

Etude de la stabilité des étalons analytiques pour la surveillance des milieux aquatiques - Cas des antibiotiques

C. Guillemain, M. Philippe, P. Boutet, A. Daval, C. Margoum

Septembre 2021

Document final

Avec le soutien de

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2021, au titre de l'action E1B2 du thème E - Garantir la qualité des données bancarisées, Outils pour assurer la qualité des données.

Auteur (s) :

Céline Guillemain
INRAE
celine.guillemain@inrae.fr

Morgane Philippe
INRAE

Pierre Boutet
INRAE

Amandine Daval
INRAE

Christelle Margoum
INRAE
christelle.margoum@inrae.fr

Vérification du document :

Sophie Lardy-Fontan
LNE
sophie.lardy-fontan@lne.fr

Laurence Almaric
BRGM
l.almaric@brgm.fr

Les correspondants

OFB : Nicolas Gaury

INRAE : Marina Coquery

Référence du document : Céline Guillemain, Morgane Philippe, Pierre Boutet, Amandine Daval, Christelle Margoum - Etude de la stabilité des étalons analytiques pour la surveillance des milieux aquatiques - Cas des antibiotiques - Rapport AQUAREF 2021 - 48 p.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

1. CONTEXTE	6
2. BIBLIOGRAPHIE.....	7
3. MATERIELS ET METHODES.....	8
3.1 Molécules	8
3.2 Protocole de l'étude de stabilité	9
3.2.1 Solvants de préparation des solutions	9
3.2.2 Type de flaconnage.....	11
3.2.3 Durée et température de stockage des solutions	11
3.3 Méthode d'analyse	12
3.4 Traitement des données : évaluation statistique de tendances avec HYPE.....	13
4. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	14
4.1 Fidélité des analyses sur la durée de l'étude	14
4.2 Critères d'influence et de stabilité.....	15
4.2.1 Evaluation de l'influence du type de solvant et du type de flaconnage	16
4.2.2 Evaluation de la stabilité des solutions mères.....	16
4.2.3 Stabilité des solutions filles et des gammes étalons.....	16
4.3 Influence du solvant pour chaque temps de conservation	17
4.4 Influence du flaconnage pour chaque temps de conservation	18
4.5 Evaluation de la stabilité dans le temps	23
4.5.1 Stabilité des solutions mères.....	23
4.5.2 Stabilité des solutions filles et solutions étalons.....	27
4.5.2.1 Variabilité du Diuron D6	27
4.5.2.2 Influence de la congélation des solutions diluées et en mélange	27
5. RECAPITULATIF DES CONDITIONS DE STOCKAGE DES ANTIBIOTIQUES.....	28
6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	30
Annexe 1 : Pureté des produits antibiotiques du fournisseur CIL Cluzeau	35
Annexe 2 : Préparation des solutions filles A et C dans l'eau.....	36
Annexe 3 : Préparation des solutions filles B et D dans l'eau	37
Annexe 4 : Préparation des gammes d'étalonnage A, B, C et D dans l'eau	38

Liste des figures :

Figure 1 : schéma de l'étude de stabilité	8
Figure 2 : Schéma récapitulatif du protocole de l'étude de stabilité	13
Figure 3 : Aires moyennes du Diuron D6 (n = 6) obtenues à chaque temps de l'étude et dans chaque condition de stockage testée	15
Figure 4 : Ratios d'aires obtenus pour l'enrofloxacin dans les solutions étalons à 10µg/L (n=1) au cours du temps pour chaque type de solvant dans les flacons en PP et dans les flacons en verre.	17
Figure 5 : Evolution du ratio d'aires de l'ampicilline et de l'ampicilline d5 sur le diuron D6 au cours du temps dans les différents modes de stockage pour la solution étalon à 20 µg/L	18
Figure 6 : Gammes d'étalonnages obtenues à T0 pour la danofloxacin dans les différentes conditions de stockage	19
Figure 7 : Comparaison des ratios d'aires obtenus entre les flacons en PP et en verre pour l'enrofloxacin et l'enrofloxacin d5 sur le diuron D6 dans la solution étalon à 5µg/L ...	19
Figure 8 : Comparaison des ratios d'aires obtenus pour les flacons en PP et en verre pour la tétracycline sur le diuron D6 dans la solution étalon à 10µg/L dans le méthanol	20
Figure 9 : Comparaison des ratios d'aires obtenus pour les flacons en PP et en verre pour la doxycycline dans la solution étalon à 10µg/L dans le méthanol.....	21
Figure 10 : Graphiques de tendance HYPE obtenus pour l'enrofloxacin (A) et la danofloxacin (B) dans les flacons en PP et l'eau dans l'étalon à 20 µg/L (T0 correspondant au 1 ^{er} point au mois de juin sur le graphique).....	23
Figure 11 : Graphiques de tendance HYPE obtenus pour l'amoxicilline (A) et l'ampicilline (B) dans les flacons en PP et l'eau dans l'étalon à 20 µg/L (T0 correspondant au 1 ^{er} point au mois de juin sur le graphique).....	24
Figure 12 : Graphiques de tendance HYPE obtenus pour la norfloxacin en aire (A) et ratio aire / aire diuron D6 (B) dans les flacons en PP et le méthanol dans l'étalon à 20 µg/L (T0 correspondant au 1 ^{er} point au mois de juin sur le graphique)	25
Figure 13 : Aires moyennes du Diuron D6 obtenues dans chaque condition de stockage pour l'étude de congélation des solutions filles et des gammes étalons.	27

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Liste des molécules de l'étude de stabilité.....	9
Tableau 2 : Liste des molécules deutérées de l'étude de stabilité	9
Tableau 3 : Types de solvant testés par molécules	10
Tableau 4 : Nomenclature des solutions préparées en fonction des types de solvant et de flaconnage utilisés	11
Tableau 5 : Aires moyennes du traceur d'injection Diuron D6 et coefficients de variation obtenus pour chaque condition testée sur la durée de l'étude	14
Tableau 6 : Récapitulatif de l'influence des paramètres testés (solvant et flaconnage) sur chaque antibiotique et paramètre optimal choisi.	22
Tableau 7 : Récapitulatif des tendances significatives obtenues par antibiotique et par condition de stockage	26
Tableau 8 : Coefficients de détermination R ² et ratios des pentes des droites d'étalonnage obtenus pour l'étude de congélation des solutions filles et gammes étalons	29
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des conditions de stockage préconisées par antibiotique en solutions mères et en solutions diluées	30

RESUME

La plupart des antibiotiques sont considérés comme des contaminants émergents des milieux aquatiques à surveiller en raison de leur persistance dans l'environnement et de leur impact sur le biote et la santé humaine. La disponibilité de méthodes analytiques exactes et sensibles pour détecter et quantifier ces composés est donc cruciale pour répondre à de nombreuses questions environnementales soulevées par leur présence dans l'environnement.

Certains groupes d'antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines et les tétracyclines sont connus pour être très instables. Différentes méthodes recommandent de préparer les solutions étalons d'antibiotiques le jour de l'analyse ou de vérifier systématiquement avant utilisation l'état de dégradation des solutions d'antibiotiques.

Durant des développements et validations de nouvelles méthodes analytiques au Laboratoire de chimie des Milieux Aquatiques d'INRAE, des problèmes de stabilité ont été identifiés sur les macrolides, les tétracyclines, les fluoroquinolones, les pénicillines et les céphalosporines dans le mode de conservation habituel du laboratoire.

L'objectif de ce travail est d'étudier la stabilité de 2 pénicillines, 1 macrolide, 1 céphalosporine, 8 fluoroquinolones et 4 tétracyclines pour identifier les conditions optimales de conservation des étalons analytiques. Cette étude a été menée sur un an et la conservation au congélateur des étalons analytiques a été testée dans deux solvants de dissolution des antibiotiques et dans deux types de flaconnage.

Les résultats de cette étude ont permis de définir la durée et les conditions optimales de conservation des étalons analytiques pour assurer une stabilité de chacun des antibiotiques. L'influence du type de flaconnage utilisé pour la conservation au congélateur des solutions s'est avérée plus importante que l'influence du solvant de dissolution des antibiotiques.

HYPE est un outil d'analyse statistique des séries temporelles d'évolution de la qualité des eaux souterraines sous environnement R développé par le BRGM. Cet outil permet de calculer de manière automatique les statistiques de bases pour caractériser des séries temporelles d'évolution des contaminants et d'identifier des tendances et des ruptures des séries chronologiques.

Le traitement statistique des données obtenues dans HYPE a permis d'identifier des tendances significatives à la stabilité ou non des antibiotiques étudiés.

Ce travail nous a également permis de proposer des pistes d'amélioration sur la méthodologie des futures études de stabilité qui seront menées au laboratoire.

Mots clés :

Etude de stabilité, antibiotiques, étalons analytiques, flaconnage, solvant de dissolution, traitement statistique.

1. CONTEXTE

Les antibiotiques sont un groupe de produits pharmaceutiques très préoccupants en raison de leur forte consommation autant humaine que vétérinaire et de leur persistance dans l'environnement. De plus, on soupçonne que l'exposition chronique aux antibiotiques pourrait induire le développement de pathogènes résistants aux antibiotiques, ce qui pourrait être un cas d'alarme en raison de l'impact ultérieur sur le biote et la santé humaine ⁽¹⁾. La présence d'antibiotiques dans différents compartiments environnementaux, tels que l'eau, le sol et le biote, a été étudiée au cours des dernières années ^{(1),(2)}. Les antibiotiques sont des contaminants émergents à surveiller⁽³⁾. La disponibilité de méthodes analytiques exactes et sensibles pour détecter et quantifier ces composés est cruciale pour répondre à de nombreuses questions environnementales soulevées par leur présence dans l'environnement.

Les pénicillines, les macrolides, les fluoroquinolones, les céphalosporines et les tétracyclines sont connues pour être très instables ^{(4),(5)}.

Durant le développement et la validation de deux méthodes d'analyse multi-résidus permettant de détecter et quantifier des médicaments à usage humain et des médicaments vétérinaires issus de la liste des contaminants émergents du réseau Norman⁽³⁾, le Laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA) a constaté des problèmes de stabilité de certains antibiotiques tels que les macrolides, les tétracyclines, les fluoroquinolones, les pénicillines et les céphalosporines dans les conditions de stockage et conservation mises en place. En effet, des problèmes de détection des étalons à faible niveau de concentration (sub µg/L) ont été constatés au cours du temps.

La méthode EPA 1694⁽⁴⁾ recommande de vérifier avant chaque préparation de solution et analyse, la dégradation potentielle de ces antibiotiques. Afin de s'affranchir de cette vérification systématique, il est nécessaire d'étudier la stabilité de ces molécules pour définir les conditions de conservation des solutions étalons pour s'assurer de la justesse des résultats d'analyse finaux.

Nous avons donc choisi de réaliser une étude de stabilité des étalons analytiques en mélange de 16 antibiotiques : 2 pénicillines, 1 macrolide, 1 céphalosporine, 8 fluoroquinolones et 4 tétracyclines. Des recherches bibliographiques définiront les critères de préparation et stockage des solutions étalons qui influencent la stabilité des antibiotiques. Les résultats de cette étude permettront de définir pour chaque antibiotique testé les conditions de conservation optimales (flaconnage, solvant, durée de conservation) pour assurer leur stabilité.

2. BIBLIOGRAPHIE

La stabilité d'une molécule organique en solution peut être influencée par de nombreux facteurs comme le solvant de dissolution, la température, la durée de conservation, le type de flaconnage utilisé pour le stockage, le pH ...

Malheureusement, il existe très peu de bibliographie sur des études de stabilité prenant en compte toutes les familles d'antibiotiques en solution. De plus, la plupart des méthodes préconisent un suivi de la stabilité des antibiotiques avant analyses à chaque utilisation⁽⁴⁾ et de refaire les solutions très régulièrement voire à chaque jour d'analyse.

Concernant les solvants de dissolution utilisés pour les composés sélectionnés dans ce travail, ils peuvent être très différents selon les études. Pour les pénicillines et les céphalosporines, les solvants utilisés sont l'eau⁽⁶⁾, un mélange eau/méthanol (50/50, v/v)⁽¹²⁾ et le méthanol⁽¹³⁾. Pour les quinolones et fluoroquinolones, les solvants utilisés sont la soude⁽⁶⁾, différents mélanges de méthanol et de soude : méthanol + 0,1% NaOH 1M⁽¹¹⁾, 0,04M NaOH dans méthanol⁽¹²⁾ et le méthanol⁽¹³⁾. Pour les macrolides, les solvants utilisés sont l'eau, un tampon phosphate⁽⁸⁾ et le méthanol^{(12),(13)}. Pour les tétracyclines, le méthanol est utilisé dans la plupart des méthodes analytiques pour la dissolution, l'extraction et l'élution ; et il est aussi utilisé dans la formulation de plusieurs médicaments contenant des tétracyclines^{(6),(9),(12),(13)}.

