

Hormones

Méthode d'analyse dans l'eau – Phase dissoute

Généralités

Nom de la famille de substances	Hormones libres et totales (fraction libre + conjuguée)	
Nom des substances individuelles	Androstenedione, cortisol, cortisone, dexamethasone, medroxyprogesterone, androsterone, drospirenone, epitestosterone, levonorgestrel, megestrol acetate, norethindrone, progesterone, testosterone, estrone, α estradiol, β estradiol, estriol, α ethynilestradiol, dienestrol, diethylstilbestrol.	
Code SANDRE des substances individuelles	Molécule	Code SANDRE
	Androstenedione	5385
	Cortisol	A demander
	Cortisone	A demander
	Dexamethasone	6574
	Medroxyprogesterone	5404
	Androsterone	5378
	Drospirenone	6757
	Epitestosterone	5382
	Levonorgestrel	6770
	Megestrol Acetate	A demander
	Norethindrone	5400
	Testostérone	5384
	Estrone	5396
	17 α Estradiol	5399
	17 β Estradiol	5397
	Estriol	6446
	17 α Ethynilestradiol	2629
	Dienestrol	7507
	Diethylstilbestrol	2628
Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]	Eau [3] : Phase aqueuse de l'eau [3] Eau douce de surface [3.1] Eaux résiduaires : Eau usée traitée [3.9]	
Principe de la méthode	Extraction sur phase solide suivie d'une étape de purification sur phase solide et analyse en chromatographie en phase liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem.	
Acronyme	SPE, CLUHP/SM/SM	
Domaine d'application	Limite inférieure : LQ Limite supérieure : 80 ng/L pour un facteur de concentration de 1250 (250 mL \rightarrow 200 μ L)	

Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Aucun
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	La verrerie de laboratoire est lavée en machine et rincée à l'acétone puis calcinée durant 2 heures à 450 °C. Tous les solvants sont de qualité « ULC/MS » (marque Biosolve), l'eau ultra-pure est de l'eau Milli-Q® LC-Pak®
Interférents (préciser la matrice)	Interférents identifiés : non étudiés Matrices testées : eaux usées traitées* et eaux continentales (cours d'eau et plan d'eau) * Une application dans les eaux usées non traitées peut être envisagée mais n'a pas fait l'objet d'une validation dans le cadre de cette fiche méthode

AVERTISSEMENT : Il convient que l'utilisateur de cette méthode connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Cette méthode n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur. Certains des solvants utilisés dans le mode opératoire sont toxiques et dangereux. Les manipuler avec précaution.

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :	Eau : Phase dissoute [3] Les eaux usées traitées et les eaux de rivière sont filtrées sur filtre GF/F 0,7 µm. Seules les eaux Evian® ne sont pas filtrées.
Conditionnement et conservation des échantillons - Protocole - Nature du contenant de stockage - Lavage du contenant - Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température...)	Echantillonnage réalisé grâce à du matériel en téflon ou/et en verre. Transport des échantillons vers le laboratoire dans des bouteilles en verre brun, à 5±3°C dans les 24h. Au laboratoire, les échantillons sont filtrés dès réception, sur filtre GF/F 0,7 µm. S'ils ne peuvent pas être extraits/analysés dans les 24h après filtration, les échantillons sont transférés dans des bouteilles en verre brun et congelés à -18°C. Les échantillons filtrés congelés peuvent être conservés 6 mois au maximum. Lavage en machine des bouteilles en verre brun puis calcination durant 2 heures à 450°C
Filtration : - Type de filtre et méthode de nettoyage : - Type de support de filtration :	Filtres Whatman microfibre de verre de diamètre de 47 mm et de diamètre de pores équivalent à 0,7 µm Unité de filtration Sartorius® (fiolle à vide et support) avec fritté en verre inséré dans une bague PTFE avec rebord de centrage

Pré-traitement des échantillons liquide ou solide

Dans le cas de l'analyse des hormones totales, une étape de déconjugaison, c'est à dire d'hydrolyse enzymatique des hormones sous formes glucuronides est nécessaire.

