

## Hormones estrogéniques

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

#### Généralités

<b>Nom de la famille de substances</b>	Hormones estrogéniques.												
<b>Nom des substances individuelles</b>	Estrone (E1), alpha et beta estradiol (17 $\alpha$ -E2 et 17 $\beta$ -E2), estriol (E3), alpha éthinylestradiol (EE2).												
<b>Code SANDRE des substances individuelles</b>	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">Estrone :</td> <td style="width: 25%;">5396</td> <td style="width: 50%;">Estriol :</td> <td style="width: 25%;">6446</td> </tr> <tr> <td>Alpha estradiol :</td> <td>5399</td> <td>Alpha éthinylestradiol :</td> <td>2629</td> </tr> <tr> <td>Beta estradiol :</td> <td>5397</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	Estrone :	5396	Estriol :	6446	Alpha estradiol :	5399	Alpha éthinylestradiol :	2629	Beta estradiol :	5397		
Estrone :	5396	Estriol :	6446										
Alpha estradiol :	5399	Alpha éthinylestradiol :	2629										
Beta estradiol :	5397												
<b>Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]</b>	Matières en suspension [7] et boues de station d'épuration [31]												
<b>Principe de la méthode</b>	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.												
<b>Acronyme</b>	PFE/SPE/LC/MS-MS												
<b>Domaine d'application</b>	<p>Limite inférieure : LQ</p> <p>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 <math>\mu</math>g/L, un volume de reprise de 200 <math>\mu</math>L et sans dilution de l'échantillon : 40 <math>\mu</math>g/kg pour les boues).</p>												
<b>Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse</b>	<p>MES : taux de MES de l'eau considérée.</p> <p>Boues : taux humidité</p>												
<b>Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode</b>	<p>La verrerie de laboratoire lavée est rincée à l'acétone.</p> <p>Tous les solvants sont de qualité « pour analyse de pesticides » (l'eau utilisée est de l'eau Milli-Q®).</p>												
<b>Interférents (préciser la matrice)</b>	<p>Matrices testées : 8 boues différentes, provenant de procédés de traitement différents.</p> <p>8 dopages de 10 à 160 ng/g sauf pour EE2 6 dopages de 10 à 100 ng/g.</p> <p>Test de Student avec un risque de 5 % (comparaison entre les concentrations ajoutées et les concentrations mesurées).</p> <p>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.</p>												

**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 [156]  
Boues [123], [134]

#### Conditionnement et conservation des échantillons

- Protocole :

MES : la filtration doit être effectuée 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.

- Nature du contenant de stockage :

MES (sur filtre) : papier aluminium.

Boues : pot en verre ambré.

- Lavage du contenant :

Lavage en machine puis rinçage à l'acétone.

- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :

MES : non testée.

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 :

- 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 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 or 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

#### Extraction

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

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

Extraction PFE 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.