Concernant le flaconnage seulement 2 types ont été testés dans la littérature : le verre⁽¹⁰⁾ et le polypropylène^{(6),(9),(12),(13)}, ambrés et transparents. Toutefois une attention particulière est portée à l'exposition à la lumière notamment pour les fluoroquinolones qui peuvent être photodégradées en quelques minutes⁽¹¹⁾.

Les différentes températures de stockage étudiées sont la température ambiante⁽⁹⁾, 4°C^{(7),(10),(11)}, -20°C^{(6),(7),(9),(10),(12)} et -76°C^{(7),(12)}. Gaugain *et al*⁽¹²⁾ ont montré dans leur étude qu'il n'y avait pas de différence entre une conservation à -20°C et -76°C sur la stabilité des antibiotiques étudiés.

Dans toutes les études, un aliquotage des solutions a été réalisé pour limiter les variations de température apportées par la décongélation/re-congélation des solutions préparées. Les durées de conservation testées vont jusqu'à maximum un an.

Concernant le pH, il n'a été testé que par Soeberg *et al*⁽¹⁰⁾ dans leur étude sur la dégradation de la chlortétracycline. Nous avons donc choisi de ne pas tester ce paramètre dans notre étude.

Pour notre étude de stabilité des antibiotiques en solution, dont le protocole général est présenté en Figure 1, nous avons donc choisi de tester sur une durée d'un an avec une approche chronologique⁽¹⁴⁾, les paramètres suivants :

- 2 types de solvants,
- 2 types de flaconnage,
- Conservation au congélateur à -20°C après aliquotage des solutions.

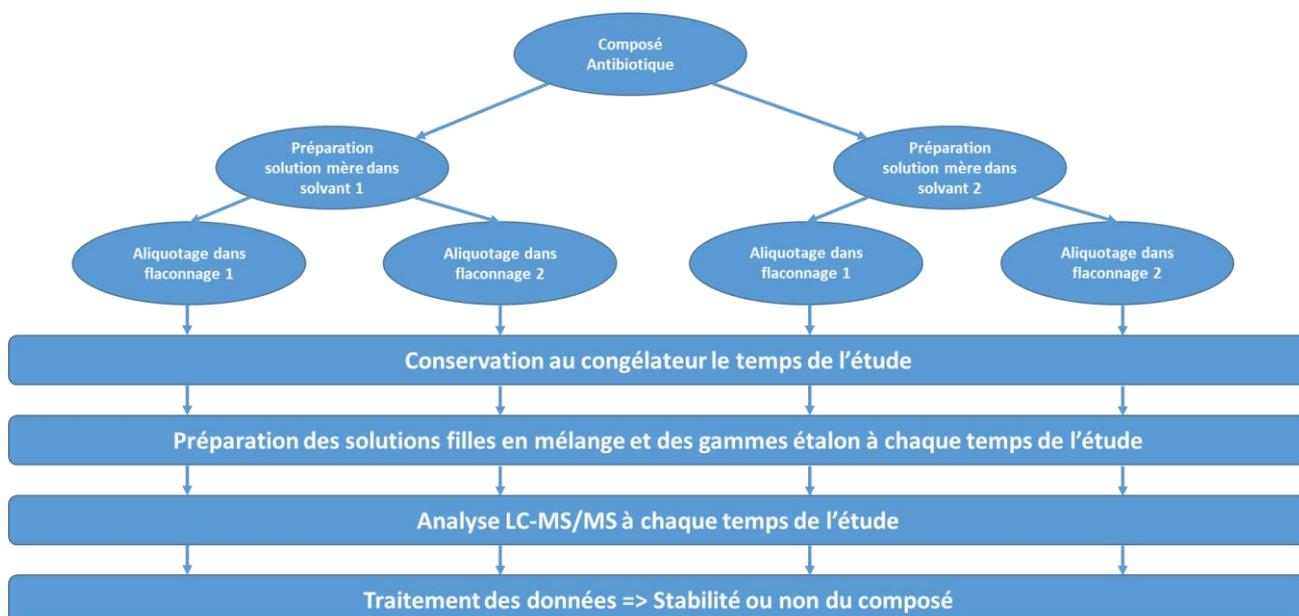


Figure 1 : schéma du l'étude de stabilité

3. MATERIELS ET METHODES

3.1 MOLECULES

Les 16 molécules choisies pour cette étude de stabilité (Tableau 1) sont les antibiotiques qui présentaient des problèmes de stabilité lors des développements et validations des méthodes antérieures.

Les molécules deutérées (Tableau 2) sont d'habitude utilisées comme des traceurs d'extraction ou d'injection. Pour cette étude de stabilité, nous avons décidé de les ajouter à l'étude et de leur appliquer le même protocole que pour leurs analogues non deutérés. Nous pourrions ainsi confirmer ou infirmer les résultats de stabilité obtenus et vérifier que leur comportement est identique à celui des analogues non deutérés.

Le diuron D6 a également été ajouté à une concentration connue et identique dans tous les flacons d'analyse sur toute la durée de cette étude. Le diuron D6 est un composé très stable que le laboratoire utilise en traceur d'injection. Il permet donc de mettre en évidence la potentielle variabilité du système analytique.

Tableau 1 : Liste des molécules de l'étude de stabilité

Antibiotique	Abréviation	Groupe chimique	N° CAS	Formule	Masse (Da)	Réglementation / liste de surveillance
Amoxicilline	AMX	Penicilline	26787-78-0	C16H19N3O5S	365,1	Emergents Norman
Ampicilline	APC	Penicilline	69-53-4	C16H19N3O4S	349,1	Emergents Norman
Azithromycine	AZI	Macrolide	117772-700	C38H72N2O12	748,5	2008/105/DCE
Ceftiofur	CTF	Cephalosporine	80370-57-6	C19H17N5O7S3	523,0	Emergents Norman
Chlortetracycline	CTC	Tetracycline	57-62-5	C22H23ClN2O8	478,1	Emergents Norman
Ciprofloxacine	CIPRO	Fluoroquinolone	85721-33-1	C17H18FN3O3	331,4	Emergents Norman
Danofloxacine	DFX	Fluoroquinolone	112398-08-0	C19H20FN3O3	357,2	Emergents Norman
Doxycycline	DXC	Tetracycline	564-25-0	C22H24N2O8	444,2	Emergents Norman
Enrofloxacine	EFX	Fluoroquinolone	93106-60-6	C19H22FN3O3	359,2	Emergents Norman
Marbofloxacine	MBF	Fluoroquinolone	115550-35-1	C17H19FN4O4	362,1	Emergents Norman
Norfloxacine	NORFLO	Fluoroquinolone	70458-96-7	C16H18FN3O3	319,1	Emergents Norman
Ofloxacine	OFLO	Fluoroquinolone	82419-36-1	C18H20FN3O4	361,1	2008/105/DCE
Oxytetracycline	OTC	Tetracycline	79-57-2	C22H24N2O9	460,2	Emergents Norman
Pefloxacine	PFX	Fluoroquinolone	70458-92-3	C17H20FN3O3	333,2	Emergents Norman
Sparfloxacine	SFX	Fluoroquinolone	110871-86-8	C19H22F2N4O3	392,2	Emergents Norman
Tétracycline	TTC	Tetracycline	60-54-8	C22H24N2O8	444,2	Emergents Norman

Tableau 2 : Liste des molécules deutérées de l'étude de stabilité

Molécule	Abréviation	N° CAS	Formule	Masse (Da)
Amoxicilline d4	AMX d4	26787-78-0	C16H15D4N3O5S	369,1
Ampicilline d5	APC d5	69-53-4	C16H14D5N3O4S	354,1
Ceftiofur d3	CTF d3	80370-57-6	C19H14D3N5O7S3	526,0
Ciprofloxacine d8	CIPRO d8	85721-33-1	C17H10D8FN3O3	339,4
Danofloxacine d3	DFX d3	112398-08-0	C19H17D3FN3O3	360,2
Doxycycline d3	DXC d3	564-25-0	C22H21D3N2O8	447,2
Enrofloxacine d5	EFX d5	93106-60-6	C19H17D5FN3O3	364,2
Norfloxacine d5	NORFLO d5	70458-96-7	C16H13D5FN3O3	324,1
Ofloxacine d3	OFLO d3	82419-36-1	C18H17D3FN3O4	364,1
Pefloxacine d3	PFX d3	70458-92-3	C17H17D3FN3O3	336,2

3.2 PROTOCOLE DE L'ETUDE DE STABILITE

L'étude bibliographique réalisée pour cette étude de stabilité a montré que différents facteurs pouvaient influencer la stabilité des antibiotiques sélectionnés. Ces facteurs sont le solvant de préparation des solutions, le flaconnage utilisé pour le stockage de ces solutions ainsi que la durée et la température de stockage.

3.2.1 Solvants de préparation des solutions

Les solutions mères ont été préparées à partir de produit pur de chacun des composés fournis par CIL Cluzeau (Sainte Foy la Grande, France) ayant une pureté connue comprise entre 89.7 % et 99.9% (Annexe 1 : Pureté des produits antibiotiques du fournisseur CIL Cluzeau). Chaque composé a été pesé

précisément et dissous avec 25 mL de solvant pour obtenir des solutions à environ exactement 200 mg/L.

Les solvants (Biosolve, Dieuze, France) testés sont le méthanol (MeOH), l'eau, l'acétonitrile (ACN) et du méthanol avec addition de 0,1 % de soude à 1 M (MeOH + 0,1 % NaOH 1 M). Dans le Tableau 3 sont présentés les deux solvants (les plus cités lors de la recherche bibliographique et les plus faciles à mettre en œuvre au laboratoire) testés par molécules. Pour les molécules de la famille des tétracyclines, seul le méthanol a été testé (cf. 1) car la recherche bibliographique n'a pas montré que d'autres solvants étaient utilisés. Pour l'azithromycine, l'acétonitrile (même si ce solvant n'a pas été identifié dans la bibliographie) a été testé pour comparer les pratiques initiales du laboratoire et les informations trouvées dans la littérature.

Tableau 3 : Types de solvant testés par molécules

Molécule	Solvant 1	Solvant 2
Amoxicilline	MeOH	Eau
Amoxicilline d4	MeOH	Eau
Ampicilline	MeOH	Eau
Ampicilline d5	MeOH	Eau
Azithromycine	MeOH	ACN
Ceftiofur	MeOH	Eau
Ceftiofur d3	MeOH	Eau
Chlortétracycline	MeOH	
Ciprofloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Ciprofloxacine d8	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Danofloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Danofloxacine d3	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Doxycycline	MeOH	
Doxycycline d3	MeOH	
Enrofloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Enrofloxacine d5	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Marbofloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Norfloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Norfloxacine d5	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Ofloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Ofloxacine d3	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Oxytétracycline	MeOH	
Pefloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Pefloxacine d3	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Sparfloxacine	MeOH	MeOH + 0,1% NaOH 1M
Tétracycline	MeOH	

Les solutions filles préparées à partir d'un mélange de toutes les solutions mères sont réalisées dans l'eau MilliQ LC-Pak (Merck Millipore) et à une concentration de 500 µg/L. La solution fille est ensuite diluée dans l'eau MilliQ LC-Pak pour préparer la gamme étalon par dilutions successives (voir annexes 2, 3 et 4).

L'eau MilliQ LC-Pak a été utilisée comme solvant de préparation des gammes étalons pour rester conforme aux méthodes analytiques validées avec lesquelles ces antibiotiques sont analysés.

3.2.2 Type de flaconnage

Les solutions mères préparées dans les deux types de solvants ont ensuite été aliquotées (environ 300 µL) dans deux types de flaconnages (flacons) différents : flacons en verre ambré TruView LCMS Waters et flacons en polypropylène (PP) QuanRecovery Waters.

