

Familles des composés pharmaceutiques : psychotropes et anti inflammatoires non stéroïdien

Méthode d'analyse dans eau -phase dissoute (<0,7µm)- par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

Généralités

Nom de la famille de substances	composés pharmaceutiques : psychotropes et anti-inflammatoires non stéroïdien AINS	
Nom des substances individuelles	10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine (HCBZ) Acide zolpidem 4-phényl-carboxylique (ZLP-4A) Benzoylecgonine (BZL) Carbamazépine (CBZ) Citalopram (CIT) Cocaïne (COC) Codéine (COD) Desméthylcitalopram (DCIT) Diazépam (DZP) Diclofénac (DCF) EDDP Fluoxétine (FLX) Gabapentine GBP MDMA Mémantine (MMT) Méthadone (MTD) Norcodéine (NCOD) Nordazépam (NDZ) O-desméthylvenlafaxine (DVLF) Oxazépam (OXA) Prazépam (PZP) Tétrazépam (TTZ) Tramadol (TMD) Venlafaxine (VLF) Zolpidem (ZLP)	
Code SANDRE des substances individuelles	10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine Acide zolpidem 4-phényl-carboxylique Benzoylecgonine Carbamazépine Citalopram Cocaïne Codéine Desméthylcitalopram Diazépam Diclofénac EDDP Fluoxétine Gabapentine MDMA	[7597] [7598] [7612] [5296] [7599] [6665] [6683] [7600] [5372] [5349] [7601] [5373] [7602] [7603]

	<p>Mémantine [7604] Méthadone [7605] Norcodéine [7608] Nordazépam [7607] O-desméthylvenlafaxine [6785] Oxazépam [5375] Prazépam [7609] Tétrazépam [7610] Tramadol [6720] Venlafaxine [7611] Zolpidem [5376]</p>
Matrice analysée [code SANDRE du (des) support(s)]	<p>Support : eau [3] Eau : eau douce de surface Autre (préciser) : eau potable présentant une teneur en chlore de 50mg/L environ.</p>
Principe de la méthode	<p>Extraction sur phase solide suivie d'une détermination par dilution isotopique associée à la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem</p>
Acronyme	<p>SPE/LC/MS²</p>
Domaine d'application	<p>Selon le paramètre considéré : de la limite de quantification jusqu'à 500 ng de composé /L d'eau</p>
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	<p>néant</p>
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	<p>L'ensemble de produits chimiques et solvants est de haute pureté. Pour référence : acétonitrile (HPLC grade Baker[®]), méthanol (LC-MS grade Baker[®]), acide acétique (AnalaR Normapur[®] pureté 100%), acide formique (AnalaR Normapur[®] pureté >99%), EDTA disodique (solution 3,7% v/v Merck[®] pureté >99,998%), thiosulfate de sodium-(H₂O)₅ (AnalaR Normapur[®] pureté >99,5%), hydroxyde d'ammonium (ACS reagent[®] 28-30% base NH₃).</p> <p>Au regard des niveaux de performances de la méthode et des niveaux d'occurrence dans les milieux naturels, des contrôles qualité doivent mis en œuvre à chaque série d'analyse. En effet, certaines de ces molécules notamment le diclofénac sont largement utilisées et des problèmes de contaminations aléatoires (par l'opérateur notamment) sont susceptibles de survenir. En outre, les conditions rigoureuses de nettoyage (nettoyage solvants et calcination) et de stockage des matériels (protection des ouvertures par aluminium) doivent être appliquées.</p>
Interférents (préciser la matrice)	<p>Interférents identifiés : pas d'interférents identifiés Matrices testées : eau de surface, eau potable</p>

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

Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à cette méthode soient exécutés par du personnel ayant

reçu une formation adéquat

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :

Eau : phase aqueuse de l'eau [3]

Conditionnement et conservation des échantillons

A l'échantillonnage ou à l'arrivée au laboratoire, du thiosulfate de sodium est systématiquement ajouté à l'échantillon afin d'atteindre une concentration de 50 mg.L⁻¹.

Une étude de stabilité a démontré la stabilité des différents paramètres de la méthode sur une durée de 24 heures dans des conditions de stockage à 4°C et dans l'obscurité. Il est recommandé d'effectuer la filtration de l'échantillon dès réception au laboratoire. Il est recommandé de stocker les échantillons dans des bouteilles en verre ambré préalablement calcinées.