Le pH des échantillons est amené à $5,2 \pm 0,2$ par ajout d'acide acétique glacial (99%). La béta-glucuronidase (enzyme de déconjugaison) est ajoutée à la prise d'essai de l'échantillon à la proportion de 1/1000 ; v/v. Le tout est mis à incuber pendant 15 heures à $52 \text{ °C} \pm 2\text{°C}$.

Si l'analyse se fait par étalonnage interne, chaque échantillon est dopé avec une solution de dopage à 50 µg/L comprenant les deutérés correspondants aux molécules analysées.

Analyse

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

Eau douce de surface **250 mL**
Eaux usées traitées (Effluent de STEP) **250 mL**

Extraction

- SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'élution)

Extraction SPE sur automate AutoTrace Caliper® sur cartouche OASIS (Waters©) HLB 6cc, 500 mg, 60 µm :

- conditionnement de la colonne par 6 mL de méthanol et 6 mL d'eau ultrapure
- percolation de l'échantillon à 15 mL/min
- rinçage de la colonne par 6 mL d'eau ultrapure
- séchage sous flux d'azote pendant 60 min
- élution par 6 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (75/25 v/v)
- Fin d'élution sous azote pendant 1 min

Si l'évaporation à sec ne se fait pas directement après l'extraction, les extraits peuvent être conservés au réfrigérateur pendant 48 h à 4°C.

L'éluat est évaporé à sec sous flux d'azote et repris dans 1 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50 v/v).

Agitation au vortex.

Passage au bain à ultrasons pendant 2 min.

Purification

(type de purification, paramètres de purification, méthode de concentration)

SPE manuelle sur cartouche Florisil (6cc, 1g) sur support « manifold » :

- conditionnement de la phase par 2 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50 v/v) ;
- percolation de l'échantillon (1 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50 v/v));
- rinçage par 2 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50 v/v);
- élution par 6 mL d'un mélange acétone/heptane (75/25 v/v);
- élution par 5 mL de méthanol.

Si l'évaporation à sec ne se fait pas directement après la purification, les échantillons peuvent être conservés au réfrigérateur pendant 24 h à 4°C.

Evaporation à sec sous flux d'azote et reprise dans 200 µL d'un mélange eau/acétonitrile (70/30 v/v).

Conservation de l'extrait

L'extrait final est analysé immédiatement ou congelé (-18°C) pour une durée de six mois maximum.

Volume ou masse finale avant analyse :

200 µL

Méthode analytique utilisée :

Indiquer les paramètres complets de la méthode (exemple pour la chromatographie : gradient, phase mobile, débit, T °C, colonne, mode de détection)

Pour la détection par masse : mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation

Analyse UHPLC-ESI(+/-)-MS-MS

Mode Négatif ESI (-)

Solvant 1A : Eau Milli-Q® LC-Pak®

Solvant 2A : Acétonitrile

Volume d'injection : 10 µL

Température du four à colonne : 40 ± 1°C

Température du passeur d'échantillons : 4 ± 2°C

Débit phase mobile : 0,6 mL/min

Colonne : Waters © BEH C18 2,1 mm x 100 mm x 1,7 µm

Tableau 1 : Gradient d'élution en UPLC pour le mode négatif :

Composition (% 2A)	Durée (min.)
20	0
20	2
100	8
100	10

Mode Positif ESI (+)

Solvant 1B : Eau Milli-Q® LC-Pak®+ 0,1 %acide formique

Solvant 2B : Acétonitrile + 0,1 % acide formique

Volume d'injection : 10 µL

Température du four à colonne : 50 ± 1°C

Température du passeur d'échantillons : 4 ± 2°C

Débit phase mobile : 0,62 mL/min

Colonne : Waters © BEH C18 2,1 mm x 100 mm x 1,7 µm

Tableau 2 : Gradient d'élution en UPLC pour le mode positif :

Composition (% 2B)	Durée (min.)
40	0
40	2
70	5
100	5,5
100	7,5

Tableau 3 : Conditions d'acquisition de spectrométrie de masse en mode MRM (multiple reaction monitoring)