Les gammes étalons préparées ensuite à partir de ces solutions mères sont stockées dans les mêmes types de flaconnages. La nomenclature choisie au laboratoire est présentée dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Nomenclature des solutions préparées en fonction des types de solvant et de flaconnage utilisés

Nomenclature	Flaconnage	Solvant
A	Verre	1
B	Verre	2
C	PP	1
D	PP	2

Pour la mise en flacon des étalons et des blancs solvants avant analyse, le Diuron D6 a été ajouté en tant que traceur d'injection et elle est réalisée comme suit en fonction du volume des flacons :

- Blanc solvant dans flacons en verre : 50 µL de solution de Diuron D6 à 20 µg/L + 950 µL d'eau MilliQ LC-Pak
- Etalons dans flacons en verre : 25 µL de solution de Diuron D6 à 20 µg/L + 475 µL d'étalon
- Etalons dans flacons en PP : 12,5 µL de solution de Diuron D6 à 20 µg/L + 237,5 µL d'étalon

3.2.3 Durée et température de stockage des solutions

Cette étude de stabilité a été menée sur 12 mois avec différents temps de préparation de solutions filles et de gammes étalons et d'analyse : T0, T1j, T4j, T7j, T14j, T28j (1 mois), T60j (2 mois), T91j (3 mois), T119j (4 mois), T152j (5 mois), T182j (6 mois), T275j (9 mois) et T367j (12 mois).

Durant cette période, les solutions mères aliquotées précédemment dans les différents solvants et flaconnages sont conservées au congélateur à -20°C. Au temps de prélèvement, les aliquotes de chacune des solutions mères sont décongelées. Les 4 solutions filles (1 par type de solvant et par type de flaconnage) sont préparées et diluées pour réaliser les gammes étalons A, B, C et D.

De plus, pour tester la congélation des solutions diluées pendant une semaine, les 4 solutions filles et les 4 gammes étalons préparées à T0 et T7j ont été

conservées à -20°C. A T0+7j et T7j+7j, les 4 gammes d'étalonnage ont été décongelées pour analyse et les 4 solutions filles ont été décongelées puis diluées pour préparation des 4 gammes d'étalonnage correspondantes.

Toutes les gammes d'étalonnage préparées aux différents temps sont conservées à 4°C sur le passeur d'échantillon pendant la séquence d'analyse.

Pour chaque temps de prélèvement, les durées de chacune des étapes (temps de décongélation, temps de préparation des solutions filles, temps passé sur le passeur avant analyse) ont été maîtrisées. Cette durée totale de manipulation/analyse est de 20h donc seule la durée de conservation peut influencer sur la stabilité des antibiotiques. Aucun réplicat n'a été réalisé lors de cette étude pour ne pas dépasser cette durée de 20h de manipulation/analyse.

La Figure 2 ci-après présente un schéma récapitulatif du protocole de l'étude.

3.3 METHODE D'ANALYSE

Le dosage des différentes molécules a été réalisé par chromatographie liquide ultra haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC Acquity - Spectromètre de masse Xevo TQ-XS Waters).

La séparation se fait sur colonne HSS T3 Waters (2,1 mm * 100 mm, 1,8 µm) à une température de 30°C. Le volume d'injection est de 10 µL. Le débit de la phase mobile est de 0,5 mL/min avec un gradient eau et acétonitrile acidifiés à 0,1 % avec de l'acide formique. La séparation dure 23 min. La source d'ionisation utilisée est l'électrospray UniSpray avec acquisition en ionisation positive.

Afin de s'assurer que les analyses se déroulent bien en terme de sensibilité, de répétabilité et de reproductibilité, un traceur deutéré d'injection le diuron D6 est ajouté lors de la mise en flacons des solutions étalons et des blancs solvants. Même si le diuron D6 n'est pas représentatif des familles d'antibiotiques ciblées dans cette étude, nous avons choisi de l'utiliser car nous savons qu'il est stable sur la durée de cette étude de stabilité. Ce traceur est à la même concentration dans tous les flacons. Un coefficient de variation des réponses de ce traceur peut donc être calculé afin d'évaluer la variabilité des injections. Des blancs solvants sont injectés régulièrement afin de s'assurer de l'absence de contamination.

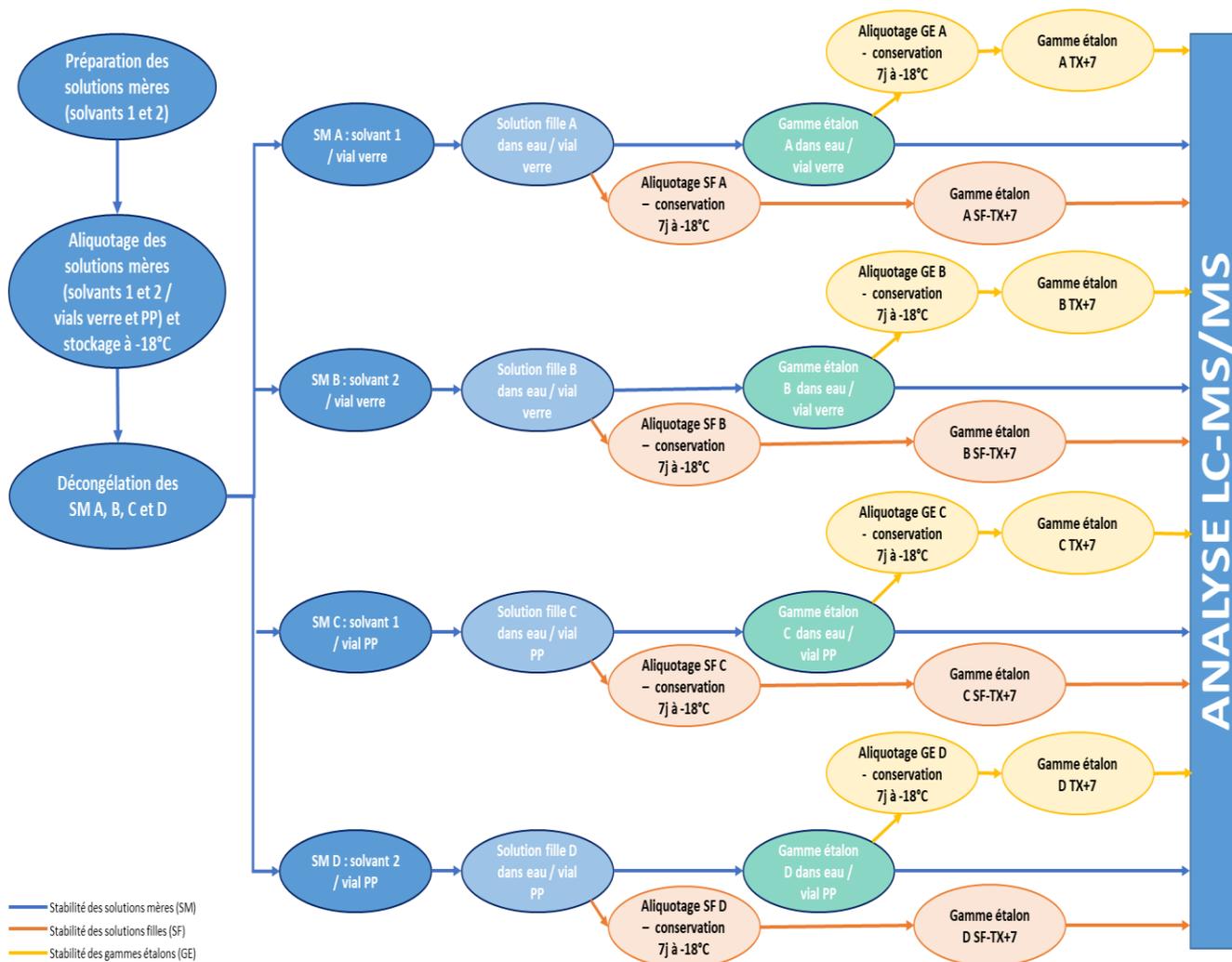


Figure 2 : Schéma récapitulatif du protocole de l'étude de stabilité

3.4 TRAITEMENT DES DONNEES : EVALUATION STATISTIQUE DE TENDANCES AVEC HYPE

Afin d'identifier si les antibiotiques sont stables ou non en solution sur la durée de l'étude, nous avons choisi d'utiliser HYPE⁽¹⁵⁾.

HYPE est un outil d'analyse statistique des séries temporelles d'évolution de la qualité des eaux souterraines sous environnement R développé par le BRGM. Cet outil permet de calculer de manière automatique les statistiques de bases pour caractériser des séries temporelles d'évolution des contaminants et d'identifier et modéliser des tendances et des ruptures des séries chronologiques.

Le module « Caractérisation » de HYPE permet de calculer les statistiques de base de séries temporelles de données en préalable à d'autres tests statistiques. Ainsi, la moyenne, l'écart-type, la médiane, la fréquence de quantification, la normalité de distribution des données et l'autocorrélation des données sont calculées. Deux fichiers de sortie sont générés un fichier .txt et un fichier .pdf

regroupant respectivement toutes les données caractéristiques des séries temporelles et leurs représentations graphiques.

Le module « Tendances » de HYPE permet d'identifier si les séries temporelles d'évolution des contaminants présentent ou pas des tendances à la baisse ou à la hausse par différents tests statistiques comme le test de tendance non paramétrique de Mann-Kendall et le test de tendance paramétrique de régression linéaire. Un test de rupture (test de Pettitt ou de Buishand en fonction de la distribution des données) est également appliqué afin d'identifier un possible changement de moyenne et/ou une inversion de tendance dans les séries temporelles d'évolution des contaminants. Deux fichiers de sortie sont générés un fichier .txt présentant les tests effectués, leur significativité et leurs résultats et un fichier .pdf avec les représentations graphiques des tendances et ruptures identifiées.

4. RESULTATS ET DISCUSSIONS

4.1 FIDELITE DES ANALYSES SUR LA DUREE DE L'ETUDE

A chaque temps de prélèvement, après la préparation des solutions étalons et lors de la mise en flacons, le diuron D6 a été ajouté à tous les flacons analysés, à la même concentration de 1 µg/L. Une aire moyenne pour chaque condition testée peut donc être calculée ainsi qu'un coefficient de variation pour déterminer la répétabilité analytique de cette étude.

Dans le Tableau 5, on constate que les coefficients de variation obtenus sont du même ordre de grandeur (environ 25%) quelles que soient les conditions de stockage testées pour toute la durée de cette étude.

Tableau 5 : Aires moyennes du traceur d'injection Diuron D6 et coefficients de variation obtenus pour chaque condition testée sur la durée de l'étude

Flaconnage	Solvant	Aire moyenne DiuD6	Ecart Type	%CV n=78
verre	1	582666	144990	25
verre	2	583415	144337	25
PP	1	548857	118843	22
PP	2	548511	137810	25

Sur la Figure 3, on constate que les aires moyennes obtenues aux temps T7j, T14j et T3 mois (91j) ne sont pas comprises dans la fenêtre $\pm 25\%$ car elles sont inférieures aux autres aires moyennes pour les 4 conditions de stockage testées. Les aires moyennes obtenues à T367j ne sont pas comprises dans la fenêtre $\pm 25\%$ car elles sont supérieures.

Dans les flacons en PP et quel que soit le solvant utilisé, les aires moyennes obtenues à T4j ne sont pas comprises dans la fenêtre $\pm 25\%$ car elles sont supérieures. Dans les flacons en verre et quel que soit le solvant utilisé, les aires

moyennes obtenues à T4 mois (119j) ne sont pas comprises dans la fenêtre $\pm 25\%$ car elles sont supérieures.

