LNE
Le progrès, une passion à partager

AQUAREF

RAPPORT FINAL

Programme AQUAREF 2009

Exploitation d'un réseau européen de référence sur les substances émergentes

PARTIE 1 : Etat de l'art des méthodes analytiques pour l'analyse de 4 substances pharmaceutiques (carbamazépine, diclofénac, iopamidol, amidotriozate)

Rédactrices : Sophie LARDY-FONTAN, Béatrice LALERE

Date : Mai 2010

La reproduction de ce document n'est autorisée que sous sa forme intégrale.
Il comporte 29 pages

Laboratoire national de métrologie et d'essais
Établissement public à caractère industriel et commercial • Siège social : 1, rue Gaston Boissier - 75724 Paris Cedex 15 • Tél. : 01 40 43 37 00
Fax : 01 40 43 37 37 • E-mail : info@lne.fr • Internet : www.lne.fr • Siret : 313 320 244 00012 • NAF : 7120B • TVA : FR 92 313 320 244
CRCA PARIS C.AFF.RENNES - IBAN : FR76 1820 6002 8058 3819 5600 104 - BIC : AGRIFRPP882

Exploitation d'un réseau européen de référence sur les substances émergentes : Partie 1 - état de l'art des méthodes analytiques pour l'analyse de 4 substances pharmaceutiques (carbamazépine, diclofénac, iopamidol, amidotriozate)

Titre : Exploitation d'un réseau européen de référence sur les substances émergentes

PARTIE 1 : Etat de l'art des méthodes analytiques pour l'analyse de 4 substances pharmaceutiques (carbamazépine, diclofénac, iopamidol, amidotriozate)

Auteur : Laboratoire National de métrologie et d'Essais (LNE)

Sujet (mots-clés) : résidus médicamenteux, produits de transformation, carbamazépine, diclofénac, agents de contraste iodés, validation de méthode, harmonisation ; qualité de la donnée

Résumé : La surveillance des milieux aquatiques porte actuellement en priorité sur les substances chimiques déjà réglementées, mais on ne peut pas faire l'impasse sur toutes les autres substances couramment utilisées, dont certaines font également l'objet d'une action spécifique dans le cadre des suites du grenelle de l'environnement.

Le réseau NORMAN construit actuellement une base de données des travaux réalisés sur les substances émergentes provenant des membres européens de ce réseau pérennisé en 2008. Il est nécessaire d'exploiter les informations réunies et d'en faire une étude sur les méthodes pratiquées et sur le niveau de valeur factuelle attribuable. Ceci afin d'informer les laboratoires prestataires comme les différents donneurs d'ordre des techniques déjà éprouvées et utilisables en routine, comme également de faire apparaître les substances pour lesquelles il y a encore des travaux de R&D à mettre en action. Au final, pour les méthodes qui auront été identifiées et diffusées pour des familles de substances, il faudra mener à terme leur validation et leur raccordement au système international (SI).

Comme première approche, le LNE a réalisé un état de l'art des méthodologies analytiques orienté sur les 4 molécules pharmaceutiques qui avaient été initialement identifiées par la liste proposée par la commission européenne COM 397 en 2006, à savoir la carbamazépine, le diclofénac et 2 agents de contraste iodés après les avoir repositionnées dans leur contexte et enjeux environnementaux. Le travail s'est tout d'abord focalisé sur les méthodes disponibles dans la base de données NORMAN mais au regard du peu d'informations disponibles, il a été élargi à l'ensemble des données scientifiques disponibles en se focalisant sur une analyse des points forts, points faibles, manques "chroniques". Cette étude s'est tout spécialement attachée aux associations produits parents – produits de transformation connus.

Diffuseur : AQUAREF

Contributeurs :

Date de publication : 2010-05

Type : Texte
Format : .pdf
Identifiant :
Langue : FR
Couverture géographique :
Couverture temporelle :
Droits d'usage : domaine public
URL :

RESUME 4
I L'EPINEUX PROBLEME DU CHOIX DES SUBSTANCES 5
I.1 Contexte 5
I.2 Choix des molécules pour l'étude 2009 5
II PRESENTATION DES MOLECULES SELECTIONNEES 6
II.1 La carbamazépine 6
II.2 Le diclofénac 6
II.3 Les produits de contraste iodés 7
III ETAT DES CONNAISSANCES CONCERNANT L'ETUDE DE LA PRESENCE ET DU DEVENIR DES SUBSTANCES SELECTIONNEES 7
III.1 Eléments de compréhension du devenir dans l'environnement 7
III.2 Données de présence dans les rejets de stations d'épuration et les écosystèmes aquatiques 8
III.2.2 Données de présence de certains produits de transformation et/ou métabolites 8
IV DONNEES DE TOXICITE 9
IV.1 Cas du diclofénac 9
IV.2 Cas de la carbamazépine 10
IV.3 Cas des agents de contraste iodés 10
IV.4 Toxicité des mélanges 10
V CONTEXTE 11
V.1 La préparation de l'échantillon 11
V.2 La séparation-détection 12
V.2.1 Analyse par chromatographie en phase gazeuse 12
V.2.2. Analyse par chromatographie en phase liquide 13
V.2.3. Les effets matriciels 14
VI METHODES ANALYTIQUES DISPONIBLES SUR LE SITE NORMAN 15
VI.1 Le réseau NORMAN, un bref rappel 15
VI.2. La validation de méthode sous NORMAN, un bref rappel 15
VI.3. Exploitation de la base de données NORMAN 15
VII AUTRES METHODES DISPONIBLES 18
VIII CONCLUSION - EVOLUTIONS NECESSAIRES 25
Références *bibliographiques* 27

RESUME

La surveillance des milieux aquatiques porte actuellement en priorité sur les substances chimiques déjà réglementées, mais on ne peut pas faire l'impasse sur toutes les autres substances couramment utilisées, dont certaines font également l'objet d'une action spécifique dans le cadre des suites du grenelle de l'environnement.

Le réseau NORMAN construit actuellement une base de données des travaux réalisés sur les substances émergentes provenant des membres européens de ce réseau pérennisé en 2008. Il est nécessaire d'exploiter les informations réunies et d'en faire une étude sur les méthodes pratiquées et sur le niveau de valeur factuelle attribuable. Ceci afin d'informer les laboratoires prestataires comme les différents donneurs d'ordre des techniques déjà éprouvées et utilisables en routine, comme également de faire apparaître les substances pour lesquelles il y a encore des travaux de R&D à mettre en action. Au final, pour les méthodes qui auront été identifiées et diffusées pour des familles de substances, il faudra mener à terme leur validation et leur raccordement au système international (SI).

Comme première approche (partie 1 – ce document DMSI/2), le LNE a réalisé un état de l'art des méthodologies analytiques orienté sur les 4 molécules pharmaceutiques qui avaient été initialement identifiées par la liste proposée par la commission européenne COM 397 en 2006, à savoir la carbamazépine, le diclofénac et 2 agents de contraste iodés après les avoir repositionnées dans leur contexte et enjeux environnementaux. Le travail s'est tout d'abord focalisé sur les méthodes disponibles dans la base de données NORMAN mais au regard du peu d'informations disponibles, il a été élargi à l'ensemble des données scientifiques disponibles en se focalisant sur une analyse des points forts, points faibles, manques «chroniques».

Les analyses précédemment conduites ont permis de proposer (partie 2 - document DMSI/3) un «*modus operandi*» méthodologique pour les développements analytiques de ces 4 molécules dans l'environnement et qui, de manière plus générale, peut être considéré pour tout développement analytique. Ce travail intègre un certain nombre d'aspects métrologiques nécessaires à mettre en œuvre pour progresser dans la qualité et la fiabilité des données de mesures.

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du partenariat LNE - ONEMA 2009, au titre de l'action 5.1 «Exploitation d'un réseau européen de collecte d'informations sur les substances émergentes » du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2009.

Suite du rapport page suivante

A/ CONTEXTE et ENJEUX ENVIRONNEMENTAUX

La raison pour laquelle les substances médicamenteuses présentent un intérêt dans le contexte environnemental est qu'elles sont isolées et/ou synthétisées pour induire un effet biologique favorable à la santé dans l'organisme animal et/ou humain. Elles présentent des caractéristiques physico-chimiques communes leur conférant des propriétés de franchissement des membranes, de bioaccumulation et in fine d'induction d'effets biologiques sur des espèces non cibles présentent dans les écosystèmes aquatiques.

Déversées dans l'environnement de manière chronique, elles sont susceptibles de provoquer des effets indésirables sans que n'en soient encore suffisamment évaluées les conséquences. Les connaissances actuelles sont limitées, aussi il importe de prendre en compte la problématique des résidus médicamenteux qui sont détectées dans les eaux y compris dans les eaux à destination humaine (dans les mêmes ordres de grandeur que certains polluants organiques jugés comme prioritaires tels que les produits phytosanitaires).

Ce sont les pays industrialisés qui sont les plus gros consommateurs de substances médicamenteuses ; l'Europe, l'Amérique du Nord et le Japon bien que ne représentant que 15% de la population mondiale constituent plus de 80 % du marché mondial.

I L'épineux problème du choix des substances

I.1 Contexte

Comme suggéré par de nombreux auteurs et comme cela a été remis en perspectives par l'Académie de pharmacie (2008), plus de 3 000 molécules pharmaceutiques sont utilisées de telle sorte qu'il apparaît totalement illusoire d'envisager d'être exhaustif quant à l'étude de leur présence dans l'environnement.

De nouvelles réflexions devront être entreprises notamment au travers du Plan National Résidus de Médicaments dans l'Eau et Plan santé-environnement II. Dans une revue de Mompelat (2009), il est rapporté que 160 molécules pharmaceutiques ont fait l'objet d'investigations pour seulement une trentaine de métabolites et de produits de transformation. Un certain nombre d'auteurs convergent vers l'idée qu'il est plus que nécessaire de palier les manques de connaissance concernant la présence, le devenir et des effets des sous produits de substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques (Kummerer, 2009 ; Mompelat, 2009, etc...).

