

Composés pharmaceutiques à usage vétérinaire

Méthode d'analyse dans les eaux (fraction dissoute)

Références de la méthode

La méthode qui suit est dérivée de la publication suivante	Sans objet
Norme dont est tirée la méthode	Sans objet
Niveau de validation selon Norman	Niveau 1
Code SANDRE de la méthode (suivant niveau de validation)	

Généralités

Nom de la famille de substances	Composés pharmaceutiques à usage vétérinaire : antibiotique, anti-inflammatoire et phytopharmaceutique.
Nom des substances individuelles	Lincomycine, Tylosine, Enilconazole, Sulfathiazole, Erythromycine, Ceftiofur, Dexaméthasone, Sulfaquinoxaline, Sulfaméthazine, Sulfadiméthoxine.
Code(s) SANDRE des substances individuelles	Lincomycine (6570), Tylosine (6523), Enilconazole (1704), Sulfathiazole (6572), Erythromycine (6522), Ceftiofur (6573), Dexaméthasone (6574), Sulfaquinoxaline (6575), Sulfaméthazine (6525), Sulfadiméthoxine (6576).
Matrice analysée	Eau : Eau douce de surface Eau souterraine
Acronyme	SPE / LC-MSMS
Principe de la méthode	Extraction sur phase solide SPE (HLB Oasis) et analyse en chromatographie phase liquide (ESI+) couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (trappe ionique).

Domaine d'application	Limite de quantification : 5 à 10 ng/L suivant les molécules
Paramètres à déterminer en parallèle à l'analyse	Sans objet
Précautions particulières à respecter lors de la mise en œuvre de la méthode	Sans objet

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
Conditionnement et conservation des échantillons	
- Protocole :	Les échantillons d'eaux brutes sont conservés à l'obscurité à 4 °C à l'abri de la lumière et seront filtrés et extraits dans les 48 heures.
- Nature du contenant de stockage :	Verre ambré (certifié EPA)
- Lavage du contenant :	Contenant neuf
- Résultats de l'étude de stabilité (durée de stabilité, température,...) :	
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 pendant 2 heures)
Pré-traitement des échantillons liquide ou solide	Ajouter l'agent complexant EDTA avant l'extraction de l'échantillon pour obtenir une concentration de 1g/L

Analyse

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

Dérivation

- Conditions (réactifs, solvants, pH, température et durée)

Sans objet

Extraction

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

Cartouche Oasis HLB® (masse d' adsorbant : 500 mg, volume de la cartouche : 6 mL, diamètre des particules : 60 µm)

Ajuster l'échantillon à pH = 7 avant l'extraction par ajout d'acide acétique
Conditionner (5 mL/min) de la cartouche 5 mL MeOH et 5 mL d'eau pH=7
Charger de l'échantillon (10 mL/min)
Laver (5 mL/min) avec 2 ml (eau/méthanol 90/10 v/v)
Sécher de la cartouche par flux d'azote pendant 1 heure
Eluer (5 mL/min) avec 10 mL MeOH
Les solvants utilisés pour l'extraction sont de qualité « pour HPLC ».
L'extrait est évaporé jusqu'à environ 0,5 mL de méthanol.

Purification

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

aucune

Conservation de l'extrait

Conservation des extraits à -20°C dans le solvant organique (méthanol).

L'extrait est évaporé à sec et repris dans 0,330 mL d'un mélange eau/méthanol 90/10 v/v avant analyse.

Minéralisation

Type d'appareil utilisé
Durée et température et de minéralisation :
Réactifs utilisés :

Sans objet

Volume ou masse finale avant analyse :

0,330 mL (eau/méthanol 90/10 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

HPLC :

Température de la colonne : 25 °C

Colonne Atlantis® C18 : longueur 150mm, diamètre 2,1 mm, diamètre des particules : 3 µm.

Débit de la phase mobile : 200 µL/min

Injection 10 µL

Voie A : eau + acide formique 0,1%

Voie B : acétonitrile + acide formique 0,1 %

Tableau du gradient de la phase mobile en HPLC :

Durée (min.)	Composition Voie A(%)	Voie B (%)
0	90	10
5	90	10
35	40	60
38	0	100
40	90	10
48	90	10

Tableau des ions utilisés en spectrométrie de masse :