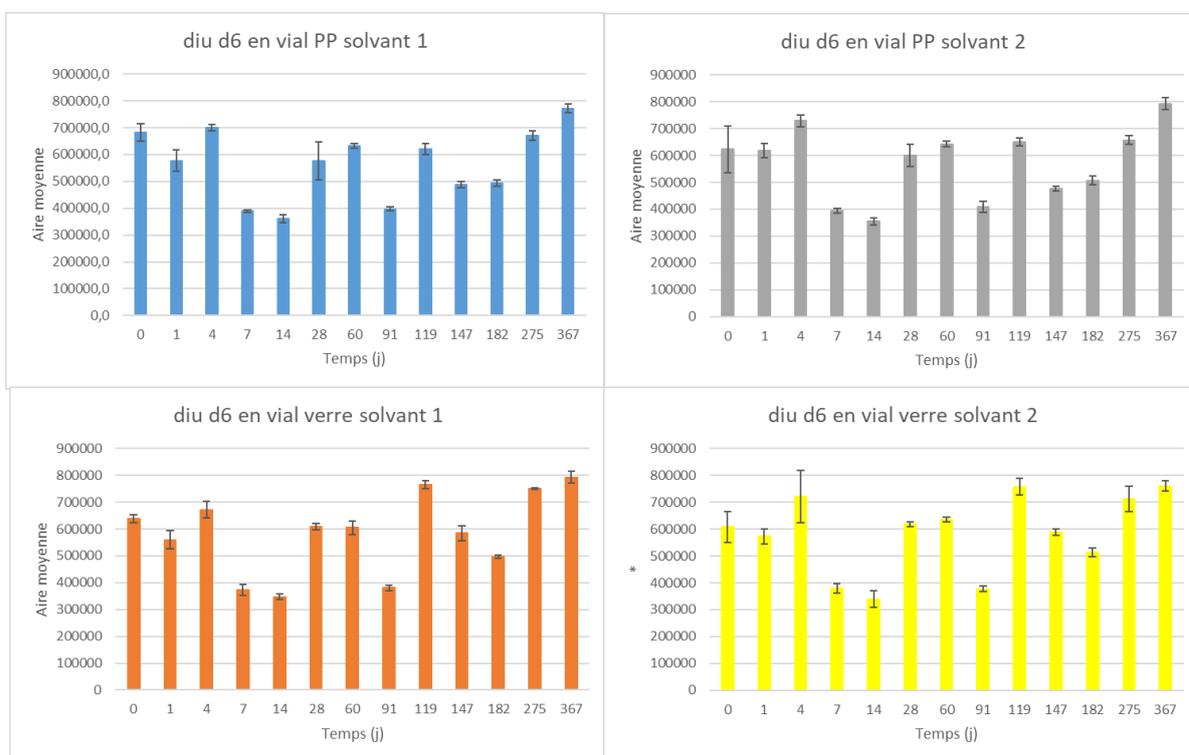


Figure 3 : Aires moyennes du Diuron D6 (n = 6) obtenues à chaque temps de l'étude et dans chaque condition de stockage testée

Le Diuron D6 est donc représentatif de la variabilité de la sensibilité analytique aux différents temps d'analyse. Pour s'affranchir de cette variabilité de la sensibilité de l'équipement dans le temps, nous avons choisi de normaliser les aires obtenues pour les antibiotiques par l'aire du diuron D6. Tous les résultats présentés dans la suite du rapport seront donc corrigés par le Diuron D6 (Aire de l'antibiotique / Aire du Diuron D6).

4.2 CRITERES D'INFLUENCE ET DE STABILITE

A chaque temps de cette étude de stabilité et pour chaque antibiotique, une gamme d'étalonnage est réalisée dans deux types de solvants et dans deux types de flaconnage. Pour chaque condition (couple solvant/flaconnage) les ratios des aires de l'antibiotique sur l'aire du Diuron D6 sont calculés pour tous les étalons et des régressions linéaires sont tracées. La comparaison des ratios d'aires des étalons et des gammes d'étalonnage (solutions mères diluées dans l'eau) obtenus à chaque temps permettront de définir si les solutions mères sont stables ou non.

4.2.1 Evaluation de l'influence du type de solvant et du type de flaconnage

Afin d'identifier si le type de solvant ou le type de flaconnage utilisé a une influence sur la conservation des antibiotiques, les coefficients de détermination (R^2) des régressions linéaires tracées pour chaque antibiotique dans chaque condition de stockage sont comparés.

Si le R^2 obtenu est inférieur à 0,99 alors nous considérons qu'il y a une perte de linéarité et donc une influence du paramètre testé. De plus, si les étalons de faible niveau de concentration ne sont pas ou plus détectés au cours du temps alors nous considérons qu'il y a une influence du paramètre testé. Enfin, si les ratios d'aire des antibiotiques sur l'aire du Diuron D6 au même temps et entre 2 facteurs (solvant 1 ou 2, flacon verre ou PP) testés présentent une différence supérieure à 30% alors nous considérons qu'il y a une influence du paramètre (solvant ou flacon) testé. Cette valeur très large de 30% a volontairement été choisie pour s'assurer que l'influence du facteur soit significative par rapport à la variabilité analytique.

4.2.2 Evaluation de la stabilité des solutions mères

Le logiciel HYPE caractérise et identifie des tendances d'évolution de contaminants sur des séries temporelles. Une série temporelle correspond aux valeurs des ratios d'Aire de l'antibiotique / Aire du Diuron D6 obtenus tout au long de l'étude pour un type de solvant dans un type de flaconnage et pour une concentration d'étalon.

Le Diuron D6 a également été inclus afin d'identifier s'il y avait une évolution de son aire au cours du temps.

Ainsi 648 séries temporelles (27 composés x 6 étalons x 4 conditions de stockage) ont été caractérisées et testées avec HYPE. Les deux tests de tendance (Mann-Kendall et régression linéaire) ont été appliqués. Pour certaines séries temporelles, le test de Mann Kendall n'a pas permis de modéliser de tendances temporelles par manque de données. Nous avons donc choisi de ne traiter que les données issues du test de régression linéaire pour l'étude de l'évaluation de la stabilité des solutions mères.

L'identification ou non de tendances significatives pour un composé dans un mode de stockage (couple solvant/flaconnage) a été validée seulement si les 6 niveaux de concentration des étalons présentaient une tendance identique.

Concernant l'identification de dates de rupture ou d'inversion des tendances, nous avons choisi de garder la date immédiatement avant la rupture indiquée pour les séries temporelles d'un même antibiotique dans un mode de stockage.

4.2.3 Stabilité des solutions filles et des gammes étalons

La stabilité des solutions filles et des gammes d'étalonnage suite à une congélation de 7 jours a été évaluée uniquement sur la condition de stockage (type de solvant et type de flaconnage) optimale identifiée. Les 2 gammes étalons (une gamme étalon obtenue à partir de la solution fille congelée 7 jours et une gamme étalon congelée 7 jours et décongelée pour analyse) obtenues ont été comparées à la gamme étalon non congelée. Les coefficients de détermination (R^2) des différentes droites d'étalonnage ont été calculés et

comparés pour identifier si la congélation apporte une perte de linéarité ($R^2 < 0,99$).

Les pentes des droites obtenues ont également été comparées, un ratio des pentes a été calculé entre les gammes étalons congelées et celle non congelée. Ce ratio doit être compris entre 0,90 et 1,10 pour que les solutions congelées soient considérées comme stables à la congélation. Cette valeur de 10% a été choisie en fonction de la variabilité analytique observée sur le diuron D6.

De plus, si les étalons de faible niveau de concentration ne sont pas détectés dans les gammes étalons congelées alors nous considérons que la congélation n'est pas possible pour la conservation des solutions diluées.

4.3 INFLUENCE DU SOLVANT POUR CHAQUE TEMPS DE CONSERVATION

Pour tous les antibiotiques, aucune influence du solvant n'est constatée sur la linéarité. En effet, les R^2 obtenus sont tous du même ordre de grandeur pour les 2 solvants dans chaque type de flaconnage.

Pour les fluoroquinolones : il n'y a pas d'influence du solvant dans les deux types de flaconnage testés. Sur la Figure 4 sont présentés les ratios d'aires de l'enrofloxacin sur l'aire du diuron D6 obtenus à chaque temps de l'étude. On constate que quel que soit le type de flaconnage PP ou verre, les ratios entre les deux solvants sont du même ordre de grandeur et présentent des différences inférieures à 30%.

Par contre dans les flacons en verre, on constate pour les solutions étalons de faibles niveaux de concentration une perte plus précoce et plus importante pour le solvant 2 (MeOH + 0.1% NaOH 1M). En effet, la perte de détection dans ce solvant pour les fluoroquinolones débute à T14j et peut aller jusqu'à 3 solutions étalons non détectés (jusqu'à $2\mu\text{g/L}$) à T4 mois (119j) alors que dans le méthanol (solvant 1) la perte de détection ne dépasse pas $1\mu\text{g/L}$. Ces pertes de détection des étalons de faibles niveaux de concentration ne sont pas dues à la baisse de sensibilité du diuron D6 constatées aux temps de prélèvement T7j et T14j (Figure 3). En effet, ces étalons ne sont plus détectés sur toute la durée restante de l'étude de stabilité alors que la sensibilité du diuron D6 revient à T28j.

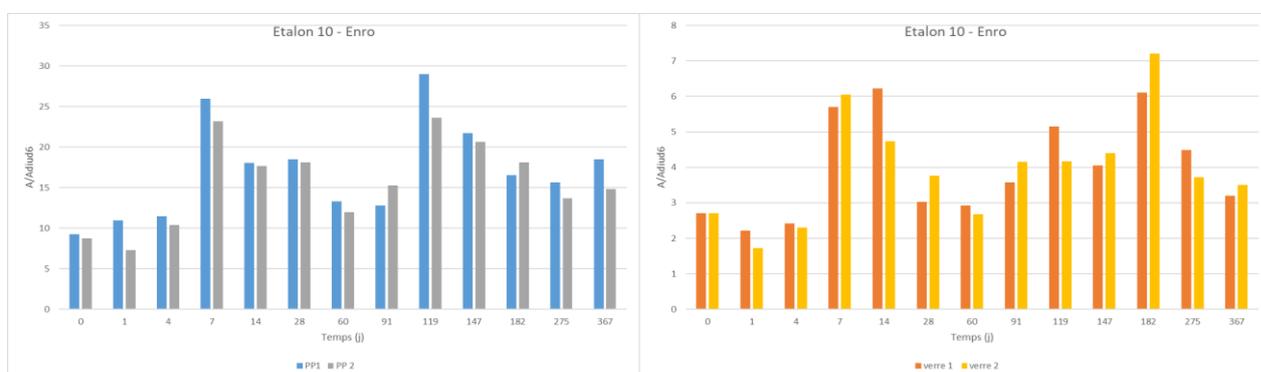


Figure 4 : Ratios d'aires obtenus pour l'enrofloxacin dans les solutions étalons à $10\mu\text{g/L}$ ($n=1$) au cours du temps pour chaque type de solvant dans les flacons en PP et dans les flacons en verre.

Pour les 2 pénicillines, on ne constate pas d'influence du solvant dans les flacons en PP. Par contre dans le verre on constate une perte significative dans le méthanol (exemple de l'ampicilline et l'ampicilline D5 sur la Figure 5). Pour l'ampicilline D5, cette perte n'est pas significative mais bien présente en comparaison des 3 autres conditions.

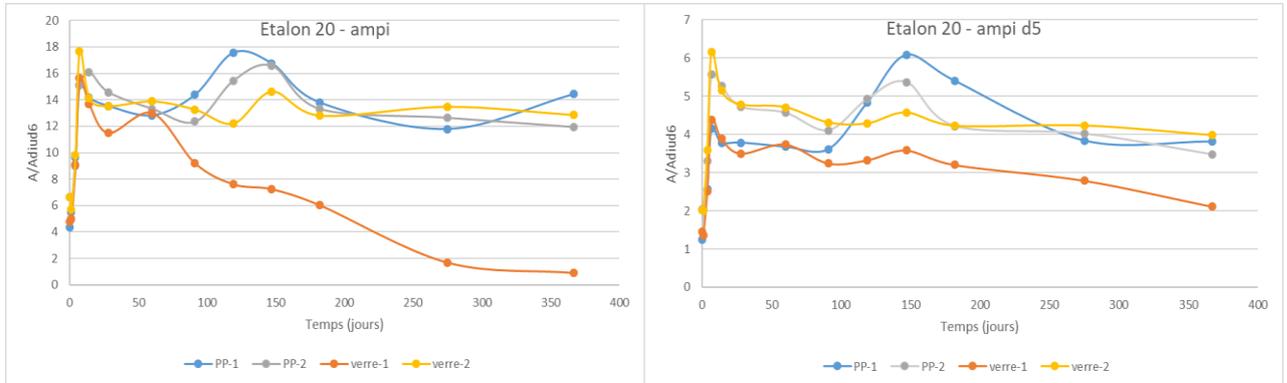


Figure 5 : Evolution du ratio d'aires de l'ampicilline et de l'ampicilline d5 sur le diuron D6 au cours du temps dans les différents modes de stockage pour la solution étalon à 20 µg/L

Pour la céphalosporine et son homologue deutéré et pour le macrolide, aucune influence du solvant n'a été constatée. Pour les tétracyclines, seul le méthanol ayant été testé, l'évolution des ratios d'aires est traitée dans le paragraphe 4.5.

