

Composés pharmaceutiques
Méthode d'analyse dans les eaux douces et souterraines par
SPE LC MS (Code SANDRE : 693)

Références de la méthode

La méthode qui suit est dérivée de la publication suivante	Sans objet
Norme française et/ou européenne dont est tirée la méthode	Sans objet

Généralités

Nom de la famille de substances	Composés pharmaceutiques
Nom des substances individuelles	Molécules (code SANDRE) : Alprazolam (5370), lorazepam (5374), oxazepam (5375), zolpidem (5376) : psychotropes; Bezafibrate (5366), acide fénofibrique (5369) : hypolipémiants; Ketoprofen (5353), diclofenac (5349) : analgésique; Atenolol (5361), metoprolol (5362), propranolol (5363) : beta-bloquant; Sulfaméthoxazole (5356), triméthoprim (5357) : antibiotiques.
Matrice analysée	Eau douce de surface Eau souterraine
Nom de la méthode	SPE / LC-MS
Principe de la méthode	Extraction sur phase solide SPE (HLB Oasis) et analyse en chromatographie phase liquide (ESI+) couplée à la spectrométrie de masse à trappe ionique.

Domaine d'application	De la limite de quantification (2 à 13 ng/l selon les composés) à 2µg/l
Autres paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Sans objet
Précautions générales à suivre lors de l'analyse	Sans objet

Protocole analytique

Prétraitement

Fraction analysée :	Phase dissoute
Conditionnement et conservation des échantillons	
- Protocole :	Les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4 °C à l'abri de la lumière et seront extraits dans la semaine suivant leur arrivée. Filtration avant extraction
- Nature du contenant de stockage :	Verre ambré (certifié EPA)
- Lavage du contenant :	Contenant neuf
- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	Sans objet
Filtration :	
- Type de filtre et méthode de nettoyage :	Filtre en fibre de verre (masse spécifique compris entre 50 et 100 g/m ²)
- Type de support de filtration :	Fiole à vide (nettoyage à 500 °c au four)
Pré-traitement des échantillons liquide ou solide	Sans objet

Analyse

Volume ou masse de la prise d'essai (mL ou mg selon la phase analysée)	Eau douce de surface et eau souterraine : 1000 ml
---	---

<p>Extraction</p> <ul style="list-style-type: none"> - Liquide / Liquide (préciser la nature et le volume du solvant) - Micro-onde (préciser la nature et le volume du solvant ainsi que les paramètres d'utilisation de l'appareil) - SPE (préciser le type de cartouche, la nature et les volumes des solvants de lavage et d'élution) <ul style="list-style-type: none"> - ASE (T°C, P, solvant d'extraction, nombre de cycles, % de flush) - Autre (préciser) 	<p>Sans objet</p> <p>Sans objet</p> <p>Extraction automatique SPE par Autotrace.</p> <p>Cartouche Oasis HLB (masse d' adsorbant : 500 mg, volume de la cartouche : 6 ml, diamètre des particules : 60 µm)</p> <p>Ajusté à pH = 7 l'échantillon avant l'extraction par ajout d'acide acétique Conditionnement (5 ml/min) de la cartouche 5 ml MeOH et 5 ml d'eau pH7 Chargement de l'échantillon (10 ml/min) Lavage (5 ml/min) avec 2 ml (eau/méthanol 90/10 v/v) Séchage de la cartouche par flux d'azote Elution (5 ml/min) avec 10 ml MeOH Les solvants utilisés pour l'extraction sont de qualité HPLC. L'extrait est évaporé à sec et repris dans 0,330 ml d'un mélange eau/méthanol (Baker) 70/30 v/v</p> <p>Sans objet</p> <p>Sans objet</p>
<p>Purification (type de purification, paramètres de purification, méthode d'évaporation)</p>	<p>Sans objet</p>
<p>Minéralisation Type d'appareil utilisé Durée et température et de minéralisation : Réactifs utilisés :</p>	<p>Sans objet</p>