« ...Au cours de ces dernières années, un nombre significatif d'études a mis en avant que la considération seule d'une molécule pharmaceutique n'était pas suffisante mais que les molécules résultant de changements structuraux de cette dernière l'était également... » (Rapport de l'Académie de pharmacie, 2008)

I.2 Choix des molécules pour l'étude 2009

Le choix des molécules pharmaceutiques sélectionnées dans l'étude 2009 a été orienté par les critères mentionnés dans le Tableau 1 ci-dessous. La carbamazépine et le diclofénac possèdent des métabolites connus qui seront également inclus dans cette étude.

Tableau 1 : Critères de sélection des 4 molécules pharmaceutiques

	CARBAMAZEPINE	DICLOFENAC	IOPAMIDOL	AMIDOTRIOZATE
Revue pour une identification comme «substance prioritaire» ou «substance dangereuse prioritaire DCE»	Oui	Oui	Oui	Oui
Substances pertinentes pour l'eau potable, action Rhin 2007	Oui	Oui	Oui	Oui
Liste des substances prioritaires France	Oui	Oui	Non évalué	Non évalué
Persistance	Oui	Oui	Oui	Oui
Ubiquité dans les systèmes aquatiques	Oui	Oui	Oui	Oui
Risques écotoxicologiques	Peu renseigné	Peu renseigné	Peu renseigné	Peu renseigné
Risques sanitaires	Peu renseigné	Peu renseigné	Peu renseigné	Peu renseigné
Indicateurs/ traceurs de contamination des stations d'épuration	Oui	Oui	Oui	Non renseigné
Données en Europe	Oui	Oui	Oui	Oui
Données en France	Oui	Oui	Oui, parcellaire	Non

II Présentation des molécules sélectionnées

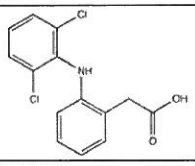
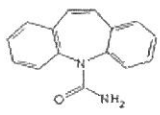
II.1 La carbamazépine

Au cours d'études pharmacologiques, la carbamazépine a montré des propriétés anticonvulsivantes, anticholinergiques et antidiurétiques. Son usage est préconisé dans le traitement des névralgies faciales, épilepsies, troubles bipolaires et migraines chroniques.
Les principales caractéristiques de la molécule sont présentées dans le Tableau 2.

II.2 Le diclofénac

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien AINS parmi les plus utilisés en France. Au cours d'études pharmacologiques, le diclofénac a montré des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. Son usage est préconisé dans le traitement chronique et aiguë des signes d'ostéoarthrite et d'arthrite rhumatoïde.
Les principales caractéristiques de la molécule sont présentées dans le Tableau 2.

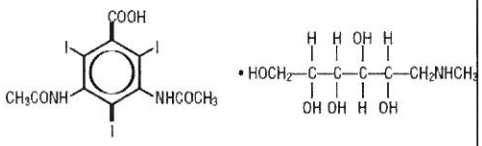
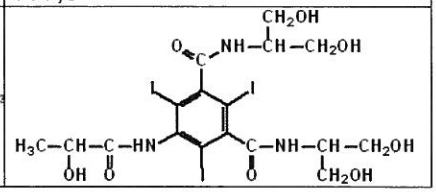
Tableau 2 : Principales caractéristiques du diclofénac et de la carbamazépine

	DICLOFENAC	CARBAMAZEPINE
CAS	15307-86-5	298-46-4
Formule chimique	$C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$	$C_{15}H_{12}N_2O$
Masse moléculaire g.mol^{-1}	318,134	236,273
Structure chimique		
Solubilité aqueuse (mg/L)	2,43 (25°C)	17,7 (25°C)
Log Kow	4,5	2,45
pKa	4,15	13,9 ; 7

II.3 Les produits de contraste iodés

Les produits de contraste sont les molécules pharmaceutiques les plus utilisées par administration intravasculaires. On estime leur consommation annuelle à environ $3,5*10^6$ kg par an. Ils sont utilisés en imagerie médicale humaine pour les tests de diagnostics. Les produits de contrastes iodés présentent pour caractéristique commune des atomes d'iode qui leurs confèrent leurs propriétés d'absorption des rayons X.
Parmi les nombreux agents de contraste utilisés en Europe, seuls deux seront ici abordés : l'iopamidol et l'amidotrizoate.
L'iopamidol est un produit de contraste classiquement utilisé pour l'opacification de la cavité utérine, des voies urinaires et des vaisseaux en radiologie.
L'amidotrizoate est pour sa part couramment employé en urographie, veinographie, artériographie, discographie, tomographie axiale assistée par ordinateur.
Les principales caractéristiques des 2 molécules sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3: Principales caractéristiques des 2 agents de contraste iodés sélectionnés

	AMIDOTRIZOATE	IOPAMIDOL
CAS	131-49-7	60166-93-0
Formule chimique	$C_{11}H_9I_3N_2O_4.C_7H_{17}NO_5$	$C_{17}H_{22}I_3N_3O_8$
Masse moléculaire ($g.mol^{-1}$)	809,13	777,8
Structure chimique		

Les phénomènes de toxicité des produits de contraste chez l'homme sont connus. Ils se traduisent, entre autres, par des réactions allergiques, des attaques cardiaques pour des personnes hypersensibles (Christiansen, 2005).

III Etat des connaissances concernant l'étude de la présence et du devenir des substances sélectionnées

Le rejet en continu de médicaments et de leurs métabolites dans le milieu aquatique confère à ces molécules un caractère de pseudo-persistance (Fenet et al., 2006).

III.1 Eléments de compréhension du devenir dans l'environnement

Après absorption par l'organisme (humain et animal), les médicaments peuvent être excrétés sous forme inchangée et / ou métabolisée. Les molécules pharmaceutiques passent au travers des usines de traitements des eaux usées au sein desquelles elles sont peu ou pas éliminées conduisant à des rejets importants vers les milieux aquatiques récepteurs. Leur persistance permet leur dispersion dans l'ensemble des écosystèmes aquatiques : eaux de surface, eaux souterraines et eaux de boisson. Les usages importants d'un point de vue quantitatif auxquels s'ajoutent les faibles taux d'abattement des molécules dans les stations d'épuration ont conduit à leur quantification dans les eaux de surface et les eaux souterraines dans des concentrations importantes. Le devenir de certaines d'entre elles, notamment des produits de contraste est mal renseigné et apparaît indispensable à la conduite d'étude de risques.

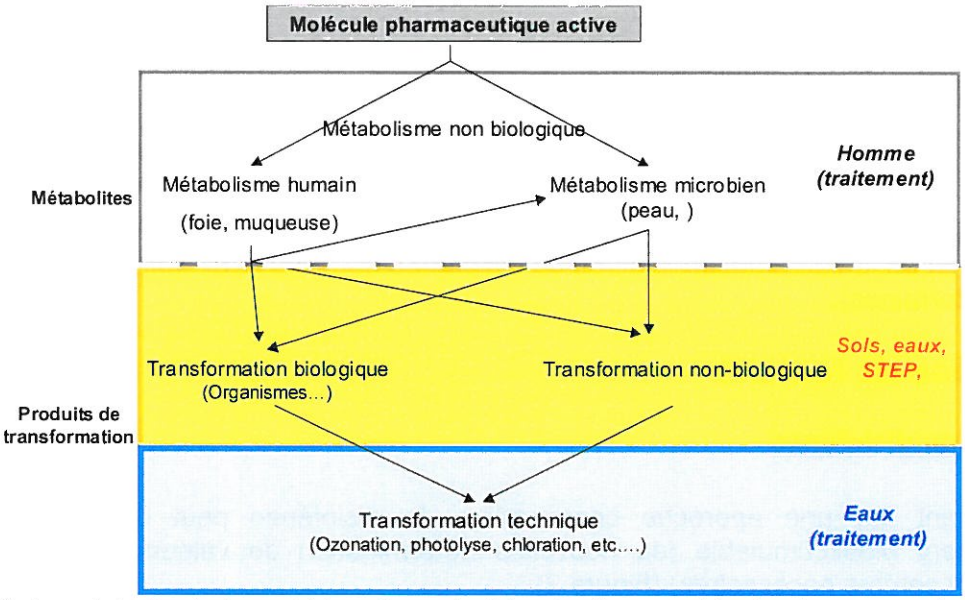


Figure 1 : Vision globale de la problématique de l'étude d'une molécule pharmaceutique parente (d'après Kummerer, 2009).

III.2 Données de présence dans les rejets de stations d'épuration et les écosystèmes aquatiques

III.2.1 Données de présence des composés parents

a) Carbamazépine et Diclofénac

Comme cela a déjà été mentionné auparavant, la carbamazépine et le diclofénac sont parmi les molécules pharmaceutiques les plus étudiées y compris en France (travaux de thèse de Anne Togola (2006), Sophie Lardy-fontan (2008)). Elles sont retrouvées à des concentrations importantes dans les effluents de station d'épuration, pouvant être supérieures au µg/L selon les pays. Dans les milieux naturels, elles ont été quantifiées dans des gammes de concentrations comprises entre la dizaine de ng/L à plusieurs centaines de ng/L. Des travaux ont également mis en avant leur présence dans des eaux de transition, des eaux marines, des eaux souterraines et des eaux de boisson (travaux de thèse de A.Togola (2006), S. Lardy-fontan (2008)).

b) Les produits de contraste

La recherche bibliographique menée n'a mis à jour qu'une seule référence rapportant des données de présence de l'iopamidol en France. Bruchet et al., (2006) dans une communication personnelle rapporte une valeur de contamination de 386 ng/L en Seine, 208 ng/L dans un système de forage et 60 ng/L dans une eau traitée.
De manière générale, les données en Europe sont parcellaires et ne permettent en aucun cas de conclure de l'état de contamination des masses d'eau en Europe. A titre d'exemple, Sacher et al. (2001), rapportent des concentrations maximales de 300 ng/L pour l'iopamidol et 1 100 ng/L pour l'amidotrizoate dans des eaux souterraines.