4.4 INFLUENCE DU FLACONNAGE POUR CHAQUE TEMPS DE CONSERVATION

Pour les fluoroquinolones, une forte influence du flaconnage a été constatée. En effet, comme le montre la Figure 6, dans les flacons en PP, les gammes d'étalonnage obtenues sont linéaires avec des $R^2 > 0,99$ alors que dans les flacons en verre les gammes d'étalonnage ne sont pas linéaires même à T0 (jour de préparation de l'ensemble des solutions étalons).

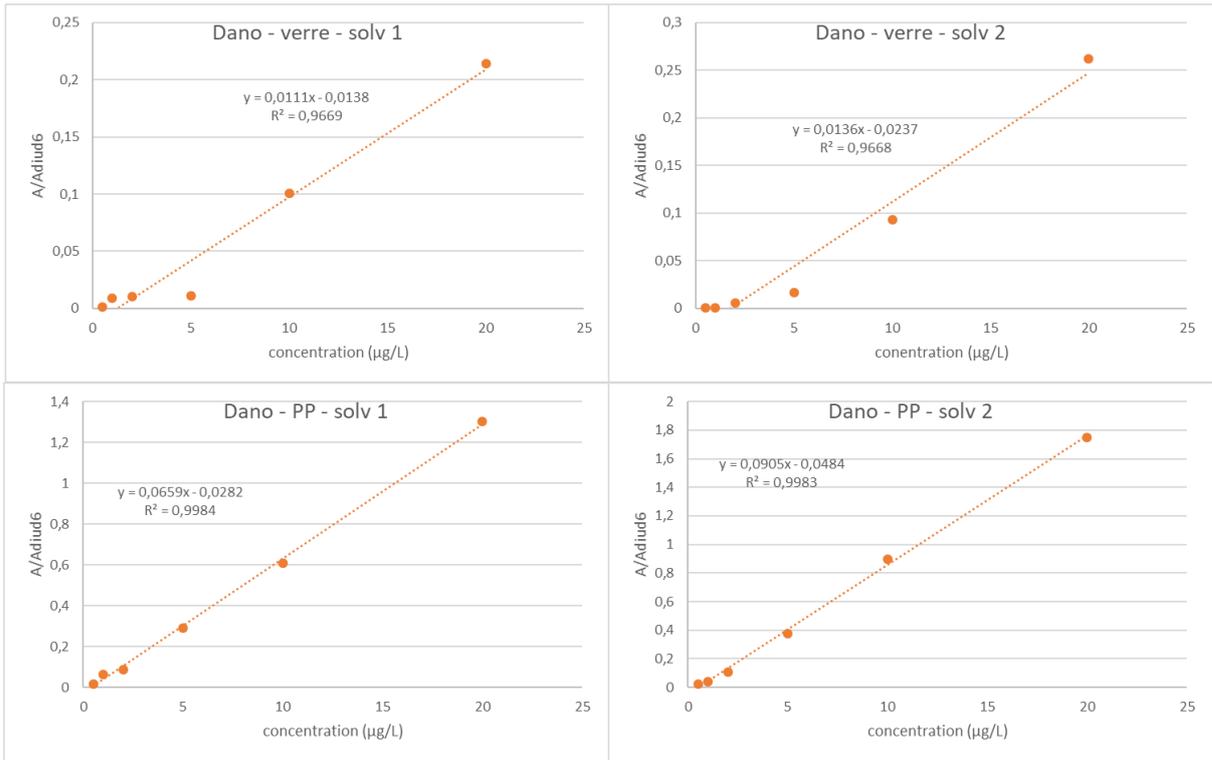


Figure 6 : Gammes d'étalonnages obtenues à T0 pour la danofloxacin dans les différentes conditions de stockage

De plus, dans les flacons en PP, les ratios d'aires obtenus sont beaucoup plus importants (les différences observées sont supérieures à 30%) comme le montre la Figure 7 et aucune perte de détection des solutions étalons de faible niveau de concentration n'est constatée contrairement à celles constatées dans les flacons en verre.

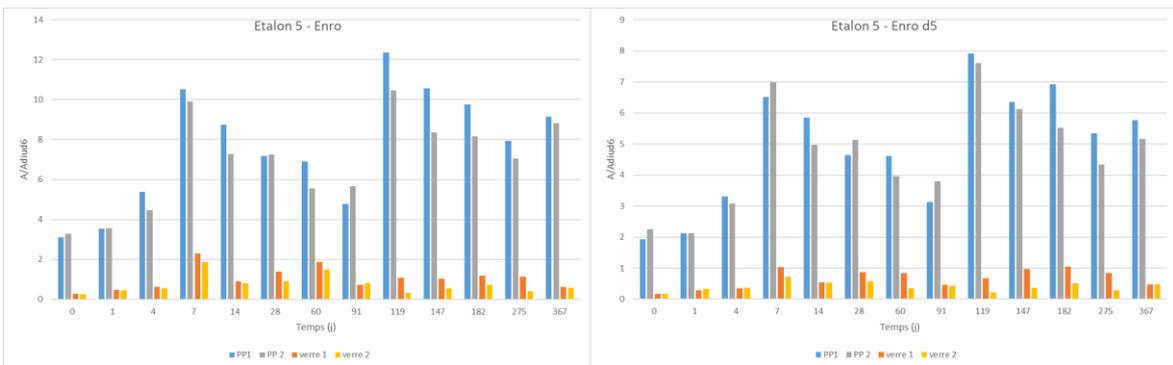


Figure 7 : Comparaison des ratios d'aires obtenus entre les flacons en PP et en verre pour l'enrofloxacin et l'enrofloxacin d5 sur le diuron D6 dans la solution étalon à 5µg/L

Pour les pénicillines, il n'y a pas d'influence du flaconnage sauf pour les solutions conservées dans le méthanol pour lesquelles une tendance à la baisse est constatée dans les flacons en verre (voir paragraphe 4.3).

Pour la céphalosporine et son homologue deutéré, aucune influence du flaconnage n'est constatée.

Par contre, pour le macrolide, une influence du flaconnage est observée avec des ratios d'aires obtenus plus importants en vial PP. Toutefois, pour l'azithromycine, nous n'avons jamais constaté de linéarité car toutes les droites d'étalonnage obtenues présentaient des $R^2 < 0,99$ quels que soient les conditions de stockage. Nous considérons donc que l'azithromycine n'est stable dans aucune des conditions testées lors de cette étude. Des essais complémentaires avec d'autres solvants ou une mise à pH spécifique doivent être réalisés pour conclure sur la stabilité de cet antibiotique.

Pour les tétracyclines, deux cas différents en fonction des composés sont constatés :

- pour la tétracycline et l'oxytétracycline, il n'y pas d'influence du flaconnage (différences observées inférieures à 30%) en tous cas pour les temps de l'étude jusqu'à 4 mois (T119j) comme le montre la Figure 8.
- Pour la doxycycline et la chlortétracycline, l'influence du flaconnage est plus marquée car les différences observées sont supérieures à 35% même sur les temps de début de l'étude de stabilité comme le montre la Figure 9.

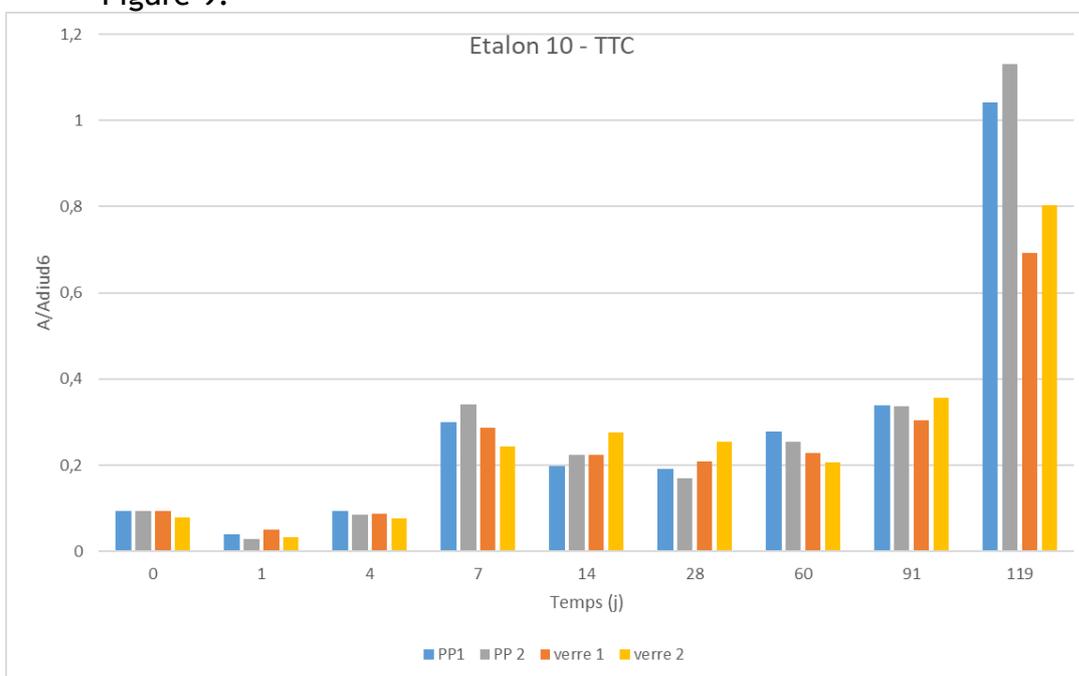


Figure 8 : Comparaison des ratios d'aires obtenus pour les flacons en PP et en verre pour la tétracycline sur le diuron D6 dans la solution étalon à 10µg/L dans le méthanol

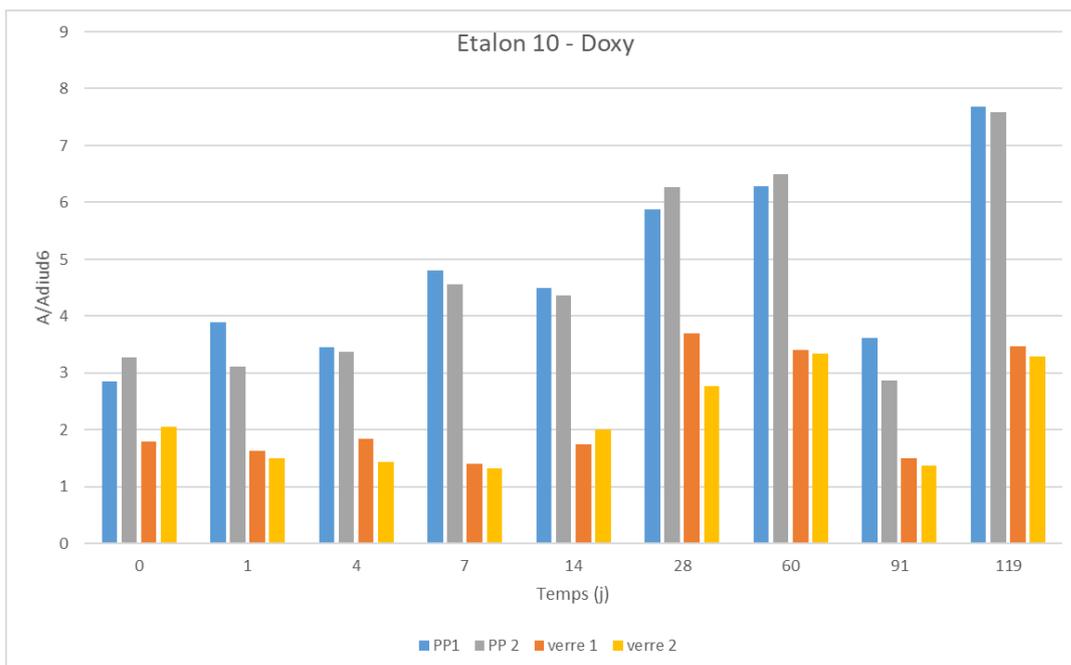


Figure 9 : Comparaison des ratios d'aires obtenus pour les flacons en PP et en verre pour la doxycycline dans la solution étalon à 10µg/L dans le méthanol

Concernant l'influence du flaconnage sur la linéarité, les mêmes résultats ont été obtenus en traçant les droites d'étalonnage avec les aires des antibiotiques sans correction du diuron D6.

Le Tableau 6 présente un récapitulatif des résultats obtenus pour chaque antibiotique lors de l'étude de l'influence des paramètres testés. En fonction de ces résultats et lorsque cela était possible, nous avons choisi un paramètre optimal pour la conservation des solutions mères d'antibiotiques. Pour les pénicillines et la céphalosporine, le choix du flaconnage et du solvant seront faits en fonction des résultats de l'étude de l'évolution de la stabilité dans HYPE au paragraphe suivant.

