

**ETUDE SUR L'AMELIORATION DES LIMITES DE  
QUANTIFICATION POUR L'ANALYSE DES  
RESIDUS MEDICAMENTEUX DE LA DCE DANS LA  
PHASE AQUEUSE DES EAUX DE SURFACE  
PARTIE 2 : EVALUATION DU COUPLAGE SPE EN  
LIGNE/LC/QTOF**

**AMELIORATION DES OPERATIONS D'ANALYSES  
PHYSICO-CHIMIQUES**

**C. Chatellier, F. Lestremau**

Octobre 2015

Programme scientifique et technique  
Année 2015

Document final



## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2015 dans le cadre du partenariat ONEMA - AQUAREF 2015, au titre de l'action D- Amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques.

Auteur (s) :

*Claudine Chatellier*  
INERIS  
[Claudine.chatellier@ineris.fr](mailto:Claudine.chatellier@ineris.fr)

*François Lestremau*  
INERIS  
[francois.lestremau@ineris.fr](mailto:francois.lestremau@ineris.fr)

---

Vérification du document

Sophie Lardy-Fontan  
LNE  
[Sophie.lardy-fontan@lne.fr](mailto:Sophie.lardy-fontan@lne.fr)

Anne Togola  
BRGM  
[a.togola@brgm.fr](mailto:a.togola@brgm.fr)

## Les correspondants

---

Onema : Pierre-François Staub, [pierre-francois.staub@onema.fr](mailto:pierre-francois.staub@onema.fr)

Etablissement : \_correspondant INERIS

Référence du document : C Chatellier, François Lestremau - Etude sur l'amélioration des limites de quantification pour l'analyse des résidus médicamenteux de la DCE dans la phase aqueuse des eaux de surface - Partie 2 : Evaluation du couplage SPE en ligne/LC/QTOF - Rapport AQUAREF 2015 - 77p

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>



---

<b>1. GLOSSAIRE</b> .....	<b>12</b>
<b>2. INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
<b>3. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>15</b>
3.1 Instrumentation .....	15
3.2 Etalons internes .....	15
3.3 Paramètres de spectrométrie de masse.....	15
3.4 Séparation chromatographique.....	16
<b>4. PERFORMANCES DU SYSTEME EN INJECTION LIQUIDE</b> .....	<b>17</b>
4.1 Analyse avec une phase mobile ACN/eau .....	17
4.2 Essais d'ajout d'additif .....	18
4.3 Conclusion .....	21
<b>5. PERFORMANCES DU SYSTEME PAR EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE (SPE-OL)</b> .....	<b>22</b>
5.1 Cartouches SPE en ligne testées.....	22
5.2 Tests des volumes d'injection .....	22
5.3 Test de la nature de la phase SPE.....	23
5.4 Evaluation des performances avec la boucle de 5 mL sur la cartouche PLRP®.....	26
5.5 Evaluation des performances pour un volume de chargement de 20 mL sur la cartouche PLRP®.....	30
5.6 Conclusion .....	33
<b>6. EVALUATION DE CARTOUCHES A EMPREINTE MOLECULAIRE (MIP) ESTROGENES</b> .....	<b>34</b>
6.1 Performances de la cartouche MIP pour des essais en SPE-OL avec 5 mL d'échantillon.....	34
6.2 Performances de la cartouche MIP pour des essais en SPE-OL avec 20 mL de chargement.....	35
6.3 Conclusion .....	38
<b>7. PERFORMANCES DE LA METHODE PAR SPE-OL-PLRP® 20 ML AVEC AJOUT D'ADDITIF EN POST-COLONNE</b> .....	<b>39</b>
<b>8. CONCLUSION</b> .....	<b>42</b>
<b>9. REFERENCES</b> .....	<b>44</b>
<b>10. LISTE DES ANNEXES</b> .....	<b>45</b>

## Liste des annexes :

Annexe 1 : Revue bibliographique de l'analyse des hormones estrogéniques par SPE en ligne

Annexe 2 : Spectrométrie de masse à temps de vol (TOF)

Annexe 3 : Structure des composés étudiés

Annexe 4 : Paramètres de réglage du spectromètre de masse

Annexe 5 : Méthode chromatographique en injection liquide

Annexe 6 : Montage de l'addition post-colonne

Annexe 7 : Méthode chromatographique avec préconcentration SPE en ligne

Etude sur l'amélioration des limites de quantification pour l'analyse des résidus médicamenteux de la DCE dans la phase aqueuse des eaux de surface- Partie 2 : évaluation du couplage SPE en ligne/LC/QTOF

*Claudine Chatellier, François Lestremau*

## RESUME

A l'issue de la révision de la Directive Cadre Eau (DCE), publiée en Août 2013, la liste des substances prioritaires inclut désormais une quinzaine de substances supplémentaires. Les résidus médicamenteux ont fait l'objet d'un traitement particulier puisque, initialement pressentis pour intégrer cette liste, ils ont été placés dans une liste spécifique, la liste de vigilance (« watch list »). Cela implique que ces substances devront être surveillées et contrôlées dans les eaux de surface européennes dans le cadre de campagnes prospectives qui permettront d'acquérir plus de données sur leur présence environnementale, afin de statuer sur leur intégration parmi les substances prioritaires lors de la prochaine révision de la directive. Certains résidus médicamenteux ont également été inclus pour une surveillance régulière au niveau national conformément à l'arrêté du 08 Aout 2015.

Trois hormones estrogéniques, l'estrone, le 17-bêta-estradiol et le 17-alpha-éthynylestradiol ont été sélectionnées avec des niveaux requis de surveillance particulièrement bas respectivement à 0,4 ng/L, 0,4 ng/L et 0,035 ng/L. Le but de cette présente étude est ainsi d'obtenir une méthode analytique qui pourrait permettre la mesure des hormones estrogéniques à ces niveaux.

En 2013, les essais menés, en phase avec la littérature, avaient démontré que l'analyse des hormones estrogéniques était possible par extraction sur phase solide en ligne (SPE-OL). Les seuils atteints par l'injection de 1,5 mL d'échantillon n'étaient cependant pas suffisants pour atteindre les niveaux requis pour la surveillance. De ce fait, une double pré-concentration d'échantillon avait été évaluée. Elle consistait à effectuer d'abord la concentration d'un volume de 1 L d'échantillon par extraction sur phase solide (SPE), puis de reprendre l'extrait et de procéder à une deuxième concentration en l'injectant via une SPE-OL. Lors du couplage avec une analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, des interférences spectrométriques importantes avaient été constatées, ce qui n'avait pas permis d'obtenir de résultats probants.

En 2015, une étude a été effectuée par des extractions en ligne large volume couplée avec un chromatographe à phase liquide/ spectromètre de masse haute résolution de type QTOF. L'utilisation d'un appareil de ce type permet d'évaluer si la sélectivité supplémentaire apportée par ce détecteur pouvait réduire les interférences/bruits de fond observés lors de l'étude initiale. Une injection large volume a été évaluée afin d'obtenir une méthode plus directe et simple que celle menée en 2013.

Dans un premier temps, des optimisations ont été effectuées sur l'étape de détection afin d'améliorer la réponse des hormones estrogéniques. Cela a notamment consisté à évaluer l'ajout de tampon à la phase mobile pour augmenter la sensibilité. L'ajout de  $\text{NH}_4\text{F}$  en addition post colonne permet d'obtenir les meilleurs résultats.

Ensuite, les tests sur différents types de cartouches polymériques SPE-OL ont conduit à la sélection de la cartouche PLRP® car elle offre une meilleure répétabilité et un bruit de fond atténué. Les essais sur une cartouche à empreinte moléculaire (MIP) de type estrogènes, dans les conditions de tests effectués, n'ont pas permis d'améliorer les performances observées avec les cartouches polymériques en raison d'un possible manque de sélectivité ou de saturation de la phase testée.

Enfin, différents tests ont été mis en œuvre sur le volume de chargement. L'utilisation d'un volume de chargement de 5 mL a permis d'atteindre des limites de quantification estimées à respectivement 25 et 50 ng/L sur de l'eau d'Evian® et de rivière (eau de l'Oise) pour les 2 substances considérées. Les essais sur un volume de chargement de 20 mL ont apporté une amélioration notable des limites de quantification qui ont été estimées à 2 et 5 ng/L (en moyenne) respectivement sur l'eau d'Evian® et de rivière.

En appliquant une addition post colonne, des performances correctes en termes de justesse et répétabilité ont été obtenues sur de l'analyse de l'eau de l'Oise pour des limites de quantification estimées allant jusqu'à 2,5 ng/L.

Ainsi, malgré la sélectivité importante apportée par la détection par le spectromètre de masse haute résolution, les niveaux atteints sont cependant largement insuffisants pour atteindre les seuils requis pour la surveillance.

L'injection d'un volume de chargement plus important que ceux testés pour améliorer les sensibilités entraînerait des difficultés opérationnelles du fait d'un temps de chargement trop important (à moins que des débits de chargement plus importants soient utilisés si le système le permet) et d'un apport d'interférences supplémentaires.

Ce type de conditions expérimentales n'apparaît donc pas adapté pour atteindre les niveaux de quantification requis pour la surveillance de ces composés. Ce type de configuration pourrait cependant être utilisé pour les analyses de composés polaires (présents majoritairement dans la phase aqueuse) pour des niveaux supérieurs à 5 ng/L afin de pouvoir disposer d'un système aisément automatisable (et donc de potentiellement réduire les coûts de préparation d'échantillon). Il pourrait surtout dans ce cadre être utilisé pour des analyses de composés ubiquistes engendrant des problèmes de contamination car il permet de réduire les étapes de préparation d'échantillons.

**Mots clés (thématique et géographique) :**

Hormones estrogéniques, phase aqueuse [sandre 3], SPE en ligne, LC/QTOF

Study about the improvement of quantification limits for the analysis of pharmaceutical compounds targeted by the WFD in the aqueous phase of surface water - part 2 - evaluation of SPE online/LC/QTOF

*CLAUDINE CHATELLIER, FRANCOIS LESTREMAU*

#### ABSTRACTS

The revision of the Water Framework Directive (WFD), published in August 2013, has included about 15 new substances. Pharmaceutical residues were positioned apart since after being initially considered to integrate this list, they were finally moved to a watch list. This results these substances will be monitored and controlled in European surface water in the frame of prospective campaigns which will generate more information about their environmental occurrence as to evaluate their integration among priority substances for the fore coming revision of this list.

Three estrogenic hormones, estrone, 17-beta-estradiol and 17-alpha-ethinylestradiol have been included in this list with particularly low requirements of monitoring level, respectively at 0.4 ng/L, 0.4 ng/L and 0.035 ng/L. The aim of this study was therefore to develop an analytical method that could reach the measure of these hormones at the required level.

The tests conducted in the first part, in accordance with the literature, had concluded that the analysis of estrogenic hormones was possible by on-line solid phase extraction (SPE-OL). The levels reached with the injection of 1.5 mL of samples were not sufficient to attain the objective. Therefore, a double pre-concentration of the samples was evaluated. It was consisting to primarily concentrate 1 L of sample by solid phase extraction (SPE) then to inject the whole extract by SPE-OL. With a LC/MS/MS analysis, severe spectrometric interferences were however observed which prevented to obtain valuable results.

In this second part, a study was carried out by large volume on line solid phase extraction coupled to a liquid chromatograph/ high resolution mass spectrometer of QTOF type. The use of this type of instrument could allow to evaluate if the selectivity provided by the detector could reduce interferences/noise observed during the first study. Large volume injection was evaluated to benefit of a more direct approach than those carried out in 2013.

Optimisations were firstly performed at detection level to improve the response obtained for the estrogenic hormones. This notably resulted to evaluate the addition of buffer to the mobile phase to increase sensitivity. Addition of NH<sub>4</sub>F in post column addition mode provided the best results.

Tests on different types of polymeric SPE-OL cartridges conducted to the selection of the PLRP® cartridge since better repetabilities and a lower noise level were noticed. Tests on an estrogenic molecularly imprinted polymers (MIP) did not however produced an improvement compared to the performances obtained for the polymeric cartridges possibly due to a lack of selectivity of the tested phase.

Several tests were carried on sample loading volume. The use of a sampling volume of 5 mL could allow to reach level estimated at respectively 25 and 50 ng/L on Evian Water and on river water (Oise water). The tests with 20 mL of loading provided significant improvement of sensitivity level which were estimated at 2 and 5 (on average) ng/L respectively for Evian water and river water.

By applying post column addition, acceptable performances were obtained on the analysis of Oise river with quantifying level down to 2.5 ng/L.

However, despite the selectivity provided by the high resolution mass spectrometer, the levels reached were still largely higher than the limits required for the monitoring of these substances.

The injection of larger loading volume that those tested to improve sensitivity level would not in fact be practical to carry out since it would imply an unacceptable loading time (unless high loading flow rates are used if system permits) and much more potential interferences.

This type of experimental conditions does not appear optimal to reach low level of detection for the targeted substances.

This type of configuration could however be used for the analysis of polar compounds (which are mainly present in the dissolved phase) from 5 ng/L to take advantage of a system which can be easily automated (and thereby reduce analytical costs). It could also be used for the analysis of commonly widespread compounds producing contamination issues during the analysis to reduce sampling steps.

**Key words (thematic and geographical area) :**

Estrogens, aqueous phase, on-line SPE, LC/MS/MS

## PRÉAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

	Rédaction	Vérification	Approbation
<b>NOM</b>	Claudine CHATELLIER François LESTREMAU	Olivier AGUERRE- CHARIOL	Marc DURIF
<b>Qualité</b>	Technicien et Ingénieur à l'Unité « Innovation pour la Mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable de l'Unité « Innovation pour la Mesure » Direction des Risques Chroniques	Responsable du Pôle « Caractérisation de l'Environnement » Direction des Risques Chroniques
<b>Visa</b>			

## 1. GLOSSAIRE

ACN	: Acétonitrile,
DCE	: Directive Cadre sur l'Eau,
E1	: Estrone,
E2	: Estradiol,
17a-E2	: 17-alpha-estradiol,
17b-E2	: 17-bêta-estradiol,
E3	: Estriol,
EE2	: 17-alpha-éthinyloestradiol,
ESI	: Ionisation par électrospray,
LC	: Chromatographie à phase liquide,
LD	: Limite de détection,
LQ	: Limite de quantification,
MIP	: Polymères à empreinte moléculaire,
MS	: Spectrométrie de masse,
MS/MS	: Spectrométrie de masse en tandem
QTOF	: Spectromètre quadripôle couplé à un temps de vol
NQE	: Norme de qualité environnementale,
SPE	: Extraction sur phase solide (solid phase extraction),
SPE-OL	: Extraction sur phase solide en ligne,
TQD	: Triple quadripôle,
TOF	: Temps de vol (Time Of Flight).

*L'abréviation SPE-OL est utilisée dans le document pour désigner l'extraction sur phase solide en ligne afin de la différencier de la SPE (extraction sur phase solide hors ligne). Le matériel de préconcentration associé est désigné par l'appellation cartouche SPE-OL pour le distinguer de la cartouche SPE utilisée en mode hors ligne.*

## **2. INTRODUCTION**

A l'issue de la révision de la Directive Cadre Eau (DCE), publiée en Août 2013 [1], la liste des substances prioritaires inclut désormais une quinzaine de substances supplémentaires. Les résidus médicamenteux ont fait l'objet d'un traitement particulier puisque, initialement pressentis pour intégrer cette liste, ils ont été placés dans une liste spécifique, la liste de vigilance (« watch list »)[2].

Cela implique que ces substances devront être surveillées et contrôlées dans les eaux de surface européennes dans le cadre de campagnes prospectives qui permettront d'acquérir des données harmonisées sur leur présence environnementale dans l'ensemble des états membres, afin de statuer sur leur intégration parmi les substances prioritaires lors de la prochaine révision de la directive.

3 hormones estrogéniques ont été incluses dans cette liste de vigilance avec une exigence de Limite Maximale Acceptable (LMA) de détection de la méthode indiquée ci-dessous:

- Le 17-bêta-estradiol (LMA =  $4.10^{-4}$  µg/L ou 0,4 ng/L ou 400 pg/L) (hormone estrogénique naturelle).
- L'estrone (LMA =  $4.10^{-4}$  µg/L ou 0,4 ng/L ou 400 pg/L) (hormone estrogénique naturelle).
- Le 17-alpha-éthynylestradiol (LMA=  $3,5.10^{-5}$  µg/L ou 0,035 ng/L ou 35 pg/L) (hormone estrogénique synthétique).

*N.B. : Lors de leur inclusion à l'origine dans la liste des substances candidates aux substances prioritaires, une NQE était mentionnée pour ces substances. Dans le cadre du document relatif à la liste de vigilance [2], il est spécifié une « Limite maximale acceptable de détection de la méthode (en ng/l) ».*

Deux de ces substances (estrone et 17-alpha-éthynyl estradiol) ont également été intégrées dans la liste des substances pertinentes de l'arrêté du 08 Août 2015 pour une surveillance régulière au niveau national.

La quantification de ces substances à ces teneurs est particulièrement difficile. Afin de pouvoir répondre à ce besoin, en 2013, une première étude avait été mise en œuvre. Elle consistait à utiliser l'extraction sur phase solide en ligne (SPE-OL) couplée à de la chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse quadripôle en tandem [3].

En effet, à la différence d'un extrait obtenu par extraction sur phase solide où seule une fraction de l'extrait est injectée dans l'instrument analytique, la totalité des quantités d'analytes de l'échantillon peut, en théorie, être détectée après injection par SPE-OL. Ainsi, le facteur de sensibilité (et de pré-concentration) dépend du volume initial de l'échantillon traité.

En 2013, les essais menés, en phase avec la littérature (Annexe 1), avaient démontré que l'analyse des hormones estrogéniques est possible par SPE en ligne. Les seuils atteints par l'injection de 1,5 mL d'échantillons n'étaient cependant pas suffisants par rapport aux besoins de la surveillance. Ainsi, une double pré-concentration d'échantillon avait été évaluée. Elle consistait à effectuer d'abord une concentration sur 1L d'échantillon par extraction sur phase solide (SPE) puis de reprendre l'extrait et de l'injecter par SPE-OL. Des interférences importantes avaient cependant été constatées ce qui n'avait pas permis d'atteindre des résultats probants.