III.2.2 Données de présence de certains produits de transformation et/ou métabolites

Comme cela a déjà été souligné, de nombreux efforts de recherche doivent être entrepris afin de caractériser la présence des molécules pharmaceutiques et de leurs métabolites. L'étude française de Leclercq (2009) sur la carbamazépine et l'oxcarbazépine permet de mettre en évidence une importante variabilité dans la distribution des différentes espèces considérées dans les effluents. Quelque soit la station dépuration considérée, ce sont les métabolites (10-OH-Cbz et DiOH-CBZ) qui sont majoritaires dans des proportions 2 à 5 fois plus importantes que le composé parent.

Dans l'étude conduite par Stülten (2008) bien que le diclofénac demeure l'espèce majoritaire avec des concentrations supérieures au µg/L, certains de ces métabolites 4-OH-DCF sont présents à des concentrations très largement supérieures à la centaine de ng/L.Ces résultats mettent en évidence que la non considération de ces sous-produits peut conduire à une sous-estimation des risques liés à la présence de substances pharmaceutiques dans l'environnement.

A notre connaissance il n'existe pas de données de présence de métabolites et /ou produits de transformation de la carbamazépine et/ou du diclofénac dans les eaux naturelles (eaux de surface et eaux souterraines).

IV Données de toxicité

IV.1 Cas du diclofénac

En se basant sur une approche conservative, le diclofénac peut être considéré comme potentiellement bioaccumulable (de nouvelles détermination de valeurs de BCF et log Kow apparaissent comme nécessaires) (Figure 2).

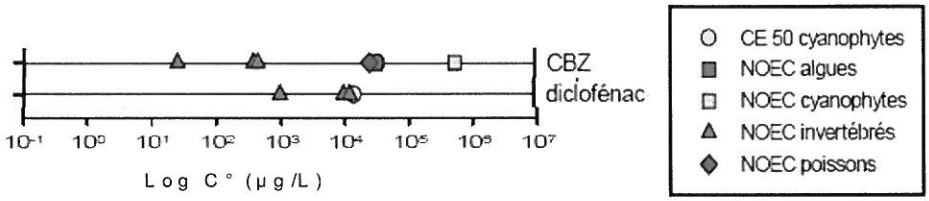


Figure 2 : Données de toxicité chronique d'une sélection de substances pharmaceutiques (Besse et Garric, 2007). (CBZ carbamazépine)

Les valeurs de NOEC (No observable effect concentration ; toxicité et reproduction) à des stades précoces de développement existent sur 3 maillons de la chaîne trophique. La valeur de 1,0 mg/L obtenue pour l'espèce la plus sensible (*Cerodaphnia. dubia*) a servi à déterminer la valeur de PNEC (Predicted no effect concentration). A la suite de la reconnaissance du diclofénac comme étant responsable du déclin de la population de vautours en Inde (induction de lésion rénales) (Oaks et al., 2004), les effets d'une exposition au diclofénac sur des populations ont été évaluées de manière plus précise, notamment chez les poissons. Des altérations cytologiques hépatiques, rénales et branchiales ont été observées chez des truites arc-en-ciel après 28 jours à une exposition de 1 µg/L (Triebskorn et al., 2004). Des lésions rénales et des altérations des branchies ont également été observées à 5 µg/L; une accumulation de diclofénac était notable dans les reins, les branchies, les muscles et le foie (Schwaiger et al., 2004). Les valeurs des facteurs de bioconcentration ont été mesurées comme étant comprises entre 12 et 2 732 et comme étant concentration-dépendant. Les différentes observations ont mené à une réévaluation de la valeur du PNEC, l'établissant à 0,01 µg/L. En conséquence, des rapports PEC/PNEC sont susceptibles d'être supérieurs à 1 dans l'environnement et indiquent l'existence d'un risque environnemental (Carlsson et al., 2006).

Dans une étude portant sur la phytotoxicité des produits de photo-transformation du diclofénac, Schmitt-Jansen et al. (2007) ont montré que la toxicité des produits de dégradation du diclofénac sur *Scenedesmus vacuolatus* était près de 6 fois plus élevée que celle de la molécule parente. Les auteurs concluent à une nécessaire prise en compte des produits de photo-transformation dans les évaluations des risques.

IV.2 Cas de la carbamazépine

La carbamazépine apparaît être relativement toxique avec une NOEC de 25 µg/L (reproduction chez *C. dubia* sur 7 jours) ; les gammes de concentrations testées ne sont pas données pour ce composé (Ferrari et al., 2004).
Peu de valeurs chroniques sont disponibles chez les poissons, il s'agit très majoritairement de tests de 10 jours sur la survie d'embryons. Pour les composés testés selon ce protocole, on retrouve une NOEC de 25 mg/L pour la carbamazépine (Nunes et al., 2005). Ceci a conduit à la détermination d'une valeur de PNEC égale 2,5 µg/L.
Le métabolite principal de la carbamazépine, le 10,11-carbamazépine époxide est un métabolite d'intérêt. En effet, il est suspecté d'être responsable des intoxications liées à la carbamazépine (Besse et Garric, 2007). A notre connaissance, il n'existe pas de données écotoxicologiques sur les produits de métabolisation de la carbamazépine.

IV.3 Cas des agents de contraste iodés

Les travaux bibliographiques accomplis se sont révélés infructueux dans l'acquisition de données d'écotoxicité des produits de contraste sélectionnés. De manière générale, il est couramment admis que ces molécules ne présentent pas de toxicité avérée pour les organismes du milieu.

Comme le souligne Perez (2007), ce n'est pas parce qu'aucun effet écotoxicologique n'est avéré à l'issue des tests de toxicité aiguë qu'il n'existe aucun risque lié à des expositions chroniques à ces molécules.

IV.4 Toxicité des mélanges

Cleuvers (Cleuvers 2003) a étudié les effets de deux mélanges de substances médicamenteuses sur des daphnies et des algues. Le premier essai concerne un mélange d'acide clofibrique et de carbamazépine. Les résultats obtenus suggèrent une additivité d'action des deux composés sur la daphnie avec une toxicité qui augmente de manière importante (pour des concentrations équivalentes entre mélange et composés simples. L'acide clofibrique provoque une immobilisation de 1 % des daphnies, la carbamazépine 16 % et le mélange une immobilisation de 95 %. Dans le cas des algues, il semble que les composés agissent de manière indépendante. Le deuxième mélange concerne deux AINS : l'ibuprofène et le diclofénac ; dans ce cas, la toxicité du mélange pour la daphnie est supérieure à une simple additivité des effets, suggérant un effet synergique. Pour les algues, l'action du mélange suit les concepts d'additivité des effets. L'auteur pense que l'action des mélanges n'est pas lié à un mécanisme précis d'action mais à un effet non spécifique dit de narcose non-polaire. Selon Ferrari et al. (2004), les cyanophytes sont les espèces les plus sensibles dans le cas de l'acide clofibrique et du diclofénac et les diatomées (bacillariophytes) sont plus sensibles à la carbamazépine et au propanolol.

suite page suivante

B/ ENJEUX ANALYTIQUES

V Contexte

Une procédure analytique repose sur 5 étapes :

- l'échantillonnage ;
- le traitement de l'échantillon ;
- la séparation ;
- la détection ;
- le traitement des données.

Il est important de garder en mémoire que la performance d'une méthode repose sur le contrôle et la réussite de chacune des 5 étapes sus-nommées.
Cette étude de la bibliographie ne traitera pas des problématiques liées l'échantillonnage.

V.1 La préparation de l'échantillon

Le principe de cette étape est de convertir une matrice en un échantillon "analysable". Ce faisant, elle modifie les interactions des analytes avec leur environnement proche. Ces interactions sont déterminées par les propriétés physiques et chimiques de l'analyte et de la matrice ; elles dictent l'applicabilité des méthodologies et sont susceptibles d'en affecter l'efficacité et la reproductibilité (Pavlovic et al., 2007). C'est pourquoi il est nécessaire de caractériser l'échantillon d'un point de vue physico-chimique et de connaître les propriétés physico-chimiques des molécules ciblées.

Concernant les substances pharmaceutiques, les paramètres principaux sont les valeurs de log Kow (le log Kow renseigne le caractère lipophile de la molécule) et les valeurs de pKa (le pKa renseigne la forme sous laquelle se trouvera une molécule à un pH donné). Les phénomènes matriciels sont extrêmement problématiques dès lors que l'on s'intéresse aux substances pharmaceutiques qui sont présentes à l'état de traces dans les matrices complexes. Un effet matriciel peut être définit comme étant l'influence d'une propriété de l'échantillon, indépendante de taux de récupération, de la présence de l'analyte et de la prise d'essai (Pavlovic et al., 2007).

Tableau 4 : Schéma de principe des objectifs de la préparation de l'échantillon

Objectifs de la préparation de l'échantillon	Exigences actuelles liées à la préparation de l'échantillon
1/ Eliminer les interférences; 2/ Augmenter la concentration de l'analyte; 3/ Convertir l'analyte sous une forme propice à l'analyse; 4/ Fournir une méthode robuste et reproductible indépendamment de la nature de la matrice	1/ Diminuer les tailles d'échantillon, les volumes d'échantillon, les volumes de solvant; 2/ Augmenter la spécificité et la sélectivité de l'extraction; 3/ Augmenter le recours à l'automatisation

Les substances pharmaceutiques sont présentes dans l'environnement à l'état de traces y compris dans des matrices complexes. Par conséquent, leur analyse nécessite la mise en place d'étapes de préparation de l'échantillon : extraction, concentration, dérivation (Tableau 4).
Pour les échantillons aqueux, les méthodes d'extraction en phase solide ont très largement supplée les approches de type classique extraction liquide-liquide. De nombreuses revues se sont attachées à détailler ces étapes. La phase de type HLB© (Hydrophilic Lipophilic Balanced) est clairement la phase la plus employée parce qu'elle permet une extraction simultanée, des composés polaires et non polaires, nécessaire à la mise en place des méthodes d'analyse multirésidus. Un certain nombre de travaux se sont également intéressés à des transferts en mode on line de ces approches avec couplage à des techniques de CL-SM afin de diminuer les temps d'analyse et d'améliorer la consistance des données générées.