Volume ou masse finale avant analyse :	0,330 ml (eau/méthanol 70/30 v/v)																																																																		
Méthode analytique utilisée Indiquer les paramètres complets de la méthode (exemple pour la chromatographie : gradient, phase mobile, débit, T °C, colonne, mode de détection) Pour la détection par masse : mode d'ionisation et ions de quantification et de confirmation	<p>HPLC :</p> <p>Voie A : eau /méthanol 90/10 v/v + acide acétique 0,05%</p> <p>Voie B : méthanol + acide acétique 0,05 %</p> <p>Les solvants utilisés pour la phase mobile sont de qualité Baker</p> <p>Temps 0 min : 100/0 A/B v/v</p> <p>Temps 30min : 0/100 A/B v/v</p> <p>Temps 32min : 0/100 A/B v/v</p> <p>Temps 33min : 100/0 A/B v/v</p> <p>Temps 40min : 100/0 A/B v/v</p> <p>Température de la colonne : 25 °c</p> <p>Colonne Atlantis C18 : longueur 150mm, diamètre 2.1 mm, diamètre des particules : 3 µm.</p> <p>Débit de la phase mobile : 200 µl/min</p> <p>Injection 15 µl</p> <p>Mode ionisation ESI+</p> <p>Analyseur : trappe ionique (MS²)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Composés</th> <th>Ions précurseur (m/z)</th> <th>Ions fils en MS² (m/z)</th> <th>Ions fils de confirmation en MS³ (m/z)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Atenolol</td> <td>267</td> <td>190, 208, 225</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Trimethoprim</td> <td>291</td> <td>123,230, 258</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Zolpidem</td> <td>308</td> <td>235, 263</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Metoprolol</td> <td>268</td> <td>116, 191, 218</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sulfamethoxazole</td> <td>254</td> <td>147, 156, 188</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Propranolol</td> <td>260</td> <td>116, 157, 183</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Lorazepam</td> <td>321</td> <td>275, 303</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Oxazepam</td> <td>287</td> <td>241, 269</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Alprazolam</td> <td>309</td> <td>206, 274, 281</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Ketoprofen</td> <td>255</td> <td>209</td> <td>105, 131, 194</td> </tr> <tr> <td>Diazepam d5</td> <td>290</td> <td>227, 233, 262</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Bezafibrate</td> <td>362</td> <td>276, 316</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Diclofenac</td> <td>296</td> <td>250, 278</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Acide fénofibrique</td> <td>319</td> <td>233</td> <td>121, 139</td> </tr> <tr> <td>Oxazepam d5</td> <td>292</td> <td>246, 274</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Les composés sont identifiés/confirmés par la présence d'au moins 2 ions fils en MS². Dans le cas de l'acide fénofibrique et du kétoprofen (1 seul ion fils en MS²), l'identité est confirmée en MS³.</p>			Composés	Ions précurseur (m/z)	Ions fils en MS ² (m/z)	Ions fils de confirmation en MS ³ (m/z)	Atenolol	267	190, 208, 225		Trimethoprim	291	123,230, 258		Zolpidem	308	235, 263		Metoprolol	268	116, 191, 218		Sulfamethoxazole	254	147, 156, 188		Propranolol	260	116, 157, 183		Lorazepam	321	275, 303		Oxazepam	287	241, 269		Alprazolam	309	206, 274, 281		Ketoprofen	255	209	105, 131, 194	Diazepam d5	290	227, 233, 262		Bezafibrate	362	276, 316		Diclofenac	296	250, 278		Acide fénofibrique	319	233	121, 139	Oxazepam d5	292	246, 274	
Composés	Ions précurseur (m/z)	Ions fils en MS ² (m/z)	Ions fils de confirmation en MS ³ (m/z)																																																																
Atenolol	267	190, 208, 225																																																																	
Trimethoprim	291	123,230, 258																																																																	
Zolpidem	308	235, 263																																																																	
Metoprolol	268	116, 191, 218																																																																	
Sulfamethoxazole	254	147, 156, 188																																																																	
Propranolol	260	116, 157, 183																																																																	
Lorazepam	321	275, 303																																																																	
Oxazepam	287	241, 269																																																																	
Alprazolam	309	206, 274, 281																																																																	
Ketoprofen	255	209	105, 131, 194																																																																
Diazepam d5	290	227, 233, 262																																																																	
Bezafibrate	362	276, 316																																																																	
Diclofenac	296	250, 278																																																																	
Acide fénofibrique	319	233	121, 139																																																																
Oxazepam d5	292	246, 274																																																																	
Equipement (modèles utilisés) :	<p>Equipement Thermo-Fisher :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Autosampler AS2000 - Pompe HPLC Surveyor MS - Trappe d'ion LCQ Deca XP+ 																																																																		
Type d'étalonnage	Interne																																																																		
Modèle utilisé	Linéaire																																																																		
Étalons / Traceurs utilisés	Standard interne : oxazepam d5. Le standard interne est ajouté avant																																																																		