Composé	Temps de rétention (min)	Polarité ionisation	Transitions		
			Quantification (Q) et Confirmation (C)		
			Précurseur	Fragment	Type
Estriol	0,6	ESI (-)	287	145	Q
			287	171	C
Estriol-D2	0,6		289	147	Q
β-Estradiol	1,8		270	145	Q
			270	183	C
β-Estradiol-D2	1,8		273	185	Q
α-Estradiol	2,2		270	145	Q
			270	183	C
α-Estradiol-D2	2,2		273	185	Q
α-Ethinylestradiol	2,5		295	154	Q
			295	159	C
α-Ethinylestradiol-D4	2,4		299	147	Q
Estrone	2,7		269	145	Q
			269	143	C
Estrone-D4	2,7		273	147	Q
Diethylstilbestrol	3,3		267	251	Q
		267	237	C	
Diethylstilbestrol-D8	3,22	275	259	Q	
		271	255	C	
Dienestrol	3,54	265	93	Q	
		265	249	C	
Dienestrol-D6	3,77	271	95	Q	
		271	255	C	
Cortisol	3,73	363	121	Q	
		363	91	C	
Cortisol-D4	3,72	367	121	Q	
		367	97	C	
Cortisone	3,74	361	163	Q	
		361	91	C	
Cortisone-D8	3,72	369	168	Q	
		369	351	C	

Composé	Temps de rétention (min)	Polarité ionisation	Transitions		
			Quantification (Q) et Confirmation (C)		
			Précurseur	Fragment	Type
Dexaméthasone	4,19	ESI (+)	393	373	Q
			393	91	C
Dexaméthasone-D4	4,17		397	377	Q
			397	359	C
Testostérone	4,8		289	109	Q
			289	97	C
Testostérone-D4	4,78		293	98	Q
			293	110	C
Norethindrone	4,84		299	109	Q
			299	91	C
Norethindrone-D6	4,82		305	91	Q
			305	87	C
Androstenedione	5,04		287	97	Q
			287	109	C
Androstenedione-D7	5,02		294	100	Q
			294	113	C
Drospirénone	5,17		367	97	Q
			367	91	C
Drospirénone-D4	5,17		371	99	Q
			371	91	C
Épitéstostérone	5,17	289	97	Q	
		289	109	C	
Épitéstostérone-D5	5,15	294	100	Q	
		294	113	C	
Levonorgestrel	5,29	313	91	Q	
		313	109	C	
Levonorgestrel-D6	5,27	319	91	Q	
		319	87	C	
Mégesterol Acétate	5,84	385	325	Q	
		385	267	C	
13C-Mégesterol Acétate-D3	5,83	389	325	Q	
		389	267	C	
Progesterone	5,86	315	109	Q	
		315	97	C	
Progesterone-D9	5,83	324	100	Q	
		324	113	C	
Médroxyprogesterone*	5,5	345	123	Q	
		345	97	C	
Androsterone*	5,64	291	273	Q	
		291	255	C	

Equipements ¹ (modèles utilisés) :

Chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC/MS-MS) : Shimadzu Nexera 2 / AB SCIEX API 4000 (triple quadrupole)

¹ Les matériels cités ici constituent des exemples d'application satisfaisante. Ces mentions ne constituent pas une recommandation exclusive, ni un engagement quelconque de la part du rédacteur ou d'AQUAREF

Type d'étalonnage	Etalonnage interne : les étalons internes deutérés sont listés dans le tableau ci-dessus. A noter que les deutérés associés à la medroxyprogesterone et androsterone sont des molécules de structures proches, respectivement la levonorgestrel deutérée (LEVO-D6) et l'androstenedione deutérée (ANDRO-D7).
Modèle utilisé Etalons / Traceurs utilisés	Linéaire Etalonnage interne (voir ci-dessus le tableau des conditions d'acquisition de spectrométrie de masse en mode MRM (<i>multiple reaction monitoring</i>))
Domaine de concentration	[0-80] µg/L
Méthode de calcul des résultats Rendement	Etalonnage interne avec des traceurs deutérés, cf. ci-dessus.
Blancs	Matrice utilisée : Blanc de méthode sur eau Evian® Soustraction du blanc : Non

