

THESE  
présentée  
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1  
pour l'obtention  
du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le  
25-10-2007  
par  
Anne Piram

Les  $\beta$ -bloquants et stéroïdes dans l'environnement :  
Analyse LC/MS/MS, occurrence et stabilité photochimique

JURY : M René Faure, directeur de thèse  
M Philippe Garrigues, rapporteur  
Mme Sylvie Guittonneau  
M Pierre Lantéri, président  
M Alain Saliot, rapporteur  
M Arnaud Salvador, co-encadrant



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

**M. le Professeur L. COLLET**

Vice-Président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J.F. MORNEX

Vice-Président du Conseil d'Administration

M. le Professeur J. LIETO

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie

M. le Professeur D. SIMON

Universitaire

M. G. GAY

## **Secrétaire Général**

## ***SECTEUR SANTE***

### ***Composantes***

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

UFR de Médecine Lyon-Nord

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

UFR de Médecine Lyon-Sud

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

UFR d'Odontologie

Directeur : M. O. ROBIN

Institut des Sciences Pharmaceutiques et  
Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche  
en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## ***SECTEUR SCIENCES***

### ***Composantes***

UFR de Physique

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

UFR de Biologie

Directeur : M. le Professeur H. PINON

UFR de Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

UFR de Génie Electrique et des Procédés

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

UFR Sciences de la Terre

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

UFR de Mathématiques

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

UFR d'Informatique

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

UFR de Chimie Biochimie

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

UFR STAPS

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Observatoire de Lyon

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Institut des Sciences et des Techniques de  
l'Ingénieur de Lyon

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

IUT A

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

IUT B

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS



## Remerciements

## Remerciements

*Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au Laboratoire des Sciences Analytiques (LSA, UMR-CNRS 5180) à l'Université Claude Bernard, Lyon 1 (UCBL).*

*Je tiens en premier lieu à remercier Monsieur René Faure, Professeur à l'UCBL, d'avoir dirigé cette thèse avec tant d'intérêt. J'ai particulièrement apprécié sa grande disponibilité ainsi que la liberté et la confiance qu'il m'a accordée.*

*Je remercie vivement Monsieur Arnaud Salvador, maître de conférences à l'UCBL, qui a co-encadré cette thèse. Outre les excellents conseils qu'il a apporté à ces travaux, il a largement équipé le laboratoire au cours de ces 3 ans (spectromètres de masse, extracteurs automatiques d'échantillon, etc.) ouvrant ainsi de nouvelles possibilités d'orientation de ces travaux de recherche. De plus je lui suis particulièrement redevable de m'avoir formée à différentes techniques et instruments.*

*J'exprime ma reconnaissance envers les membres du jury qui ont évalué ces travaux. Merci à Monsieur Pierre Lantéri, Professeur à l'UCBL, d'avoir accepté de présider ce jury. Je le*

*remercie également, conjointement à Jean-Yves Gauvrit, ingénieur d'étude à l'UCBL, pour leur contribution à l'étude chimiométrique présentée dans ce mémoire.*

*Je remercie Messieurs Alain Saliot, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, et Philippe Guarrigues, Directeur de recherche à l'institut des Sciences Moléculaires de l'Université de Bordeaux I, d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et d'en être rapporteurs.*

*Enfin, merci à Madame Sylvie Guittonneau, Professeur à l'Université de Savoie, d'avoir activement participé à ce jury et formulé d'intéressantes remarques.*