Domaine de concentration	l'injection de l'extrait. Traceur : Diazepam d5. Le traceur est ajouté avant l'extraction de l'échantillon. Domaine de la gamme d'étalonnage : oxazepam, zolpidem : 1 à 200 µg/l dans l'extrait sulfamethoxazole, diclofenac, metoprolol, lorazepam, ketoprofen, bezafibrate, alprazolam, acide fenofibrique : 5 à 200 µg/l dans l'extrait trimethoprim, atenolol, propranolol : 10 à 200 µg/l dans l'extrait
Méthode de calcul des résultats	Correction par le rendement : Oui

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	XPT90210 et adaptation pour quelques paramètres. Application également des profils d'exactitude.
Modèle utilisé	
Domaine de validation	Domaine de 1 à 200 µg/l dans l'extrait selon les molécules
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1
Matériaux de référence certifiés utilisés	Sans objet
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	Blancs sur toute la méthode, réalisés avec 1000 ml d'eau Evian ; doivent être inférieurs la limite de quantification
Rendement - par type de matrice - par niveau de concentration - par molécule (si moyenne préciser le nombre de répétitions et l'écart-type)	Sans objet Sans objet Taux de récupération moyen (écart-type) obtenu par dopage à 150 ng/l dans 13 eaux de surface différentes : Alprazolam 97 % (9 %) Acide fénofibrique 69 % (14 %) Atenolol 104 % (15 %) Bezafibrate 80 % (10 %) Diclofenac 73 % (15 %) Ketoprofen 77 % (12 %) Lorazepam 80 % (6 %) Metoprolol 99 % (9 %) Oxazepam 92 % (6 %) Propranolol 99 % (15 %) Sulfamethoxazole 87 % (6 %) Trimethoprim 94 % (10 %) Zolpidem 90% (13 %)

Ces taux de récupérations ont été vérifiés à la limite de quantification par dopage (à la LQ) de 6 eaux naturelles différentes.

**Limite de détection (LD)
Limite de quantification (LQ)**

(indiquez la méthode de détermination en précisant la matrice testée)

Les limites de quantification sont les suivantes :

Atenolol : 13ng/l
Trimethoprim : 13 ng/l
Metoprolol : 5 ng/l
Zolpidem : 2 ng/l
Sulfamethoxazole : 6 ng/l
Propranolol : 10 ng/l
Lorazepam : 6 ng/l
Alprazolam : 5 ng/l
Oxazepam : 2 ng/l
Ketoprofen : 7 ng/l
Bezafibrate : 5 ng/l
Diclofenac : 7 ng/l
Acide fenofibrique : 5 ng/l

Elles ont été vérifiées selon la norme XPT90-210 (§ 5.1.3.3) dans une eau d'Evian puis dans 6 eaux de surface différentes.

La limite de détection est obtenue en divisant la limite de quantification par 3.

Spécificité de la méthode (préciser la matrice)

Testée : Oui X

La spécificité de la méthode est validée pour l'analyse des composés pharmaceutiques dans les eaux de surface et eaux souterraines.

Cette étude de spécificité a été réalisée et validée en dopant des échantillons d'eaux naturelles

Incertitudes (%) sur les résultats

- par type de matrice

- par niveau de

concentration

- par molécule

(reproductibilité avec méthode de détermination)

Sans objet

Sans objet

L'incertitude a été déterminée par la méthode GUM. Seules les incertitudes liées à la courbe d'étalonnage et à l'extraction (fidélité et justesse) sont prises en compte.

Les incertitudes sur les pesées et la préparation de la gamme sont négligeables.

Les incertitudes (élargies $k=2$) pour les eaux de surface et eaux souterraines sont les suivantes :

[C]échantillon ng/l	LQ	50 à 200
Atenolol	55 %	45 %
Trimethoprim	50 %	30 %
Metoprolol	55 %	45 %
Zolpidem	55 %	40 %
Sulfamethoxazole	60 %	45 %
Propanolol	50 %	45%
Lorazepam	50 %	30%
Oxazepam	45 %	30 %
Alprazolam	45 %	40 %
Ketoprofen	65 %	40 %

Bezafibrate	80 %	40 %
Diclofenac	60 %	45 %
Acide fénofibrique	55 %	45 %

Contacts

Auteurs	S.Bristeau
Institut	BRGM
Adresses mail	s.bristeau@brgm.fr