Quelques applications de la technique de micro-extraction en phase solide sont notables mais le manque de robustesse de l'outil représente une limitation forte quant à son emploi dans des optiques quantitatives. Cependant, cette technique est apparue comme extrêmement performante dans une optique de préparation de l'échantillon. D'autres techniques ont également émergé, ce sont des dérivés de l'extraction liquide-liquide (LPME ; extraction membranaire) ; leur usage est, pour l'heure, peu répandu du fait de leur manque de robustesse.

Concernant les matrices solides, les techniques mises en œuvre sont communes à l'ensemble des molécules organiques et ont fait l'objet de plusieurs travaux de synthèse. Etant donné le caractère hydrosoluble des molécules, très peu de données méthodologiques sont disponibles dans la bibliographie.

V.2 La séparation-détection

Comme cela a été mentionné par de nombreuses revues scientifiques, l'analyse des substances pharmaceutiques peut être accomplie par chromatographie en phase gazeuse et/ou chromatographie en phase liquide. Quelle que soit la technique de séparation envisagée, le couplage avec un détecteur de spectrométrie de masse est généralisé en raison de leurs performances intrinsèques en terme de spécificité et de limite de quantification.

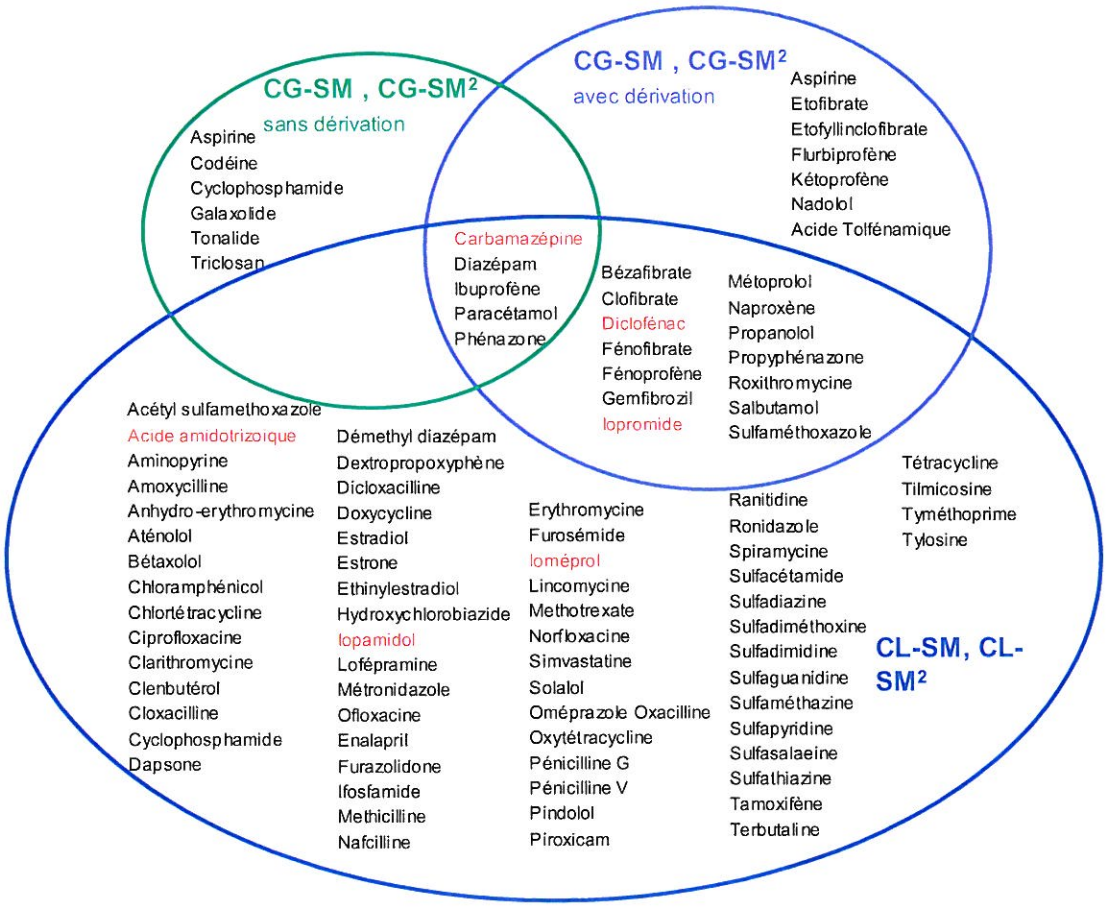


Figure 3 : Techniques d'analyse et molécules pharmaceutiques (d'après Fatta et al., 2007)

V.2.1 Analyse par chromatographie en phase gazeuse

Les couplages mettant en jeu la chromatographie en phase gazeuse (CG) ont été les premiers à être mis en œuvre dans les études ciblant les composés pharmaceutiques. Ils sont encore très largement utilisés en raison de leur disponibilité dans les laboratoires d'analyse.

A l'exception de certaines molécules pharmaceutiques neutres, la grande majorité des molécules pharmaceutiques sont polaires, non-volatiles et thermo-labiles ce qui les rend difficilement Les couplages à des détecteurs de type spectromètre de masse représentent la référence de travail pour leur sensibilité, leur spécificité et pour leur banques de données spectrales. Le recours à l'ionisation par impact électronique à 70 eV est généralisé même si l'usage de l'ionisation chimique négative a été envisagée dans certaines études pour sa très haute sensibilité. Simple quadripôle, triple quadripôle, trappes à ions ont fait l'objet d'investigations qui ont mis en avant leur performances à identifier et quantifier des molécules pharmaceutiques dans les matrices environnementales à l'état de traces.
analysables par chromatographie en phase gazeuse.

a) La dérivation

Un nombre important d'agents de dérivation existe sur le marché. Le recours à cette étape supplémentaire de préparation de l'échantillon est un facteur limitant majeur pour l'application des techniques de chromatographie en phase gazeuse. Les principaux verrous posés par cette technique sont les suivants :

- l'étape de dérivation est consommatrice en temps ;
- les rendements de dérivation peuvent être affectés par un certain nombre de paramètres : nature de l'agent de dérivation, température de réaction, matrices, etc.... ;
- l'étape de dérivation engendre une dénaturation de l'échantillon ;
- selon le type d'agent de dérivation employé, des problèmes de stabilité des analytes dans l'échantillon peuvent être observés (eg, phénomènes d'hydrolyse versus réactions de sylilation).

b) Les molécules thermo-labiles

Une autre limitation importante de la technique peut-être ici illustrée par la carbamazépine : exemple d'une molécule thermo-labile.

⇒ Exemple de la carbamazépine

L'analyse de la carbamazépine est difficile à mettre en œuvre par CG-SM du fait de sa dégradation partielle (thermique) en iminostilbène dans l'injecteur. Ce phénomène a initialement été mis en évidence par Frigerio et al. (1973). Gomez et al. (2007), Duran et Alvarez (2007), Vogna et al. (2004) ont également observé qu'en dépit de ce phénomène, la fidélité de la mesure est suffisante avec une répétabilité et reproductibilité considérées comme acceptable. Se faisant aucune correction des mesures n'a été entreprise afin de prendre en compte la contribution de l'iminostilbène. Parce que certains auteurs suggèrent que le phénomène est dépendant de l'état de l'injecteur, il apparaît plus qu'évident que le recours à la technique de CL-SM est souhaitable.

La séparation est généralement acquise sur des colonnes classiques présentant des phases stationnaires de type DB5MS, DB5 et HP5MS ou leur équivalent et de dimension 30 m * 0,25 mm * 0,25 µm, en mode gradient 50 à 300°C.

Ces couplages se sont vus challengés par les couplages mettant en jeu des techniques de chromatographie en phase liquide-ionisation à pression atmosphérique - spectrométrie de masse qui sont compatibles avec l'analyse de composés polaires, peu volatiles.

V.2.2. Analyse par chromatographie en phase liquide

La séparation est classiquement réalisée sur des colonnes en phase inverse de type C18, C8 et nécessite des étapes de développement importantes concernant l'optimisation de la séparation de certaines classes de molécules avec le recours à des agents d'appariement d'ions. Au regard de la grande diversité des molécules ciblées, le recours à des phases tamponnées est classique. De

nouveaux types de phase stationnaire ont été designés pour la séparation des molécules hautement polaires : chromatographie de type HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography).
Très récemment la commercialisation de nouveaux types de colonnes de chromatographie en phase liquide ultra rapide (UPLC, RRLC) a soulevé un engouement majeur. Ces colonnes présentent une efficacité plus importante dont résultent des pics chromatographiques plus fins, une meilleure séparation et des temps d'analyse plus courts.
L'ionisation à pression atmosphérique est généralement réalisée par electrospray même si dans des applications très spécifiques le recours à l'ionisation chimique à pression atmosphérique, la photo-ionisation à pression atmosphérique sont rapportées.

Comme cela a déjà été mentionné, les détecteurs de type triple quadripôle sont très largement utilisés pour leur sensibilité et leur sélectivité. Le développement de nouvelles techniques hybrides trappes à ions linéaires/quadripôle qui combinent les capacités des triples quadripôles (QqQ) et des trappes à ions en une seule plate-forme offrent de nombreuses possibilités quant à la détermination de « vrais positifs » avec une confiance importante.

Les techniques de couplage CL-SM-SM sont maintenant unanimement reconnues comme les techniques de référence pour l'analyse des substances pharmaceutiques et de leurs métabolites. Et cela, en dépit d'une de leur limitation majeure : leur forte susceptibilité aux effets matriciels.