Filtration :

Tous les échantillons sont filtrés sous vide à travers un filtre Whatman® 0,7 µm type F en fibre de verre (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) et sont stockés dans des bouteilles en verre ambré préalablement calcinées.

Analyse

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

Eau : le volume de prise d'essai est de 500 mL. Cependant il est possible d'étendre le volume de prise d'essai à 1 litre sans pertes des performances initiales de la méthode

Extraction

0,05% d'EDTA¹ (v/v) est ajouté par volumétrie à l'échantillon. Ce dernier est ensuite ajusté à un pH $3,0 \pm 0,2$ grâce à de l'acide formique. Les étalons internes sont ajoutés par gravimétrie avant extraction de manière à obtenir une concentration de 70 ng/L environ dans l'échantillon.

- Extraction en phase solide SPE

Les cartouches Oasis® MCX (60 mg, 3 cc) (Waters, Guyancourt, France) sont conditionnées avec 3 mL de méthanol et 3 mL d'Evian® (0,05% EDTA (v/v)) ajustée à pH $3,0 \pm 0,2$ avec de l'acide formique. Après la percolation de l'échantillon à un débit de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, les cartouches sont séchées sous vide puis éluées par 3 mL de méthanol (6% HCOOH (v/v)) et 3 mL de méthanol (2% NH₄OH (v/v)). L'éluat, contenu dans un flacon en verre ambré de 10 mL est évaporé à sec, par exemple sous vide à une température de 40°C grâce au système de concentration Savant SC250Exp SpeedVac® (Thermo-Scientific, Villebon sur Yvette, France).

Le passage dans les conditions d'injection s'effectue au moment de l'analyse instrumentale et ne constitue nullement les conditions de stockage de l'extrait analytique.

¹ Des agents chélatant comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) se complexent avec les métaux dans la solution et permettent d'éviter la formation de complexes entre les RP et ces métaux qui s'adsorbent sur les groupements silanols libres des bouteilles en verre. L'ajout d'EDTA augmente les taux de recouvrement des analytes.

Conservation de l'extrait

Les extraits méthanoliques peuvent être conservés à $-20 \pm 5 \text{ °C}$. Aucune instabilité n'a été mise en évidence sur période de 1 mois.

Volume ou masse finale avant analyse :

200 µL d'un mélange eau-méthanol (90/10 (v/v)).

Méthode analytique utilisée :
Paramètres chromatographiques:

Colonne : Acquity® UPLC BEH C₁₈ (1,7 µm ; 2,1 mm x 100 mm) (Waters),

Température : 40°C

Elution en mode gradient :

Le gradient chromatographique est détaillé ci-dessous.

temps (min)	phase mobile	
	H ₂ O	ACN
	(0,1%CH ₃ COOH)	(0,1%CH ₃ COOH)
0	95%	5%
1,5	95%	5%
9	40%	60%
10	5%	95%
12	5%	95%
12,5	95%	5%
17	95%	5%

Débit : 0,6 mL.min⁻¹.

Volume injecté : 7,5 µL.

Paramètres du spectromètre de masse :

Mode d'ionisation : electrospray en mode positif ESI+

Tension du capillaire : 2,7kV

Température de la source : 150°C.

Gaz de désolvatation : azote, chauffé à 650°C, débit de 1000 L.h⁻¹.

Gaz de collision : argon, pression de la cellule de collision maintenue à environ 3,5 e⁻³ mbar.

Paramètres de détection :

Mode MRM

	Temps de rétention (indicatif) min	Transition de quantification (u.m.a)	Transition de confirmation (u.m.a)
HCBZ	4,32	271,3 > 180,1	271,3 > 253,1
ZLP-4A	3,40	338,6 > 265,2	338,6 > 293,2
ZLP-4A	3,38		
D6		334,3 > 265,1	-
BZL	3,53	290,1 > 105,0	290,1 > 168,0
BZL D8	3,50	298,1 > 110,0	-
CBZ	5,93	237,2 > 194,1	237,2 > 192,1
CBZ D8	5,89	245,2 > 202,1	-
CIT	5,43	325,1 > 109,0	325,1 > 262,1
CIT D6	5,42	331,3 > 108,9	-
COC	4,22	304,3 > 182,2	304,3 > 150,1
COC D5	4,20	309,2 > 182,1	-
COD	2,33	300,2 > 165,2	300,2 > 215,2
COD D3	2,31	303,3 > 164,9	-
DCIT	5,35	311,0 > 109,0	311,0 > 234,0
DCIT	5,34		
13C-D3		315,3 > 108,9	-
DZP	7,53	285,0 > 193,2	285,0 > 154,0
DZP D5	7,49	290,2 > 198,2	-

