40	43.4	35.9	56.3	110
	0.40-1.4	6.6	5.7	8.7	17
	>1.4	3.2	7.4	8.1	16

Objectifs

- Démontrer l'adéquation à l'usage prévu de méthodes optimisées et validées pour la mesure des œstrogènes à l'aide de techniques basées sur la spectrométrie de masse et sur les bioessais (par exemple ERa-Calux et A-YES)
- Définir les performances de ces méthodes en termes de répétabilité intra-laboratoire et de reproductibilité.

Time	Action
by 30 th September 2022	The ILC Organizer sends the Protocol to the laboratories
by 2 nd November 2022	The test materials sent to each involved laboratory
by 23 rd November 2022 → delayed 30 th November	The involved laboratories provided the results to ilc-empir@isprambiente.it
by 20 th December 2022 → delayed 30 th December 2022	A Preliminary statistical evaluation sent to the involved laboratories
by 14 th January 2023	Comments from the participants
17 th February 2023	The Final Report sent to the involved laboratories.
22 th February 2023	Plenary meeting for the presentation and discussion of the results



Matériaux

- *Reconstitution de la matrice*
- *2 niveaux de concentration*



27 laboratoires inscrits :

- 22 par spectrométrie
- 10 par bioessais



BioDetection Systems BV (The Netherlands)

Ecotox Centre (Switzerland)

Federal Institute of Hydrology (Germany)

ISPRA-Centro Nazionale per la Rete nazionale dei laboratori-Area Metrologia (Italy)

ISSeP - Institut Scientifique de Service Public (Belgium)



IWW Water Center (Germany)

QuoData GmbH (Germany)

Ruhrverband – Kooperationslabor (Germany)

Staatliche Betriebsgesellschaft für Umwelt und Landwirtschaft (Germany)



Solution pour contrôle qualité

Matériaux

- *Reconstitution de la matrice*
- *2 niveaux de concentration*
- *Analyse en duplicat (mesures indépendantes)*



EDC-WFD B1	Low EEQ Range ng/L β E2 eq	SPM mg/L	DOC mg/L	EDC-WFD B2	Medium EEQ Range ng/L β E2 eq	SPM mg/L	DOC mg/L
Cumulative effect	0,1-1,0	10	2	Cumulative effect	0,5 -5,0	50	5

EDC-WFD – B1

Lab code	Measurand	Cumulative effect	
	Unit	ng/L β E2 eq	
		value	expanded uncertainty
5	unit 1	0,56	0,34
	unit 2	0,51	0,31
	Average value	0,54	0,33
9	unit 1	0,28	0,03
	unit 2	0,34	0,03
	Average value	0,31	0,03
12	unit 1	0,47	0,29
	unit 2	0,61	0,40
	Average value	0,54	0,34
16	unit 1	0,12	0,08
	unit 2	0,15	0,09
	Average value	0,14	0,09
17	unit 1	< LOQ	
	unit 2	< LOQ	
	Average value	< LOQ	
18	unit 1	0,006	0,006
	unit 2	0,006	0,006
	Average value	0,006	0,006
24	unit 1	0,129	0,052
	unit 2	0,195	0,078
	Average value	0,162	
25	unit 1	0,18	
	unit 2	0,31	
	Average value	0,30	
26	unit 1	0,206	
	unit 2	0,226	
	Average value	0,216	