Les pistes d'amélioration qui avaient été identifiées étaient notamment :

- de bénéficier d'une plus grande sélectivité lors de la détection, par l'utilisation de spectrométrie de masse haute résolution, afin de réduire le bruit lié à l'influence de la matrice,

- d'utiliser d'autres supports d'extraction notamment des polymères à empreintes moléculaires (MIP) ce qui permettrait peut-être d'apporter une sélectivité suffisante pour réduire considérablement les effets de matrices et les interférences lors de l'analyse instrumentale.

Ainsi dans ce présent travail, une analyse mettant en œuvre de la chromatographie liquide haute performance couplée à de la spectrométrie de masse haute résolution a été évaluée. Ce type de détection permet d'obtenir une meilleure résolution et en théorie d'être moins perturbée par certains effets de matrices. La technologie spectrométrique utilisée dans ce cadre est du temps de vol (TOF : time of flight). Cette technologie est présentée en Annexe 2 et également dans le document AQUAREF [4].

De plus, l'appareil utilisé avait la capacité d'injecter en SPE-OL des volumes plus importants d'échantillon que lors de l'étude précédente ce qui permettait une approche plus directe et pratique à mettre en œuvre. Suite aux constatations de l'étude précédente, différentes cartouches ont été testées, notamment des MIP spécifiques aux estrogènes.

Comme pour la première partie de l'étude, d'autres hormones d'intérêt (17-alpha-estradiol et estriol) ont également été considérées (structures moléculaires en Annexe 3).

### 3. MATERIEL ET METHODES

#### 3.1 INSTRUMENTATION

L'appareil utilisé pour cette étude provenait du fabricant Agilent® et constitué d'un module SPE-OL 1290 flexcube, couplé avec une chromatographie en phase liquide modèle 1290 et un système 6550 ifunnel Q/TOF. L'ensemble est piloté par le logiciel « Masshunter ».



Figure : Instrumentation SPE-OL/LC/QTOF

#### 3.2 ETALONS INTERNES

Pour les analyses par SPE-OL/LC/QTOF (comme pour les analyses de l'étude précédente), des étalons internes marqués par des isotopes stables (de H et de C) ont été utilisés afin de pouvoir s'affranchir de variations de rendement lors de l'extraction et/ou lors de la détection (effets de matrice).

La liste des étalons internes utilisés par composé est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 1 : Liste des étalons et analogues isotopiquement marqués utilisés pour cette étude

Composés	Etalons internes
17-bêta-estradiol	17-bêta-estradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>
17-alpha-estradiol	17-bêta-estradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>
17-alpha-éthinyloestradiol	17-alpha-éthinyloestradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>
Estriol	Estrone- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>
Estrone	Estrone- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>

#### 3.3 PARAMETRES DE SPECTROMETRIE DE MASSE

Les paramètres de spectrométrie de masse pour les composés cibles et les étalons internes ont été optimisés pour l'instrument utilisé (voir Annexe 4).

L'optimisation de la recherche spécifique des composés en QTOF et en analyses triples quadripôles est différente. En effet, alors que pour chaque composé étudié, une optimisation des énergies de collision et des masses de collision doivent être mises en œuvre en détection TQD, seule la connaissance des ions correspondants aux molécules visées est nécessaire en QTOF.

Pour les hormones de cette étude, toutes les analyses étaient effectuées en mode négatif. Ainsi, les ions à suivre correspondaient à l'ion moléculaire [M-H].

### 3.4 SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE

Pour cette étude, l'utilisation d'une phase mobile basique devait être testée pour améliorer la sensibilité. Ainsi, une colonne pouvant résister à des pH élevés, la colonne Kinetex EVO (de type C18) (5 µm, 100\*2,1 mm, Phenomenex®), a été utilisée. Le gradient d'élution a été optimisé de façon à obtenir une méthode rapide et une séparation avec retour à la ligne de base des 2 isomères de l'estradiol.

Un chromatogramme type est présenté ci-dessous.

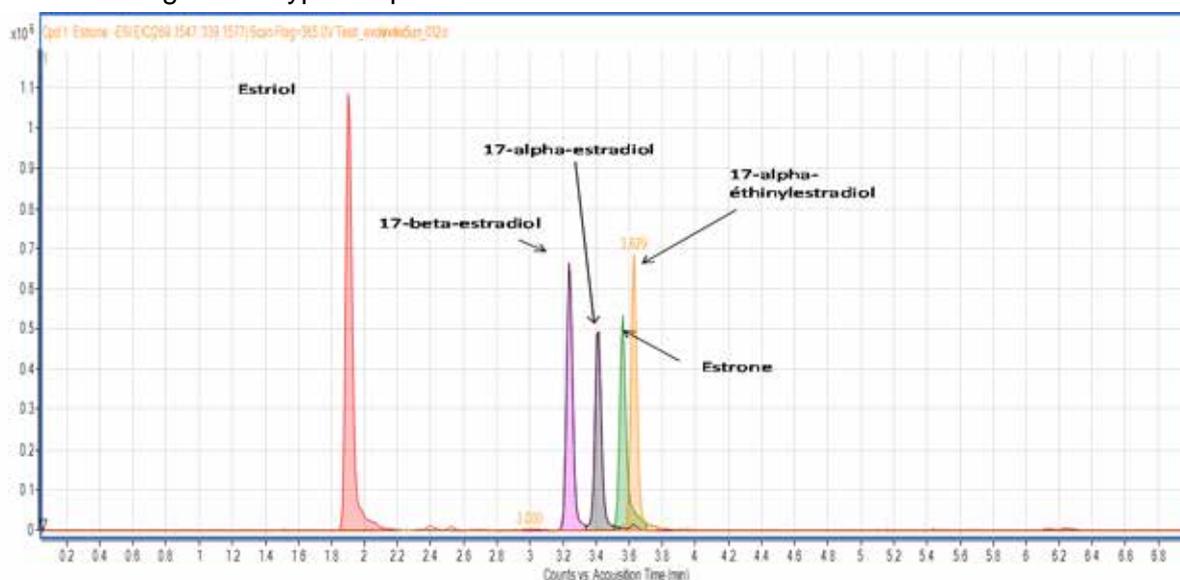


Figure 1 : Chromatogramme type de l'analyse des hormones estrogéniques avec la colonne Kinetex EVO (pic rose : estriol, mauve : 17-bêta-estradiol, gris : 17-alpha-estradiol, vert : estrone, jaune : 17-alpha-éthynylestradiol)

Les conditions chromatographiques détaillées sont présentées en Annexe 5.

## 4. PERFORMANCES DU SYSTEME EN INJECTION LIQUIDE

L'étude précédente [3] avait été effectuée avec une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile (ACN), sans ajout de tampon. Dans un premier temps, une comparaison des performances obtenues avec le système précédemment utilisé (LC/MS/MS triple quadripôle) a été effectuée avec des conditions de phase mobile identiques. Dans un second temps, afin d'améliorer la sensibilité, de nouveaux tests ont été effectués en variant la composition de la phase mobile en termes de nature de tampon ou en effectuant des additions en post-colonne.

### 4.1 ANALYSE AVEC UNE PHASE MOBILE ACN/EAU

Les premiers essais sur LC/QTOF ont repris les conditions analytiques qui avaient été utilisées pour l'étude précédente. Ainsi, de l'eau et de l'acétonitrile (ACN) ont été utilisés comme phase mobile.

Les performances analytiques ont été déterminées avec les réglages spectrométriques décrits en Annexe 4.

Une première évaluation de la gamme dynamique de mesure a été réalisée avec des concentrations comprises entre 5 et 1000 ng/mL. Ces concentrations correspondent aux limites de quantification et gammes de linéarité définies dans la précédente étude sur le système HPLC/MS/MS (Acquity TQD Waters®). Ces résultats préliminaires ont montré une meilleure sensibilité du système LC/QTOF par rapport au système précédemment testé.

Une nouvelle gamme a été préparée avec des concentrations allant de 0,1 à 500 ng/mL (ACN/H<sub>2</sub>O 20 :80 v/v). Pour 5 µL injectés, la limite de quantification du 17-bêta-estradiol est estimée à 1 ng/mL avec une gamme linéaire jusqu'à 100 ng/mL. Au-delà de ce niveau, le signal obtenu en LC/QTOF semble saturer (Figure 2).

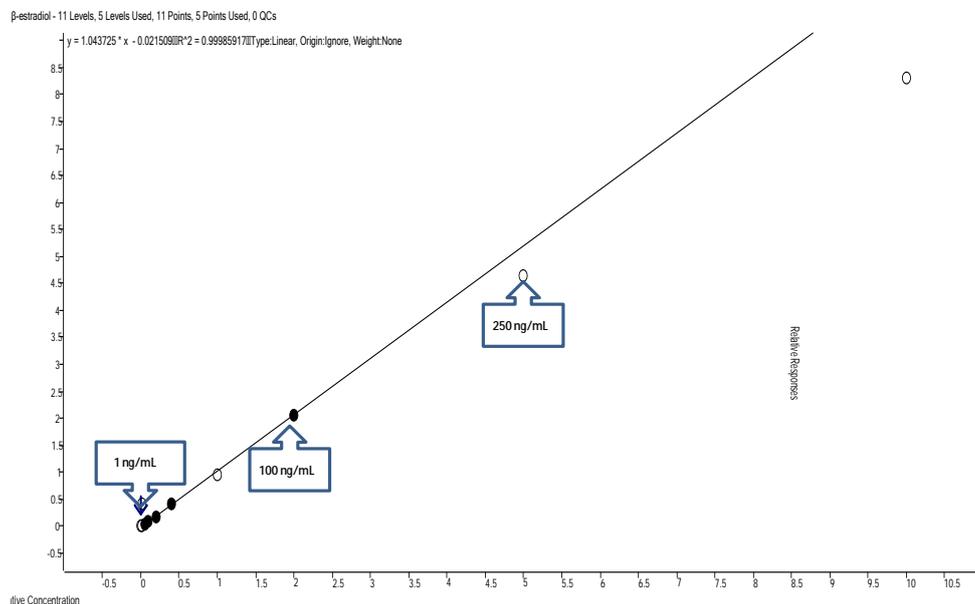


Figure 2: Gamme de linéarité du 17-bêta-estradiol entre 1 et 100 ng/mL - 5 µL injecté.

Les domaines de linéarité et limites instrumentales (estimées par le rapport signal sur bruit = 10) obtenus avec le système LC-QTOF sont présentés dans le Tableau 2. La comparaison avec les résultats obtenus avec un système LC/MS/MS(TQD) est également présentée.

Tableau 2 : Domaines de linéarité et limites instrumentales de quantification du LC/QTOF testé (mêmes conditions expérimentales (sauf colonne chromatographique mais C18 dans les 2 cas))

	Limites instrumentales (ng/ml)		
	LQ/TQD	LQ/QTOF	Domaine linéarité QTOF
<b>17-bêta-estradiol</b>	10	1	1-100
<b>17-alpha-estradiol</b>	10	1	1-100
<b>17-alpha-ethinylestradiol</b>	10	1	1-100
<b>Estrone</b>	5	1	1-100
<b>Estriol</b>	5	2	2-100

L'injection directe dans le système LC/QTOF testé permet d'atteindre des limites instrumentales de quantification estimées à 1 ou 2 ng/mL.

## 4.2 ESSAIS D'AJOUT D'ADDITIF

Selon l'étude bibliographique réalisée, complétée par les notes d'application Agilent [5,6], l'introduction d'hydroxyde d'ammonium (NH<sub>4</sub>OH) ou de fluorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>F) dans la phase mobile ou en post colonne permettrait d'augmenter la réponse des hormones estrogéniques.

### 4.2.1.1 ESSAIS D'AJOUT D'ADDITIF EN PHASE MOBILE.

Des essais ont été réalisés en introduisant l'additif dans la phase aqueuse de la phase mobile :

- Hydroxyde d'ammonium (NH<sub>3</sub>OH) à 0,1 %
- Fluorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>F) à 0,05 mol/L

L'ajout d'hydroxyde d'ammonium à 0,1 % produit une phase mobile de pH basique à 10,2. Le fluorure d'ammonium à 0,05 mol/L conduit quant à lui à un pH de 5,7.

Par rapport à une analyse sans additif, l'ajout d'hydroxyde d'ammonium dans la phase mobile permet de gagner un facteur 2 en sensibilité hormis pour l'estriol. Au niveau testé, l'utilisation du fluorure d'ammonium produit une diminution de signal d'un facteur 50 en moyenne (Figure 3).

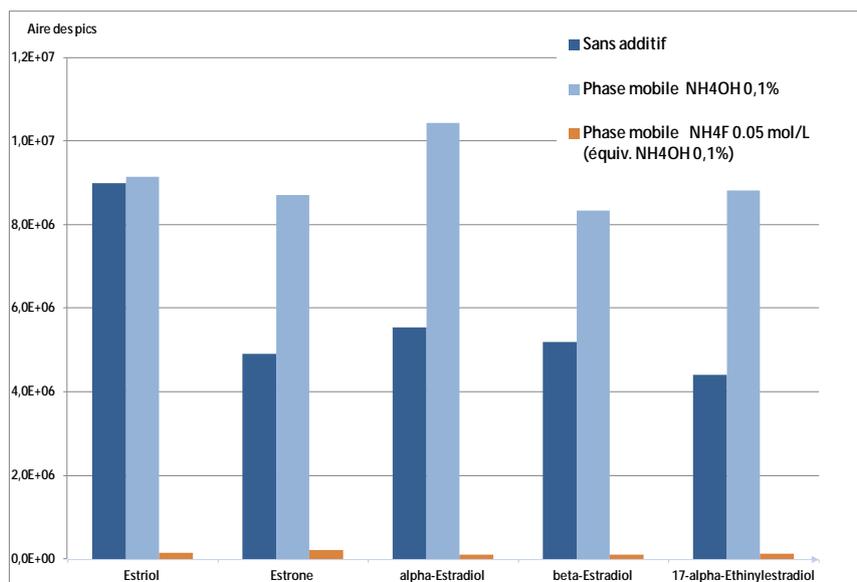


Figure 3 : Influence de l'ajout d'additif dans la phase mobile.

Les performances obtenues pour le 17-bêta-estradiol sont résumées dans le Tableau 3. Une tendance similaire est observée pour les autres composés suivis.

Tableau 3 : Domaines de linéarité et limites instrumentales de quantification estimées pour le 17-bêta-estradiol selon les différentes conditions d'ajout d'additif en phase mobile testées.

	Sans additif		Phase mobile NH4OH- 0,1%		Phase mobile NH4F- 0,05 mol/L	
	Domaine linéarité (ng/ml)	Limites instrumentales (ng/ml)	Domaine linéarité (ng/ml)	Limites instrumentales (ng/ml)	Domaine linéarité (ng/ml)	Limites instrumentales (ng/ml)
<b>17-bêta-estradiol</b>	1-100	1	0,5 - 250	0,5	25 - 250	25

#### 4.2.1.2 ESSAIS D'AJOUT D'ADDITIF EN POST-COLONNE

L'ajout d'additifs a également été étudié en addition post-colonne. Le mode post-colonne consiste à introduire l'additif à l'aide d'une pompe réglée à un faible débit en sortie de colonne chromatographique et avant l'entrée dans l'analyseur (montage en Y) (voir montage Annexe 6). L'objectif de cet ajout est d'éviter l'impact négatif des additifs sur la partie chromatographique tout en obtenant un gain sur la détection.

Différentes conditions ont été testées, faisant varier la nature du tampon et/ou la concentration et/ou le débit d'ajout:

- Hydroxyde d'ammonium à 0,1 % à 100 µL/min.
- Hydroxyde d'ammonium à 1 % à 10 µL/min.
- Fluorure d'ammonium à 0,055 mol/L à 100 µL/min.
- Fluorure d'ammonium à 0,55 mol/L à 10 µL/min.
- Fluorure d'ammonium à 0,4 mmol/L à 100 µL/min
- Fluorure d'ammonium à 0,4 mmol/L à 10 µL/min

Pour l'ensemble des composés, une même tendance est observée avec une réponse plus importante obtenue dans les conditions de post-colonne où est ajouté du NH<sub>4</sub>F à 0,4 mM (10 µL/min) (Figure 4).

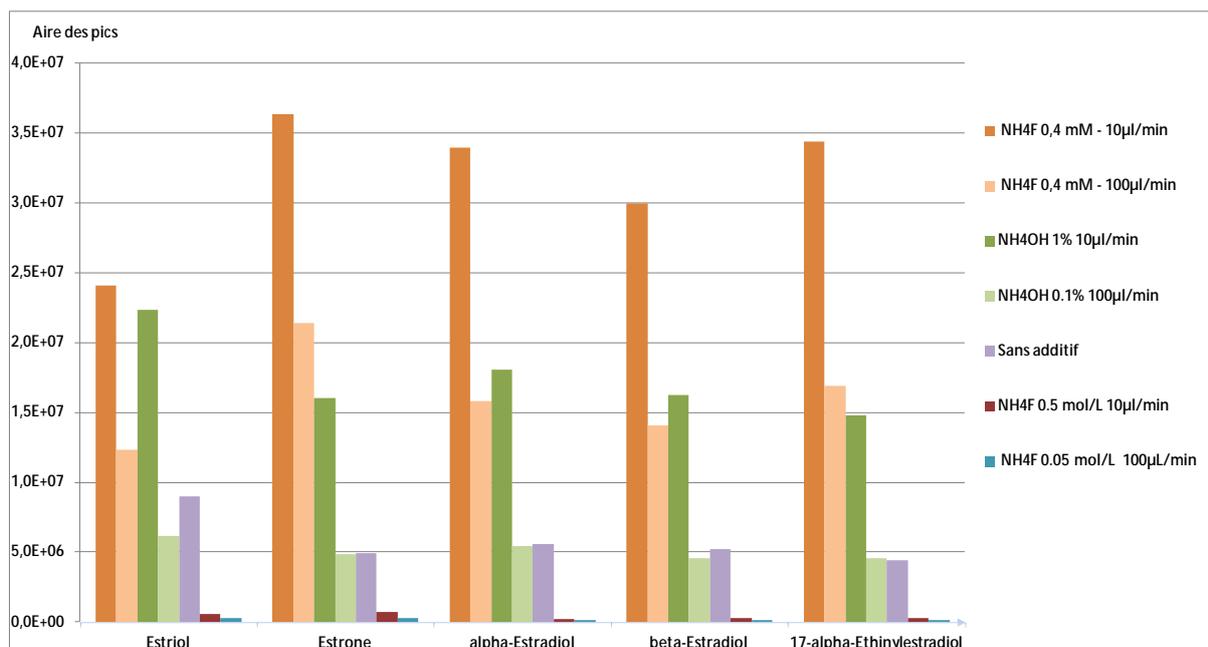


Figure 4 : Influence de l'ajout d'additif en addition post-colonne sur la réponse des composés étudiés.