*Ces travaux ont été financé par la Région Rhône Alpes et ont contribué à un projet plus vaste impliquant le Service Central d'Analyse de Solaize (SCA, USR-CNRS 059), le laboratoire d'analyses physico-chimiques du Cemagref de Lyon, le Laboratoire des Sciences Analytiques et le Grand Lyon. J'adresse donc mes remerciements à la Région Rhône-Alpes pour avoir financé ces travaux, ainsi qu'aux différents partenaires de ce projet. Je remercie plus particulièrement Messieurs André Chenavier, Yves Cornelou et Florian Gal, du laboratoire de la direction de l'eau du Grand Lyon, pour leur réactivité vis sa vis des demandes d'échantillon (parfois tardives !) ou pour les information fournies sur ces échantillons ou plus générale sur le fonctionnement des différentes stations d'épuration du Grand Lyon. Je remercie toute l'équipe du Cemagref pour leur accueil chaleureux lors de mes fréquentes visites et plus particulièrement Cécile Miège pour ses conseils et informations quant à l'interprétation des résultats environnementaux et Corinne Brosse pour ces longues discussions quant aux problèmes rencontrées communément, chacune dans son laboratoire !*

*Je remercie Maxime Favier, doctorant à l'Institut für Siedlungs-Wasserwirtschaft d'Aix la Chapelle (Allemagne), ainsi qu'Henry Chermette, Professeur à l'UCBL, pour leur participation à ces travaux.*

*Merci à tous les stagiaires qui ont fortement contribué aux résultats présentés dans ce mémoire : Marie-Laure, Raphaëlle, Cédric, Cécilia et Fatima ; ainsi qu'à tous les membres du laboratoire permanents ou non : Bernard, Françoise, Pédro, Etienne, Mehdi, Tanguy et Caroline.*

*Je remercie mes parents pour leur soutien et leur confiance durant ces longues études.*

*Et enfin, un grand merci à Sébastien pour sa patience, son soutien et ses encouragements.*

# Table des matières

|                                                                |             |
|----------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>REMERCIEMENTS .....</b>                                     | <b>V</b>    |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>                            | <b>XIII</b> |
| <b>INTRODUCTION.....</b>                                       | <b>3</b>    |
| <b>CHAPITRE 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>                  | <b>7</b>    |
| <b>1    MEDICAMENTS ET ENVIRONNEMENT.....</b>                  | <b>7</b>    |
| 1.1    HISTORIQUE.....                                         | 8           |
| 1.2    DEVENIR DES MEDICAMENTS DANS L'ENVIRONNEMENT .....      | 8           |
| 1.2.1    Sources de contamination et voies de dispersion ..... | 8           |
| 1.2.2    Voies de dégradation.....                             | 12          |
| 1.3    OCCURRENCE .....                                        | 12          |
| 1.3.1    Stations d'épuration .....                            | 13          |
| 1.3.2    Eaux de surface .....                                 | 16          |
| 1.3.3    Eaux souterraines et potables .....                   | 18          |
| 1.3.4    Conclusions .....                                     | 19          |
| 1.4    RISQUES.....                                            | 19          |
| 1.4.1    Ecotoxicité des résidus pharmaceutiques.....          | 19          |
| 1.4.2    Bioaccumulation et persistance.....                   | 20          |
| 1.4.3    Effets.....                                           | 20          |
| 1.5    CONCLUSIONS.....                                        | 21          |
| <b>2    MOLECULES ETUDIEES .....</b>                           | <b>22</b>   |
| 2.1    STEROÏDES.....                                          | 22          |
| 2.1.1    Généralités .....                                     | 22          |
| 2.1.2    Corticostéroïdes .....                                | 23          |
| 2.1.3    Estrogènes.....                                       | 26          |
| 2.2 $\beta$ -BLOQUANTS.....                                    | 27          |
| 2.2.1    Propriétés physico-chimiques .....                    | 28          |
| 2.2.2    Pharmacologie .....                                   | 29          |