EDC-WFD – B2

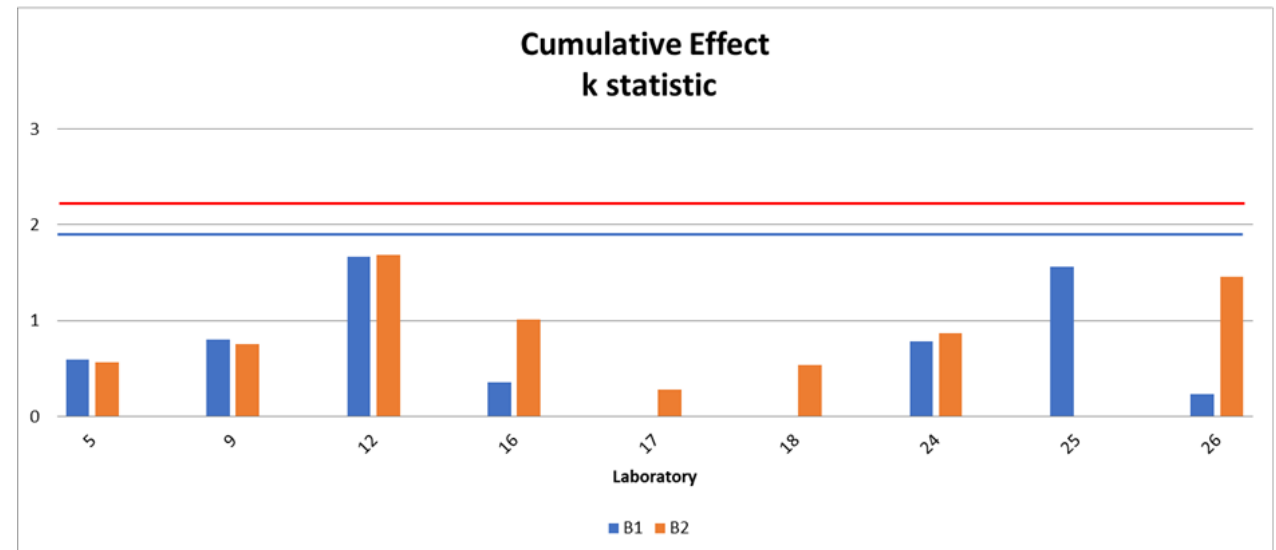
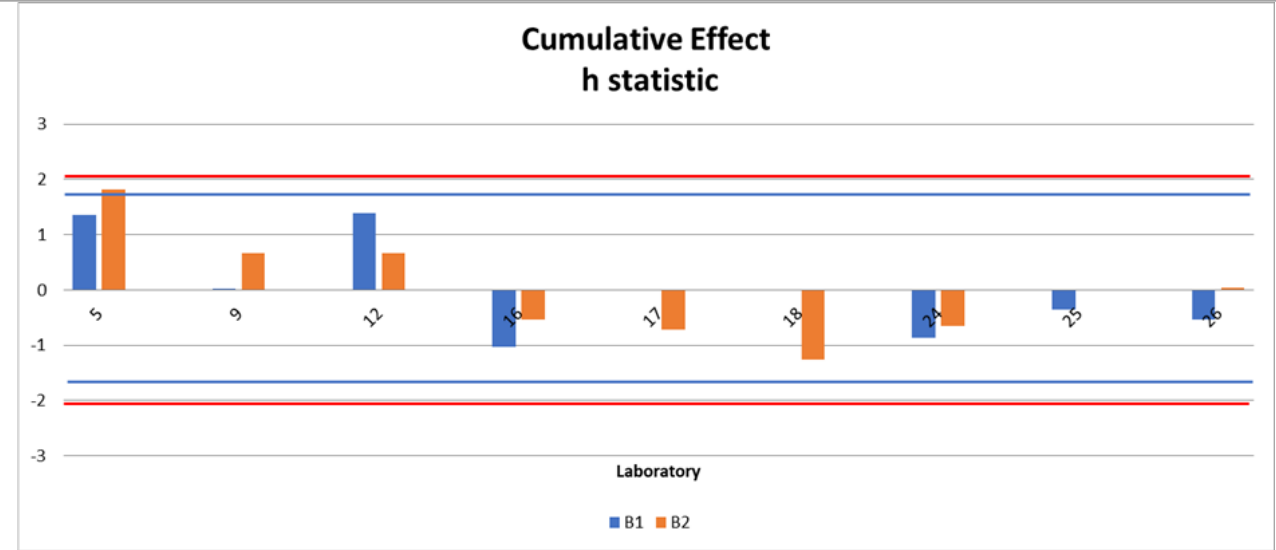
Lab code	Measurand	Cumulative effect	
	Unit	ng/L β E2 eq	
		value	expanded uncertainty
5	unit 1	2,5	1,5
	unit 2	2,4	1,4
	Average value	2,5	1,5
9	unit 1	1,57	0,35
	unit 2	1,70	0,17
	Average value	1,63	0,35
12	unit 1	1,78	0,12
	unit 2	1,48	0,24
	Average value	1,62	0,18
16	unit 1	0,88	0,65
	unit 2	0,70	0,51
	Average value	0,79	0,58
17	unit 1	0,683	
	unit 2	0,634	
	Average value	0,658	
18	unit 1	0,233	0,022
	unit 2	0,329	0,033
	Average value	0,289	0,028
24	unit 1	0,629	0,25
	unit 2	0,784	0,31
	Average value	0,706	
25	unit 1	<LOD	
	unit 2	3,7	
	Average value		
26	unit 1	1,06	
	unit 2	1,32	
	Average value	1,19	

Norme ISO 5725-2:2019 : les statistiques h et k (Mandel) pour vérifier la cohérence des données (technique graphique) :

- h : variabilité inter laboratoires
- k : variabilité intra laboratoire



Cohérence des données



EDC-WFD B1

	S _r %	S _R %	mean value ng/L βE2 eq
Cumulative effect	19,4	56,4	0,31 (7/14)

EDC-WFD B2

	S _r %	S _R %	mean value ng/L βE2 eq
Cumulative effect	10,8	60,8	1,17 (8/16)

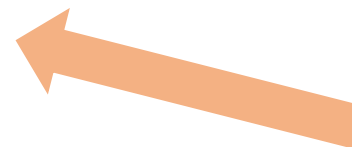
* Between brackets number of labs and valid data (i.e 12/24)

Bioassay		Reproducibility (%)	Repeatability (%)	Mean value (*) ng/L βE2 eq
EDC-WFD B1	<u>ERα-Calux</u>	61,8	11,1	0,33 (3-6)
	<u>A-YES</u>	29,1	29,0	0,21 (3-6)
EDC-WFD B2	<u>ERα-Calux</u>	74,2	7,3	1,29 (4-8)
	<u>A-YES</u>	37,8 (CV%)	16,0 (CV%)	0,95 (2-4)

Cumulative
effect

Normes

Norme	S _r %	S _R %
ISO 19040-2 (20-25)	7,5-21,4	16-28
ISO 19040-3 (22-25)	13-18	18-33



Pas suffisamment de données
Valeurs indicatives

- Le plan d'expérience de validation mis en œuvre s'est révélé adapté à la validation des EBM.
- La matrice, les interférents et le COD n'ont pas d'incidence sur les analyses des échantillons en termes de résultats et de courbes dose-réponse lorsque la procédure mise en œuvre est appliquée comme procédure de préparation des échantillons.
- À des concentrations proches de la norme de qualité environnementale (NQE), le test biologique CALUX a donné de meilleurs résultats en termes de précision et de biais, tandis que la méthode A-YES a fourni les incertitudes les plus faibles lorsque des concentrations plus élevées ont été prises en compte.