En revanche, de manière analogue à l'addition dans l'éluant, l'addition de fluorure d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{F}$ ), à quantité équimolaire de celle de l'hydroxyde d'ammonium de (0,5 mol/L à 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  ou 0,055 mol/L à 100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), n'apporte pas de gain de sensibilité sur les ions formés. A l'inverse, il diminue leur signal en moyenne de 25 fois par rapport au signal mesuré sans additif.

En addition post-colonne, pour chaque additif testé, la réponse obtenue est toujours plus importante lorsque le débit est faible (Figure 5).

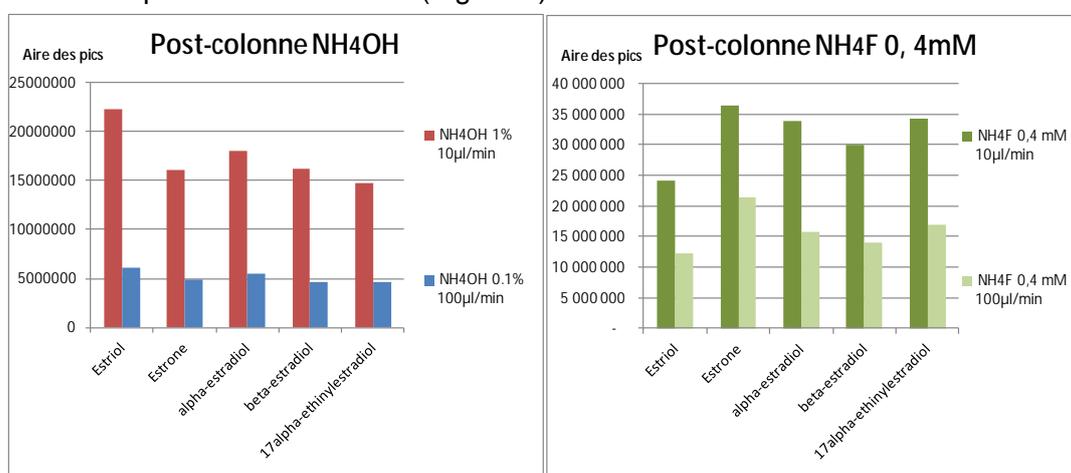


Figure 5 : Influence de la concentration et du débit d'ajout d'additif en post-colonne sur la réponse des composés étudiés.

Les domaines de linéarité et limites instrumentales obtenus en fonctions de l'additif utilisé en post-colonne pour le 17-bêta-estradiol sont présentés en Tableau 4.

Des tendances similaires sont observées pour les autres composés suivis.

Tableau 4 : Domaines de linéarité et limites instrumentales de quantification estimées pour le 17-bêta-estradiol selon les différentes conditions d'ajout post colonne testées.

	Sans additif		Post-colonne NH <sub>4</sub> OH-1% 10 µL/min		Post-colonne NH <sub>4</sub> F-0,5 M 10 µL/min		Post-colonne NH <sub>4</sub> F-0,4 mM 10 µL/min	
	Domaine linéarité (ng/ml)	Limites instrumentale (ng/ml)	Domaine linéarité (ng/ml)	Limite instrumentale (ng/ml)	Domaine linéarité (ng/ml)	Limite instrumentale (ng/ml)	Domaine linéarité (ng/ml)	Limite instrumentales (ng/ml)
<b>17-bêta-estradiol</b>	1-100	1	0,2 - 100	0,1	5 - 250	5	0,1 -100	0,1

### 4.3 CONCLUSION

La meilleure limite instrumentale est obtenue dans les conditions d'addition post-colonne avec 10 µL/min de NH<sub>4</sub>F à 0,4 mM.

Avec la colonne Kinetex®-C<sub>18</sub> en conditions post-colonne à 10 µL/min d'une solution de NH<sub>4</sub>F à 0,4 mM, les limites instrumentales ont été estimées, sur la base d'un rapport signal sur bruit = 10, à 0,1 ng/mL avec un domaine de linéarité jusqu'à 100 ng/mL pour tous les composés testés.

## **5. PERFORMANCES DU SYSTEME PAR EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE EN LIGNE (SPE-OL)**

Le système SPE en ligne (SPE-OL) est présenté en Annexe 7. Par SPE-OL, certains facteurs sont particulièrement à considérer. Ainsi, les paramètres suivants ont été particulièrement étudiés :

- volume et mode d'injection
- nature de la cartouche
- débit de passage d'échantillon

### **5.1 CARTOUCHES SPE EN LIGNE TESTEES**

Dans la précédente étude [3], suite à l'évaluation de différentes cartouches sur les rendements d'extraction et les limites de quantification, la cartouche HLB® avait été sélectionnée. La cartouche HLB® a été évaluée pour cette étude et comparée à d'autres supports.

Ainsi, dans le contexte de l'injection larges volumes, des cartouches PLRP-S® ont également été évaluées :

- BE ONLINE PLRP-S® 15-20 µm 2,1 x 12,5 mm (Agilent®, référence 5982-1271), cartouches polymériques (polystyrène et divinylbenzène) en phase inverse, pouvant être utilisées à des pH extrêmes.

Ce type de cartouche, de nature proche de la HLB®, a été utilisé lors d'une étude semblable sur des injections d'échantillons en larges volumes. Ainsi, Rodriguez-Mozaz et al. [6] (et Annexe 1) l'avaient évaluée sur des volumes allant jusqu'à 250 mL et avaient obtenu des LQ comprises entre 0,01 et 0,38 ng/L. Par conséquent, la cartouche PLRP® a été principalement considérée pour toutes les expériences de ce document.

Dans l'étude précédente, des problèmes d'interférences avaient été constatés. Il avait été envisagé d'utiliser des cartouches à empreintes moléculaires qui pourraient permettre d'apporter plus de sélectivité et réduire ainsi ces phénomènes matriciels. Ainsi, des cartouches AFFINIMIP®-SPE ESTROGENS (20 mm X 2 mm (Polyintell®, référence FS104-1EL.2X2)), spécifique à la famille des estrogènes ont également été évaluées.

### **5.2 TESTS DES VOLUMES D'INJECTION**

Le système était équipé d'une boucle d'injection de 5 mL. Différents volumes de chargement (en chargeant partiellement ou totalement la boucle d'injection, de 900 µL à 5 mL) ont été d'abord testés à 1 mL/min avec la cartouche PLRP® afin d'évaluer les limites de quantification pour ces niveaux (n=4 pour chaque point).

Afin de ne pas introduire une étape analytique supplémentaire pour ces essais d'optimisations, ces tests ont été réalisés sans ajout d'additif.

Les résultats obtenus pour le 17-bêta-estradiol et son homologue marqué  $^{13}\text{C}_2$  sont exposés Figure 6.

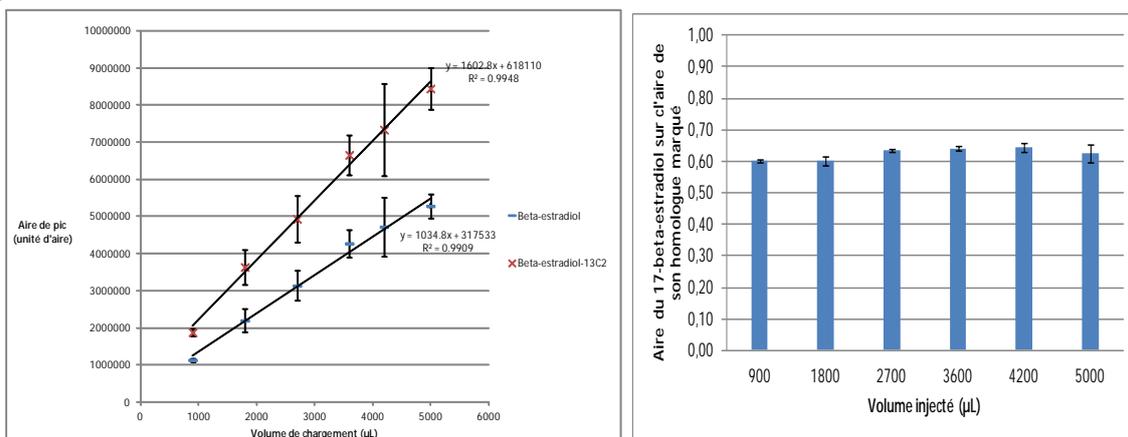


Figure 6 : A gauche, variation du signal obtenu sur l'aire du pic du 17-bêta-estradiol et son homologue marqué  $^{13}\text{C}_2$  en fonction du volume de chargement en SPE-OL sur la cartouche PLRP® (échantillon d'eau d'Evian® dopé à 200 ng/L). A droite, rapport entre les aires de 17-bêta estradiol et de son homologue marqué (même conditions expérimentales) (n=4)

La représentation graphique de l'aire du pic du 17-bêta-estradiol et son homologue marqué  $^{13}\text{C}_2$  en fonction du volume du chargement produit une droite dont le coefficient de détermination est supérieur à 0,99. Le rapport des aires entre le 17-bêta-estradiol et son homologue marqué est pratiquement constant avec un écart type très faible ce qui indique qu'une correction efficace est obtenue pour ce biais.

Les différents tests sur la boucle de 5 mL ont ainsi démontré une réponse linéaire de 900 µL à 5000 µL d'injection.

Les essais suivants avec la boucle de 5 mL ont été effectués en remplissant totalement la boucle donc avec un volume de chargement théorique sur cartouche SPE-OL de 5 mL.

### 5.3 TEST DE LA NATURE DE LA PHASE SPE

La cartouche HLB® ayant produit les meilleurs résultats lors de l'étude précédente [3], elle a été comparée à la cartouche PLRP® qui a été précédemment utilisée par un autre groupe de recherche pour des études d'injections large volume [7]. Les tests ont été effectués en utilisant la boucle de 5 mL (chargement théorique de 5 mL sur cartouche SPE-OL) avec une vitesse de chargement à 1 mL/min.

La configuration du système testé permettant de monter 2 cartouches en parallèle, les essais ont été effectués sur un échantillon d'eau d'Evian® enrichi à 200 ng/L en estrogènes sur les cartouches HLB® et PLRP® opérées en parallèle (cartouches neuves utilisées pour ces 2 types de phase lors de ces essais).

Dans un premier temps, afin de s'assurer qu'il n'y avait pas d'influence de la position des cartouches dans le système d'analyse, le montage des 2 cartouches (HLB® n°1 et PLRP® n°1) a été alterné. Pour une série d'essais (n=5 par cartouche), la cartouche HLB® n°1 est montée sur la position 1 et la cartouche PLRP® n°1 sur la position 2 du système. Pour la seconde série (n=5 par cartouche), les mêmes cartouches sont inversées. Il n'a toutefois pas été remarqué de différence dans les résultats sur cet aspect.

### 5.3.1.1 COMPARAISON DES CARTOUCHES HLB® ET PLRP®

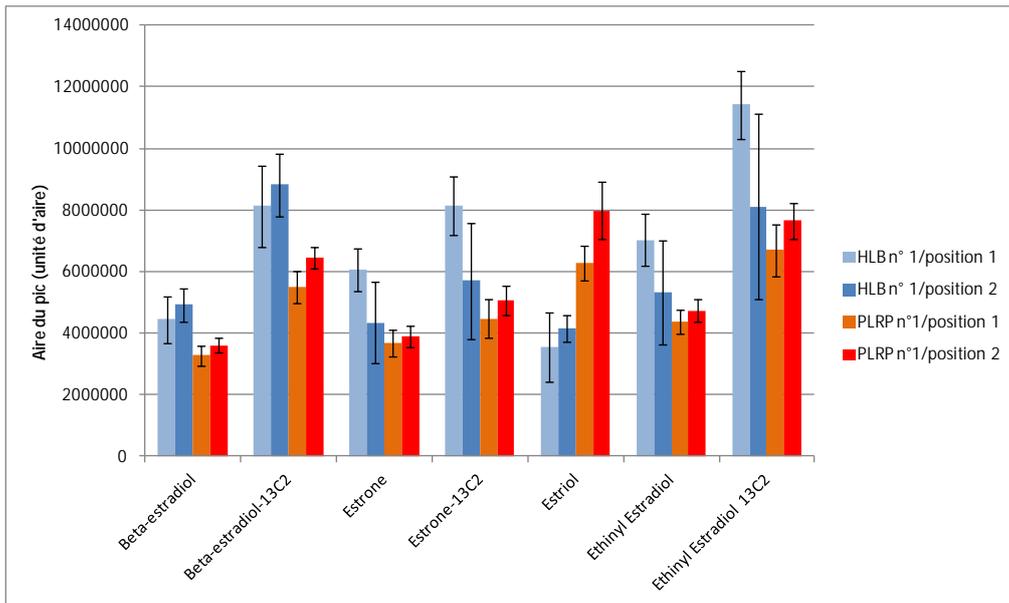


Figure 7 : Intensité du signal en fonction de la cartouche SPE-online : PLRP® ou HLB® sur de l'eau d'Evian® à 200 ng/L d'estrogène avec pré-concentration de 5 mL d'échantillon

Hormis pour l'estriol, une aire de pic supérieure de 15 à 20 % est obtenue avec la cartouche HLB®, quelle que soit la position de montage (Figure 7).

Cependant, en fonction des composés, les variations de coefficients de réponse sont comprises de 11% à 37% pour la cartouche HLB® et de 5 à 14 % pour la cartouche PLRP®, et cela indépendamment de la position de montage. Cette variation plus importante pourrait provenir d'une différence d'homogénéité des cartouches.

De plus, le 17-alpha-éthynylestradiol, par exemple, présente un profil chromatographique plus symétrique en utilisant la cartouche PLRP® qu'avec la cartouche HLB® (Figure 8).

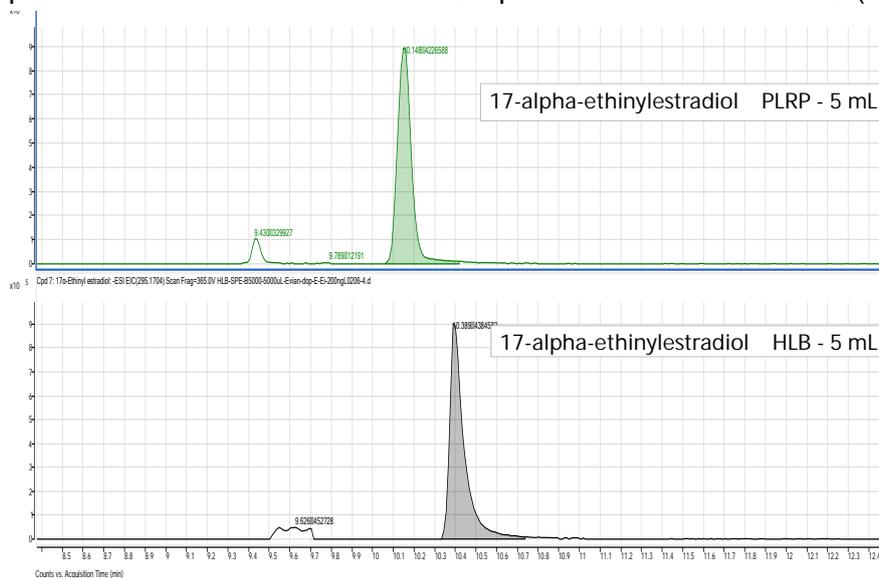


Figure 8 : Profil chromatographique de la 17-alpha-éthynylestradiol obtenu en SPE-OL avec une cartouche HLB® et une cartouche PLRP® (eau d'Evian® à 200 ng/L)

Cette différence de profil est particulièrement marquée pour les composés qui ont une élution en début de chromatogramme comme l'estriol. Ainsi, un bruit de fond plus important est également observé avec la cartouche HLB® (Figure 9).

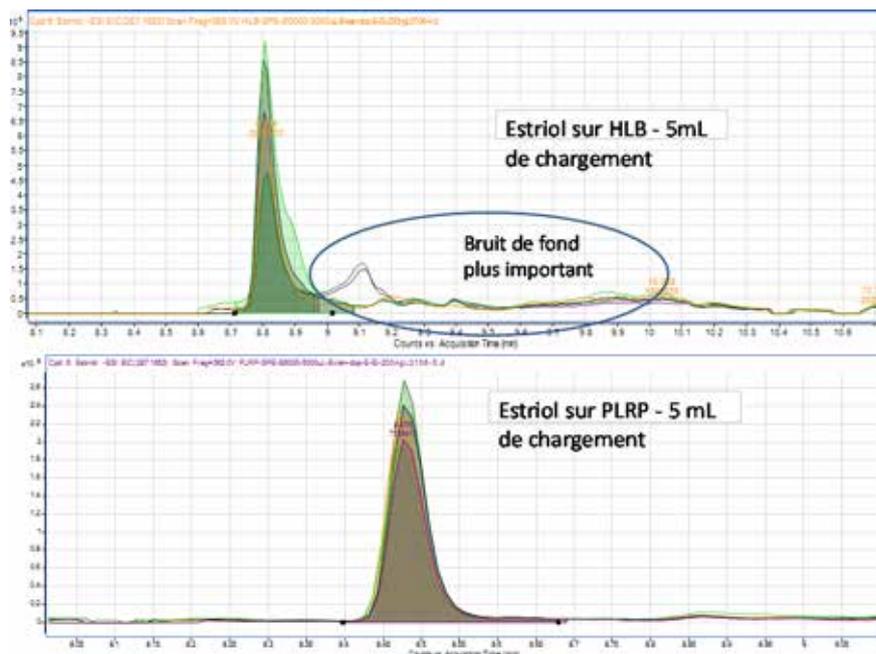


Figure 9 : Profil chromatographique de l'estriol obtenu en SPE-OL avec une cartouche HLB® ou une cartouche PLRP® (eau d'Evian® à 200 ng/L)

La différence de profil chromatographique ainsi que de temps de rétention semble indiquer que des interactions potentiellement plus fortes interviennent pour la cartouche PLRP® par rapport à la cartouche HLB®. Ainsi, ces composés, notamment l'estriol sont mieux retenus sur cette cartouche et élués donc plus tard sur la colonne chromatographique améliorant ainsi son profil.