DCF	8,37	296,0 > 250,0	-
DCF D4	8,34	300,0 > 254,1	-
EDDP	5,66	278,2 > 234,1	278,2 > 249,1
EDDP D3	5,66	281,4 > 234,2	-
FLX	6,37	310,3 > 44,1	310,3 > 148,1
FLX D6	6,35	316,3 > 44,1	-
GBP	2,09	172,1 > 154,1	172,1 > 95,0
GBP D4	2,06	176,2 > 158,1	-
MDMA	2,92	194,1 > 162,9	194,1 > 105,1
MDMA D5	2,91	199,1 > 165,0	-
MMT	4,65	180,3 > 163,2	180,3 > 107,1
MMT D6	4,63	188,2 > 171,1	-
MTD	6,23	310,2 > 105,0	310,2 > 265,1
MTD D9	6,21	319,4 > 104,9	-
NCOD	2,04	286,3 > 165,1	286,3 > 268,2
NCOD D3	1,99	289,3 > 165,0	-
NDZ	6,84	271,3 > 140,0	271,3 > 165,0
NDZ D5	1,99	276,3 > 140,0	-
DVLF	3,59	264,3 > 58,0	264,3 > 133,0
DVLF D6	3,56	270,4 > 58,1	-
OXA	6,30	287,3 > 241,1	287,3 > 269,1
OXA D5	6,27	292,0 > 246,1	-
PZP	8,75	325,1 > 271,1	325,1 > 140,0
PZP D5	8,72	330,3 > 276,1	-
TTZ	7,69	289,0 > 197,0	289,0 > 225,1
TTZ 13C- D3	7,66	293,2 > 201,1	-
TMD	3,92	264,2 > 58,0	264,2 > 246,2
TMD D6	3,91	270,3 > 64,0	-
VLF	4,68	278,2 > 121,0	278,2 > 215,1
VLF D6	4,67	284,4 > 121,1	-
ZLP	4,45	308,4 > 235,2	308,4 > 263,2
ZLP D6	4,42	314,4 > 235,2	-

Deux transitions ont été retenues pour chaque paramètre, la plus intense étant généralement utilisée pour la quantification et la seconde pour la confirmation. Cela n'a toutefois pas été possible pour le diclofénac pour lequel une seule transition a été considérée. Pour tous les autres paramètres, un total de quatre critères d'identification a été retenu : le temps de rétention, 2 transitions MRM et leur rapport d'abondance (dans une tolérance de 20 à 50%) comme le préconise la Directive du Conseil Européen sur les exigences de performance pour la détection par spectrométrie de masse (European Commission, 2002).

Equipements¹ (modèles utilisés) :	ACQUITY UPLC XEVO TQ MS Waters
Type d'étalonnage	Dilution isotopique c'est à dire étalonnage interne avec analogue marqué à l'exception de la 10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine pour laquelle il n'existe pas d'analogue marqué. Pour cette molécule : étalonnage interne avec analogue marqué de la carbamazépine
Modèle utilisé	Dilution isotopique (analogues marqués au deutérium ou C13) (cf tableau ci-dessus)
Etalons / Traceurs utilisés	Modèle de type linéaire.
Domaine de concentration	Des gammes d'étalonnage en 13 points. Concentrations en analytes comprises entre 0,06 ng.g ⁻¹ et 340 ng.g ⁻¹ et en étalons internes marqués constantes à 30 ng.g ⁻¹ . Les triplicats d'injection de ces solutions pour les cinq niveaux de concentration encadrant au mieux le rapport d'aires A/A* observé dans l'échantillon à quantifier sont choisis pour définir une droite d'étalonnage en 5x3 points adaptée à chaque composé. L'adéquation au modèle est vérifiée à chaque série d'analyses (R ² , analyse des résidus, analyse des variances et test de linéarité)
Méthode de calcul des résultats	Des contrôles qualité : blancs et échantillons dopés sont mis en œuvre à chaque série d'analyses
Rendement	L'ensemble des résultats de mesure est corrigé du rendement absolu.
Blancs	Blanc appareillage : solvants d'injection tout au long de la séquence d'analyse Blanc méthode : eau Evian (bouteille de verre)
	Soustraction du blanc : Non. Lorsque que l'ensemble du processus de mesure est maîtrisé, les valeurs typiques de blanc sont inférieures à LOQ. Si une contamination des blancs instrumentaux est mise en évidence, les extraits analytiques sont réinjectés. Si le blanc méthode est > LOQ, la série analytique est invalidée.