|          |                                                                          |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.3    | <i>Ecotoxicité</i> .....                                                 | 30        |
| <b>3</b> | <b>MOYENS ANALYTIQUES</b> .....                                          | <b>31</b> |
| 3.1      | ANALYSE DE RESIDUS PHARMACEUTIQUES DANS LES EAUX ENVIRONNEMENTALES ..... | 31        |
| 3.1.1    | <i>Méthodologies</i> .....                                               | 31        |
| 3.1.2    | <i>Préparation d'échantillon</i> .....                                   | 32        |
| 3.1.3    | <i>Technique séparative</i> .....                                        | 33        |
| 3.1.4    | <i>Détection</i> .....                                                   | 34        |
| 3.1.5    | <i>Conclusions</i> .....                                                 | 37        |
| 3.2      | ANALYSE DES CORTICOSTEROÏDES .....                                       | 37        |
| 3.2.1    | <i>Préparation d'échantillon</i> .....                                   | 38        |
| 3.2.2    | <i>Analyse chromatographique</i> .....                                   | 38        |
| 3.3      | ANALYSE DES ESTROGENES .....                                             | 40        |
| 3.3.1    | <i>Préparation d'échantillon</i> .....                                   | 40        |
| 3.3.2    | <i>Analyse par LC/MS</i> .....                                           | 42        |
| 3.3.3    | <i>Autres méthodes d'analyse</i> .....                                   | 42        |
| 3.4      | ANALYSE DES $\beta$ -BLOQUANTS.....                                      | 43        |
| 3.4.1    | <i>Préparation d'échantillon</i> .....                                   | 43        |
| 3.4.2    | <i>Analyse</i> .....                                                     | 44        |
| 3.5      | CONCLUSIONS.....                                                         | 45        |
| <b>4</b> | <b>PHOTODEGRADATION</b> .....                                            | <b>46</b> |
| 4.1      | NOTIONS THEORIQUES .....                                                 | 46        |
| 4.1.1    | <i>Processus photochimiques et photophysiques</i> .....                  | 46        |
| 4.1.2    | <i>Photochimie des molécules simples</i> .....                           | 47        |
| 4.2      | ETUDES ENVIRONNEMENTALES .....                                           | 48        |
| 4.2.1    | <i>Photodégradation dans les matrices environnementales</i> .....        | 48        |
| 4.2.2    | <i>Photodégradation des molécules pharmaceutiques</i> .....              | 49        |
| 4.3      | PHOTOCHIMIE DES STEROÏDES .....                                          | 50        |
| 4.3.1    | <i>Estrogènes</i> .....                                                  | 50        |
| 4.3.2    | <i>Corticostéroïdes</i> .....                                            | 52        |
| 4.3.3    | <i>Conclusions</i> .....                                                 | 56        |
| 4.4      | PHOTOCHIMIE DES $\beta$ -BLOQUANTS.....                                  | 56        |
| 4.4.1    | <i>Stabilité photochimique</i> .....                                     | 57        |
| 4.4.2    | <i>Schémas de dégradation</i> .....                                      | 57        |
| 4.4.3    | <i>Conclusions</i> .....                                                 | 59        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSIONS</b> .....                                                 | <b>60</b> |