En conclusion, lors des essais de comparaison des performances obtenues pour les cartouches SPE-OL PLRP® et HLB® pour le chargement de 5 mL d'échantillon, les aires mesurées montrent une meilleure sensibilité de 15 à 20 % de la cartouche HLB® par rapport à la cartouche PLRP®. Cependant, pour la cartouche HLB®, le bruit de fond observé pour certaines parties du chromatogramme est plus important. La symétrie des pics ainsi que les coefficients de variations obtenus sont également meilleurs pour la cartouche PLRP®.

Ainsi, en tenant compte de tous ces éléments, la cartouche PLRP® a été retenue pour la suite de l'étude.

#### 5.3.1.2 COMPARAISON DE 2 CARTOUCHES PLRP® DE CONDITIONS DIFFERENTES

La cartouche PLRP® utilisée pour les tests précédents (et ayant subi à peu près 80 injections d'eau d'Evian®) a été comparée par une cartouche neuve afin d'évaluer le maintien dans le temps des performances (analyses effectuées en parallèle) (Figure 10).

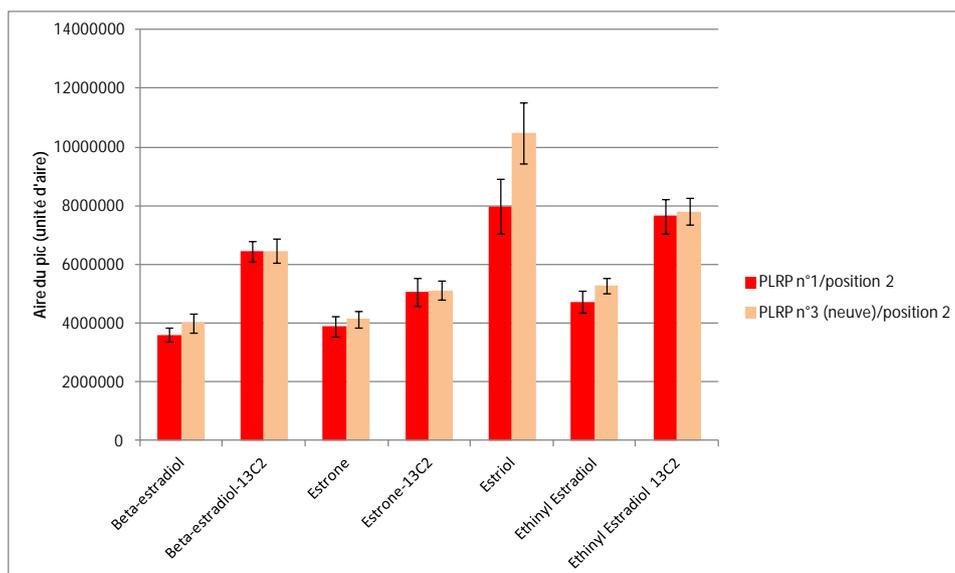


Figure 10 : Sensibilité du signal en fonction de 2 cartouches PLRP® (1 neuve (n°3) et 1 avec 80 extractions (n°1)) sur de l'eau d'Evian® à 200 ng/L d'estrogène avec pré-concentration de 5 mL d'échantillon

Hormis l'estriol, aucune différence de sensibilité notable n'a été constatée pour les résultats obtenus pour les 2 cartouches. Ainsi, ces résultats démontrent une certaine robustesse pour ce type de cartouche aux cycles successifs d'extractions.

## 5.4 EVALUATION DES PERFORMANCES AVEC LA BOUCLE DE 5 mL SUR LA CARTOUCHE PLRP®

### 5.4.1.1 EVALUATION DES PERFORMANCES AVEC LA BOUCLE DE 5 mL SUR LA CARTOUCHE PLRP® AVEC DE L'EAU D'EVIAN®

Afin de définir le domaine de linéarité de la méthode de pré-concentration en ligne avec la boucle de 5 mL (totalement remplie) sur la cartouche PLRP®, des analyses d'échantillons d'eau d'Evian® enrichis à hauteur de : 2, 5, 10, 25, 100, 150, 200 et 250 ng/L ont été analysés selon les conditions suivantes: durée de chargement de 360 s, vitesse de chargement de 1 mL/min (cela représente 6 mL de volume de chargement de la boucle de 5 mL car il est effectué en léger excès afin de prendre en compte le volume représenté par le système (tuyaux particulièrement)).

En étalonnage externe, des problèmes potentiellement liés au chargement n'ont pas permis d'obtenir une linéarité satisfaisante comme le montre la Figure 11.

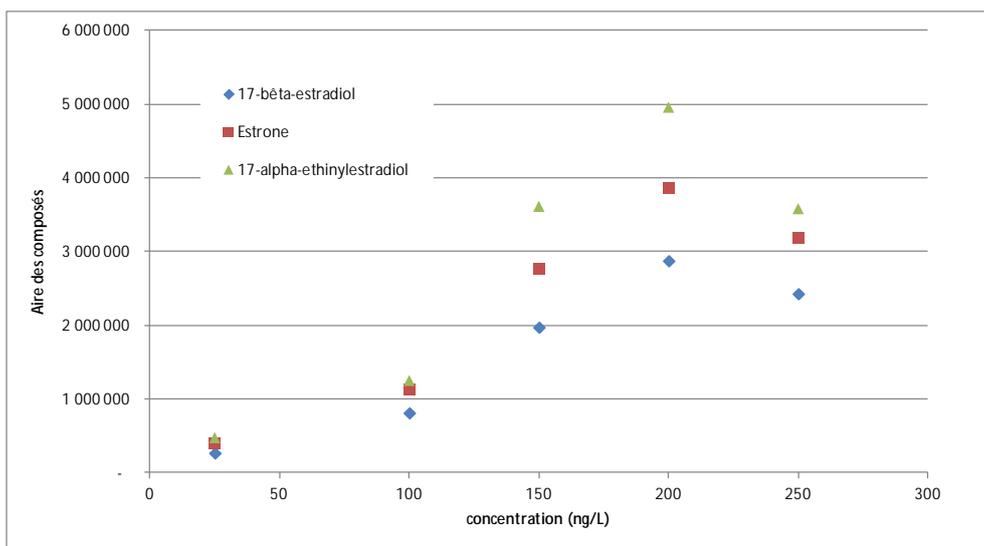


Figure 11 : Etude de la réponse en étalonnage externe par pré-concentration sur la cartouche PLRP® (Echantillons d'eau d'Evian® enrichis à différentes concentrations d'estrogènes avec la boucle de 5 mL)

En étalonnage interne, grâce à la correction des étalons internes, le domaine de linéarité est établi sur la totalité de la gamme testée (Figure 12).

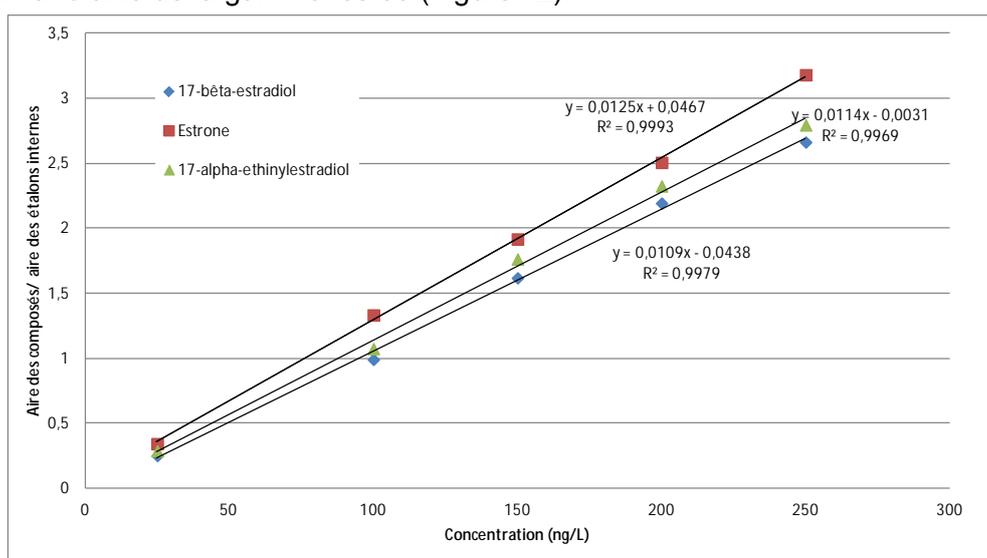


Figure 12 : Exemple d'étude du domaine de linéarité en étalonnage interne (échantillons d'eau d'Evian® dopés sur la cartouche PLRP® (V = 5 mL))

NB : la représentation des abscisses est généralement exprimée en rapport des concentrations (E/EI). Pour être plus explicite, les représentations des droites sont exprimées dans ce document en concentration seule de l'analyte sachant que les concentrations des étalons internes sont constantes dans tous les cas.

Ces expériences montrent que pour les expériences effectuées dans ces conditions, l'utilisation d'étalons internes est indispensable pour effectuer de la quantification. La limite de quantification pour cette expérience a été estimée à 25 ng/L pour chaque estrogène.

#### 5.4.1.2 VARIATION DE LA DUREE DE CHARGEMENT SUR LA CARTOUCHE PLRP® AVEC LA BOUCLE DE 5 mL.

Tous les essais de chargement avec la boucle de 5 mL précédents ont été réalisés à la vitesse de 1 mL/min pendant 360 s.

Afin de tester l'influence de l'étape du chargement de la boucle, la durée de chargement précédemment utilisée (360 s) a été comparée à une durée de chargement représentant au moins 2 fois le volume de la boucle considérée, soit 10 mL. Par conséquent, en considérant un débit de 1 mL/min, la durée de chargement doit donc être d'au moins 10 min, soit 600 s.

Des essais de comparaison du signal (aire du pic du composé) obtenu avec la boucle de 5 mL sur un échantillon d'eau d'Evian® à 100 ng/L, entre la méthode habituellement utilisée (360 s de chargement, soit 6 mL de volume d'eau) et la nouvelle méthode où la durée de chargement est de 600 s ont été effectués (Figure 13).

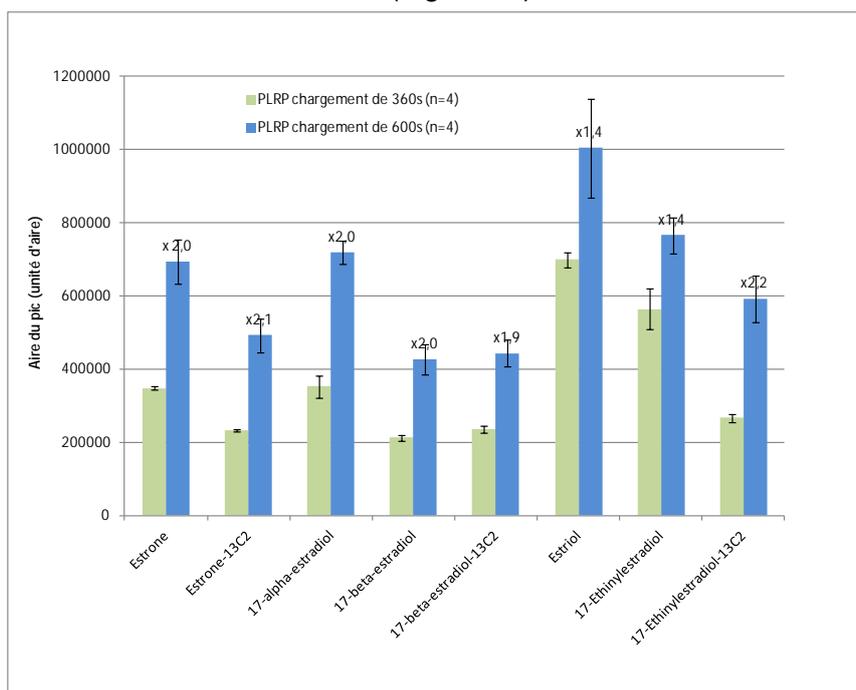


Figure 13 : Evaluation des aires pour la durée de chargement (vitesse de chargement de 1 ml/min) sur la cartouche PLRP® avec la boucle de 5 mL de chargement d'eau d'Evian dopé à 100 ng/L.

Ces essais mettent en évidence une augmentation du signal d'un facteur 1,4 à 2,2 avec un temps de chargement plus long. Pour un temps de chargement de 360 s, la boucle de 5 mL n'est peut être pas totalement remplie. La méthode d'extraction SPE-OL avec la boucle de 5 mL a ainsi été modifiée avec une augmentation de la durée de chargement de 360 s à 600 s.

### 5.4.1.3 EVALUATION DES PERFORMANCES AVEC UNE BOUCLE DE 5 ML SUR LA CARTOUCHE PLRP® AVEC DE L'EAU DE RIVIERE (EAU DE L'OISE)

Pour des essais sur une matrice plus chargée et représentative des milieux d'eau de surface, une eau de rivière (eau de l'Oise) a été utilisée. Cette eau a été filtrée avec un filtre GF/F (ce qui correspond à un seuil de coupure autour de 0,7 µm). L'analyse de cette eau n'a pas révélée de présence d'estrogènes visés. Cette eau a ensuite été dopée selon les composés et concentrations d'intérêt (de 10 jusqu'à 100 ng/L).

Des essais ont donc été réalisés sur la boucle de 5 mL à la vitesse de chargement de 1 mL/min pendant 600 s.

Pour un échantillon à 10 ng/L d'eau de l'Oise, la réponse des 2 isomères alpha et bêta-estradiol est confondue dans le bruit de fond. Une distinction est obtenue à partir de 50 ng/L.

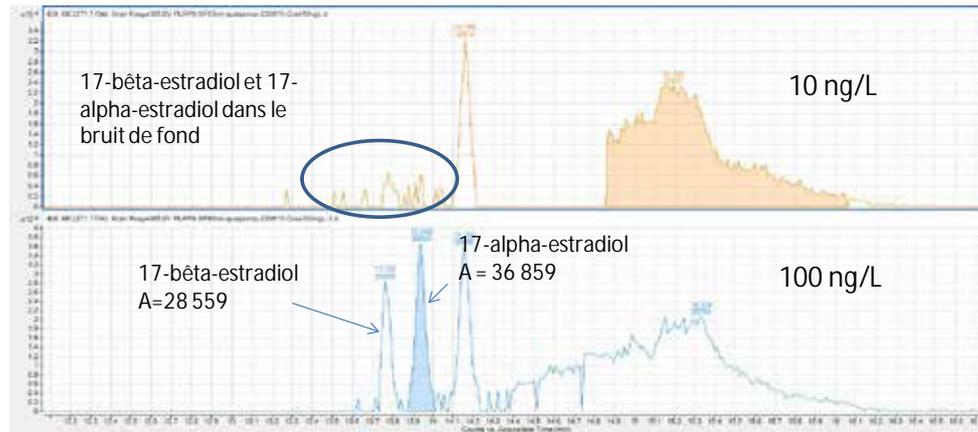


Figure 14 : Réponses de la 17-bêta et 17-alpha-estradiol à 10 et 100 ng/L dans l'eau de l'Oise par SPE-OL 5 mL

Par conséquent, les essais sur 5 mL sur des échantillons d'eau de l'Oise mettent en évidence une baisse de sensibilité d'un facteur 5 de la méthode pour les hormones par rapport aux résultats déterminés dans l'eau d'Evian® en raison d'interférences de la matrice.

Les limites de quantification sont ainsi estimées à 50 ng/L dans cette matrice.

Les performances obtenues pour ces expériences sont très éloignées des objectifs fixés. Ainsi, un volume de chargement plus important, de 20 mL, a été testé.

## 5.5 EVALUATION DES PERFORMANCES POUR UN VOLUME DE CHARGEMENT DE 20 ML SUR LA CARTOUCHE PLRP®

### 5.5.1.1 EVALUATION DES PERFORMANCES POUR UN VOLUME DE CHARGEMENT DE 20 ML SUR LA CARTOUCHE PLRP® AVEC DE L'EAU D'EVIAN®

Afin d'améliorer la sensibilité de l'analyse, un volume de chargement de 20 mL a été considéré. Des volumes supérieurs à 20 mL, bien que techniquement possibles avec l'appareil utilisé, n'ont pas été testés car le temps de chargement est également significativement augmenté. Ainsi, dans un premier temps les analyses ont été réalisées au débit de 1 mL/min entraînant une durée d'analyse totale de 40 min.

Des points de concentrations différentes (2, 5, 10, 25, 60 et 100 ng/L) dans l'eau d'Evian® ont été analysés sur 2 cartouches PLRP® montées en parallèle.

Les résultats obtenus en étalonnage externe sont présentés en Figure 15.

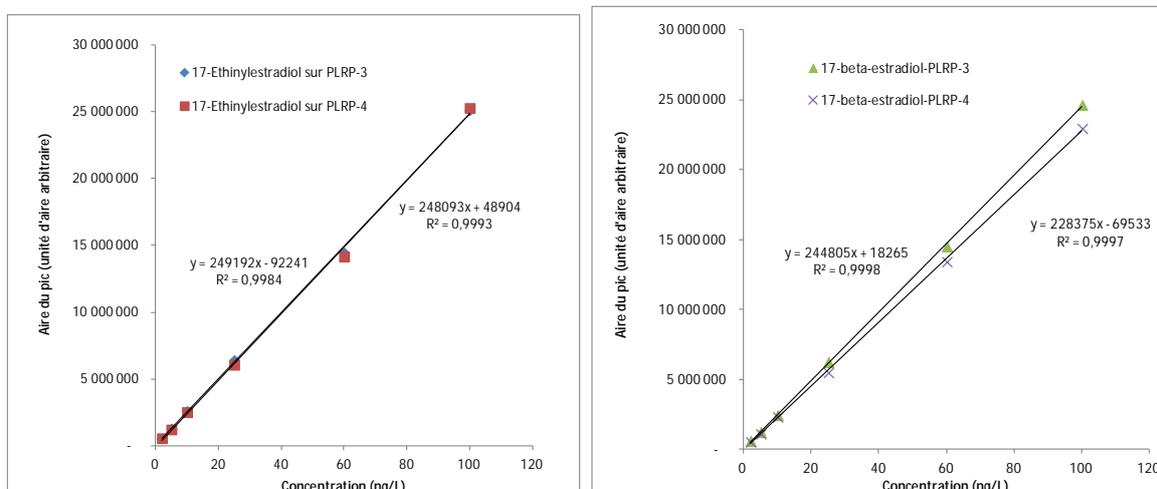


Figure 15 : Droites d'étalonnage externe pour la 17-alpha-éthinyloestradiol (à gauche) et la 17-bêta-estradiol (à droite) par pré-concentration de 20 mL d'eau d'Evian® dopés sur 2 cartouches PLRP®

Le modèle semble linéaire pour chaque droite avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99. Les droites obtenues par composé sur chaque cartouche sont confondues (cas de la 17-alpha-éthinyloestradiol) ou présentent des pentes très proches (cas de la 17-bêta-estradiol).