Tableau 6 : Récapitulatif de l'influence des paramètres testés (solvant et flaconnage) sur chaque antibiotique et paramètre optimal choisi.

Groupe chimique	Antibiotique	Influence du solvant	Influence du flaconnage	Choix solvant optimal	Choix flaconnage optimal
Pénicillines	Amoxicilline	oui	non	eau	à définir
	Amoxicilline d4	oui	non	eau	à définir
	Ampicilline	oui	non	eau	à définir
	Ampicilline d5	oui	non	eau	à définir
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	oui	oui	MeOH	PP
	Ciprofloxacin d8	oui	oui	MeOH	PP
	Danofloxacin	oui	oui	MeOH	PP
	Danofloxacin d3	oui	oui	MeOH	PP
	Enrofloxacin	oui	oui	MeOH	PP
	Enrofloxacin d5	oui	oui	MeOH	PP
	Marbofloxacin	oui	oui	MeOH	PP
	Norfloxacin	oui	oui	MeOH	PP
	Norfloxacin d5	oui	oui	MeOH	PP
	Ofloxacin	oui	oui	MeOH	PP
	Ofloxacin d3	oui	oui	MeOH	PP
	Pefloxacin	oui	oui	MeOH	PP
	Pefloxacin d3	oui	oui	MeOH	PP
Sparfloxacin	oui	oui	MeOH	PP	
Céphalosporine	Ceftiofur	non	non	à définir	à définir
	Ceftiofur d3	non	non	à définir	à définir
Tétracyclines	Chlortétracycline	N/A	oui	MeOH	PP
	Doxycycline	N/A	oui	MeOH	PP
	Doxycycline d3	N/A	oui	MeOH	PP
	Oxytétracycline	N/A	oui	MeOH	PP
	Tétracycline	N/A	oui	MeOH	PP
Macrolide	Azithromycine	N/A	N/A	N/A	N/A

4.5 EVALUATION DE LA STABILITE DANS LE TEMPS

Pour cette étude, la stabilité des solutions mères ne sera évalué que dans les conditions optimales de flaconnage et de solvant identifiées dans le Tableau 6. Pour les conditions restant à définir, tous les paramètres seront étudiés.

4.5.1 Stabilité des solutions mères

Pour évaluer la stabilité des antibiotiques, nous avons choisi d'utiliser le logiciel HYPE⁽¹⁵⁾ qui permet d'identifier des tendances significatives sur des séries temporelles de contaminants. Sur les deux tests de tendance (Mann-Kendall et régression linéaire) appliqués, nous avons choisi de ne traiter que les données issues du test de régression linéaire (voir paragraphe 4.2.2).

Si aucune tendance significative n'est identifiée alors le composé est stable dans le mode de stockage évalué (couple solvant/flaconnage) et pour la durée de conservation considérée. Si une tendance significative est identifiée, il faut que cette tendance soit significative pour tous les niveaux de concentration des étalons pour être considérée.

Pour les fluoroquinolones et leurs analogues deutérés dans les flacons en PP et le solvant MeOH, aucune tendance n'a été identifiée par contre, des dates de rupture de 4j (enrofloxacin, marbofloxacin, ofloxacin) à 4 mois (ciprofloxacin, danofloxacin, pefloxacin) ont été identifiées comme le montrent la Figure 10 et le Tableau 7. Pour la norfloxacin et la sparfloxacin, aucune date de rupture n'a été identifiée. Malgré le fait qu'aucune tendance ne soit significative pour toutes les fluoroquinolones, on constate une forte augmentation du ratio d'aire de l'antibiotique sur l'aire du Diuron D6 entre T0 et T7j (Figure 10). Cette augmentation est suivie d'une chute du ratio jusqu'à T4 mois (septembre 2020) puis d'une remontée à T5 mois avec un équilibre jusqu'à T1 an.

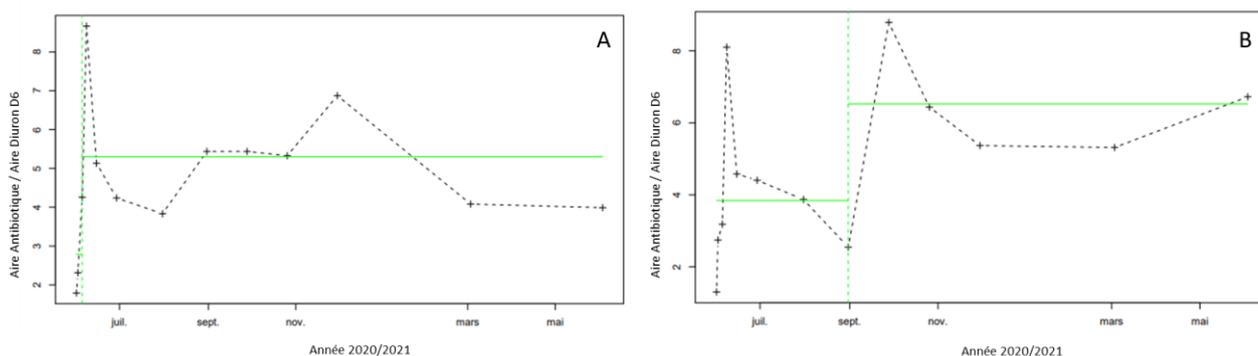


Figure 10 : Graphiques de tendance HYPE obtenus pour l'enrofloxacin (A) et la danofloxacin (B) dans les flacons en PP et l'eau dans l'étalon à 20 µg/L (T0 correspondant au 1^{er} point au mois de juin sur le graphique)

Au regard de cette forte augmentation du ratio des aires des antibiotiques sur l'aire du diuron D6, nous avons décidé de ne pas prendre en considération les dates de rupture jusqu'à T7j. De plus, nous avons décidé de prendre comme durée de conservation maximale de la solution, la date de prélèvement immédiatement avant la date de rupture identifiée et d'utiliser la même durée

de conservation pour tous les composés d'un même groupe chimique. Par exemple, pour les fluoroquinolones, la durée de conservation maximale préconisée est de 3 mois car des dates de rupture à T4 mois ont été identifiées et que les dates de rupture à T4j ne sont pas prises en compte (Tableau 9).

Pour les pénicillines dans le solvant eau, aucune tendance significative n'a été identifiée quel que soit le flaconnage (verre ou PP). Comme le montre la Figure 11, pour l'amoxicilline (A) et son deutéré, aucune date de rupture n'a été identifiée contrairement à l'ampicilline (B) et son deutéré pour lesquels une date de rupture à T4j a été identifiée (voir Tableau 7). Comme pour les fluoroquinolones, une forte augmentation du ratio d'aire des antibiotiques sur l'aire du diuron D6 est constaté entre T0 et T7j.

Pour les pénicillines dans le solvant eau, l'étude des tendances HYPE ne permet pas d'identifier un flaconnage optimal pour la conservation de ces composés en solutions mères. La durée de conservation maximale des solutions mères des pénicillines est de 1 an (Tableau 9).

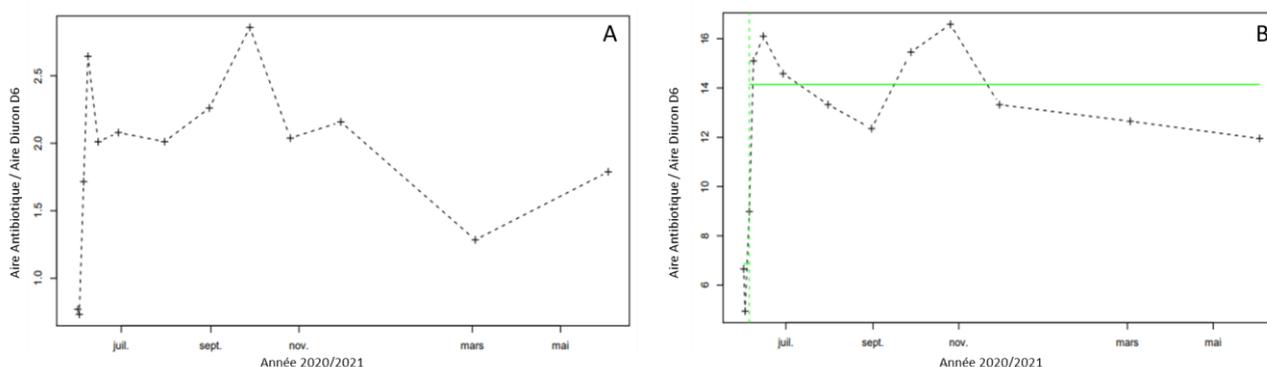


Figure 11 : Graphiques de tendance HYPE obtenus pour l'amoxicilline (A) et l'ampicilline (B) dans les flacons en PP et l'eau dans l'étalon à 20 µg/L (T0 correspondant au 1^{er} point au mois de juin sur le graphique)

Pour la céphalosporine, le flaconnage et le solvant optimaux restaient à définir. Pour le ceftiofur et son analogue deutéré, aucune tendance significative n'a été identifiée dans HYPE. Un flaconnage optimal ne peut donc toujours pas être défini. Concernant le solvant, une date de rupture à T4 mois est identifiée dans le MeOH pour le flacon PP (voir Tableau 7). Nous préconisons donc l'utilisation de l'eau comme solvant optimal. La durée maximale de conservation en solution mère du ceftiofur et de son analogue deutéré dans le solvant eau est de 1 an (Tableau 9).

Comme pour les fluoroquinolones et les pénicillines, une forte augmentation du ratio d'aire des antibiotiques sur l'aire du diuron D6 est constaté entre T0 et T7j.

Pour les tétracyclines et leurs analogues deutérés dans les flacons PP et le MeOH, aucune tendance significative n'a été identifiée. Des dates de rupture de 14j à 5 mois ont été identifiées (voir Tableau 7). Les tests HYPE ont permis d'identifier des dates de rupture différentes entre les mélanges en solvants 1 (uniquement MeOH) et 2 (mélange MeOH, Eau, ACN et MeOH+NaOH). Les dates de rupture les plus faibles sont observées avec les mélanges en solvant 2. Le solvant préconisé est donc le MeOH sans mélange avec d'autres solvants qui

semblent avoir un impact même à faible proportion. La durée maximale de conservation est de 3 mois (Tableau 9).

Comme pour les fluoroquinolones, les pénicillines et la céphalosporine, une forte augmentation du ratio d'aire des antibiotiques sur l'aire du diuron D6 est constaté entre T0 et T7j.

Cette augmentation de signal entre T0 et T7j n'est pas liée à la perte de sensibilité du diuron D6 car la même augmentation est constatée en traitant les résultats en aire sans correction comme le montre la Figure 12 pour la norfloxacin. Cette augmentation est peut-être due à une période nécessaire pour la solubilisation des antibiotiques ou à une période d'équilibration entre les phénomènes potentiels d'absorption/désorption entre le flaconnage et le solvant de dissolution ou à une période d'équilibrage à la congélation. Des tests supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir répondre à cette question.

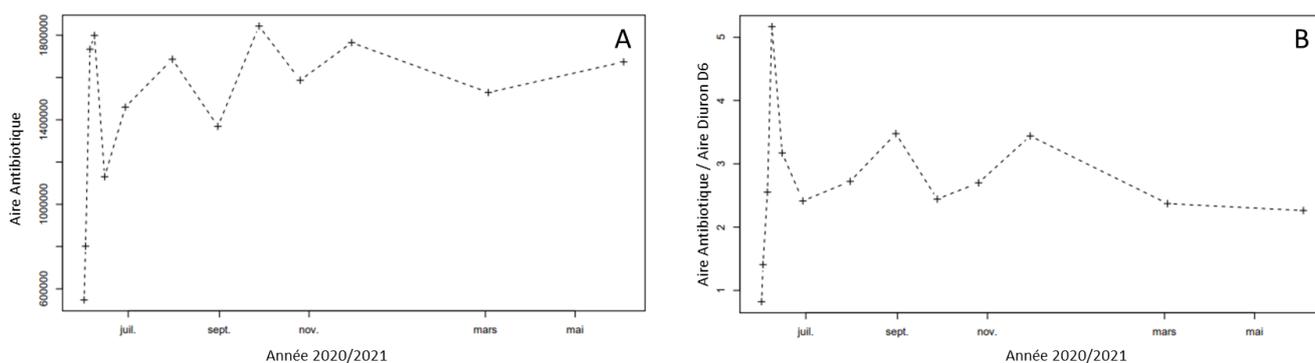


Figure 12 : Graphiques de tendance HYPE obtenus pour la norfloxacin en aire (A) et ratio aire / aire diuron D6 (B) dans les flacons en PP et le méthanol dans l'étalon à 20 µg/L (T0 correspondant au 1^{er} point au mois de juin sur le graphique)

Suite à tous ces résultats, nous avons défini des conditions de stockage pour chaque antibiotique ainsi que des durées de conservation. Ces conditions sont présentées dans le Tableau 9.