|                                                                                                    |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>CHAPITRE 2 DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE : CORTICOSTEROÏDES ET <math>\beta</math>-BLOQUANTS.....</b> | <b>63</b>  |
| <b>1 MATERIELS ET METHODES.....</b>                                                                | <b>64</b>  |
| 1.1 REACTIFS ET SOLVANTS.....                                                                      | 64         |
| 1.2 PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX.....                                             | 64         |
| 1.3 LC/MS/MS.....                                                                                  | 65         |
| 1.4 EXTRACTION.....                                                                                | 67         |
| 1.4.1 Choix du support.....                                                                        | 67         |
| 1.4.2 Matériel.....                                                                                | 67         |
| <b>2 DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'EXTRACTION.....</b>                                             | <b>68</b>  |
| 2.1 TESTS DE FAISABILITE.....                                                                      | 68         |
| 2.2 DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'EXTRACTION.....                                                  | 70         |
| 2.2.1 Apport de la chimimétrie.....                                                                | 70         |
| 2.2.2 Choix des paramètres à cribler.....                                                          | 70         |
| 2.2.3 Etude de criblage.....                                                                       | 71         |
| 2.2.4 Bilan.....                                                                                   | 74         |
| <b>3 DEVELOPPEMENT DE LA METHODE LC/MS/MS.....</b>                                                 | <b>76</b>  |
| 3.1 CHOIX DE LA SOURCE.....                                                                        | 76         |
| 3.2 CHOIX DES PHASES MOBILES.....                                                                  | 77         |
| 3.3 SEPARATION CHROMATOGRAPHIQUE.....                                                              | 78         |
| 3.3.1 Colonnes testées.....                                                                        | 79         |
| 3.3.2 Séparation des $\beta$ -bloquants.....                                                       | 80         |
| 3.3.3 Séparation des corticostéroïdes.....                                                         | 90         |
| 3.4 CONCLUSIONS.....                                                                               | 95         |
| <b>4 PERFORMANCES DE LA METHODE.....</b>                                                           | <b>96</b>  |
| 4.1 EXTRACTION.....                                                                                | 96         |
| 4.2 LINEARITE.....                                                                                 | 98         |
| 4.2.1 Dans l'eau ultra pure.....                                                                   | 98         |
| 4.2.2 Dans les matrices environnementales.....                                                     | 100        |
| 4.3 STABILITE.....                                                                                 | 101        |
| <b>5 APPLICATION A DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX.....</b>                                      | <b>102</b> |
| 5.1 CHOIX DE LA METHODE DE DOSAGE.....                                                             | 102        |
| 5.1.1 Etalonnage interne.....                                                                      | 102        |
| 5.1.2 Méthode des ajouts dosés.....                                                                | 102        |
| 5.1.3 Etalonnage externe.....                                                                      | 103        |
| 5.1.4 Conclusions.....                                                                             | 103        |
| 5.2 FAISABILITE DE LA METHODE DES AJOUTS DOSES.....                                                | 103        |

|          |                                                               |            |
|----------|---------------------------------------------------------------|------------|
| <b>6</b> | <b>CONCLUSIONS.....</b>                                       | <b>105</b> |
|          | <b>CHAPITRE 3 DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE : ESTROGENES .....</b> | <b>109</b> |
| <b>1</b> | <b>MATERIELS ET METHODES.....</b>                             | <b>110</b> |
| 1.1      | REACTIFS ET SOLVANTS .....                                    | 110        |
| 1.2      | DERIVATION DES ESTROGENES .....                               | 110        |
| 1.2.1    | <i>Choix du dérivant.....</i>                                 | <i>110</i> |
| 1.2.2    | <i>Mode opératoire.....</i>                                   | <i>111</i> |
| 1.3      | MATERIEL.....                                                 | 112        |
| 1.3.1    | <i>Extraction.....</i>                                        | <i>112</i> |
| 1.3.2    | <i>Analyse .....</i>                                          | <i>113</i> |
| <b>2</b> | <b>DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE.....</b>                          | <b>115</b> |
| 2.1      | APPORT DE LA DERIVATION .....                                 | 115        |
| 2.1.1    | <i>Ionisation en solution.....</i>                            | <i>115</i> |
| 2.1.2    | <i>Fragmentation.....</i>                                     | <i>116</i> |
| 2.1.3    | <i>Sensibilité .....</i>                                      | <i>116</i> |
| 2.1.4    | <i>Conclusions .....</i>                                      | <i>117</i> |
| 2.2      | METHODE D'EXTRACTION HORS LIGNE.....                          | 117        |
| 2.2.1    | <i>Principe.....</i>                                          | <i>117</i> |
| 2.2.2    | <i>Influence du dépôt et du premier lavage .....</i>          | <i>118</i> |
| 2.2.3    | <i>Dérivation sur support.....</i>                            | <i>119</i> |
| 2.2.4    | <i>Influence du second lavage .....</i>                       | <i>120</i> |
| 2.2.5    | <i>Elution des estrogènes.....</i>                            | <i>121</i> |
| 2.2.6    | <i>Bilan.....</i>                                             | <i>122</i> |
| 2.3      | METHODE EN LIGNE.....                                         | 123        |
| 2.3.1    | <i>Dispositif instrumental.....</i>                           | <i>123</i> |
| 2.3.2    | <i>Choix du support d'extraction.....</i>                     | <i>124</i> |
| 2.3.3    | <i>Influence du premier lavage.....</i>                       | <i>127</i> |
| 2.3.4    | <i>Dérivation .....</i>                                       | <i>127</i> |
| 2.3.5    | <i>Influence du deuxième lavage .....</i>                     | <i>129</i> |
| 2.3.6    | <i>Elution.....</i>                                           | <i>130</i> |
| 2.3.7    | <i>Conclusions .....</i>                                      | <i>130</i> |
| <b>3</b> | <b>PERFORMANCES DE LA METHODE.....</b>                        | <b>131</b> |
| 3.1      | EFFET MATRICE .....                                           | 131        |
| 3.2      | RENDEMENT, REPRODUCTIBILITE ET LINEARITE .....                | 132        |
| <b>4</b> | <b>CONCLUSIONS.....</b>                                       | <b>133</b> |