V.2.3. Les effets matriciels

Les effets matriciels existent aussi bien dans les couplages de chromatographie en phase gazeuse avec la spectrométrie de masse que dans les couplages de chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse et peuvent affecter la qualité des données générées. Ce phénomène est quasi incontournable dans les couplages CL-SM et CL-SM-SM, plus rare dans les couplages de CG-SM et CG-SM-SM.

Il peut conduire à une suppression du signal partielle ou totale (faux négatif) ou à une amélioration du signal (faux positif). Il peut être généré par les composés interférents, présents dans les extraits, et qui possèdent des ions similaires (à la fois en SM simple ou en SM tandem). Dans cette configuration, le problème peut être résolu par le choix d'un autre ion non interféré, par l'amélioration de la procédure de préparation de l'échantillon (purification plus poussée, changement des conditions de préparation) ou par l'amélioration du processus de séparation (en CG comme en CL).

L'effet matriciel engendré par une interaction/compétition entre l'analyte et les composantes de la matrice est propre aux couplages mettant en jeu la CL-SM (SM-SM, etc....). En effet, ces couplages reposent sur la mise en oeuvre d'un processus d'ionisation dit à pression atmosphérique qui est considéré comme un processus d'ionisation doux par comparaison à l'impact électronique (processus qui entraîne une fragmentation de la molécule visée et également de la matrice) couramment employé dans les couplages de chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse. En chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, ce phénomène a été mis en évidence dans les 2 modes d'ionisation les plus répandus (electrospay (ESI) et ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)), bien qu'il y ait une prévalence des effets en mode electrospray. Pour contrer ce phénomène, plusieurs stratégies sont classiquement mises en oeuvre (Kloepfer et al., 2005; Antignac et al., 2005) : purification de l'échantillon (complexe à mettre en oeuvre dans les analyses multirésidus, problème de pertes des composés d'intérêt), amélioration de la technique de séparation (Van De Steene et al., 2006; Van De Steene and Lambert, 2008), dilution des extraits, division (split) avant l'entrée dans le spectromètre de masse. Plus généralement, la mise en oeuvre de différentes méthodes de calibration peuvent être envisagées pour générer des données plus fiables (méthode des ajouts dosés (Baugros et al., 2008), double étalonnage (étalon interne et étalon d'injection), méthode de dilution isotopique).

VI Méthodes analytiques disponibles sur le site NORMAN

VI.1 Le réseau NORMAN, un bref rappel

Le réseau NORMAN a commencé ses activités en septembre 2005 avec l'aide financière de la Commission européenne (projet NORMAN - 6ème programme-cadre N° 018486).Il est maintenant établi comme un réseau auto-entretenu permanent des laboratoire de référence, de centres de recherche et d' organismes connexes impliqués dans la surveillance et le biomonitoring des substances émergentes dans l'environnement. Ses missions sont d'augmenter les échanges d'informations et la collecte des données substances émergentes dans l'environnement; d' encourager la validation et l'harmonisation des méthodes de mesure et de surveillance, d' assurer et de favoriser la connaissance sur les polluants émergents par des projets de recherche interdisciplinaires et collaboratifs.

VI.2. La validation de méthode sous NORMAN, un bref rappel

La validation de méthode est le processus de vérification que la méthode est ajustée à son objectif initial, c'est à dire pour fournir des données appropriées pour solutionner un problème particulier ou répondre à une question particulière. Ce processus inclut :

- d'établir les caractéristiques de performances, les avantages et les limites de la méthode et
- d'identifier les facteurs qui influencent et peuvent affecter ces caractéristiques et leur étendu,
- d'évaluer de manière détaillée les résultats de ce processus en relation avec les intentions (initiales) de la méthode, eg concordance.

VI.3. Exploitation de la base de données NORMAN

Les résultats issus de l'investigation de la base de données Norman sont présentés dans les tableaux. Un certain nombre d'éléments peuvent être tirés de ce travail et sont exposés dans les points ci dessous.

- Sur l'ensemble des molécules sélectionnées, seuls la carbamazépine et le diclofénac voient des méthodes renseignées ce qui est justifié par la fait que ces deux molécules sont les molécules pharmaceutiques les plus étudiées. La base de données ne recense aucune méthodes d'analyse des agents de contraste ce qui est là aussi cohérent avec les intérêts de la recherche européenne actuelle.

- La base de données ne présente aucune méthode pour des métabolites ou des produits de transformation connus de ces molécules.

- L'hétérogénéité des pratiques analytiques (fraction caractérisée, détection, niveau de validation, etc....) et des critères de performances analytiques (limites de quantification, maîtrise des incertitudes, etc...) est notable et confirme la nécessaire harmonisation des méthodologies et leur transfert vers la normalisation.

- Il est intéressant de noter que la grande majorité des laboratoires qui ont renseigné la base de données ont participé à l'essai inter laboratoires organisé par Norman en 2007 (Case study 2) sur les anti-inflammatoires non stéroïdiens (incluant le diclofénac). Preuve une nouvelle fois du grand dynamisme et de la grande volonté de l'ensemble de la communauté de recherche européenne. Cela conforte également l'idée que le recours à ce type d'essai inter laboratoires est indispensable à l'amélioration de la fiabilité et de la qualité des données.

En l'état actuel, la base Norman constitue une première approche dans la recherche de méthodes d'analyse de substances pharmaceutiques dans les matrices environnementales. Cependant, force est de constater, qu'il est plus qu'indispensable de rester critique quant aux niveaux de renseignements et de validation des méthodes référencées.

Tableau 5 : Exploitation de la base de données méthodes NORMAN pour la carbamazépine

CARBAMAZEPINE	Lab 1	Lab2	Lab3		Lab 4	Lab 5
Fraction	totale (analyse indépendante)	non renseigné	dissoute	dissoute	dissoute	dissoute
Préparation d'échantillon	SPE	SPE	SPE	online SPE	SPE	SPE
Séparation / Détection	CL/SM CL/SM^2	CL/SM CL/SM^2	CG/SM CG/SM^2	CL/DAD	CL/SM CL/SM^2	CL/SM CL/SM^2
LoD	0,0005 µg/L	0,002 µg/L	0,02 µg/L	0,005 µg/L	0,001 µg/L	0,001 µg/L
LoQ	0,001 µg/L	0,011 µg/L	0,05 µg/L U=10% (k=2)	0,010 µg/L U=10% (k=2)	0,001 µg/L	0,001 µg/L
Niveau de validation Norman	non	non renseigné	V1	V1	V1	non renseigné
Correction des données par le rendement	oui	oui	non	non	oui	oui
Blanc de terrain	oui	oui	oui	oui	oui	non
Le laboratoire est il accrédité ISO 17025 ?	non	non renseigné	oui	oui	non	oui
Le laboratoire est il accrédité pour le paramètre ?	non	non renseigné	non	non	non	non
Le laboratoire a-t-il participé à des essais inter laboratoires ?	non	non	non	non	non	non

Tableau 6 : Exploitation de la base de données méthodes NORMAN pour le diclofénac

DICLOFENAC	Lab 1	Lab2	Lab3		Lab 4	Lab 5		Lab 6	Lab 7
Fraction	totale (analyse indépendante)	non renseigné	dissoute	dissoute	dissoute	totale	totale	dissoute	dissoute
Préparation d'échantillon	SPE	SPE	online SPE	online SPE	SPE	LLE	online SPE	SPE	SPE
Séparation / Détection	CL/SM CL/SM^2	CL/SM CL/SM^2	CG/SM CG/SM^2	CL/DAD	CG/SM CG/SM^2	CG/SM CG/SM^2	CL/DAD	CL/SM CL/SM^2	CL/SM CL/SM^2
LoD	0,0005 µg/L	0,002 µg/L	0,01µg/L	0,005 µg/L	0,003 µg/L	0,01 µg/L	0,005 µg/L	0,001 µg/L	0,002 µg/L
LoQ	0,001 µg/L	0,006 µg/L	0,05 µg/L U=5% (k=2)	0,010 µg/L U=5% (k=2)	0,009 µg/L	0,05 µg/L U=11% (k=2)	0,010 µg/L U=11% (k=2)	0,001 µg/L	0,007 µg/L U=56%
Niveau de validation Norman	V2	non renseigné	non renseigné	non renseigné	non	V1	V1	V3	V3
Correction des données par le rendement	oui	oui	non	non	oui	non	non	oui	oui
Blanc de terrain	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	non
Le laboratoire est il accrédité ISO 17025 ?	non	non renseigné	oui	oui	non renseigné	oui	oui	non	oui
Le laboratoire est il accrédité pour le paramètre ?	non	non renseigné	non	non	non renseigné	non	non	non	oui
Le laboratoire a-t-il participé à des essais inter laboratoires ?	oui	oui	oui (Z score <3)	oui (Z score <3)	Oui (Z score <3)	oui (Z score <3)	oui (Z score <3)	oui	non

VII Autres méthodes disponibles

Parce que la base de données NORMAN est apparu comme trop peu représentative, un travail de recherche de bibliographie annexe a été conduit. Il s'est focalisé sur d'une part la recherche de méthodes d'analyse des produits de contraste iodés dans les matrices environnementales aqueuses et d'autre part sur la recherche de méthodes d'analyse de la carbamazépine et du diclofénac prenant en compte leurs métabolites et produits de transformation connus. Une synthèse (méthodes et critères de performances associés) de cette recherche est présentée dans les Tableaux 7, 8, 9.
Une lecture critique de ses tableaux de synthèse permet de dresser un panorama objectif de l'état des pratiques analytiques aussi bien en terme de développement de méthodes que de leur validation tel qu'il peut être observé en se basant sur un état de l'art des publications disponibles à ce jour. Tout d'abord, il faut noter que le faible nombre d'études à s'être focalisé sur les associations produits parents-produits de transformation affecte la représentativité des interprétations et des discussions exposées ci-après. Elle n'en altère cependant pas la pertinence. Leur extrapolation à l'ensemble des méthodologies et pratiques s'adressant à l'étude des résidus médicamenteux pourrait être délicate.

