

Hormones naturelles et synthétiques

Méthode d'analyse dans les eaux- Eau brute-par extraction sur phase solide sur disque et chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Généralités

Nom de la famille de substances	Hormones
Nom des substances individuelles	Estrone (E1) 17- β -Estradiol (E2) 17- α -Ethinylestradiol (EE2)
Code SANDRE des substances individuelles	Estrone [5396] 17 β -Estradiol [5397] 17- α -Ethinyl estradiol [2629]
Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]	Eau : Eau douce de surface [3]
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 ensuite dérivé par dansylation avant d'être 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-LC/MSMS
Domaine d'application	Selon le paramètre considéré : de la limite de quantification jusqu'à 5 ng de composé /L d'eau (sur la base de 1 litre repris dans 100 μ L)
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	MES La méthode est validée jusqu'à un seuil de 100 mg L ⁻¹ de MES
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Les 3 substances ciblées sont des CMR en conséquence il est indispensable de porter des EPI. 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.
Interférents (préciser la matrice)	Interférents identifiés : pas d'interférents identifiés lors des essais de validation Matrices testées : eaux de surface

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 [3] Eau brute [23]

Conditionnement et conservation des échantillons

En respect des recommandations du JRC ISPRA pour la mise en œuvre de la Watch List au niveau des Etats Membres et des décisions prises au niveau national, aucune spécification de conditionnement/stabilisation n'a été mise en place.

Une étude de stabilité sur 24 heures, $5 \pm 3^\circ\text{C}$, a été réalisée sur deux matrices (Eau Evian et Eau de Seine brute). Des pertes acceptables ($< 20\%$) ont été observées.

En conséquence, 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

Analyse

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

Eau : Eau douce de surface 1 L

Extraction

Extraction automatique SPE-DEX® 4790 (Horizon Technology) sur support d'extraction Speedisk Bakerbond H2O-Philic DVB 50mm (J.T.Baker)

		Nombre de cycles	Temps de mouillage	Temps de séchage
Rinçage	MeOH	1	90s	30s
	Eau	2	60s	
Dépôt de l'échantillon	1 L d'échantillon			
Séchage	10 min			
Elution	MeOH	3	90s	30s

Purification

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

1-Conditionner la cartouche avec 4 mL de MeOH

2-Déposer les 1 mL de l'extrait à purifier

3-Elution avec 2 mL de MeOH

Il est possible d'interrompre la procédure d'analyse à cette étape. Les extraits méthanoliques peuvent être stockés à $-20 \pm 5^\circ\text{C}$.

L'éluat est évaporé à sec à l'aide d'un reconcentrateur automatique SpeedVac®.

Conservation de l'extrait	Les extraits peuvent être conservés à -20 ± 5 °C. Aucune instabilité n'a été mise en évidence sur période de 1 mois.
Dérivation	La dérivation est réalisée par dansylation. L'objectif de cette étape de dérivation est d'augmenter la sensibilité de la méthode instrumentale LC/MS². Après purification/reconcentration, l'extrait 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 mL⁻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 au SpeedVac. 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 (35/65 (v/v)).
Volume ou masse finale avant analyse :	100 µL d'un mélange eau-acétonitrile (35/65 (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

Paramètres chromatographiques:

Colonne : phase inverse greffée C18 SymmetryShield® RP18, Waters, 150 mm x 2,1 mm ; 3,5 µm de diamètre de particules
Température : 20°C

Elution en mode isocratique :

temps (min)	phase mobile	
	H ₂ O	ACN
	(0,1% HCOOH ; v/v)	(0,1% HCOOH ; v/v)
0	35%	65%
20	35%	65%

Débit : 0,4 mL min⁻¹

Volume injecté : 20 µL.

Paramètres du spectromètre de masse :

Mode d'ionisation : electrospray en mode positif ESI+

Paramètres de détection :

Mode MRM

	Temps de rétention (indicatif) min	Transition de quantification (u.m.a)	Transition de confirmation (u.m.a)
E1	11,7	504,3>156	504,3>171
E2	11,0	506,3>171	506,3>156
EE2	12,9	530,3>171	530,3>156
EE2- D ₄	12,8	534,3>171	534,3>156
E1- 3C ₁₃	11,7	507,2>171	507,2>156
E2- D ₅	10,8	511,3>171	511,3>156

**Equipements ¹
(modèles utilisés) :**

Surveyor LC / TSQ Quantum Discovery max (Thermo Fischer Scientific)

Type d'étalonnage

Dilution isotopique

**Modèle utilisé
Etalons / Traceurs utilisés
Domaine de concentration**

Linéaire

De la LQ à 5 ng/L (ou au-delà si dilution)