|                                                                                                   |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>CHAPITRE 4 MESURES DE TERRAIN.....</b>                                                         | <b>137</b> |
| <b>1    MATERIELS ET METHODES.....</b>                                                            | <b>138</b> |
| 1.1    REACTIFS ET SOLVANTS.....                                                                  | 138        |
| 1.2    ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX.....                                                         | 138        |
| 1.2.1    Stations d'épuration.....                                                                | 138        |
| 1.2.2    Echantillonnage.....                                                                     | 140        |
| 1.3    ANALYSES.....                                                                              | 141        |
| 1.3.1    Analyses physico-chimiques.....                                                          | 141        |
| 1.3.2    Analyse des corticostéroïdes et des $\beta$ -bloquants.....                              | 142        |
| 1.3.3    Analyses des estrogènes.....                                                             | 143        |
| 1.4    METHODOLOGIE DE DOSAGE ET CALCUL DES CONCENTRATIONS ENVIRONNEMENTALES.....                 | 143        |
| 1.4.1    Corticostéroïdes et $\beta$ -bloquants.....                                              | 143        |
| 1.4.2    Estrogènes.....                                                                          | 144        |
| <b>2    RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>                                                          | <b>144</b> |
| 2.1    CONCENTRATIONS DANS LES STEP.....                                                          | 144        |
| 2.1.1    Analyse des influents.....                                                               | 145        |
| 2.1.2    Effluents.....                                                                           | 147        |
| 2.1.3    Conclusions.....                                                                         | 150        |
| 2.2    FLUX ENVIRONNEMENTAUX POUR CHAQUE ANALYTE.....                                             | 150        |
| 2.2.1 $\beta$ -bloquants.....                                                                     | 151        |
| 2.2.2    Corticostéroïdes.....                                                                    | 152        |
| 2.2.3    Estrogènes.....                                                                          | 153        |
| 2.2.4    Conclusions.....                                                                         | 154        |
| 2.3    FLUX PAR STEP.....                                                                         | 154        |
| 2.4    EFFICACITE D'EPURATION.....                                                                | 157        |
| 2.4.1    Principe.....                                                                            | 157        |
| 2.4.2    Résultats.....                                                                           | 158        |
| 2.5    ESTIMATION DES RISQUES.....                                                                | 160        |
| <b>3    CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....</b>                                                      | <b>162</b> |
| <b>CHAPITRE 5 PHOTODEGRADATION DES CORTICOSTEROÏDES ET DES <math>\beta</math>-BLOQUANTS .....</b> | <b>167</b> |
| <b>1    MATERIELS ET METHODES.....</b>                                                            | <b>168</b> |
| 1.1    REACTIFS ET SOLVANTS.....                                                                  | 168        |
| 1.2    CONDITIONS DE PHOTODEGRADATION.....                                                        | 168        |
| 1.2.1    Photoréacteur.....                                                                       | 168        |
| 1.2.2    Source d'irradiation.....                                                                | 169        |
| 1.3    PHOTODEGRADATION DES RESIDUS PHARMACEUTIQUES.....                                          | 169        |
| 1.3.1    Photodégradations en milieu dilué.....                                                   | 170        |