Le premier élément remarquable est l'hétérogénéité des méthodologies de traitement de l'échantillon (pour une même classe de molécules ou entre les différentes classes de molécules qui sont référencées dans ces études et qui laisse présager que la normalisation d'une méthode «universelle» ou «unique» de préparation de l'échantillon visant à l'analyse quantitative de résidus médicamenteux dans les matrices environnementales aqueuses sera techniquement complexe. De gros efforts devront être entrepris afin d'évaluer les différentes méthodologies disponibles et de sélectionner les meilleures techniques disponibles (ce qui nécessitera auparavant de définir précisément les objectifs visés par ces travaux et les critères de décision).
Concernant les méthodes de séparation et de détection, la généralisation des approches mettant en jeu la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem n'est pas surprenante et d'autant plus pertinente que l'on s'intéresse ici à des produits de métabolisation qui sont caractérisées par un net caractère polaire.

Dès lors que la réflexion se porte sur l'évaluation des critères de performances méthodologiques, l'analyse est rendue difficile par l'hétérogénéité de la terminologie employée par les différentes études et par les plans d'expérimentations associées (notamment concernant les critères tels que la limite de quantification, l'évaluation des effets matriciels ; le calcul des taux de récupération l'évaluation de la spécificité de la méthode, le choix des méthodes de quantification); ce qui rend toutes comparaisons très délicate. Il est également remarquable de mettre en avant qu'un certain nombre de ses éléments ne sont pas renseignés dans les études alors qu'ils sont susceptibles d'en affecter la pertinence ou tout du moins la fiabilité des données générées. Plus largement, il est également remarquable de souligner que l'ensemble des travaux évoqués au travers de cette revue bibliographique ne renseigne pas de la conduite d'étude de stabilité des échantillons au cours du processus analytique; notamment entre le temps d'échantillonnage et le commencement des étapes de pré-traitement de l'échantillon; au cours des étapes de traitement de l'échantillon. Ceci est d'autant plus notable si l'on considère que ces études se focalisent sur des produits de transformation. Même si une part importante de ces molécules est issue du métabolisme humain, il est crucial de garder à l'esprit qu'un certain nombre d'entre elles (produits de transformation) peut également être issu des mécanismes de transformation biologiques qui peuvent se dérouler dans les matrices naturelles (au sein desquelles une flore bactérienne disposant des arsenaux enzymatiques nécessaires à la conduite d'activité de métabolisation peut être présente). Enfin, une analyse critique des méthodes disponibles permet de mettre en avant l'absence de renseignements concernant les niveaux d'incertitudes liés aux méthodologies exposées (incertitudes élargies avec k=2). Il est ici utile de rappeler que d'une part ce paramètre est une exigence de la directive QA/QC (2009/90/CE) et de la norme NF 90-210 (2009) et d'autre part ce paramètre est indispensable à la comparabilité des données de mesure ainsi qu'à l'estimation des tendances qui sont deux points fondamentaux de la surveillance chimique des milieux.

Ces constats ne font que renforcer le besoin d'harmoniser un modus operandi pour le développement et la validation de méthodes d'analyse quantitative en général et applicable aux résidus médicamenteux en particulier.

En résumé, un nombre important d'efforts dans le domaine de la validation et de l'harmonisation de méthodes d'analyses pour les produits sélectionnées et leurs métabolites de dégradation doit être entrepris afin d'améliorer la qualité et la comparabilité des données de mesure.

Suite du rapport page suivante

LNE

Tableau 7 : Méthodes d'analyses des produits de contraste iodés

Molécules	Matrices	Préparation échantillon	Méthode d'extraction	Méthode de purification	Méthode d'analyse	
Iopromide + Acide amidotrizoique + Iopamidol + Iohexol, Acide ioxaglique + Acide iothalamique + Iodipamide + Ioméprol	STEP	Ajout de 100 mg/L sodium azide dans la bouteille avant échantillonnage. Conservation 4°C	Injection Directe		HPLC	Micromass Quattro Ultima Triple Quadrupole
					Phenomenex Gemini C18 125 mm*3 mm id; 3 µm	ESI$^+$
					A : ACN 0,01% acide acétique	
					B : eau 10mM ammonium formate, 0,5% acide acétique, 1% ACN	
Iopromide + Diatrizoate + Iohexol + Iotrolan + 4 métabolites	STEP, eaux de surface	Filtration 0,45 µm Ajustement pH 3,5 pour passage sur LiChrolut EN; pH 2 pour Envi-carb	Extraction séquentielle SPE		HPLC	PDA
			LiChrolut EN (200 mg, Merck)	Envi-Carb (250 mg, Supelco)	Luna C18 125 mm*2 mm id; 3µm	Micromass Quattro LC Triple Quadrupole
			Elution : 6 mL MeOH	Elution : 8 mL ACN-Eau (50:50;v/v)	A : eau ultrapure+ 0,05 % acide trifluoroacétique	ESI$^+$
					B : MeOH + 0,05 % acide trifluoroacétique	
Iopromide + Iohexol + Iopamidol + Ioméprol	Eaux de surface	Acidification pH3 (Ac. Sulf.)	SPE ENV+ (200 mg, Separtis)		HPLC	Trappe à ions MS/MS
			4*1 mL MeOH		Phenomenex Luna RP C18 250mm*4,6mm; 5µm	ESI$^+$
					A : eau ultrapure+10 mL/L ACN, 5 mL/L acide formique, 1mL/L formiate ammonium 5 M	
					B : ACN	Micromass Quattro LC Triple Quadrupole
Iopromide + Diatrizoate + Iotrolan + Acide Iotroxine	Eaux de surface, eaux de boisson	Filtration 0,45 µm Ajustement pH 4,5	Extraction séquentielle SPE		HPLC	
			LiChrolut EN (200 mg, Merck)	Envi-Carb (250 mg, Supelco)	Luna C18 150mm*2mm id; 3µm	ESI$^+$
			Elution : 6 mL MeOH	Elution : 8 mL ACN-Eau (50:50;v/v)	A : eau ultrapure + 0,05 % acide trifluoroacétique	
					B : MeOH + 0,05 % acide trifluoroacétique	
Iopromide + Acide amidotrizoique + Iopamidol + Iohexol + Acide iothalamique + Ioméprol	Eaux de surface, eaux de puits	Pas de pré-traitement	pas de pré-traitement		Chromatographie Ionique CI	ICP-MS
Iomeprol + Iohexol + Diatrazoate + Iopamidol + Iopromide + Acide iothalamique + Acide ioxithalamique	Boues de stations d'épuration	Filtration sur GF8	Extraction ultrasons	SPE ENV+ Isolut (200 mg)	HPLC	API 365 Triple Quadrupole
			MeOH puis Acé	pH : 2,8 (H_2SO_4)	Lichrospher RP C18ec 125 mm* 3 mm; 5 µm	ESI$^+$
			Reconcentration	Elution : 4*1 mL MeOH	A : 5 mM acétate ammonium (pH=5,7)	
					B : ACN	

Sensibilité		Rendements	Méthode de quantification	Effets matriciels	Références
LOD (S/N=3) eau milli Q	LOD (S/N=3) effluents	non appropriée	nr	vérifiés, contournés par méthode des ajouts dosés	Busetti et al. (2008)
0,12 à 0,49 µg/L	0,11 à 0,97 µg/L				
LOD		eau supplémentée 3 niveaux de contamination (n=3)	supplémentation de l'extrait avant extraction (comparaison extrait supplémenté-extrait non supplémenté)	vérifiés, contournés par méthode des ajouts dosés	Putschew et al. (2001)
		10 µg/L R= 80 % ± 15 % à 100 % ± 10 %			
		5 µg/L R= 80 % ± 5 % à 100 % ± 10 %			
		1µg/L R= 80 % ± 5 % à 100 % ±10 %			
LOQ eaux de surface		Rendements n=12	nr	non vérifiés	Seitz et al. (2006)
< 40 ng/L		35 % ± 6 % à 79 % ± 10 %			
LOD		eau supplémentée 10 µg (n=3)	supplémentation de l'extrait avant extraction (comparaison extrait supplémenté-extrait non supplémenté)	vérifiés, contournés par méthode des ajouts dosés	Putschew et al. (2000)
0,05 µg/L		eau ultrapure R= 43 % à 110 %			
		eau surface R= 56 % à 100 %			
		eau boisson R= 50 % à 114 %			
LOD	LOQ		NR		Sacher et al. (2005)
0,13 à 0,21 µg/L	0,39 à 0,77 µg/L				
LOD	LOQ 50 ng/g	R= 88 % ± 4 % à 119 % ± 30 % dans les boues ; R= 54 % ± 7 % à 85 % ± 11 % dans les boues digérées	Etalonnage interne	NR	Ternes et al. (2005)

Tableau 8 : Méthodologies analytiques pour l'étude de la carbamazépine et de ses métabolites