En dépit du temps nécessaire au chargement, la programmation du système permet de conditionner une cartouche pendant que l'autre est en analyse. Des résultats semblables sont observés pour un volume de chargement de 20 mL d'échantillon quelle que soit la cartouche. Ils mettent également en évidence l'efficacité du conditionnement de la cartouche.

Par conséquent, les données brutes provenant des deux cartouches peuvent être utilisées indépendamment de la cartouche ayant traité la pré-concentration. Ainsi, les courbes d'étalonnage interne ont été tracées en réunissant les données brutes issues des 2 cartouches (Figure 16).

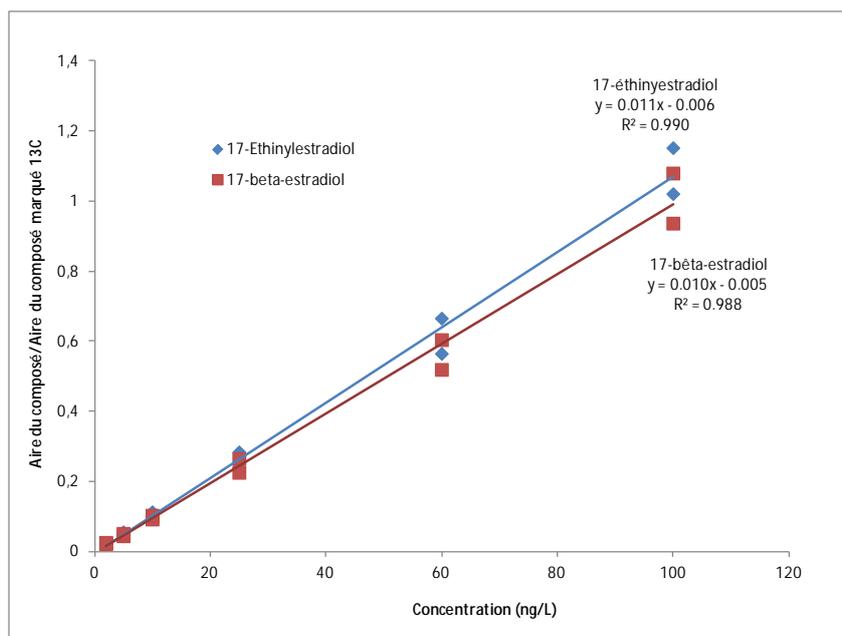


Figure 16 : Droites d'étalonnage interne pour la 17-alpha-éthinyloestradiol et la 17-bêta-estradiol par pré-concentration de 20 mL d'échantillons d'eau d'Evian® dopés en estrogènes, en SPE-OL sur 2 cartouches PLRP® montées en parallèle.

Bien qu'une certaine déviation soit observée entre les 2 cartouches, le modèle incorporant l'ensemble des données peut être considéré comme acceptable avec un coefficient de détermination proche de 0,99.

La pré-concentration de 20 mL d'échantillon permet ainsi d'obtenir des limites de quantification estimées à 2 ng/L contre 25 ng/L. Le domaine de linéarité s'étend au moins jusqu'à 100 ng/L dans l'eau d'Evian® (dernier point testé).

L'augmentation de la sensibilité est plus importante pour des analyses avec 20 mL (d'un facteur 10 alors que le volume de chargement a augmenté d'un facteur 4 par rapport à 5 mL d'injection). Les essais SPE-OL 5 mL sur des échantillons d'eau de l'Oise ont mis en évidence un manque de sensibilité pour les principales hormones. Dans ce cas, il se pourrait que le ratio de la quantité extraite d'hormones par rapport à la quantité d'interférents ne soit pas suffisant pour que l'analyseur puisse générer un signal suffisant pour la détection des hormones. En revanche, si le volume d'échantillon pré-concentré en SPE-OL est de 20 mL, la quantité d'interférents accumulée n'est peut être pas proportionnelle au volume passé (en relatif par rapport au volume, moins d'interférents seraient récupérés). Ainsi, le ratio concentration d'hormones/concentration d'interférents serait supérieur et permettrait une amélioration de la sensibilité de l'analyse.

#### 5.5.1.2 TESTS POUR LE CHARGEMENT DE 20 ML D'ECHANTILLON A 1,5 ML/MIN PAR LA CARTOUCHE PLRP® SUR DES ECHANTILLONS D'EAU D'EVIAN

La configuration d'injection de volume de 20 mL par le système SPE-OL génère moins de perte de charge (pas d'utilisation de boucle notamment) et permet donc à la pompe de travailler à un débit de 1,5 mL/min sans générer de pression excessive. De ce fait, des essais comparatifs entre 1 mL/min et 1,5 mL/min de chargement ont été effectués (Figure 17).

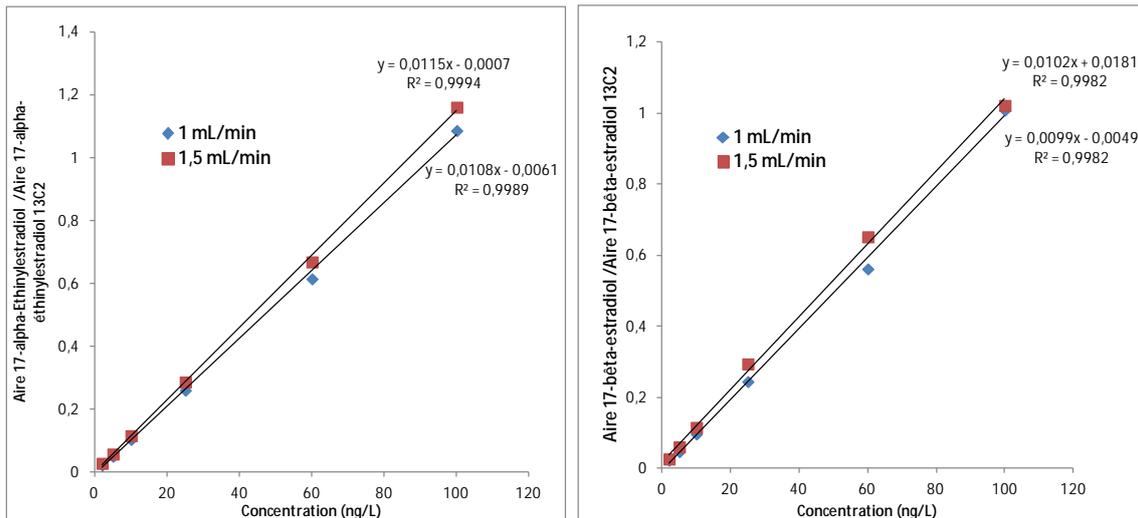


Figure 17 : Comparaison de droites d'étalonnage interne avec pour exemple la 17-alpha-éthinyloestradiol (à gauche) et la 17-bêta-estradiol (à droite) par pré-concentration de 20 mL d'échantillons d'eau d'Evian® dopés à 1 mL/min et à 1,5 mL/min.

Les résultats montrent une faible augmentation de sensibilité de 6 % pour la 17-alpha-éthinyloestradiol et de 3% pour la 17-bêta-estradiol pour un débit de chargement de 1,5 mL/min. Cela met ainsi en évidence une bonne efficacité d'extraction des cartouches indépendamment du débit de chargement. Par ailleurs, un gain de temps conséquent est obtenu puisque le temps de chargement est réduit de 20 min à 13,5 min.

En conséquence, pour 20 mL de chargement, un débit de 1,5 mL/min a été retenu pour les tests ultérieurs (les essais sur des eaux de rivière, qui sont susceptibles d'être plus chargées en « particules » (colloïdes et matières organiques dissoutes)), et donc de générer des surpressions, ont été menés à ce débit sans problèmes particuliers dans ce sens).

### 5.5.1.3 ÉVALUATION DES PERFORMANCES POUR UN VOLUME DE CHARGEMENT DE 20 ML SUR LA CARTOUCHE PLRP® AVEC DE L'EAU DE RIVIERE (EAU DE L'OISE)

Ces essais ont donc été réalisés au débit de 1,5 mL/min. L'eau de rivière (eau de l'Oise) a été filtrée sur filtre GF/F (Whatman®, fibre de verre ; 0,7 µm de dimension nominale de pores). Des points de concentrations différentes (2, 5, 10, 25, 60 et 100 ng/L) dans l'eau d'Evian® et dans l'eau de l'Oise filtrée ont été analysés sur 2 cartouches PLRP® montées en parallèle.

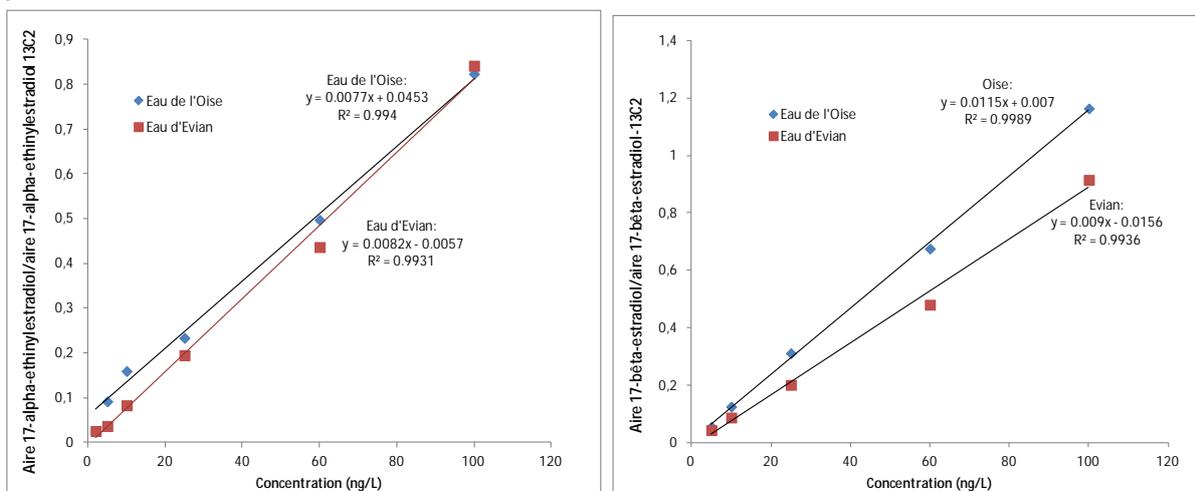


Figure 18 : Exemple de droites d'étalonnage dans l'eau d'Evian® et l'eau de l'Oise pour la 17-alpha-éthinyloestradiol (à gauche) et la 17-bêta-estradiol (à droite) avec cartouches PLRP®, à 1,5 mL/min et chargement de 20 mL d'échantillon

La pente pour les courbes d'étalonnage interne obtenues dans les 2 milieux est sensiblement comparable pour la 17-alpha-éthynylestradiol. En revanche, pour la 17-bêta-estradiol, une différence de 22 % de la pente de la droite de réponse est constatée ce qui démontre dans ce cas un effet de matrice significatif.

Le bruit de fond observé sur les analyses dans l'eau de l'Oise entraine une limite de quantification remontée à 5 ng/L pour la 17-alpha-estradiol, la 17-bêta-estradiol et la 17-alpha-éthynylestradiol et à 25 ng/L pour l'estriol. Seul l'estrone a une limite de quantification identique à celle estimée dans l'eau d'Evian® à 2 ng/L.

## 5.6 CONCLUSION

L'ensemble des essais réalisés sur la cartouche PLRP® aboutissent aux résultats suivants:

- pour un volume de chargement de 5 mL d'eau d'Evian® un domaine de linéarité estimé de 25 à 250 ng/L pour l'ensemble des estrogènes,
- pour un volume de chargement de 5 mL d'eau de l'Oise, une limite de quantification estimée à 50 ng/L pour l'ensemble des estrogènes (testé jusqu'à 100 ng/L),
- pour un volume de chargement de 20 mL d'eau d'Evian®, un domaine de linéarité estimé de 2 à 100 ng/L pour l'ensemble des estrogènes,
- pour un volume de chargement de 20 mL d'eau de l'Oise un domaine de linéarité estimé (sur un nombre réduit de points) de 5 à 100 ng/L pour le 17-alpha-estradiol, le 17-bêta-estradiol et le 17-alpha-éthynylestradiol, de 25 à 100 ng/L pour l'estriol et de 2 à 100 ng/L pour l'estrone.

## 6. EVALUATION DE CARTOUCHES A EMPREINTE MOLECULAIRE (MIP) ESTROGENES

Afin de pouvoir améliorer les limites de quantification dans un milieu complexe comme une eau de rivière et réduire les interférences matricielles telles que l'encrassement observé sur la source de l'analyseur, des cartouches à empreinte moléculaire (MIP) spécifiques aux estrogènes ont été évaluées.

### 6.1 PERFORMANCES DE LA CARTOUCHE MIP POUR DES ESSAIS EN SPE-OL AVEC 5 ML D'ECHANTILLON

#### 6.1.1.1 PERFORMANCES DE LA CARTOUCHE MIP AVEC 5 ML D'INJECTION DANS L'EAU D'EVIAN®

Les premiers essais sur les cartouches MIP ont été réalisés sur une matrice peu complexe en termes d'interférences de composés organiques, l'eau de source d'Evian®. Les tests ont été effectués avec un débit de 1 mL/min sur la boucle de 5 mL (chargement 600 s).

Pour la cartouche MIP, le domaine de linéarité a été étudié en analysant des échantillons d'eau d'Evian® dopés aux concentrations de 2, 5, 10, 20, 50 et 100 ng/L (en présence d'étalons internes marqués au  $^{13}\text{C}$  à 50 ng/L). Le domaine de linéarité s'étend entre 2 et 50 ng/L avec des coefficients de corrélation pour l'ensemble des composés supérieurs à 0,99. Pour des concentrations plus élevées, la linéarité n'est plus observée probablement provoquée par une saturation du système de détection.

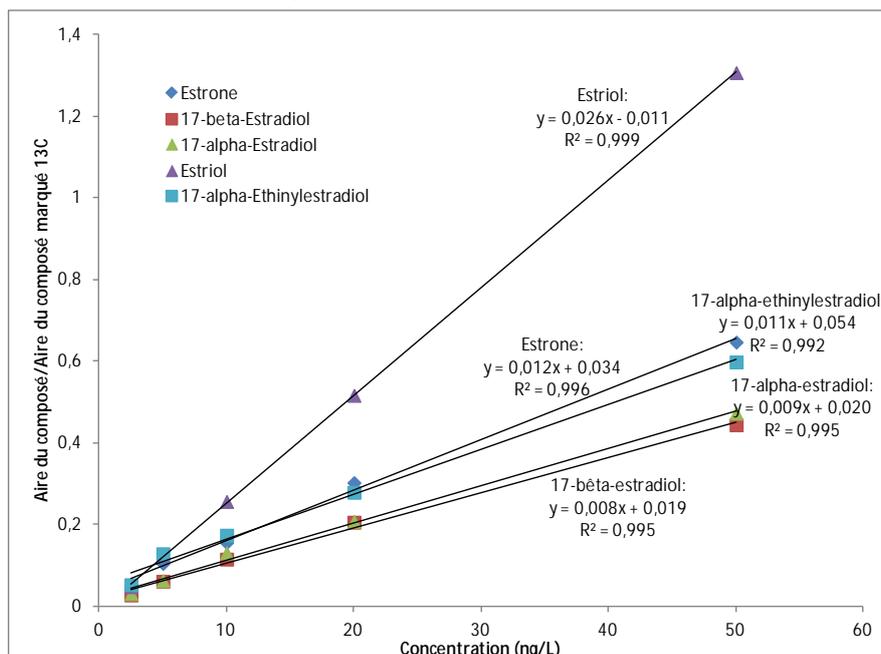


Figure 19 : Domaine de linéarité des composés cibles dans l'eau d'Evian® avec une boucle de 5 mL sur un MIP

En comparant ces résultats à ceux trouvés pour les essais en SPE-OL avec la cartouche PLRP® dans les mêmes conditions expérimentales:

- la sensibilité est améliorée d'un facteur 10 sur la MIP puisque la limite de quantification est estimée (S/N) à 2 ng/L alors que sur la PLRP®, elle était estimée à 25 ng/L (soit le rendement observé pour les MIP est plus important, soit les effets de matrices et donc le bruit est minimisé pour les MIP, ou une addition des 2 phénomènes),

- le domaine de linéarité est borné en valeur haute à 50 ng/L sur la MIP et à 250 ng/L pour la PLRP® (ce qui correspond aux concentrations hautes observées dans les mesures environnementales) (pour des hautes concentrations, une saturation du détecteur est observé. En supposant que les mêmes quantités sont piégées sur le MIP à 50 ng/L et à 250 ng/L (meilleure extraction avec les MIP), cela pourrait représenter la valeur maximum avant une saturation du détecteur),
- les pentes des droites d'étalonnage sont relativement similaires pour les 2 types de cartouches.

### 6.1.1.2 PERFORMANCES DE LA CARTOUCHE MIP AVEC LA BOUCLE DE 5 ML SUR DES ECHANTILLONS D'EAU DE L'OISE.

Des essais dans l'eau de l'Oise ont également été réalisés avec les MIP à des concentrations de 2, 5, 10, 20, 50 et 100 ng/L (en présence d'étalons internes marqués au <sup>13</sup>C à 50 ng/L).

Ces analyses ont mises en évidence d'importants effets de matrices entraînant la dégradation des performances. Les résultats obtenus sur l'essai à 100 ng/L en particulier permettent d'illustrer une chute de sensibilité, par l'absence du signal correspondant au 17-alpha-éthinylestrodiol et par une augmentation du bruit de fond. Ainsi la sensibilité de la méthode avec les MIP vis-à-vis du 17-bêta- et du 17-alpha-estradiole est diminuée d'un facteur 50 pour l'analyse en eau de l'Oise comparée à celle en eau d'Evian®.