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante	
Norme dont est tirée la méthode	
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée Domaine de validation	NF T90-210:2009 [0-80] µg/L
Matériaux de référence utilisés	Aucun
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	Les blancs méthode (Evian®) et de phase mobile sont vérifiés régulièrement et ne doivent pas dépasser la valeur de LQ pour chaque composé
Rendement - par type de matrice - par niveau de concentration	Matrice : Evian® / Eau de rivière / Eau usée traitée n = 6 x 2 6 échantillons dopés, en duplicat, et pour 2 niveaux de dopages (20 et 80% du domaine). Les rendements sont corrigés de ceux des étalons internes

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

Hormones	Evian® / Eau de rivière / Eau usée traitée				Ionisation
	Dopage à 20 ng/L		Dopage à 80 ng/L		
	Rendement (%)	RSD (%)	Rendement (%)	RSD (%)	
Estriol E3	84	5	95	13	ESI (-)
Alpha-estradiol α E2	99	5	98	6	
Beta-estradiol β E2	89	8	96	7	
Alpha-éthynyl estradiol EE2	99	17	98	17	
Estrone E1	89	8	100	7	
Diethylstilbestrol DES	84	10	98	12	
Androstenedione ANDRO	111	6	104	4	ESI (+)
Androsterone ANDROSTER	110	19	106	17	
Cortisol CORT-OH	93	6	98	7	
Cortisone CORT	94	8	106	5	
Dexaméthasone DEXA	98	13	101	3	
Drospirone DROSPI	120	9	96	19	
Epi-testostérone EPI-TESTO	92	11	97	10	
Levonorgestrel LEVO	82	10	102	8	
Medroxyprogestérone MEDROX	101	7	100	6	
Megestrol Acétate MEG-AC	113	6	106	3	
Norethindrone NORE	82	9	94	9	
Progesterone PROG	86	12	97	7	
Testostérone TESTO	102	5	99	2	

Limite de quantification (LQ)
Limite de détection (LD)
(indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)

En l'absence de matrices réelles non contaminées, la détermination de la LQ selon norme NF T90-210-2009 a été faite sur la matrice Evian®
La détermination de la LQ pour chaque composé a été faite sur 6 échantillons dopés, en duplicat.

Hormone	LQ (ng/L)
Estriol E3	0,2
Alpha-estradiol α E2	0,2
Beta-estradiol β E2	0,2
Alpha-éthynyl estradiol EE2	0,2
Estrone E1	0,2
Diethylstilbestrol DES	0,2
Dienestrol DIEN	0,2

Hormone	LQ (ng/L)
Androstenedione ANDRO	0,2
Androsterone ANDROSTER	0,2
Cortisol CORT-OH	0,2
Cortisone CORT	0,2
Dexamethasone DEXA	0,2
Drospirenone DROSPI	0,2
Epi-testosterone EPI-TESTO	0,2
Levonorgestrel LEVO	0,2
Medroxyprogesterone MEDROX	0,2
Megestrol Acetate MEG-AC	0,2
Norethindrone NORE	0,2
Testosterone TESTO	0,2

Incertitudes (%) sur les résultats

- par type de matrice
- par niveau de concentration
- par molécule
(reproductibilité avec méthode de détermination)

Méthode d'évaluation : ISO 11352 : 2012
Facteur d'élargissement : $k = 2$

Hormone	Incertitudes à 20 ng/L	Incertitudes à 80 ng/L
estriol	28%	31%
α - estradiol	16%	20%
β - estradiol	17%	19%
α - ethinylestradiol	34%	34%
estrone	25%	18%
diethylstilbestrol	33%	29%
androstenedione	33%	19%
androsterone	65%	47%
cortisol	34%	17%
cortisone	41%	27%
dexamethasone	40%	16%
drospirenone	40%	40%
epi-testosterone	32%	25%
levonorgestrel	51%	34%
medroxyprogesterone	29%	29%
megestrol acetate	47%	23%
norethindrone	32%	22%
progesterone	35%	24%
testosterone	22%	20%

Contacts

Auteurs

Philippe Bados, Maud Gregson, Cécile Miège

Institut

Irstea

Contact

cecile.miege@irstea.fr