<p>- SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'éluion)</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Temps (min.)</th> <th>Etapes</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0 - 5</td> <td>Préchauffage</td> </tr> <tr> <td>5 - 10</td> <td>Chauffage à 100 °C</td> </tr> <tr> <td>10 - 25</td> <td>Phase statique avec 80/20 v/v H<sub>2</sub>O/MeOH (100°C, 100 bars) pendant 5 minutes puis vidange (100 % du volume de la cellule). Cycle répété 3 fois.</td> </tr> <tr> <td>120 s</td> <td>Purge</td> </tr> </tbody> </table> <p>SPE sur Autotrace Caliper® sur cartouche OASIS (Waters©) HLB 6 mL, 500 mg :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- conditionnement de la colonne par 5 mL de méthanol et 5 mL d'eau milliQ©</li> <li>- percolation de l'extrait provenant de l'ASE (environ 30 mL) à 10 mL/min</li> <li>- rinçage de la colonne par 10 mL d'eau milliQ©</li> <li>- séchage sous azote pendant 45 min</li> <li>- éluion par 6 mL d'acétate d'éthyle</li> </ul> <p>Evaporation sous courant d'azote et reprise dans 1 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50 v/v)</p>	Temps (min.)	Etapes	0 - 5	Préchauffage	5 - 10	Chauffage à 100 °C	10 - 25	Phase statique avec 80/20 v/v H <sub>2</sub> O/MeOH (100°C, 100 bars) pendant 5 minutes puis vidange (100 % du volume de la cellule). Cycle répété 3 fois.	120 s	Purge
Temps (min.)	Etapes										
0 - 5	Préchauffage										
5 - 10	Chauffage à 100 °C										
10 - 25	Phase statique avec 80/20 v/v H <sub>2</sub> O/MeOH (100°C, 100 bars) pendant 5 minutes puis vidange (100 % du volume de la cellule). Cycle répété 3 fois.										
120 s	Purge										
<p><b>Purification</b> (type de purification, paramètres de purification, méthode de concentration)</p>	<p>SPE non automatisée sur manifold sur Florisil (Supelco®) 6 mL, 1 g</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- conditionnement de la phase par 2 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane 50/50 v/v</li> <li>- percolation de l'échantillon (1 mL dans le mélange heptane/dichlorométhane 50/50 v/v)</li> <li>- rinçage par 2 mL du mélange heptane/dichlorométhane 50/50 v/v</li> <li>- séchage sous vide</li> <li>- éluion par 5 mL d'un mélange acétone/heptane 75/25 v/v</li> </ul> <p>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)</p>										
<p><b>Conservation de l'extrait</b></p>	<p>Pas d'étude effectuée.</p>										
<p><b>Volume ou masse finale avant analyse :</b></p>	<p>200 µL (150 µL analysés directement et 50 µL dilués par 10 dans un mélange eau/acétonitrile 90/10 v/v).</p>										
<p><b>Méthode analytique utilisée :</b></p>	<p><u>Séparation HPLC :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>□ Colonne : Xbridge Waters© C18 (150 mm * 2,1 mm * 3,5 µm) ; précolonne de même phase (10 mm * 2,1 mm * 3,5 µm)</li> <li>□ Température de colonne : 30°C</li> <li>□ Volume d'injection : 10 µL</li> <li>□ Gradient : phase mobile : eau qualité HPLC (A) / acétonitrile (B)</li> <li>□ Durée d'analyse (y compris équilibrage): 51 minutes</li> <li>□ Débit : 0,2 mL/min</li> </ul>										

**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	

**Equipements<sup>1</sup>  
(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-Ethynilestradiol-D4.

**Domaine de concentration**

Gamme comprise entre 0,25 et 100 µg/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 utilisé 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.

**Références de la méthode****La méthode 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. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010, 396, 1841-1851.

<sup>1</sup> 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

**Norme dont est tirée la méthode**

Sans objet

**Niveau de validation selon Norman**

Niveau 1

**Paramètres de validation de la méthode****Norme utilisée**

Des tests 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.

**Domaine de validation**

De 0,25 à 100 µg/L.

**Matériaux de référence 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, niveau de concentration et par molécule****Répétabilité :**

*Sur boues dopées* : dopage bas : 10 ng/g (sauf pour E1 : 20 ng/g) et dopage haut : 60 ng/g.  
n = 5

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

***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	< Q	/

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

<b>Limite de quantification(LQ)</b> <b>Limite de détection (LD)</b> (indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)	Estimation de la LQ présumée. 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 <sup>er</sup> point de gamme confirmé corrigé par le rendement des étalons deutérés associé à chaque échantillon et pour une prise d'essai théorique de 500 mg. 1 ng/g pour E1 de 2 à 4 ng/g pour $\alpha$ E2, $\beta$ E2 et E3 5 ng/g pour EE2
<b>Incertitudes (%) sur les résultats</b> - par type de matrice - par niveau de concentration - par molécule (reproductibilité avec méthode de détermination)	Non réalisé

## Contacts

<b>Auteurs</b>	Cécile MIEGE
<b>Institut</b>	Irstea (Cemagref) Lyon
<b>Contact</b>	cecile.miege@irstea.fr