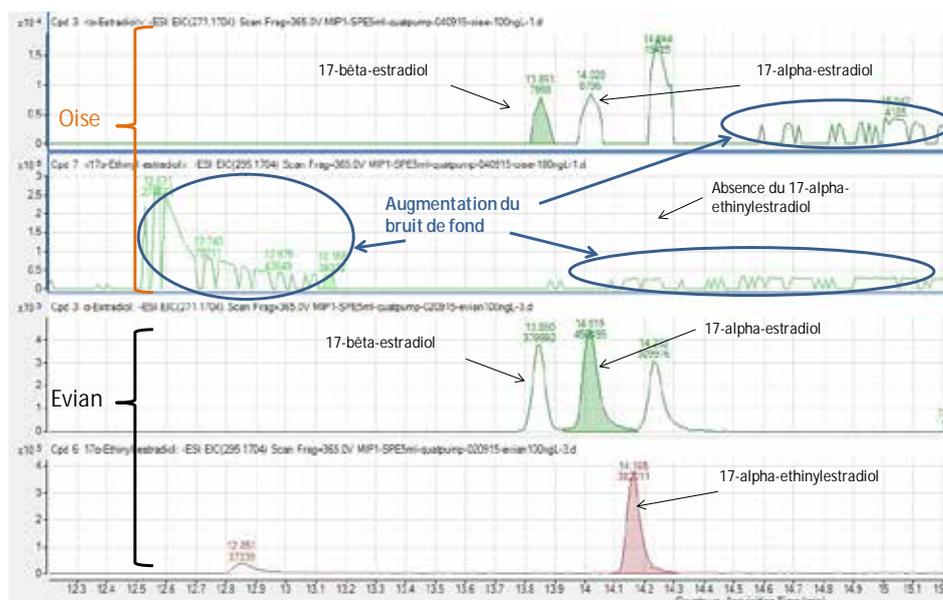


Figure 20 : Comparaison du signal obtenu avec la boucle de 5 mL par une cartouche MIP sur un échantillon d'eau d'Evian® à 100 ng/L dans et un échantillon d'eau de l'Oise à 100 ng/L.

Cette baisse de sensibilité peut être supposée provenir d'un effet de saturation de certains sites MIP, ou de la rétention de composés avec la cartouche MIP qui vont provoquer des interférences lors de la détection spectrométrique.

## 6.2 PERFORMANCES DE LA CARTOUCHE MIP POUR DES ESSAIS EN SPE-OL AVEC 20 ML DE CHARGEMENT

### 6.2.1.1 PERFORMANCES DE LA CARTOUCHE MIP AVEC INJECTION DE 20 ML D'EAU D'EVIAN®

Le test d'une gamme de concentration allant de 2 à 100 ng/L a montré une réponse linéaire pour l'ensemble des composés avec une estimation de la limite de quantification à 2 ng/L.

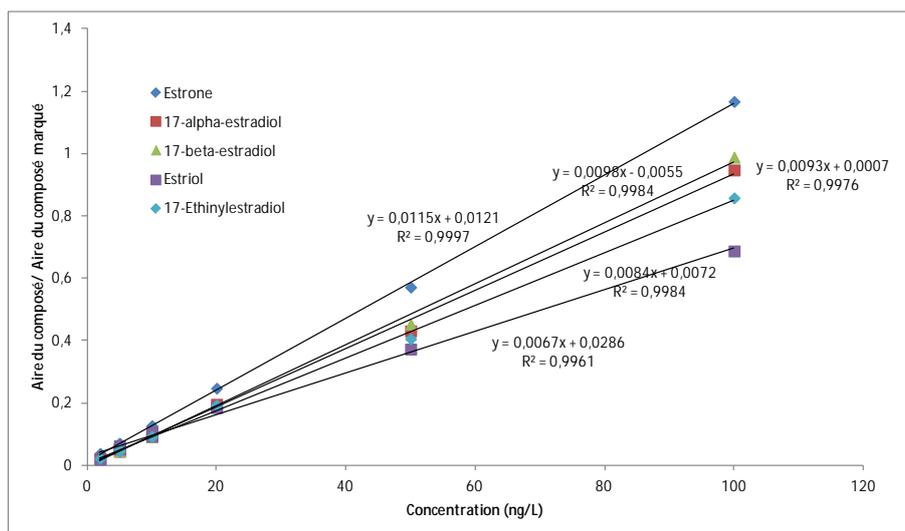


Figure 21 : Courbe de calibration des estrogènes par SPE-OL (20 mL) sur MIP dans l'eau d'Evian®.

En comparaison des résultats obtenus pour la PLRP® avec 20 mL de chargement d'eau d'Evian®, les pentes des droites sont comparables.

Cependant, les profils de séparation chromatographique pour 20 mL de chargement par MIP perdent en résolution entre les isomères 17-bêta et 17-alpha-estradiol. Ces différences de profils peuvent être corrélées avec la différence de temps de rétention observée entre les cartouches MIP et PLRP. Ainsi, il peut être supposé qu'une différence d'interaction existe entre les composés et les 2 supports polymériques testés. Il est nécessaire de passer un pourcentage d'acétonitrile plus important sur les MIP pour pouvoir les élué par rapport au support PLRP®. Ces interactions plus fortes sont également peut être plus hétérogènes pour les MIP ce qui impliquerait que les composés piégés ne sont pas élués à des pourcentages de solvant complètement identiques, notamment en présence de matrice complexe qui peut perturber ces interactions, entraînant une plus forte dispersion lors de l'analyse.

Ainsi, par rapport aux résultats obtenus avec 5 mL de chargement sur MIP et de 20 mL sur la PLRP®, mais également avec le signal obtenu sur les 2 isomères :

- les pics sont mieux résolus sur la PLRP®
- la sensibilité est meilleure sur la PLRP®

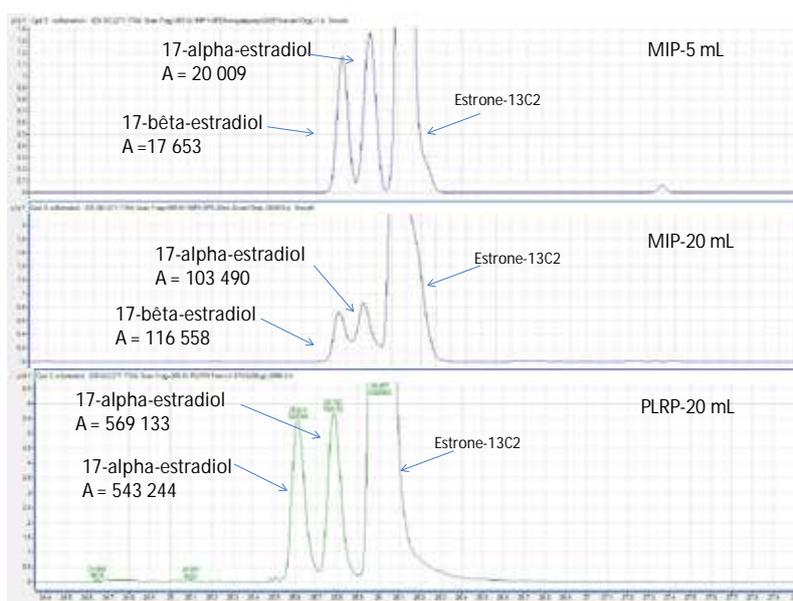


Figure 22 : Résolution chromatographique entre le 17-bêta et le 17-alpha-estradiol sur des échantillons à 10 ng/L dans l'eau d'Evian® par MIP 5 mL, MIP-20 mL et PLRP® -20 mL.

En conclusion, pour les tests avec l'eau d'Evian® et 20 mL de chargement, la cartouche PLRP® montre une meilleure sensibilité et une séparation chromatographique mieux définie pour les 2 isomères 17-bêta et 17-alpha-estradiol.

### 6.2.1.2 PERFORMANCES DE LA CARTOUCHE MIP AVEC INJECTION 20 ML D'EAU DE L'OISE.

Les analyses d'échantillons d'eau de l'Oise (eau filtrée sur filtre Whatman® GF/F -fibre de verre ; 0,7 µm de dimension nominale de pores) enrichis à 2, 5, 10, 20, 50 et 100 ng/L en estrogène et à 50 ng/L en étalon marqué <sup>13</sup>C<sub>2</sub> montrent notamment une diminution de la sensibilité sur le 17-bêta et 17-alpha-estradiol et une mauvaise résolution chromatographique de ces deux isomères.

Comme observé pour les injections de 5 mL, aucun signal n'est mesuré pour le 17-alpha-éthynylestradiol et son homologue marqué <sup>13</sup>C<sub>2</sub>.

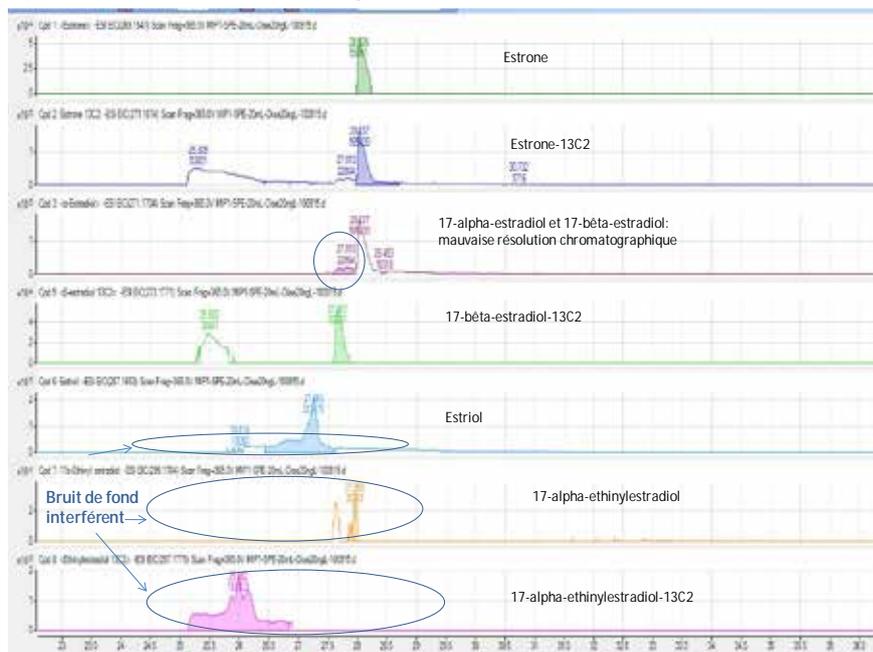


Figure 23 : Signaux mesurés sur les masses (ions) spécifiques des composés cibles lors de l'analyse d'échantillon de 20 mL d'eau de l'Oise par MIP (concentration 20 ng/L pour tous les composés)

Ainsi, le 17-bêta-estradiol, le 17-alpha-estradiol produisent une réponse détectable à partir de 50 ng/L.

L'analyse de l'estrone produit une réponse linéaire sur une gamme allant de 5 à 100 ng/L.

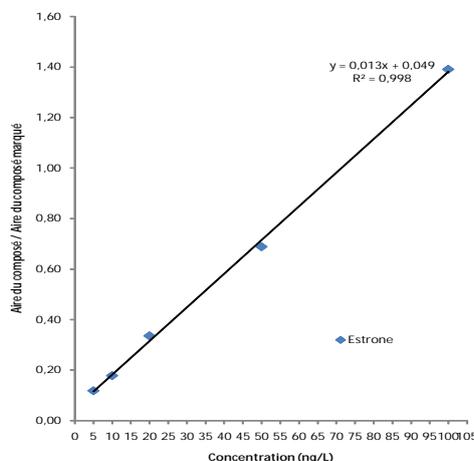


Figure 24 : Droite d'étalonnage pour l'estrone par pré-concentration par SPE-OL (MIP) de 20 mL d'échantillons d'eau de l'Oise dopés.

### 6.3 CONCLUSION

La cartouche PLRP® présente de meilleures performances comparée à l'extraction par cartouche MIP particulièrement pour l'analyse d'une eau de rivière filtrée.

En effet, les tests des cartouches MIP avec cette matrice ont montré un bruit de fond important. Ainsi, la sélectivité de ce type de cartouche « labellisé » estrogènes n'est peut être pas suffisante pour un milieu complexe contenant des substances pouvant potentiellement induire certaines interférences (des substances présentant des conformations moléculaires susceptibles de venir obstruer les sites d'extraction des MIP par exemple).

L'ensemble des essais réalisés sur la cartouche MIP aboutissent aux résultats suivants:

- pour un volume de chargement de 5 mL d'eau d'Evian® un domaine de linéarité estimé de 2 à 50 ng/L pour l'ensemble des estrogènes,
- pour un volume de chargement de 5 mL d'eau de l'Oise, une limite de quantification estimée à 100 ng/L pour la plupart des hormones avec une perte du signal pour le 17-alpha-éthinyloestradiol,
- pour un volume de chargement de 20 mL d'eau d'Evian®, un domaine de linéarité estimé de 2 ng/L (plus bas niveau testé) à 50 ng/L pour l'ensemble des estrogènes,
- pour un volume de chargement de 20 mL d'eau de l'Oise, une limite de quantification estimée à 50 ng/L pour la plupart des hormones avec une perte du signal pour le 17-alpha-éthinyloestradiol. L'estrone peut être analysé de 5 à 100 ng/L.

## **7. PERFORMANCES DE LA METHODE PAR SPE-OL-PLRP® 20 ML AVEC AJOUT D'ADDITIF EN POST-COLONNE**

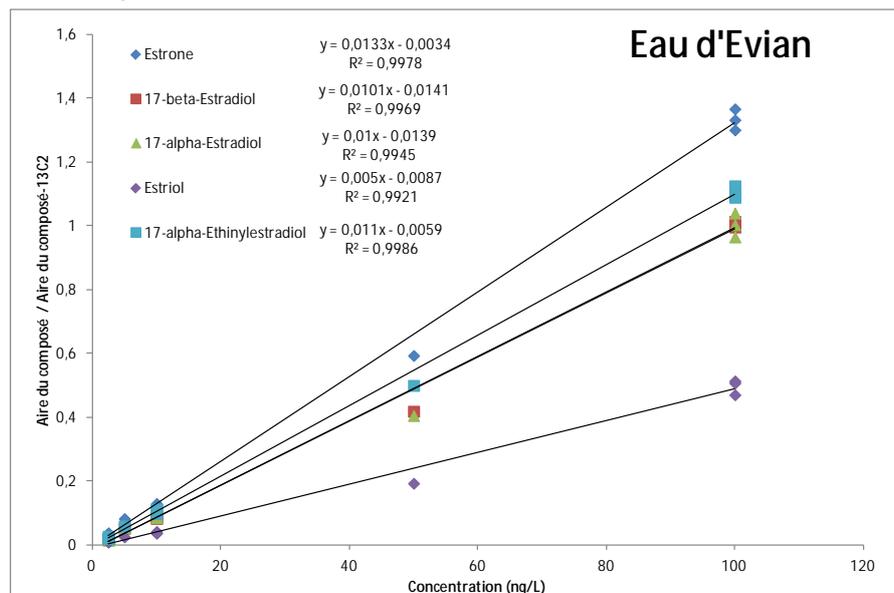
Les meilleurs résultats ayant été obtenus avec une cartouche PLRP® et un volume de chargement de 20 mL, des essais ont ainsi été effectués dans ces conditions avec une addition post-colonne de NH<sub>4</sub>F à 0.4 mM (10 µL/min).

Deux séries d'échantillons ont été analysés:

- une série d'échantillons d'eau d'Evian® enrichis à 2,5, 5, 10, 50 et 100 ng/L en estrogènes et à 50 ng/L en estrogènes marquée-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, avec des analyses en triplicat pour les échantillons à 2,5, 10 et 100 ng/L,
- une série d'échantillons d'eau de l'Oise filtrée sur filtre Whatman® GF/F et enrichis à 2,5, 5, 10, 50 et 100 ng/L en estrogènes et à 50 ng/L en estrogènes marquée-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>, avec des analyses en triplicat pour les échantillons à 2,5, 10 et 100 ng/L.

### **Domaine de linéarité**

Dans l'eau d'Evian®, le domaine de linéarité des estrogènes a pu être établi entre 2,5 et 100 ng/L. Pour les analyses dans l'eau de l'Oise, le domaine de linéarité s'étend de 2,5 à 100 ng/L pour la 17-bêta et la 17-alpha-estradiol, pour l'estrone et la 17-alpha-éthinyloestradiol, tandis que pour l'estriol, le domaine de travail est restreint par la présence d'un bruit de fond entraînant un pic de l'estriol exploitable seulement pour les essais à 50 et 100 ng/L.



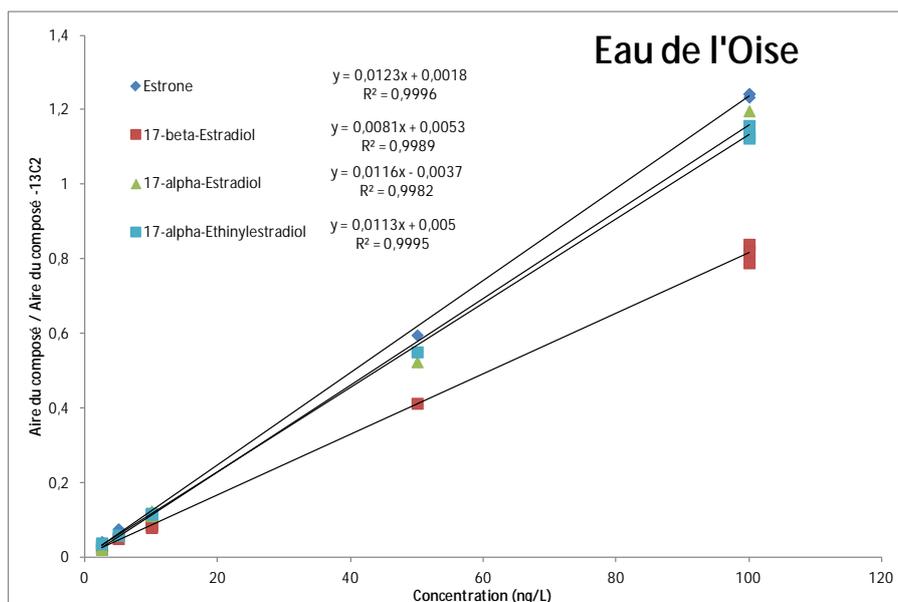


Figure 25 : Domaine de linéarité de l'analyse des estrogènes par analyse de 20 mL d'eau d'Evian® et d'eau de l'Oise par la cartouche PLRP®

### Coefficient de variation

Les analyses réalisées en triplicat dans les deux milieux enrichis en estrogènes à 2,5, 10 et 100 ng/L ont été utilisées pour déterminer la dispersion relative des résultats en déterminant les coefficients de variation, par valeur de concentration. Ainsi, les essais dans l'eau d'Evian® montrent une dispersion relative maximum pour la plus faible des concentrations testées (2,5 ng/L), de 15 % pour l'estriol et de 17 % pour le 17-alpha-éthinyloestradiol. Les essais dans l'eau de l'Oise produisent une dispersion relative maximum du même ordre de grandeur, pour la même valeur de concentration, respectivement de 14 % et 15 % pour le 17-bêta-estradiol et le 17-alpha-estradiol.