Tableau 7 : Récapitulatif des tendances significatives obtenues par antibiotique et par condition de stockage

Groupe chimique	Antibiotique	flaconnage	Solvant	Tendance	Date de rupture
Pénicillines	Amoxicilline	verre	eau	=	N/A
		PP	eau	=	N/A
	Amoxicilline d4	verre	eau	=	N/A
		PP	eau	=	N/A
	Ampicilline	verre	eau	=	T4j
		PP	eau	=	T4j
Ampicilline d5	verre	eau	=	T4j	
	PP	eau	=	T4j	
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	PP	MeOH	=	4 mois
	Ciprofloxacin d8	PP	MeOH	=	4 mois
	Danofloxacin	PP	MeOH	=	4 mois
	Danofloxacin d3	PP	MeOH	=	N/A
	Enrofloxacin	PP	MeOH	=	4j
	Enrofloxacin d5	PP	MeOH	=	4 mois
	Marbofloxacin	PP	MeOH	=	4j
	Norfloxacin	PP	MeOH	=	N/A
	Norfloxacin d5	PP	MeOH	=	4j
	Ofloxacin	PP	MeOH	=	4j
	Ofloxacin d3	PP	MeOH	=	4 mois
	Pefloxacin	PP	MeOH	=	4 mois
	Pefloxacin d3	PP	MeOH	=	4j
Sparfloxacin	PP	MeOH	=	N/A	
Céphalosporine	Ceftiofur	verre	MeOH	=	N/A
		verre	eau	=	N/A
		PP	MeOH	=	4 mois
		PP	eau	=	N/A
	Ceftiofur d3	verre	MeOH	=	N/A
		verre	eau	=	N/A
		PP	MeOH	=	N/A
		PP	eau	=	N/A
Tétracyclines	Chlortétracycline	PP	MeOH-1	=	4 mois
		PP	MeOH-2	=	4 mois
	Doxycycline	PP	MeOH-1	=	4 mois
		PP	MeOH-2	=	4 mois
	Doxycycline d3	PP	MeOH-1	=	4 mois
		PP	MeOH-2	=	14j
	Oxytétracycline	PP	MeOH-1	=	N/A
		PP	MeOH-2	=	5 mois
Tétracycline	PP	MeOH-1	=	4 mois	
	PP	MeOH-2	=	14j	
Macrolide	Azithromycine	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A : Non applicable, pas de date de rupture

4.5.2 Stabilité des solutions filles et solutions étalons

Les droites d'étalonnage (T0 et T7) ont été comparées d'une part avec les droites d'étalonnage réalisées à partir de la solution fille congelée 7 jours (SF_T0+7 et SF_T7+7) et d'autre part avec les droites d'étalonnage réalisées avec les solutions étalons congelées 7 jours (T0+7 et T7+7).

4.5.2.1 Variabilité du Diuron D6

Le Diuron D6 présente une forte variabilité pour cette étude de congélation des solutions filles et gammes étalons. Les aires moyennes à chaque temps et dans chaque condition de stockage ont été comparées (Figure 13). On constate une forte baisse d'environ 50 % de l'aire du Diuron D6 entre T0 et T7 (T0+7, SF_T0+7, T7, T7+7 et SF_T7+7).

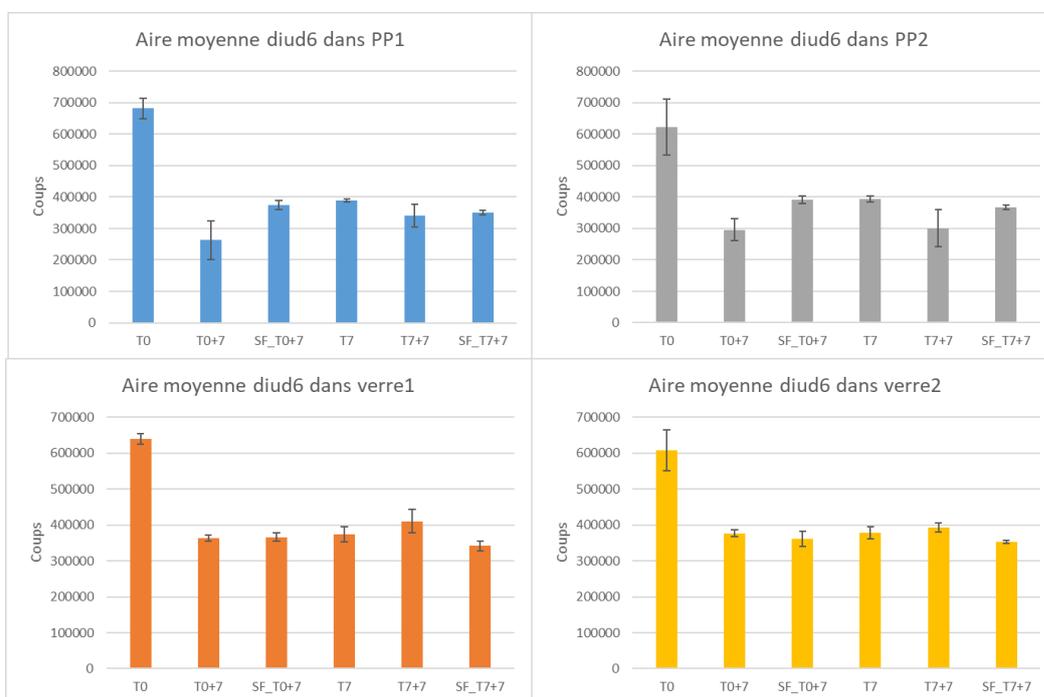


Figure 13 : Aires moyennes du Diuron D6 obtenues dans chaque condition de stockage pour l'étude de congélation des solutions filles et des gammes étalons.

Suite au constat de ces problèmes de variabilité analytique, le ratio des aires des antibiotiques sur l'aire du Diuron D6 a été utilisé pour tracer les droites d'étalonnage (R^2 et pentes). De plus, étant donné l'augmentation constatée sur les aires et les ratios d'aires entre T0 et T7j pour tous les antibiotiques (voir paragraphe 4.5.1), nous avons décidé de ne tenir compte pour cette étude de congélation des solutions filles et gammes étalons que des résultats obtenus à T7, T7+7 et SF_T7+7 dans les conditions définies au 4.5.1 et dans le Tableau 9.

4.5.2.2 Influence de la congélation des solutions diluées et en mélange

Pour tous les antibiotiques, aucune perte de linéarité n'est constatée suite à la congélation des solutions filles et des gammes étalons. En effet, tous les coefficients de détermination obtenus sont supérieurs à 0,99 (voir

Tableau 8).

Pour chaque antibiotique, les pentes des droites d'étalonnage obtenues avec la gamme étalon à T7j congelée 7 jours (T7+7) et celle obtenue à partir de la solution fille à T7 congelée 7 jours (SF_T7+7) ont été comparées à celle obtenue avec la gamme à T7 non congelée (T7). Les ratios des pentes ont été calculés et ils doivent être compris entre 0,90 et 1,10 pour que le composé soit considéré comme stable à la congélation en solution diluée et en mélange.

Les ratios obtenus sont présentés dans le Tableau 8. On constate que les solutions filles et les gammes étalons de l'amoxicilline, la ciprofloxacine, la danofloxacine, l'enrofloxacine, la norfloxacine, la pefloxacine, la sparfloxacine et la tétracycline ainsi que leurs analogues deutérés ne peuvent pas être conservés 7 jours au congélateur. Pour l'ampicilline et son analogue deutéré et l'oxytétracycline, seules les solutions filles peuvent être conservées au congélateur pendant 7 jours. Enfin, pour la marbofloxacine, l'ofloxacine et le ceftiofur ainsi que leurs analogues deutérés, seules les gammes étalons peuvent être congelées 7 jours au congélateur (Tableau 9).

La proportion d'eau dans ces solutions filles ou étalons doit avoir un impact sur la conservation au congélateur, nous préconisons donc de ne pas conserver ces solutions filles ou étalons mais de les préparer le jour de l'analyse.

5. RECAPITULATIF DES CONDITIONS DE STOCKAGE DES ANTIBIOTIQUES

Cette étude de stabilité nous a permis de définir pour chacun des 16 antibiotiques étudiés, les conditions de stockage comme le solvant de dissolution, le flaconnage ainsi que la durée de conservation les plus appropriés pour garantir la stabilité de ces composés en solutions mères. Une étude complémentaire sur la congélation en solutions diluées a également permis d'identifier la possibilité de conserver au congélateur les solutions filles et les gammes étalon pendant une semaine. Le Tableau 9 présente ces conditions par antibiotique.

Tableau 8 : Coefficients de détermination R² et ratios des pentes des droites d'étalonnage obtenus pour l'étude de congélation des solutions filles et gammes étalons

Groupe chimique	Antibiotique	R ² T7	R ² SF-T7+7	R ² T7+7	ratio T7+7/T7	ratio SF_T7+7/T7
Pénicillines	Amoxicilline	0,999	1,000	0,992	0,63	0,71
	Amoxicilline d4	0,999	1,000	0,991	0,63	0,70
	Ampicilline	0,999	1,000	0,999	0,83	0,90
	Ampicilline d5	0,999	1,000	0,999	0,82	0,90
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	0,998	0,999	0,995	0,77	0,69
	Ciprofloxacin d8	0,998	1,000	0,996	0,78	0,68
	Danofloxacin	0,990	0,999	0,999	0,72	0,54
	Danofloxacin d3	0,991	0,999	0,996	0,78	0,56
	Enrofloxacin	0,998	1,000	0,998	0,77	0,66
	Enrofloxacin d5	0,997	1,000	0,995	0,86	0,65
	Marbofloxacin	0,998	1,000	0,995	0,94	0,76
	Norfloxacin	0,998	1,000	0,992	0,78	0,64
	Norfloxacin d5	0,998	1,000	0,991	0,79	0,64
	Ofloxacin	0,998	0,999	0,992	0,97	0,71
	Ofloxacin d3	0,998	1,000	0,995	1,05	0,81
	Pefloxacin	0,996	1,000	0,995	0,81	0,61
	Pefloxacin d3	0,996	1,000	0,994	0,81	0,61
	Sparfloxacin	0,997	0,999	0,996	0,78	0,76
Céphalosporine	Ceftiofur	0,999	1,000	0,995	0,97	0,88
	Ceftiofur d3	0,999	1,000	0,999	0,99	0,88
Tétracyclines	Chlortétracycline	0,991	1,000	0,996	1,02	1,15
	Doxycycline	0,997	1,000	0,994	1,06	1,07
	Doxycycline d3	0,996	1,000	0,994	1,06	1,08
	Oxytétracycline	0,999	0,999	0,991	0,59	0,98
	Tétracycline	0,999	0,997	0,997	0,50	0,84
Macrolide	Azithromycine	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A : Non applicable

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des conditions de stockage préconisées par antibiotique en solutions mères et en solutions diluées

Groupe chimique	Antibiotique	Flaconnage	Solvant	Durée de conservation solution mère	Congélation 7 jours Solution Fille	Congélation 7 jours Gamme étalon
Pénicillines	Amoxicilline	verre ou PP	Eau	1 an	non	non
	Amoxicilline d4	verre ou PP	Eau	1 an	non	non
	Ampicilline	verre ou PP	Eau	1 an	ok	non
	Ampicilline d5	verre ou PP	Eau	1 an	ok	non
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Ciprofloxacin d8	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Danofloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Danofloxacin d3	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Enrofloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Enrofloxacin d5	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Marbofloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	ok
	Norfloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Norfloxacin d5	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Ofloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	ok
	Ofloxacin d3	PP	MeOH	3 mois	non	ok
	Pefloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Pefloxacin d3	PP	MeOH	3 mois	non	non
	Sparfloxacin	PP	MeOH	3 mois	non	non
Céphalosporine	Ceftiofur	verre ou PP	Eau	1 an	non	ok
	Ceftiofur d3	verre ou PP	Eau	1 an	non	ok
Tétracyclines	Chlortétracycline	PP	MeOH	3 mois	ok	ok
	Doxycycline	PP	MeOH	3 mois	ok	ok
	Doxycycline d3	PP	MeOH	3 mois	ok	ok
	Oxytétracycline	PP	MeOH	3 mois	ok	non
	Tétracycline	PP	MeOH	3 mois	non	non
Macrolide	Azithromycine	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A : Non applicable

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Suite à des recherches bibliographiques, nous avons mené une étude de stabilité sur un an de 16 antibiotiques en solution pour tester la stabilité et définir les conditions de conservation les plus adaptées. Différents paramètres ont été pris en compte dans le protocole de cette étude comme la nature du flaconnage avec deux types de vial testés (verre ambré Truview Waters et PP Quanrecovery Waters) et le solvant de dissolution des antibiotiques avec deux types de solvants testés sauf pour les tétracyclines pour lesquelles seul le méthanol a été utilisé.