Molécules	Matrices	Préparation échantillon	Méthode d'extraction	Méthode de purification	Méthode d'analyse	
Carbamazépine + Carbamazépine époxide + Oxcarbazépine + 10-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazépine + Carbamazépine-10,11-époxide + 2-hydroxycarbamazépine + 3-hydroxycarbamazépine + 1011-dihydro-10,11-trans-dihydroxycarbamazépine+ Iminostilbène + Iminoquinone+ 9-acridan	Plasma humain	-20°C	Extraction Acé puis centrifugation		HPLC	Mass spectrometer HP1100
					Zorbax XD8 150 mm*4,6 mm; 5 µm	ESI$^+$
					A: tampon formate (2 mM, pH 3)	
					B : ACN	
Carbamazépine+ Oxcarbazépine + 10-hydroxy-10,11-dihydrocarbamazépine+ Carbamazépine-10,11-époxide + 2-hydroxycarbamazépine + 10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxycarbamazépine + Iminostilbène + acridine+ acridone + 9-hydroxy-méthyl-10-carbamoylacridan	Eaux de STEP	Stockage à 4°C, 48 heures Filtration GF/C	Extraction SPE		HPLC	Mass spectrometer HP1100
			OASIS HLB		Zorbax XD8 150 mm*4,6 mm; 5 µm	ESI$^+$
			Elution 2 * 5 mL EA		A : tampon formate (2mM, pH 3)	
					B : ACN	
Carbamazépine + 10,11-dihydro-10,11-époxycarbamazépine + 10,11-dihydro-10-hydroxycarbamazépine-10,11-époxide + 2-hydroxycarbamazépine + 3-hydroxycarbamazépine + 10,11-dihydro-10,11-trans-dihydroxycarbamazépine+ 10,11-dihydroxycarbamazépine	Eaux de STEP, Eaux de surface	Stockage 4°C, 24 heures Filtration 1,5 µm; Tamponnage pH 7,0 (3M H_2SO_4 + 1,0 M NaOH)	Extraction SPE		HPLC	Micromass mass spectrometer Quatro LC Triple Quadrupole
			OASIS HLB		Genesis C8 150 mm*2,1 mm; 3 µm	
			Elution 3 *2 mL MeOH		A : 10 mM acétate ammonium (0,1% acide formique, pH 4)	ESI$^+$
					B : ACN/MeOH	

<table>
<tr><th colspan="2">Sensibilité</th><th>Spécificité</th><th>Rendements</th><th>Méthode de quantification</th><th>Effets matriciels</th><th>Références</th></tr>
<tr><td colspan="2">LLOQ (mg/L)</td><td rowspan="2">vérifiée</td><td rowspan="2">80 à 105 % selon les composés</td><td rowspan="2">étalonnage interne</td><td rowspan="2">vérifiés entre 1,75 % et 4,43 %</td><td rowspan="2">Le breton et al. (2005)</td></tr>
<tr><td colspan="2">0,023 à 0,5 mg/L selon les composés</td></tr>
<tr><td>LOD (ng/L)</td><td>LOQ (ng/L)</td><td rowspan="2">non vérifiée</td><td rowspan="2">77,0 % à 98,3 % selon les composés</td><td rowspan="2">étalonnage interne</td><td rowspan="2">nr</td><td rowspan="2">Leclercq et al. (2008)</td></tr>
<tr><td>1,8 à 10,8 selon les composés</td><td>5,0 à 20,1 selon les composés</td></tr>
<tr><td colspan="2">IDL (pg injecté) (S/N 3)</td><td rowspan="4">non vérifiée</td><td>Eaux de surface : 95,7 % ± 4,8 % à 102,9 % ± 4,1 %</td><td rowspan="4">étalonnage interne</td><td rowspan="4">vérifiés, très importants dans les échantillons entrée STEP</td><td rowspan="4">Miao et al. (2003)</td></tr>
<tr><td colspan="2" rowspan="3">0,8 à 4,8 pg selon le composé</td><td>Entrée STEP : 90,6 % ± 5,4 % à 103,5 % ± 5,8 %</td></tr>
<tr><td>Sortie STEP : 83,6 % ± 4,9 % à 102,2 % ± 3,1 %</td></tr>
</table>

Tableau 9 : Méthodes d'analyse du diclofénac et de ses métabolites

Molécules	Matrices	Préparation échantillon	Méthode d'extraction	Méthode de purification	Méthode d'analyse	
			SPE		HPLC	TSQ 7000 (Thermo)
Diclofénac+5-Hydroxydiclofénac + 4'-Hydroxydiclofénac + 4'-hydroxy diclofénac déhydrate	Eaux STEP	Filtration 5951/2; acidification pH 6,3 acide citrique	Bakerbond PolarPlus C18 (1 g)	nr	Nucleodur sphinx RP 250 mm*2 mm*5 µm	Triple quadruple
			3*2 mL MeOH		A : eau + 0,1% acide formique	ESI^-
					B : ACN + 0,1 % acide formique	

Sensibilité		Spécificité	Rendements	Méthode de quantification	Effets matriciels	Références
LOD (S/N =3)	LOQ (3*LOD)		Eau ultrapure			
18 à 23 ng/L selon le composé	55 à 69 ng/L selon le composé	nr	62 % ± 4,7 % à 81 % ± 2,1 % selon le composé	Etalon interne et étalonnage externe	nr	Stülten et al. (2008)

LOD : limite de détection ; LOQ limite de quantification ; Acé Acétone ; MeOH Méthanol ; ACN Acétonitrile ; EA Acétate d'éthyle ; nr non renseigné ; IDL Limite de détection instrumentale ; LLOQ plus petite limite de quantification ; STEP Station d'épuration ; H_2SO_4 Acide sulfurique

VIII Conclusion - Evolutions nécessaires

Au cours des 5 dernières années, un nombre important de revues a été publié couvrant les domaines de la préparation de l'échantillon à l'analyse, que ce soit pour des matrices liquides ou solides. La Figure 4 présente une synthèse des principaux faits marquants qu'elles ont apporté.

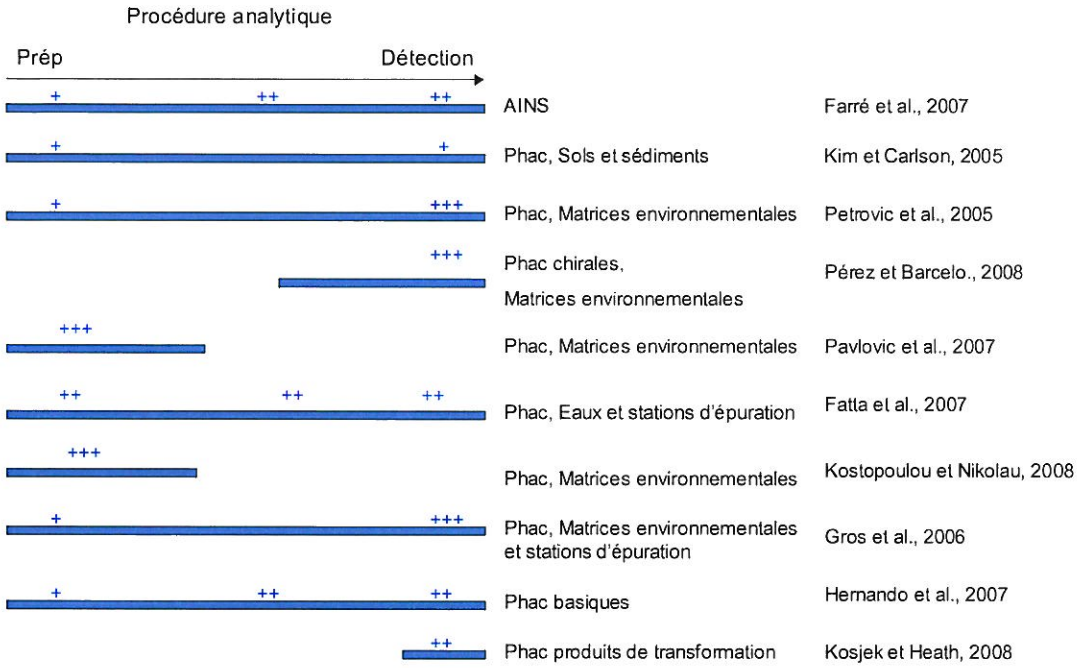


Figure 4 : Principaux domaines d'intérêt des états de l'art analytique de la bibliographie.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence certains éléments clés qui sont présentés ci dessous et qui ont également conditionné les choix de développement et de recherche proposés en 2009 :

⇒ **Petrovic et al. (2005)** mettent en avant la nécessité de développer des méthodes génériques qui permettront la détermination simultanée des composés pharmaceutiques parents et leurs produits de dégradation ;

⇒ **Kim et al. (2005)** mettent en avant le manque de méthodes analytiques fiables pour mesurer les molécules pharmaceutiques dans les matrices solides, notamment et la nécessiter d'y palier afin de parvenir à une meilleure compréhension des risques environnementaux liés à ces molécules ;

⇒ **Farré et al. (2007)** mettent en avant la nécessité de déterminer les voies de dégradation, dans ce cas précis, des anti-inflammatoires non stéroïdiens et d'évaluer ces métabolites et produits de transformation. Les auteurs mettent en perspective les potentialités offertes par les nouveaux spectromètres de masse hybrides (TOF/SM ; Q/TOF) pour y parvenir ;

⇒ **Fatta et al. (2007)** mettent en avant la nécessité de poursuivre d'une part les approches visant à diminuer les limites de détection et d'autre part les développements méthodologiques afin de tendre vers des mélanges plus complexes ;

⇒ **Kostopoulou et al. (2008)** rapportent l'important besoin d'améliorer d'une part l'exactitude des méthodes et d'autre part la sensibilité. Les auteurs encouragent les futures recherches à évaluer l'impact des molécules pharmaceutiques et leurs métabolites et produits de transformation au sein des écosystèmes aquatiques ;

⇒ **Gros et al. (2006)** mettent en avant les tendances actuelles dans le développement de méthodes génériques qui permettent l'analyse simultanée de plusieurs classes de molécules. Les auteurs déplorent que la majorité des efforts de recherche soient toujours focalisés sur les molécules pharmaceutiques parentes alors que l'analyse simultanée des produits de transformation et des métabolites est clairement indispensable. Les auteurs proposent les nouvelles technologies de spectrométrie de masse hybride comme des solutions intéressantes à examiner ;

⇒ **Hao et al. (2007)** concluent leur étude sur la nécessité de réfléchir à des protocoles de développement «standardisés» ainsi que la généralisation de l'usage de contrôle qualité (QC) afin de maintenir un niveau de confiance important dans les données environnementales. Avec pour objectifs de permettre une meilleure évaluation et compréhension des effets écotoxicologiques liés à la présence de molécules pharmaceutiques et leurs métabolites et/ou produits de transformation dans l'environnement.