**Méthode de calcul des résultats
Rendement**

Utilisation du rendement : non

Blancs

Matrice utilisée :
Blanc méthode eau Evian

Soustraction du blanc : 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

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante	Non applicable
Norme dont est tirée la méthode	Non applicable
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 5 ng L ⁻¹																																				
Matériaux de référence utilisés	Il n'existe pas de MRC pour ces molécules en matrice																																				
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	<LQ																																				
Rendement	L'étude de rendement a été réalisée sur une eau de référence (eau d'Evian) et sur une matrice naturelle représentative (eau de l'Oise, MES ≈ 100 mg L⁻¹; COD ≈ 5 mg L⁻¹) dans des conditions de fidélité intermédiaire (2 opérateurs, 6 jours), 3 niveaux de dopage ont été étudiés selon les limites maximales acceptables de détection MDL définie par la Watch List : MDL, 3*MDL et 6*MDL (exprimé en ng L⁻¹) <table><tr><th>Substances</th><th>Evian [3MDL]</th><th>R %</th><th>Oise / [MDL]</th><th>R %</th><th>Oise / [3*MDL]</th><th>R %</th><th>Oise / [6*MDL])</th><th>R %</th></tr><tr><td>E1</td><td>1,2</td><td>91</td><td>0,4</td><td>97</td><td>1,2</td><td>93</td><td>2,4</td><td>97</td></tr><tr><td>E2</td><td>1,2</td><td>91</td><td>0,4</td><td>98</td><td>1,2</td><td>94</td><td>2,4</td><td>100</td></tr><tr><td>EE2</td><td>0,1</td><td>104</td><td>0,035</td><td><LQ</td><td>0,1</td><td>92</td><td>0,2</td><td>104</td></tr></table>	Substances	Evian [3MDL]	R %	Oise / [MDL]	R %	Oise / [3*MDL]	R %	Oise / [6*MDL])	R %	E1	1,2	91	0,4	97	1,2	93	2,4	97	E2	1,2	91	0,4	98	1,2	94	2,4	100	EE2	0,1	104	0,035	<LQ	0,1	92	0,2	104
Substances	Evian [3MDL]	R %	Oise / [MDL]	R %	Oise / [3*MDL]	R %	Oise / [6*MDL])	R %																													
E1	1,2	91	0,4	97	1,2	93	2,4	97																													
E2	1,2	91	0,4	98	1,2	94	2,4	100																													
EE2	0,1	104	0,035	<LQ	0,1	92	0,2	104																													
Limite de quantification(LQ) Limite de détection (LD) (indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)	L'étude de la limite de quantification a été réalisée sur une matrice naturelle représentative (eau de l'Oise : MES ≈ 100 mg L⁻¹ COD ≈ 5 mg L⁻¹) dans des conditions de fidélité intermédiaire (2 opérateurs, 6 jours) <table><tr><th>Substances</th><th>LQ (ng L⁻¹)</th><th>LD (ng L⁻¹)</th></tr><tr><td>E1</td><td>0,4</td><td>0,1</td></tr><tr><td>E2</td><td>0,4</td><td>0,1</td></tr><tr><td>EE2</td><td>0,1</td><td>0,035</td></tr></table>	Substances	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)	E1	0,4	0,1	E2	0,4	0,1	EE2	0,1	0,035																								
Substances	LQ (ng L ⁻¹)	LD (ng L ⁻¹)																																			
E1	0,4	0,1																																			
E2	0,4	0,1																																			
EE2	0,1	0,035																																			
Incertitudes (%) sur les résultats - par type de matrice - par niveau de concentration	Méthode d'évaluation : NF ISO 11352 (2012) Les incertitudes ont été estimées à l'aide du logiciel MUKIT Facteur d'élargissement : k = 2 <table><tr><th>Substances</th><th>U% (k=2)</th></tr><tr><td>E1</td><td>35%</td></tr><tr><td>E2</td><td>35%</td></tr><tr><td>EE2</td><td>50%</td></tr></table>	Substances	U% (k=2)	E1	35%	E2	35%	EE2	50%																												
Substances	U% (k=2)																																				
E1	35%																																				
E2	35%																																				
EE2	50%																																				

- par molécule

(reproductibilité avec méthode de détermination)

Ces incertitudes pourront être réévaluées à nouveau dans le cadre de la mise en œuvre de la méthode lors des campagnes nationales Watch List en 2016-2017 afin de tenir compte de la variété des matrices.

Contacts

Auteurs

Sophie Lardy-Fontan ; Véronique Le Diouron ; Carine Fallot ; Béatrice Lalere

Institut

LNE

Contact

sophie.lardy-fontan@lne.fr