Tableau 5 : Coefficients de variation pour les essais avec la cartouche PLRP® et 20 mL de chargement avec post-colonne addition (n=3).

	Eau d'Evian®			Eau de l'Oise		
	2,5 ng/L	10 ng/L	100 ng/L	2,5 ng/L	10 ng/L	100 ng/L
Estrone	8 %	1 %	2,5 %	8 %	3 %	1 %
17-bêta-estradiol	4 %	6 %	1 %	14 %	5 %	3 %
17-alpha-estradiol	5 %	6 %	4 %	15 %	6 %	2 %
Estriol	15 %	7 %	5 %	ND	ND	5 %
17-alpha-éthinyloestradiol	17 %	7 %	2 %	3%	1 %	2 %

### Détermination de la justesse

Les résultats obtenus sur les échantillons d'eau de l'Oise ont été comparés à ceux obtenus dans l'eau d'Evian® afin d'évaluer par étalonnage interne la justesse avec l'étalonnage effectué par ce type de matrice. Ces résultats ont permis de déterminer l'écart à la valeur cible, en déclarant la valeur cible comme étant la valeur de concentration théorique de dopage.

Tableau 6 : Justesse calculée pour des échantillons d'eau de l'Oise par rapport à un étalonnage dans l'eau d'Evian® par étalonnage interne (avec une cartouche PLRP®, un volume de chargement de 20 mL et une addition post-colonne) (moyenne de n=3).

	Concentration réelle théorique (ng/L)	Concentration estimée (ng/L)	Ecart à la valeur cible (%)
<b>Estrone</b>	2,5	3,0	+ 21 %
<b>17-bêta-estradiol</b>	2,5	1,6	- 37%
<b>17-alpha-estradiol</b>	2,5	1,6	- 36 %
<b>17-alpha-éthinylestadiol</b>	2,5	3,1	- 22 %
<b>Estrone</b>	10	9,0	- 10 %
<b>17-bêta-estradiol</b>	10	7,4	- 26 %
<b>17-alpha-estradiol</b>	10	11,0	+ 10 %
<b>17-alpha-éthinylestadiol</b>	10	10,3	+ 3 %
<b>Estrone</b>	100	95,4	- 5 %
<b>17-bêta-estradiol</b>	100	80,7	- 19 %
<b>17-alpha-estradiol</b>	100	115,7	+ 16 %
<b>17-alpha-éthinylestadiol</b>	100	103,1	+ 3 %

Les écarts à la valeur cible atteignent 37 % en valeur absolue pour la concentration la plus basse de 2,5 ng/L. Pour la concentration la plus élevée, des écarts jusqu'à 19 % sont observés.

## **8. CONCLUSION**

L'objectif de ces travaux AQUAREF répartis sur deux exercices (2013 et 2015) était d'obtenir une méthode qui pourrait permettre la mesure des hormones estrogéniques aux concentrations correspondant aux normes de qualité environnementale de la DCE, soit respectivement de 0,4 ng/L pour l'estrone, 0,4 ng/L pour le 17-bêta-estradiol et 0,035 ng/L pour le 17-alpha-éthynylestradiol, dans la fraction dissoute d'une eau de surface.

Une première étude [3] avait permis de démontrer, en phase avec la littérature, que l'analyse des hormones estrogéniques est possible par extraction sur phase solide en ligne (SPE-OL). Les seuils atteints par l'injection de 1,5 mL d'échantillons n'étaient cependant pas suffisants par rapport à l'objectif fixé. De ce fait, une double pré-concentration d'échantillon avait été évaluée. Elle consistait à effectuer d'abord la concentration d'un volume de 1 L d'échantillon par extraction sur phase solide (SPE), puis de reprendre l'extrait et de procéder à une deuxième concentration en l'injectant via une SPE-OL. Lors du couplage avec une analyse par LC/MS/MS, des interférences spectrométriques importantes avaient cependant été constatées, ce qui n'avait pas permis d'obtenir de résultats probants.

Dans cette deuxième partie, une étude a été effectuée sur des extractions en ligne large volume couplées avec la chromatographie à phase liquide/spectromètre de masse haute résolution de type QTOF. L'utilisation d'un appareil de ce type permettait d'évaluer si l'apport de sélectivité supplémentaire de ce détecteur pouvait réduire les interférences/bruits de fond observés lors de l'étude précédente. De plus, cet appareil avait la capacité d'injecter en SPE-OL des volumes plus importants d'échantillon que lors de l'étude précédente ce qui permettait une approche plus directe et pratique à mettre en œuvre.

Des optimisations ont tout d'abord été effectuées sur la détection afin d'améliorer la réponse du détecteur sur les hormones estrogéniques. Cela a notamment consisté à évaluer l'ajout de tampon à la phase mobile pour augmenter la sensibilité. L'ajout de  $\text{NH}_4\text{F}$  en addition post colonne permet d'obtenir les meilleurs résultats.

Les tests sur différents types de cartouches polymériques SPE-OL ont conduit à la sélection de la cartouche PLRP® car elle offre une meilleure répétabilité et un bruit de fond atténué. Les essais sur une cartouche à empreinte moléculaire (MIP) n'ont pas permis d'améliorer les performances observées sur les cartouches polymériques en raison d'un possible manque de sélectivité de la phase testée.

L'utilisation d'un volume de chargement de 5 mL a permis d'atteindre des limites de quantifications estimées à respectivement 25 et 50 ng/L sur de l'eau d'Evian® et de rivière (eau de l'Oise). Les essais sur 20 mL de chargement ont apporté une amélioration notable des limites de quantification qui ont été estimées (en moyenne) à 2 et 5 ng/L respectivement sur l'eau d'Evian® et de rivière.

En appliquant une addition post colonne, des performances correctes en termes de justesse et répétabilité ont été obtenues sur de l'analyse de l'eau de l'Oise pour des limites de quantification estimées allant jusqu'à 2,5 ng/L.

Cependant, malgré la sélectivité importante apportée à la détection par le spectromètre de masse haute résolution, les niveaux atteints sont cependant largement insuffisants pour atteindre les seuils requis pour la surveillance.

L'injection d'un volume de chargement plus important que ceux testés pour améliorer les sensibilités ne serait pas souhaitable car il entrainerait un temps de chargement trop important (à moins que des débits de chargement plus importants soient utilisés si le système le permet) et un apport d'interférences supplémentaires.

Ce type de conditions expérimentales n'apparaît donc pas adapté pour atteindre des niveaux de détection particulièrement bas pour ces composés. Ce type de configuration pourrait cependant être envisagé pour les analyses de composés polaires (présents majoritairement dans la phase aqueuse) pour des niveaux de concentration supérieurs à 5 ng/L afin de pouvoir disposer d'un système aisément automatisable (et donc de potentiellement réduire les coûts de préparation d'échantillon).

Il pourrait plus largement dans ce contexte être utilisé pour des analyses de composés ubiquistes engendrant des problèmes de contamination car il permet de réduire les étapes de préparation d'échantillon.

Les travaux sur les hormones se sont poursuivis au sein d'AQUAREF dans le cadre de la liste de vigilance. Ainsi, une méthode avec une stratégie analytique différente a été évaluée par le LNE avec l'utilisation de l'extraction sur phase solide par disque sur 1 litre d'échantillon suivie d'une purification puis d'une re-concentration de l'extrait avant dérivation par dansylation. L'extrait dérivé est ensuite analysé par LC/MSMS. Les performances obtenues par cette méthode permettent de répondre aux exigences de la liste de vigilance. La synthèse de ces nouveaux travaux seront disponibles via la fiche méthode MA-68.

## **9. REFERENCES**

- [1] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy-2013
- [2] Décision d'exécution (UE) 2015/495 de la commission du 20 mars 2015 établissant une liste de vigilance relative aux substances soumises à surveillance à l'échelle de l'Union dans le domaine de la politique de l'eau en vertu de la directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil
- [3] C. Chatellier, F. Lestremau – Etude sur l'amélioration des limites de quantification pour l'analyse des résidus médicamenteux de la DCE dans la phase aqueuse des eaux de surface -2013- rapport AQUAREF, DRC-14-136908-01307A, 91 p.
- [4] Togola A, Lardy-Fontan S., Lestremau F., Soulier C. - Rapport de positionnement sur l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour le criblage environnemental - 2015- rapport AQUAREF. BRGM/RP-65420-FR 75, 65 p.
- [5] Trace level measurement of steroids with Agilent 6490 triple quadrupole mass spectrometer, Note d'application, Agilent Technologies, 2012
- [6] D-H. D. Yang, J-Z. Li, B. Wuest, Determination of Eight Estrogens in milk by UHPLC and the Agilent 6495 Triple Quadrupole Mass Spectrometer, Note d'application, Agilent Technologies, 2014
- [7] Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barcelo D., Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method, Analytical Chemistry 76 (2004) 6998-7006

## 10. LISTE DES ANNEXES

<b>Repère</b>	<b>Désignation</b>	<b>Nombre de pages</b>
Annexe 1	Revue bibliographique de l'analyse des hormones estrogéniques par SPE en ligne	1
Annexe 2	Spectrométrie de masse à temps de vol (TOF)	2
Annexe 3	Structure des composés étudiés	1
Annexe 4	Paramètres de réglage du spectromètre de masse	3
Annexe 5	Méthode chromatographique en injection liquide	1
Annexe 6	Montage de l'addition post-colonne	1
Annexe 7	Méthode chromatographique avec préconcentration SPE en ligne	3



## **ANNEXE 1**

---

Revue bibliographique de l'analyse des hormones  
estrogéniques par SPE en ligne



(repris de [a])

Composé	Volume d'échantillon (mL)	Matrice	Cartouche utilisée	Détection	LD (ng/L)	Rendements (%)	Référence
E1, E2, E3, EE2	250	Eau de rivière, de boisson	PLRP-s	LC-MS/MS (ESI)	0,01-0,38	74-90	[b]
E1, E2, E3	50	Eau de rivière, de lac	Filtre de cigarette, C <sub>18</sub>	LC/UV	1 - 80	85-112	[e]
E1, E2, E3, EE2	1	Eau de surface, de STEP	Hypersil Gold C <sub>18</sub>	LC-MS/MS (APPI)	3-50	75-103	[f]
E1, E2, EE2	1	Eau de STEP	Dérivation sur support HLB®	LC-MS/MS (ESI)	0,4 – 0,7	80 - 95	[d]
E1, E2, E3, EE2	200	Eau de boisson, souterraine, de surface, de STEP	PLRP-S	LC/UV	10 - 20	96- 111	[c]
E1, E2, E3, EE2	50	Eau de rivière, de STEP	NG1	LC-MS/MS (ESI)	0,1 - 25	32 - 120	[a]

E1 = Estrone ; E2= 17-alpha et 17-bêta estradiol ; E3= Estriol ; EE2= 17-alpha-éthinyloestradiol ; LD : limites de détection

[a] Guo F., Liu Q., Qu G., Song S., Sun J., Shi J., Jiang G., Simultaneous determination of five estrogens and four androgens in water samples by online solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1281 (2013) 9-18

[b] Rodriguez-Mozaz S., de Alda M.J.L., Barcelo D., Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 6998-7006

[c] de Alda M.J.L., Barcelo D., Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection, *Journal of Chromatography A* 911 (2001) 203-210

[d] Salvador A., Moretton C., Piram A., Faure R., On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants, *Journal of Chromatography A* 1145 (2007) 102-109

[e] Wang S., Huang W., Fang G., He J., Zhang Y., On-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of estrogens in environment, *Analytica Chimica Acta* 606 (2008) 194-201

[f] Viglino L., Aboufadi K., Prevost M., Sauvé S., Analysis of natural and synthetic estrogenic endocrine disruptors in environmental waters using online preconcentration coupled with LC-APPI-MS/MS, *Talanta* 76 (2008)1088-1096



## **ANNEXE 2**

---

Spectrométrie de masse à temps de vol (TOF)



Un spectromètre de masse est un appareil de détection qui permet de mesurer la masse moléculaire d'un composé organique et de ses fragments. Un appareil de spectrométrie de masse haute résolution permet d'obtenir une meilleure précision sur la masse exacte d'une molécule organique.

Un appareil par spectrométrie de masse basse résolution, de type quadripôle, va fournir une indication sur la masse unitaire du composé, par exemple dans le cas de l'analyse du 17-alpha-éthynylestradiol à 296 g/mol.

Un appareil de masse haute résolution, en temps de vol dans ce cas, va apporter plus de précision sur la masse mesurée, à  $10^{-4}$  Da, c'est-à-dire dans cet exemple 296,4034. Ainsi, la probabilité de la présence d'ions interférents possédant cette masse exacte est potentiellement beaucoup plus réduite que lorsqu'un analyseur avec une masse unitaire simple est utilisé. Ce constat est à pondérer pour les appareils en masse unitaire car pour obtenir une meilleure sensibilité, ils sont utilisés en couplant deux quadripôles ce qui permet d'apporter une sélectivité supplémentaire.

La technologie temps de vol (TOF) consiste à séparer les composés ionisés selon leur ratio masse/charge. Dans un premier temps, les composés sont ionisés dans la source puis focalisés à travers des lentilles (cette partie est commune à tous les spectromètres de masse et aucune particularité ne s'applique concernant les TOF). Puis les ions traversent le quadripôle (le quadripôle est utilisé pour la fragmentation des composés et permettre leur identification. Dans le cadre de cette étude, il n'a donc pas été activement utilisé). Les ions arrivent alors à une interface qui, via le pusher, va les propulser dans le tube à vide.

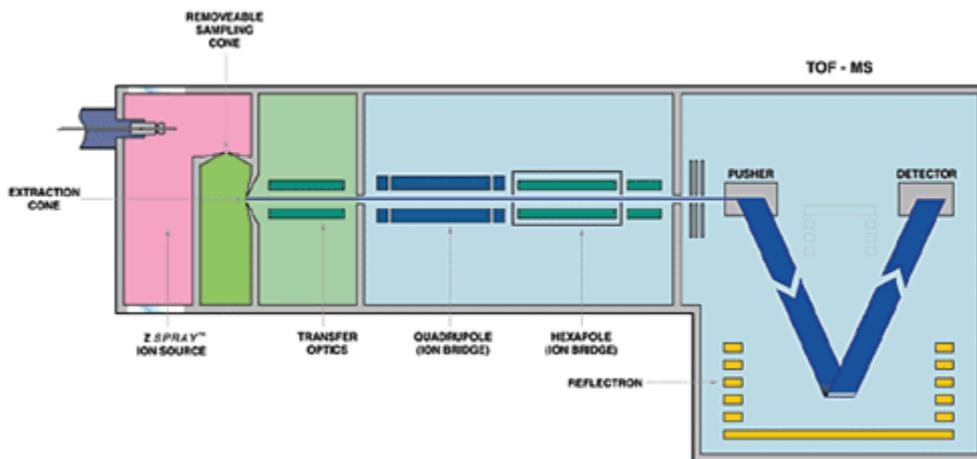


Schéma typique d'un appareil QTOF (source Waters®)

Les ions voyagent dans le tube, puis sont repoussés par le réflectron (en jaune dans le schéma), effectuent en sens inverse le trajet dans le tube avant d'atteindre le détecteur (un trajet des ions en V avec le réflectron permet d'augmenter la distance de vol et ainsi l'efficacité (la résolution) de la séparation des ions).

Lors du vol des ions dans le tube sous vide, une relation s'établit entre le temps qu'un composé met à voyager et sa masse (en fait son ratio masse/charge). Les composés les plus lourds cheminent plus lentement que les composés les plus légers ce qui permet d'obtenir leur ségrégation. En calibrant l'appareil avec des substances de masses connues, une mesure de masse très précise peut ainsi être obtenue. Ainsi, une résolution spectrométrique de l'ordre de 30 000 est généralement atteinte avec cette technologie.

Un autre avantage majeur de la technologie TOF est que les performances en termes de fréquence d'acquisition et de fréquence de balayage sont pratiquement indépendantes de la gamme de balayage des ions étudiés. Pour obtenir une sensibilité optimale en triple quadripôle (TQD), il est nécessaire d'optimiser et de sélectionner une gamme de masse à rechercher très précise. Il en résulte que tout ce qui n'est pas recherché ne peut pas être détecté. Aucune sélection de masse n'est nécessaire avec le TOF. Ainsi, la totalité des ions générés peuvent en théorie être détectés par l'analyseur. Il suffit ensuite lors du retraitement de données de sélectionner les ions correspondants aux composés d'intérêt (cet avantage constitue aussi une relative faiblesse car tous les interférents potentiels sont également détectés et peuvent perturber le signal d'acquisition). Il est également possible d'effectuer un retraitement des données après analyse avec pour cible des composés qui n'avaient pas été considérés initialement.

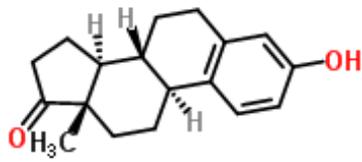
Les performances en termes de sensibilité et de gamme de linéarité ont été améliorées par les constructeurs ces dernières années pour pratiquement atteindre celles obtenues sur des systèmes de triple quadripôles. Le TOF (et système de masse haute résolution en général) permettant cependant une meilleure précision sur la mesure du rapport  $m/z$  et évitent la discrimination des informations lors de l'acquisition ; ce type d'appareil peut ainsi être utilisé pour la quantification des composés bien qu'il soit principalement dédié pour la mesure de composés suspectés/non ciblés.