Conclusion

Les études de synthèse qui ont été menées dans le cadre de ce travail sous l'égide AQUAREF permettent de confirmer les besoins d'amélioration de la qualité et de la comparabilité des données de mesure au regard des méthodes et techniques d'analyses disponibles à ce jour pour l'analyse de résidus médicamenteux. Une harmonisation, à minima, des pratiques est plus que recommandée ; un transfert vers la normalisation est plus que souhaitable et cela d'autant plus si ces substances rentrent dans des listes de suivi DCE (bon état chimique, bon état écologique) au niveau national ou européen. Ces observations sont d'ailleurs confortées par les résultats du second exercice d'inter comparaison sur les anti-inflammatoire non stéroïdien organisé par le réseau NORMAN et qui confirme que l'harmonisation des méthodes d'analyse affecte de manière favorable la dispersion des résultats (Heath et al., 2010).
Dans l'attente que ces travaux s'initient, le LNE propose un "Modus operandi : Pour le Développement et la Validation de méthodes pour l'analyse de Substances Pharmaceutiques dans les Matrices Environnementales" dans la deuxième partie de ce travail.
Ce travail de réflexion et de proposition prend en compte un certain nombre de points techniques et pratiques liés à la validation interne des méthodes d'analyse et intègre les enjeux liés à la traçabilité métrologique des techniques d'analyse.

Paris, le 18 mai 2010

La Responsable du
Pôle Chimie et Biologie

Sophie VASLIN-REIMANN

Suite du rapport page suivante

Références Bibliographiques

Antignac, J.-P.; De Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F. et Le Bizec, B. (2005). Analytica Chimica Acta, 529 (1-2), 129-136.

Baugros, J. B.; Giroud, B.; Dessalces, G.; Grenier-Loustalot, M. F. et Cren-Oliva, C. (2008). Analytica Chimica Acta, 607, 191-203.

Bruchet A (2007). Communication personnelle colloque ASTEE, Deauville.

Busetti, F.; Linge, K.L. et Heitz A. (2009). Journal of Chromatography A, 1216, 5807–5818.

Carlsson, C.; Johansson, A. K.; Alvan, G.; Bergman, K. et Kuhler, T. (2006a). Science of the Total Environment, 364, 67-87.

Carlsson, C.; Johansson, A. K.; Alvan, G.; Bergman, K. et Kuhler, T. (2006b). Science of the Total Environment, 364, 88-95.

Christiansen, C. (2005). Toxicology, 209, 185-187.

Cleuvers, M. (2003). Toxicology Letters 142, 185-194.

Cleuvers, M. (2004). Ecotoxicology and Environmental Safety 59, 309-315.

Durán-Alvarez, J.C.; Becerril-Bravo, E.; Silva Castro, V.; Jiménez, B. et Gibson, R. (2009). Talanta, 78 (3),1159-1166.

Farré, M.; Petrovic, M. et Barceló, D. (2007). Analytical and Bioanalytical Chemistrry, 387, 1203–1214.

Fatta, D.; Achilleos, A.; Nikolaou, A. et Meric, S. (2007). TrAC - Trends in Analytical Chemistry 26,515-533.

Fenet, H.; Gomez, E.; Leclerc, M. et Casellas, C. (2006). Devenir des médicaments dans l'environnement, 5, 243-247.

Ferrari, B.; Mons, R.; Vollat, B.; Fraysse, B.; Paxeus, N.; Lo Giudice, R.; Pollio, A. et Garric, J. (2004). Environmental Toxicology and Chemistry, 23, 1344-1354.

Gomez, M. J.; Aguera, A.; Mezcua, M.; Hurtado, J.; Mocholi, F.et Fernandez-Alba, A. R. (2007). Talanta, 73, 314-320.

Gros, M.; Petrovic, M. et Barcelo, D. (2009). Analytical Chemistry, 81, 898-912.

Hao, C.; Zhao, X. et Yang P. (2007). Trends in Analytical Chemistry, 26 (6), 569-580.

Heath, E. et coll. (2010) Talanta, 1189-1198.

Heberer, T. (2002). Journal of Hydrology 266, 175-189.

Heberer, T., et Feldmann, D. (2005). Journal of Hazardous Materials 122, 211-218.

Kim, I.; Yamashita, N. et Tanaka, H. (2009). Chemosphere, 77, 518-525.

Kloepfer, A.; Quintana, J.B. et Reemtsma, T. (2005). Journal of Chromatography A, 1067 (1-2), 153-160.

Kostopoulou, M. et Nikolaou, A. (2008). TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 27 (11), 1023-1035.

Kot-Wasik, A., Debska, J., et Namiesnik, J. (2007). TrAC - Trends in Analytical Chemistry 26, 557-568.

Kummerer, K. (2004). Sources, Fate, Effects and Risks, 2nd Edition.

Kummerer, K. (2009) Journal of Environmental Management, 90, 2354-2366.

Lardy-Fontan Sophie (2008), Les substances émergentes dans les écosystèmes aquatiques français. Une application aux alkylphénol-polyéthoxylés et aux substances pharmaceutiques. n°ordre , Université Bordeaux 1.

Le Breton, H.; Cociglio, M.; Bressolle, F.; Peyriere, H.; Blayac, J. P.; et Hillaire-Buys, D. (2005). Journal of Chromatography B, 828, 80–90.

Leclercq, M.; Mathieu, O.; Gomez, E.; Casellas, C.; Fenet, H. et Hillaire-Buys, D. (2009). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 56, 408-415.

Mompelat, S.; Le Bot, B.; Thomas, O. (2009). Environment International, 35, 803-814.

Miao, X. S., Koenig, B. G., et Metcalfe, C. D. (2002). Journal of Chromatography A 952, 139-147.

Nunes, B.; Carvalho, F.; Guilhermino, L. (2005). Ecotoxicology and Environmental Safety, 61, 413-419.

Pavlovic, D. M., Babic, S., Horvat, A. J. M., et Kastelan-Macan, M. (2007). TrAC - Trends in Analytical Chemistry 26, 1062-1075.

Perez, S. et Barcelo, D. (2007). TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 26 (6), 494-514.

Petrovic, M., Gros, M., et Barcelo, D. (2006). Journal of Chromatography A, 1124, 68-81.

Petrovic, M., Hernando, M. D., Diaz-Cruz, M. S., et Barcelo, D. (2005). Journal of Chromatography A, 1067, 1-14.

Putschew, A.; Schittko, S. et Jekel, M. (2001). Journal of Chromatography A, 930, 127-134.

Putschew, A.; Wischnack, S.et Jekel, M. (2000). Science of the Total Environment, 255, 129-134.

Sacher, F.; Lange, F. T.; Brauch, H. J. et Blankenhorn, I. (2001). Journal of Chromatography A, 938, 199-210.

Schmitt-Jansen, M.; Bartels, P.; Adler, N. et Altenburger, R. (2007). Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387, 1389-1396.

Schwaiger, J.; Ferling, H.; Mallow, U.; Wintermayr, H. et Negele, R. D. (2004). Aquatic Toxicology, 68, 141-150.

Seitz, W.; Jiang, J. Q.; Weber, W. H.; Lloyd, B. J.; Maier, M. et Maier, D. (2006). Environmental Chemistry, 3, 35-39.

Ternes, T. (2001). In "ACS Symposium Series", Vol. 791, pp. 39-54.

Ternes, T., Bonerz, M., et Schmidt, T. (2001). Journal of Chromatography A, 938, 175-185.

Ternes, T. A. (1998). Water Research, 32, 3245-3260.

Ternes, T. A., Bonerz, M., Herrmann, N., Loffler, D., Keller, E., Lacida, B. B., et Alder, A. C. (2005). Journal of Chromatography A, 1067, 213-223.

Ternes, T. A., Herrmann, N., Bonerz, M., Knacker, T., Siegrist, H., et Joss, A. (2004a). Water Research, 38, 4075-4084.

Ternes, T. A., Joss, A., et Siegrist, H. (2004b). Environmental Science and Technology, 38, 392A-399A.

Ternes, T. A., Stuber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., et Teiser, B. (2003). Ozonation: Water Research, 37, 1976-1982.

Togola Anne (2006) Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques, n° ordre 3314, Université Bordeaux 1.

Togola, A., et Budzinski, H. (2007). Analytical Chemistry, 79, 6734-6741.

Togola A. et Budzinski H.(2008). Journal of Chromatography A, 1177, 150-158.

Triebskorn, R.; Casper, H.; Heyd, A.; Eikemper, R.; Kohler, H. R. et Schwaiger, (2004). Journal of Aquatic Toxicology, 68, 151-166.

Van De Steene, J.C. et Lambert, W. E. (2008). Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 19 (5), 713-718.

Van De Steene, J. C., Mortier, K. A., et Lambert, W. E. (2006). Journal of Chromatography A, 1123, 71-81.

Vogna, D.; Marotta, R.; Napolitano, A.; Andreozzi, R. et d'Ischia M. (2004). Water Research, 38, 414–422.

Autres sources

- Rapport POSEIDON : Assessment of Technologies for the Removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Sewage and Drinking Water Facilities to Improve the Indirect Potable - Water Reuse Project acronym POSEIDON Contract No. EVK1-CT-2000-00047 http//www.eu-poseidon.com Project co-ordinator: Dr. Thomas Ternes REPORT related to the overall project duration: January 1st, 2001 – June 30th, 2004

- BESSE Jean-Philippe, GARRIC Jeanne (2007) Rapport Agence eau Rhône méditerranée corse, Médicaments à usage humain: risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs ;260 pages. http://www.norman-network.net/public/library/docs/rmc-medic_vf_juin2007.pdf

- Académie de Pharmacie (2008), rapport Médicaments et environnement, 94 pages.

- NORMAN : http://www.norman-network.net/index_php.php?module=public/about_us/home

fin du rapport