Composés	Ion précurseur (m/z)	Ions fils de quantification en MS ² (m/z)	Ions fils de confirmation en MS ² (m/z)
Lincomycine	407	126+359+389	-
Tylosine	916	772	-
Enilconazole	297	255	201+159+176
Sulfathiazole	256	156+108+92	-
Erythromycine	734	576+716+698	522+540+558
Ceftiofur	524	241+396+285	-
Dexaméthasone	393	373+355	337
Sulfaquinoxaline	301	156+108+92	-
Sulfaméthazine	279	204+186+124	156+174+218
Sulfadiméthoxine	311	156+218+245	108
Oxazépam d5 (étalon interne)	292	246+274	-
Diazepam d5 (traceur)	290	227+233+262	-

Mode ionisation ESI+

Analyseur : trappe ionique (MS²)**Equipement ¹(modèles utilisés) :**

Equipement Thermo-Fisher :

- Autosampler AS2000

- Pompe HPLC Surveyor MS

- Trappe d'ion LCQ Deca XP+

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	Interne
Modèle utilisé	Linéaire
Etalons / Traceurs utilisés	Etalon interne : oxazépam d5. L'étalon interne est ajouté (50 µL) avant l'injection de l'extrait à une concentration de 300 µg/L dans l'extrait final. Traceur : Diazepam d5. Le traceur est ajouté (1 mL) à une concentration de 100 µg/L avant l'extraction de l'échantillon.
Domaine de concentration	Domaine de la gamme d'étalonnage : Lincomycine, Sulfathiazole, Erythromycine, Dexaméthasone, Sulfaquinoxaline, Sulfamethazine : 5 à 300 µg/L dans l'extrait Tylosine, Enilconazole, Cefotiofur, Sulfadiméthoxine : 15 à 300 µg/L dans l'extrait
Méthode de calcul des résultats	
Rendement	Utilisation du rendement : Correction par le calcul (cf. détermination du rendement)
Blancs	Blanc sur toute la méthode, réalisé avec 1000 mL d'eau de source (Evian)

Paramètres de validation de la méthode

Norme utilisée	XP T90-210 (1998)
Modèle utilisé	Linéaire
Domaine de validation	selon les molécules : domaine de 5 à 300 µg/L ou 15 à 300 µg/L dans l'extrait (domaine validé suivant la XP T90-210)
Matériaux de référence certifiés utilisés	Pas de matériau disponible
Blancs analytiques (concentration ou résultat maximum acceptable)	Les résultats doivent être inférieurs à la limite de quantification pour valider la série
Rendement - par type de matrice - par niveau de concentration	Etude dans une eau de source (eau souterraine)

- par molécule

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

Taux de récupération moyen (écart-type) obtenu par dopage à 6 niveaux (10 à 100 ng/L) de l'ensemble des composés dans une eau Evian :

Substances	Moyenne (%)	Ecart-type (%)
Lincomycine	80	7
Tylosine	80	4
Enilconazole	100	11
Sulfathiazole	91	4
Erythromycine	75	10
Ceftiofur	71	13
Dexaméthasone	93	8
Sulfaquinoxaline	89	6
Sulfaméthazine	89	7
Sulfadiméthoxine	98	3

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

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

Les limites de quantification vérifiées sont les suivantes :

substances	LQ (ng/L)
Lincomycine	5
Tylosine	10
Enilconazole	10
Sulfathiazole	5
Erythromycine	5
Ceftiofur	10
Dexaméthasone	5
Sulfaquinoxaline	5
Sulfaméthazine	5
Sulfadiméthoxine	10

Elles ont été vérifiées selon la norme XP T90-210 (§ 5.1.3.3) dans une eau d'Evian.

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

Spécificité de la méthode (préciser la matrice)

Matrices testées : Eau de source (Evian)

Pas d'interférences identifiées

Acquisition de données de spécificité en cours

Incertitudes (%) sur les résultats

- par type de matrice
- par niveau de concentration

Méthode d'évaluation : GUM (référence ISO & NF T 90-220, option 1)

Facteur d'élargissement : $k = 2$

Eau de source (eau souterraine)

Cf. ci-dessous

- par molécule(reproductibilité avec
méthode de détermination)

Substances	LQ	LQ à ≤ 50 ng/L	> 50 ng/L
Lincomycine	25%	20%	20%
Tylosine	40%	35%	30%
Enilconazole	60%	40%	40%
Sulfathiazole	30%	20%	15%
Erythromycine	60%	50%	40%
Ceftiofur	60%	50%	40%
Dexaméthasone	30%	25%	25%
Sulfaquinoxaline	25%	25%	20%
Sulfaméthazine	20%	20%	20%
Sulfadiméthoxine	25%	20%	15%

Contacts

Auteurs**Institut****Adresses mail**

S.Bristeau

BRGM

s.bristeau@brgm.fr