Références de la méthode

La méthode est dérivée de la publication suivante	Publication en cours de préparation.
Norme dont est tirée la méthode	

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

Niveau de validation selon Norman

Niveau 1

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée

NF T 90 :210 (2009) Caractérisation des performances initiales de la méthode

Domaine de validation

De la limite de quantification (LOQ) jusqu'à 500 ng de composé /L d'eau

Matériaux de référence utilisés

Il n'existe pas de matériau de référence certifié à matrice pour les paramètres visés par cette méthode.

Blancs analytiques

Des blancs de méthode et blancs instrumentaux sont mis en œuvre lors de chaque série d'extractions et d'analyses. Lorsque que l'ensemble du processus de mesure est maîtrisé, les valeurs typiques de blanc sont inférieures à LOQ. Si une contamination des blancs instrumentaux est mise en évidence, les extraits analytiques sont réinjectés. Si le blanc méthode est > LOQ, la série analytique est invalidée.

Rendement

Rendements dans des conditions de répétabilité (n=3). Eau d'Evian dopée à 70ng/L.

	Rendement moyen (%)	Ecart type de répétabilité (%)
HCBZ	79	4
ZLP-4A	111	3
BZL	102	1
CBZ	98	1
CIT	98	1
COC	98	1
COD	100	1
DCIT	100	2
DZP	100	1
DCF	106	1
EDDP	109	1
FLX	103	1
GBP	92	1
MDMA	102	1
MMT	118	1
MTD	98	1
NCOD	102	1
NDZ	98	1
DVLF	105	1
OXA	105	1
PZP	99	1
TTZ	98	1
TMD	98	1
VLF	103	1
ZLP	105	2

Rendements dans des conditions de fidélité intermédiaire (4 jours et 4 réplicats). Eau d'Evian dopée à 70ng/L.

	R moyen %	écart type de fidélité intermédiaire%
HCBZ	71	9
ZLP-4A	107	5
BZL	100	3
CBZ	106	11
CIT	99	2
COC	94	4
COD	99	2
DCIT	101	3
DZP	98	2
DCF	105	5
EDDP	101	7
FLX	118	13
GBP	93	5
MDMA	101	1
MMT	123	4
MTD	99	2
NCOD	101	3
NDZ	99	2
DVLF	104	1
OXA	117	10
PZP	100	1
TTZ	99	2
TMD	99	1
VLf	110	5
ZLP	105	1

Limite de quantification(LQ)

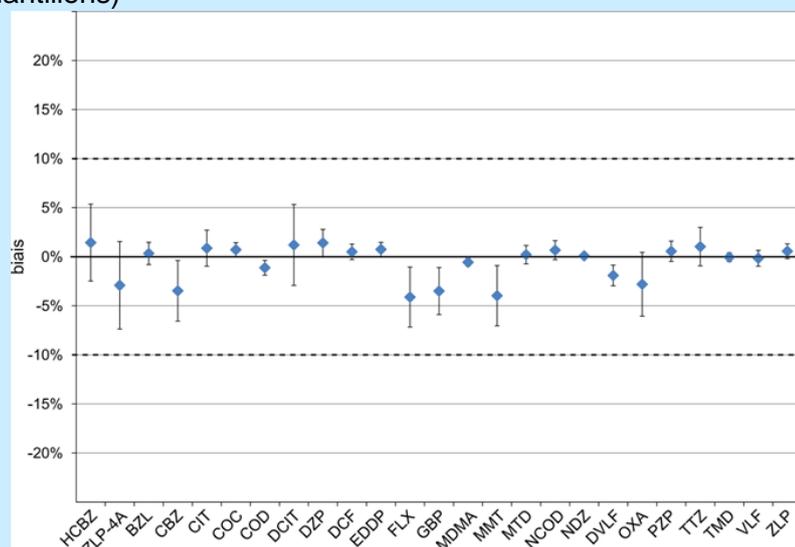
Lors de la caractérisation de la méthode, il n'a pas été trouvé de matrices naturelles exemptes de certains des paramètres visés par la présente méthode. Ainsi, pour ces derniers, une validation en matrice naturelle (eau de surface) n'a pas été possible et seuls les résultats sur eau Evian ont été considérés.