|          |                                                                |            |
|----------|----------------------------------------------------------------|------------|
| 1.3.2    | <i>Photodégradations en milieu concentré.....</i>              | 170        |
| 1.4      | ANALYSE.....                                                   | 170        |
| 1.4.1    | <i>Appareillage.....</i>                                       | 170        |
| 1.4.2    | <i>Conditions d'analyse.....</i>                               | 171        |
| <b>2</b> | <b>PHOTODEGRADATION DES CORTICOSTEROÏDES.....</b>              | <b>171</b> |
| 2.1      | CARACTERISTIQUES SPECTRALES .....                              | 171        |
| 2.2      | STABILITE PHOTOCIMIQUE.....                                    | 172        |
| 2.2.1    | <i>Photodégradations en milieu dilué.....</i>                  | 172        |
| 2.2.2    | <i>Photodégradations en milieu concentré.....</i>              | 175        |
| 2.3      | ETUDE DES PHOTOPRODUITS .....                                  | 176        |
| 2.3.1    | <i>Cortisone.....</i>                                          | 176        |
| 2.3.2    | <i>Triamcinolone .....</i>                                     | 180        |
| 2.3.3    | <i>Triamcinolone acétonide.....</i>                            | 183        |
| 2.3.4    | <i>Conclusions.....</i>                                        | 186        |
| <b>3</b> | <b>PHOTODEGRADATION DES <math>\beta</math>-BLOQUANTS .....</b> | <b>186</b> |
| 3.1      | CARACTERISTIQUES SPECTRALES .....                              | 186        |
| 3.2      | STABILITE PHOTOCIMIQUE.....                                    | 187        |
| 3.2.1    | <i>Photodégradations en milieu dilué.....</i>                  | 187        |
| 3.2.2    | <i>Photodégradations en milieu concentré.....</i>              | 189        |
| 3.3      | ETUDE DES PHOTOPRODUITS .....                                  | 191        |
| 3.3.1    | <i>Etude comparative eau milli-Q vs eau de STEP.....</i>       | 191        |
| 3.3.2    | <i>Propranolol.....</i>                                        | 193        |
| <b>4</b> | <b>CONCLUSIONS.....</b>                                        | <b>196</b> |
|          | <b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES .....</b>                    | <b>199</b> |
|          | <b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>                                      | <b>205</b> |

## Liste des abréviations

|       |                                                                                                |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ac    | Acébutolol                                                                                     |
| AcN   | Acétonitrile                                                                                   |
| Al    | Alprénolol                                                                                     |
| APCI  | Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (ionisation chimique à pression atmosphérique)        |
| APPI  | Atmospheric Pressure PhotoIonisation (ionisation par photoionisation à pression atmosphérique) |
| ASE   | Accelerated Solvent Extraction                                                                 |
| At    | Aténolol                                                                                       |
| Be    | Bétaméthasone                                                                                  |
| Bi    | Bisoprolol                                                                                     |
| Bp    | Bupranolol                                                                                     |
| BSTFA | N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide                                                      |
| Bu    | Budésonide                                                                                     |
| Bx    | Bétaxolol                                                                                      |
| C     | Cortisone                                                                                      |
| CE    | Capillary Electrophoresis (électrophorèse capillaire)                                          |
| Ct    | Cartéolol                                                                                      |
| D     | Dexaméthasone                                                                                  |
| DBO   | Demande Biologique en Oxygène                                                                  |
| DCO   | Demande Chimique en Oxygène                                                                    |