## **ANNEXE 3**

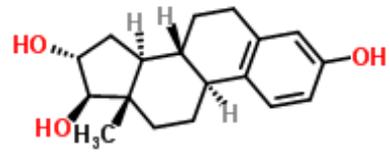
---

Structure des composés étudiés

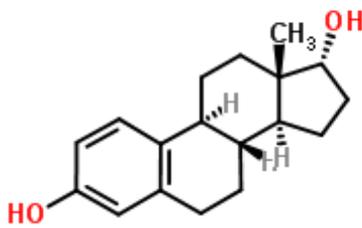




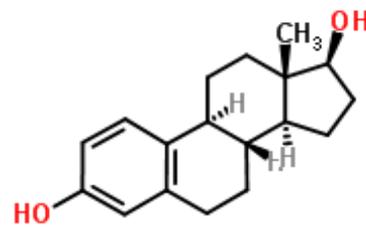
Estrone (E1) (M= 270 g/mol)



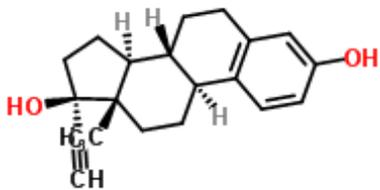
Estriol (E3) (M= 288 g/mol)



17-alpha-estradiol (17a-E2) (M= 272 g/mol)



17-bêta-estradiol (17b-E2) (M= 272 g/mol)



17-alpha-éthynylestradiol (EE2) (M=296 g/mol)



## **ANNEXE 4**

---

Paramètres de réglage du spectromètre de masse haute  
résolution



## Optimisation des paramètres spectrométriques

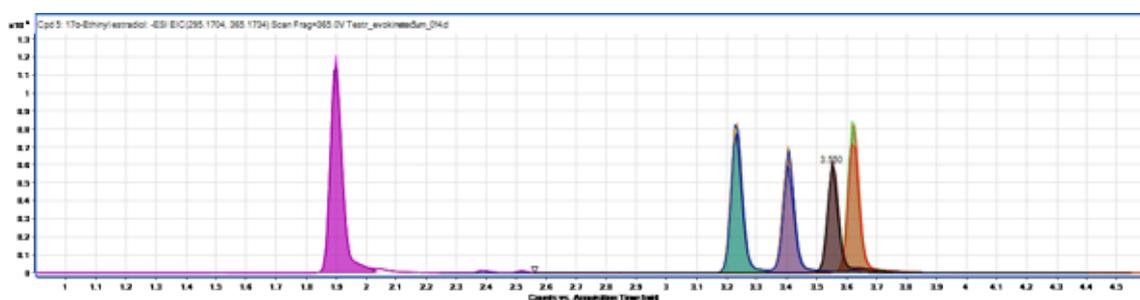
L'utilisation du QTOF nécessite l'optimisation de nombreux paramètres, particulièrement au niveau de la source. Le constructeur Agilent® nous a indiqué les paramètres qui pouvaient avoir une influence significative sur la sensibilité de la détection des composés.

Trois paramètres ont ainsi été particulièrement étudiés (entre parenthèses, les valeurs par défaut):

- Le VCAP (voltage d'ionisation des molécules) (3000 V)
- Le sheath gas temperature (gaz servant à la volatilisation des molécules) (300°C)
- Les réglages du funnel (Funnel RF HP et Funnel LP) (tension servant à focaliser les ions formés) (HP : 100 V ; LP : 60 V)

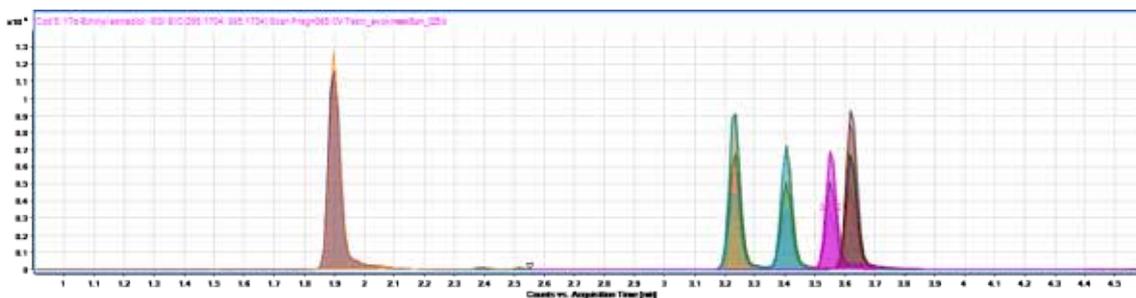
Un autre paramètre, le nozzle voltage a été également testé mais aucun résultat probant n'a été obtenu.

Pour le VCAP, 4 niveaux ont été testés (2500, 3000, 3500, 4000 V). Aucune différence significative n'a été remarquée entre les 4 niveaux testés.



Variation de la valeur de VCAP

Pour le sheath gas temperature (testé à 270, 300, 350 et 390°C), des réponses équivalentes ont été observés pour 270 et 300 °C. Les réponses chutaient avec l'augmentation de la température à partir de ce seuil.

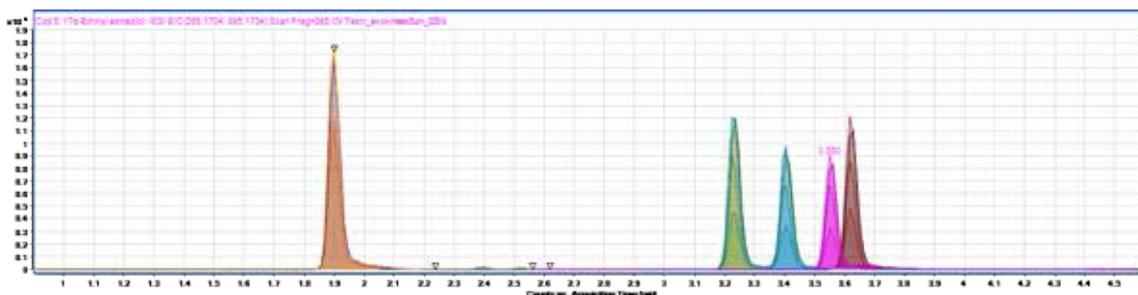


Variation de la valeur de sheath temperature

Pour les réglages du funnel, 4 conditions ont été testées :

- 1 : HP 80 V ; LP 50 V
- 2 : HP 100 V ; LP 60 V (valeur par défaut)
- 3 : HP 150 V, LP 80 V
- 4 : HP 200 V, LP 100 V

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les 2 réglages du funnel avec des voltages hauts. La réponse commençait à décroître pour des réglages plus bas (à partir de HP 100 V et LP 60V).



Variation des réglages du funnel

Au final, les conditions opératoires retenues sont un VCAP de 3000 V, un sheath gas température de 300°C et des réglages de funnel de HP 150V et LP 80V.

### Paramètres spectrométriques utilisés

- **Source:** Dual AJS ESI
  - Ø Mode d'ionisation : ESI(-),
  - Ø VCap : 3 kV,
  - Ø Nozzle voltage : 1500 V
  - Ø Température de la source : 180° C,
  - Ø Sheath gaz temperature (N2) : 300° C,
  - Ø Sheath gaz flow (N2): 11 L/min,
  - Ø Drying gaz (N2) : 16 L/min,
  - Ø Nebulizer (N2) : 15 psig,
  - Ø Funnel Exit DC: 50 V,
  - Ø Funnel RF HP: 150 V,
  - Ø Funnel RF LP: 80V,
  
- **Mode d'acquisition du TOF:** MS-Mode
  - Fréquence d'acquisition : 1,5 spectre/s
  - Durée : 666,7 ms/spectre
  - Transient/spectre : 5455
  
- **Masses exactes suivies en TOF**

Composés	[M-H]- (m/z)
17-bêta-estradiol	271,1704
17-alpha-estradiol	271,1704
17-bêta-estradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	273,1771
17-alpha-éthynilestradiol	295,1704
17-alpha-éthynilestradiol- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	297,1771
Estriol	287,1653
Estrone	269,1547
Estrone- <sup>13</sup> C <sub>2</sub>	271,1614

## **ANNEXE 5**

---

Méthode chromatographique avec injection liquide sans  
préconcentration



## **Conditions chromatographiques :**

- **Pompe binaire haute pression**

Les conditions de gradient de la pompe sont les suivantes :

Temps (min)	Débit (mL/min)	Voie A (Eau ultra-pure)	Voie B (Acétonitrile)
Initial	0,3	80	20
5,00	0,3	20	80
5,50	0,3	5	95
7,00	0,3	5	95

- **Passeur haute pression**

Aiguille de 10 µl, volume injecté de 5 µl.

Solvant de lavage : Acétonitrile.

- **Four**

La température du four est réglée à 30°C.

Colonne : Kinetex® EVO C18 ; 5 µm, 100 X 2,1 mm ; PhenomenexÒ (00D-4633-AN).



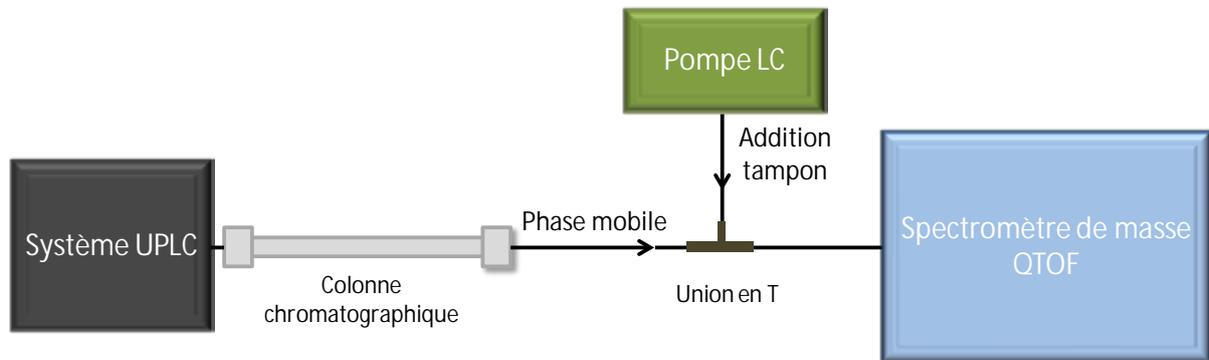
## **ANNEXE 6**

---

Montage de l'addition post-colonne



## Montage de l'addition post colonne





## **ANNEXE 7**

---

Méthode chromatographique avec pré-concentration SPE en ligne



## Présentation du système SPE en ligne (SPE-OL) utilisé

Le principe détaillé et la bibliographie sur l'analyse des hormones par SPE en ligne a été traité dans le rapport précédent [3]. Seul le principe du présent système est détaillé.

Le module SPE en ligne utilisé a été conçu afin de pouvoir apporter une flexibilité lors de l'injection et de l'analyse. Ainsi, ce système peut basculer entre différents mode d'injection (voir le schéma détaillé ci-après) :

- injection directe grâce au passeur d'échantillons haute pression, équipé d'un portoir pour flacons de petit volume (~2 mL), et de faible volume d'injection ( $V_{inj} < 15 \mu\text{L}$ )
- pré-concentration sur une cartouche de SPE-OL de différents volumes d'échantillon d'eau :
  - volume inférieur ou égal à 900  $\mu\text{L}$ , grâce à une boucle de 900  $\mu\text{L}$  ;
  - entre 900  $\mu\text{L}$  et 5 000  $\mu\text{L}$  grâce à une boucle de 5 000  $\mu\text{L}$  (la boucle peut être partiellement remplie en fonction du volume d'échantillon passée dans celle-ci);
  - en mode large volume (volume d'échantillon > 5 mL) grâce à une vanne multi-voies qui permet de sélectionner 12 échantillons d'eau différents. Le système gère le volume de chargement en fonction de la durée et du débit de pompage.

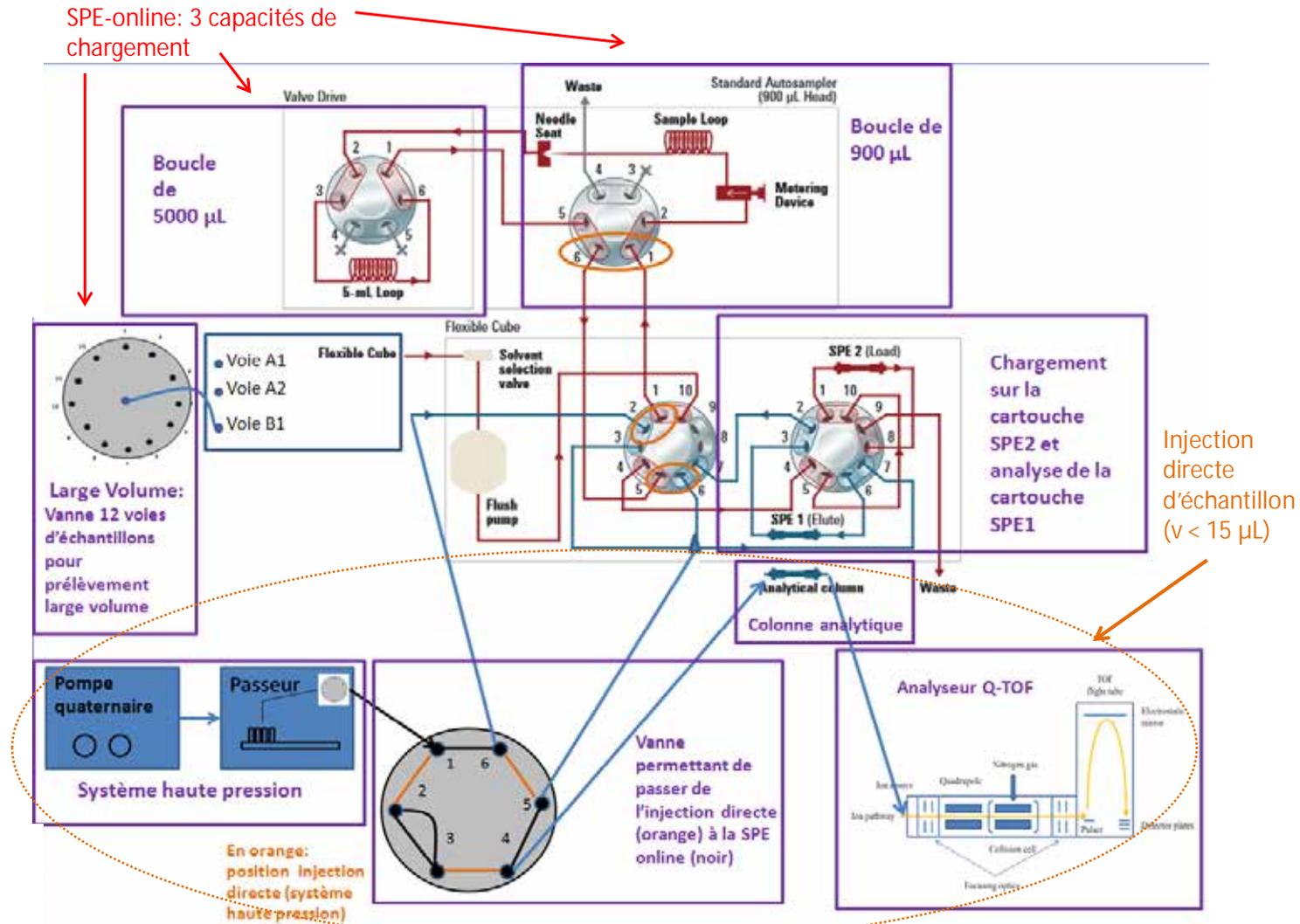
Le pilotage fourni par le logiciel permet de basculer du mode d'injection directe au mode de pré-concentration sans démontage de tubulures ; il en est de même pour passer d'un volume/mode de pré-concentration/chargement SPE-OL à un autre.

Afin de minimiser les effets de mémoire, le chargement de la cartouche SPE-OL se fait dans un sens grâce à la pompe du module de SPE-OL puis l'élution est effectuée à contre-courant en connectant le système à la pompe LC pour obtenir une élution à contre flux (en « back-flush »).

Par ailleurs, sur le système utilisé de SPE-OL, une vanne est dédiée au montage de 2 cartouches de SPE-OL permettant ainsi de les utiliser en parallèle (voir schéma ci-après). Pendant qu'une cartouche est dédiée à la pré-concentration de l'échantillon puis à son analyse, l'autre cartouche est conditionnée pour être prête à la pré-concentration de l'échantillon suivant. L'étape de conditionnement consiste à rincer la cartouche par de l'acétonitrile (10 min à 1 mL/min) puis par de l'eau ultra-pure (10 min à 1 mL/min). L'avantage de ce système est l'augmentation de productivité : le conditionnement de la cartouche est réalisé pendant l'analyse de l'autre cartouche. Un tableau décrivant les différentes étapes de traitement des échantillons d'eau en SPE-OL est également présenté ci-après.



Schéma de fonctionnement de l'appareillage LC/QTOF avec injection liquide directe ( $V_{\text{éch}} < 15 \mu\text{L}$ ) ou pré-concentration par SPE-online ( $900 \mu\text{L} < V_{\text{éch}} < 20 \text{ mL}$ )





Volume de chargement dans la colonne SPE : boucle de 900 µL, boucle de 5mL ou chargement de large volume

Colonne analytique: Kinetex® EVO C<sub>18</sub> ; 5 µm, 100 X 2,1 mm ; Phenomenex (00D-4633-AN).

Débit : 0,3 mL/min (lorsque la colonne analytique est présente sur le parcours d'élution)

Phases mobiles d'élution de la colonne analytique:

Solvant : Acétonitrile

Phase Aqueuse : Eau

Phase aqueuse de chargement : Eau ultra-pure

Température du four : 30°C

*Gradient chromatographique lors de l'analyse par SPE-on line*

Temps (min)	POMPE BINAIRE			FLEXCUBE (OU POMPE QUATERNAIRE)			Cartouche SPE 1	Cartouche SPE2
	Eau (voie A)	Acétonitrile (Voie B)	Débit de la pompe haute pression binaire (ml/min)	Eau ultra pure (Voie A1)	Acétonitrile (Voie A2)	Débit sur la pompe du flexcube (mL/min)		
T= 0	80	20	0.1	100 %	0	1	Flexcube	Pompe binaire (cartouche en série avec la LC)
T= n	80	20	0.1	100 %	0	1		
T= n + 0.01	80	20	0.3	100 %	0	1		
T= n + 4	80	20	0.3	0	100 %	1	Pompe binaire (cartouche en série avec la LC)	Flexcube
T= n + 7	/	/	/	0	100 %	1		
T= n + 9	20	80	0.3	0	100 %	1		
T= n + 12	/	/	/	0	100 %	1		
T= n + 13.5	5	95	0.3	100 %	0	1		
T= n + 20	5	95	0.3	100 %	0	1		

n: durée variable qui dépend du volume et du débit de chargement de la cartouche SPE

Etape de chargement
Etape de conditionnement
Analyse

*Schéma des étapes de traitement des échantillons d'eau en SPE-online*