	LQ Eau Evian (ng.l ⁻¹)	LQ matrice naturelle eau de surface (ng.l ⁻¹)
HCBZ	1,35	-
ZLP-4A	0,17	-
BZL	0,14	-
CBZ	0,23	-
CIT	0,17	-
COC	0,28	0,38
COD	0,72	-
DCIT	0,24	-
DZP	0,20	0,39
DCF	1,30	-
EDDP	0,24	-
FLX	2,29	3,40

Exactitude de la méthode

GBP	0,38	-
MDMA	0,16	0,49
MMT	0,15	-
MTD	0,18	0,65
NCOD	0,26	-
NDZ	0,19	-
DVLF	0,30	-
OXA	0,18	-
PZP	0,33	0,74
TTZ	0,23	0,95
TMD	3,54	-
VLF	1,83	-
ZLP	0,16	0,29

Biais de justesse et dispersion observés pour l'ensemble des paramètres dans des conditions de fidélité intermédiaire (5 jours x 3 échantillons)



Incertitudes (%) sur les résultats

La méthodologie de mise en œuvre de la présente méthode correspond à aux objectifs suivants : assigner des valeurs de référence à des échantillons. En conséquence, elles diffèrent dans des conditions de mises en œuvre des méthodes visant à acquérir des données de surveillance.

Ainsi, les incertitudes de mesure ont été estimées sur un échantillon naturel d'eaux de surface. Pour les trois paramètres suivants : cocaïne, fluoxétine et zolpidem qui n'ont jamais été quantifiés, ces dernières n'ont pas pu être estimées.

Méthode d'évaluation : GUM. GUM - JCGM (2008)

Facteur d'élargissement : $k = 2$

	$C \pm U_{\text{laboratoire}}$ en ng.l^{-1}	$U_{\text{laboratoire}}$ en %
HCBZ	27,6 \pm 2,3	8
ZLP-4A	7,99 \pm 0,96	12
BZL	2,324 \pm 0,085	4
CBZ	20,09 \pm 0,41	2
CIT	3,07 \pm 0,18	6
COD	9,07 \pm 0,37	4

DCIT	2,40	± 0,23	10
DZP*	0,24	± 0,041	17
DCF	28,50	± 0,74	3
EDDP	1,623	± 0,039	2
GBP	176	± 15	9
MDMA*	0,368	± 0,017	5
MMT	1,59	± 0,12	8
MTD*	0,515	± 0,017	3
NCOD	1,47	± 0,12	8
NDZ	0,837	± 0,029	3
DVLF	26,4	± 1,3	5
OXA	44,0	± 5,0	11
PZP *	0,393	± 0,027	7
TTZ	0,84	± 0,14	16
TMD	62,6	± 1,9	3
VLF	16,29	± 0,35	2

* Valeurs inférieurs à la limite de quantification, considérées comme indicatives.

Contacts

Auteurs Sophie LARDY-FONTAN ; Béatrice LALERE

Institut Laboratoire national de métrologie et d'Essais

Contact Sophie.lardy-fontan@lne.fr; beatrice.lalere@lne.fr

Bibliographie :

Vincent Brieudes (2014) Caractérisation de la contamination des systèmes aquatiques par les psychotropes : développement d'une méthode de référence incluant une démarche multifactorielle de hiérarchisation. Thèse de doctorat de l'Université Bordeaux.

V. Brieudes, S. Lardy-Fontan, B. Lalere, S. Vaslin-Reimann, and H. Budzinski (2015) Validation and uncertainties evaluation of an isotope dilution-SPE-LC-MS/MS for the quantification of drug residues in surface waters. Accepted Talanta