Une étude complémentaire sur les solutions diluées en mélange en solution fille ou en gamme étalon a été menée pour identifier si les antibiotiques étaient stables à la congélation.

Les résultats obtenus montrent que l'aliquotage des solutions mères pour limiter les étapes de décongélations/congélations successives au cours de l'utilisation des solutions mères d'antibiotiques est primordial pour garantir la stabilité de ces composés.

Sur les deux paramètres de conservation testés, le type de flaconnage a une forte influence sur la conservation des antibiotiques contrairement au type de solvant choisi pour la dissolution. Seules les pénicillines présentent une perte importante lorsqu'elles sont conditionnées dans du méthanol et des flacons en verre. Pour tous les autres antibiotiques, les flacons en PP Quanrecovery présentent un signal en spectrométrie de masse beaucoup plus intense que les flacons en verre, une linéarité des gammes étalons maintenues et pas de perte de détection pour les étalons de faibles niveaux de concentration. Nous recommandons donc l'utilisation de ce type de flacons pour la conservation des solutions mères des antibiotiques.

Pour les tétracyclines, il est recommandé de ne pas faire de mélanges avec des composés dilués dans un autre solvant que le méthanol.

Les durées de conservation maximales des antibiotiques varient de 3 mois pour les tétracyclines et les fluoroquinolones à 1 an pour les pénicillines et la céphalosporine.

Pour le macrolide azithromycine, aucune condition de stockage ne peut être préconisée car aucune des conditions testées n'a répondu à nos critères de linéarité des gammes étalons réalisées. Pour ce composé, une étude supplémentaire sera à réaliser en prenant en compte d'autres paramètres comme le pH ou le choix d'autres solvants de dissolution.

L'étude complémentaire sur la stabilité des antibiotiques en solutions diluées suite à une congélation de 7 jours a permis d'identifier :

- les composés stables en solutions filles et en gammes étalons congelées : Chlortétracycline et Doxycycline ;
- les composés stables uniquement en solutions filles congelées : Ampicilline et Oxytétracycline
- les composés stables uniquement en gammes étalon congelées : Ceftiofur, Marbofloxacin et Ofloxacin
- les composés instables en solutions filles et gammes étalons congelées : Amoxicilline, Ciprofloxacine, Danofloxacine, Enrofloxacine, Norfloxacine, Pefloxacine, Sparfloxacine et Tétracycline

Nous préconisons toutefois de réaliser, pour tous les antibiotiques testés dans cette étude, les solutions filles et gammes étalons le jour de l'analyse et de ne pas les conserver en solutions diluées (<500µg/L dans l'eau).

Cette étude a également montré que les analogues deutérés des antibiotiques présentent le même profil de stabilité que les non deutérés dans les conditions testées. Il semble donc important d'ajouter des analogues deutérés lors de la conservation d'échantillons pour identifier et corriger de potentiels problèmes de stabilité.

Etant donnée la forte augmentation de signal des antibiotiques observée entre T0 et T7j, il sera intéressant de mener une étude complémentaire pour comprendre et essayer d'identifier les phénomènes qui se produisent sur cette période.

D'un point de vue plus méthodologique sur ce genre d'étude de stabilité, afin d'avoir une bonne représentativité des traceurs choisis par rapport aux composés étudiés, il faudrait mener deux études de front :

- une pour les composés non deutérés avec, pour ajout de traceur, les analogues deutérés
- une pour les analogues deutérés avec, pour ajout de traceur, les analogues non deutérés.

Références bibliographiques :

- (1) Monteiro SC., Boxall A.B.A. (2010), Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 53-153.
- (2) Richardson S.D. (2012), Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical chemistry* 84, 747-778.
- (3) <https://www.norman-network.com/nds/susdat/>
- (4) Method EPA 1694 (2007) : Pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS.
- (5) US EPA, Office of water (2010), Stability of pharmaceuticals, personal care products, steroids, and hormones in aqueous samples, POTW effluents, and biosolids.
- (6) Okerman L., Van Hende J., De Zutter L. (2007), Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. *Analytica Chimica Acta* 586, 284-288.
- (7) Riediker S., Rytz A., Stadler R. (2004), Cold-temperature stability of five β -lactams antibiotics in bovine milk and milk extracts prepared for liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis. *Journal of chromatography A* 1054, 359-363.
- (8) Zhang Y., Liu X., Cui Y., Huang H., Chi N., Tang X. (2009), Aspects of degradation kinetics of azithromycin in aqueous solution. *Chromatographia* 70, 67-73.
- (9) Liang Y., Bonner Denton M., Bates R. (1998), Stability studies of tetracycline in methanol solution. *Journal of chromatography A* 827, 45-55.
- (10) Soeborg T., Ingerslev F., Halling-Sorensen B. (2004), Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. *Chemosphere* 57, 1515-1524.
- (11) Sturini M., Speltini A., Maraschi F., Pretali L., Profumo A., Fasani E., Albini A., Migliavacca R., Nucleo E. (2012), Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. *Water research* 56, 5575-5582.
- (12) Gaugain M., Chotard MP., Verdon E. (2013), Stability study for 53 antibiotics in solution and in fortified biological matrixes by LC/MS/MS. *Journal of AOA international* 96.

- (13) Llorca M., Gros M., Rodriguez-Mozaz S., Barcelo D. (2014), Sample preservation for the analysis of antibiotics in water. *Journal of chromatography A* 1369, 43-51.
- (14) Lardy-Fortan S., Lalere B. (2017), Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau. Rapport AQUAREF.
- (15) Croiset N., Lopez B. (2013), HYPE Outil d'analyse statistique des séries temporelles d'évolution de la qualité des eaux souterraines - Manuel d'utilisation. Rapport ONEMA BRGM/RP-63066-FR, 64p.

ANNEXES

Annexe 1 : Pureté des produits antibiotiques du fournisseur CIL Cluzeau

Molécule	Pureté (%)
Amoxicilline	98,0
Amoxicilline d4	98,0
Ampicilline	98,5
Ampicilline d5	95,0
Azithromycine	99,9
Ceftiofur	91,8
Ceftiofur d3	98,6
Chlortetracycline	92,9
Ciprofloxacine	92,3
Ciprofloxacine d8	89,7
Danofloxacine	95,2
Danofloxacine d3	98,0
Doxycycline	99,3
Doxycycline d3	97,0
Enrofloxacine	99,7
Enrofloxacine d5	98,7
Marbofloxacine	98,3
Norfloxacine	96,1
Norfloxacine d5	93,6
Ofloxacine	96,5
Ofloxacine d3	93,5
Oxytetracycline	95,2
Pefloxacine	92,1
Pefloxacine d3	99,2
Sparfloxacine	99,0
Tetracycline	97,1

Annexe 2 : Préparation des solutions filles A et C dans l'eau

Composés	conc Solution Mère (mg/L)	conc Solution Fille (µg/L)	Volume final (mL)	Volume Solution Mère prelevé (µL)
amoxicilline	178,8	500	10	27,96
amoxicilline d4	74,3	500	10	67,30
ampicilline	226,8	500	10	22,04
ampicilline d5	61,4	500	10	81,44
azithromycine	275,6	500	10	18,15
ceftiofur	224,0	500	10	22,32
ceftiofur d3	90,5	500	10	55,23
chlortetracycline	283,5	500	10	17,63
ciprofloxacin	287,7	500	10	17,38
ciprofloxacin d8	181,5	500	10	27,55
danofloxacin	273,5	500	10	18,28
danofloxacin d3	55,1	500	10	90,67
doxycycline	330,1	500	10	15,15
doxycycline d3	53,1	500	10	94,14
enrofloxacin	371,0	500	10	13,48
enrofloxacin d5	192,8	500	10	25,94
marbofloxacin	307,1	500	10	16,28
norfloxacin	395,3	500	10	12,65
norfloxacin d5	131,1	500	10	38,14
ofloxacin	296,4	500	10	16,87
ofloxacin d3	149,4	500	10	33,46
oxytetracycline	246,1	500	10	20,31
pefloxacin	248,9	500	10	20,09
pefloxacin d3	108,5	500	10	46,07
sparfloxacin	259,7	500	10	19,25
tetracycline	309,6	500	10	16,15

Annexe 3 : Préparation des solutions filles B et D dans l'eau

Composés	conc Solution Mère (mg/L)	conc Solution Fille (µg/L)	Volume final (mL)	Volume Solution Mère prelevé (µL)
amoxicilline	232,7	500	10	21,49
amoxicilline d4	74,3	500	10	67,30
ampicilline	281,9	500	10	17,73
ampicilline d5	60,9	500	10	82,04
azithromycine	224,6	500	10	22,27
ceftiofur	256,0	500	10	19,53
ceftiofur d3	88,5	500	10	56,52
chlortetracycline	283,5	500	10	17,63
ciprofloxacine	269,1	500	10	18,58
ciprofloxacine d8	127,7	500	10	39,14
danofloxacine	341,3	500	10	14,65
danofloxacine d3	77,6	500	10	64,45
doxycycline	330,1	500	10	15,15
doxycycline d3	53,1	500	10	94,14
enrofloxacine	306,6	500	10	16,31
enrofloxacine d5	153,0	500	10	32,68
marbofloxacine	331,8	500	10	15,07
norfloxacine	331,6	500	10	15,08
norfloxacine d5	127,1	500	10	39,34
ofloxacine	286,5	500	10	17,45
ofloxacine d3	130,5	500	10	38,31
oxytetracycline	246,1	500	10	20,31
pefloxacine	256,4	500	10	19,50
pefloxacine d3	161,1	500	10	31,04
sparfloxacine	257,1	500	10	19,45
tetracycline	309,6	500	10	16,15

Annexe 4 : Préparation des gammes d'étalonnage A, B, C et D dans l'eau

Composés	conc SF µg/L	conc ET 20µg/L	conc ET 10µg/L	conc ET 5µg/L	conc ET 2µg/L	conc ET 1µg/L	conc ET 0,5µg/L
		200µL de SF dans 5mL	100µL de SF dans 5mL	2,5mL de ET 20µg/L dans 10mL	1mL de ET 20µg/L dans 10mL	1mL de ET 10µg/L dans 10mL	1mL de ET 5µg/L dans 10mL
amoxicilline	500	20	10	5	2	1	0,5
amoxicilline d4	500	20	10	5	2	1	0,5
ampicilline	500	20	10	5	2	1	0,5
ampicilline d5	500	20	10	5	2	1	0,5
azithromycine	500	20	10	5	2	1	0,5
azithromycine d3	500	20	10	5	2	1	0,5
ceftiofur	500	20	10	5	2	1	0,5
ceftiofur d3	500	20	10	5	2	1	0,5
chlortetracycline	500	20	10	5	2	1	0,5
ciprofloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
ciprofloxacine d8	500	20	10	5	2	1	0,5
danofloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
danofloxacine d3	500	20	10	5	2	1	0,5
doxycycline	500	20	10	5	2	1	0,5
doxycycline d3	500	20	10	5	2	1	0,5
enrofloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
enrofloxacine d5	500	20	10	5	2	1	0,5
marbofloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
norfloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
norfloxacine d5	500	20	10	5	2	1	0,5
ofloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
ofloxacine d3	500	20	10	5	2	1	0,5
oxytetracycline	500	20	10	5	2	1	0,5
pefloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
pefloxacine d3	500	20	10	5	2	1	0,5
sparfloxacine	500	20	10	5	2	1	0,5
tetracycline	500	20	10	5	2	1	0,5
Mise en vial :							
- blanc : 50µL diud6 20µg/L + 950µL eau							
- vials verre : 25µL diud6 20µg/L + 475µL Etalons							
- vials PP : 12,5µL diud6 20µg/L + 237,5µL Etalons							