|            |                                                                                   |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| DnCl       | Chlorure de Dansyle                                                               |
| Ds         | Désonide                                                                          |
| E1         | Estrone                                                                           |
| E2         | Estradiol                                                                         |
| E3         | Estriol                                                                           |
| EE2        | Ethinylestradiol                                                                  |
| EM         | Effet Matrice                                                                     |
| ESI        | ElectroSpray Ionisation (ionisation par électrospray)                             |
| FBIBT      | benz[5,6]isoindolo[1,2-b]benzothiazole,12-(4,6-difluoro-1,3,5-triazin-2yl)        |
| Fc         | Fluocinolone acétonide                                                            |
| FE         | Facteur d'Enrichissement                                                          |
| FIA        | Flow Injection Analysis                                                           |
| FOA        | Acide Formique                                                                    |
| Fs         | Flunisolide                                                                       |
| GC         | Gaz Chromatography (chromatographie en phase gazeuse)                             |
| HAP        | Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques                                           |
| HRMS       | High Resolution Mass Spectrometry (spectrométrie de masse haute résolution)       |
| Hy         | Cortisol                                                                          |
| L          | Labétalol                                                                         |
| LC         | Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide)                          |
| LC/MS(/MS) | chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (en tandem)           |
| LDQ        | Limite De Quantification                                                          |
| LOEC       | Lowest Observed Effect Concentration (concentration minimale produisant un effet) |
| LPME       | Liquid Phase MicroExtraction (microextraction en phase liquide)                   |
| LQI        | Limite de Quantification Instrumentale                                            |
| M          | Métoprolol                                                                        |
| MALDI      | Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation                                       |
| MeOH       | Méthanol                                                                          |

|          |                                                                                     |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| MePl     | Méthylprednisolone                                                                  |
| MES      | Matières En Suspension                                                              |
| MOD      | Matière Organique Dissoute                                                          |
| MRM      | Multiple Reaction Monitoring                                                        |
| MS       | Mass Spectrometry (spectrométrie de masse)                                          |
| N        | Nadolol                                                                             |
| n.c.     | non communiqué                                                                      |
| n.d.     | non détecté                                                                         |
| n. m.    | non mesuré                                                                          |
| Ox       | Oxprénolol                                                                          |
| P        | Prednisone                                                                          |
| PEC      | Predicted Environmental Concentration (concentration environnementale prédite)      |
| Pi       | Pindolol                                                                            |
| Pl       | Prednisolone                                                                        |
| PNEC     | Predicted No Effect Concentration (concentration prédite ne produisant pas d'effet) |
| Pr       | Propranolol                                                                         |
| PSCI     | Chlorure de pyrènesulfonyl                                                          |
| PS-DVB   | copolymère PolyStyrène-DiVinylBenzène                                               |
| PVB-N-VP | copolymère DiVinylBenzène-N-VinylPyrrolidone                                        |
| QR       | Quotient de risque                                                                  |
| Q-TOF    | analyseur hybride quadripôle-temps de vol                                           |
| RIA      | RadioImmunoAssay (radioimmunoessai)                                                 |
| S        | Sotalol                                                                             |
| SAR      | Structure-Activity Relationship (relation structure-activité)                       |
| SIM      | Single Ion Monitoring                                                               |
| SOA      | N-triméthysilyl-2-oxazolidinone                                                     |
| SPE      | Solid Phase Extraction (extraction sur phase solide)                                |
| SPIE     | Solid Phase ImmunoExtraction ( immunoextraction sur phase solide)                   |

|        |                                                                                       |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| SPME   | Solid Phase MicroExtraction (microextraction sur phase solide)                        |
| SSI    | Sonic Spray Ionisation (ionisation par spray sonic)                                   |
| STEP   | STation d'EPuration                                                                   |
| T      | Triamcinolone                                                                         |
| TA     | Triamcinolone acétonide                                                               |
| Ti     | Timolol                                                                               |
| TIS    | TurboIonSpray                                                                         |
| TOF    | Time Of Flight (temps de vol)                                                         |
| UPLC   | Ultra Performance Liquid Chromatography (chromatographie liquide à ultra-performance) |
| UV-vis | Ultra-Violet-visible                                                                  |







# Introduction



## Introduction

La croissance démographique ainsi que l'évolution du mode de vie ont généré une demande de plus en plus importante en eau potable. Dans le même temps, la qualité des eaux de surface et des eaux souterraines, à partir desquelles l'eau potable est produite s'est dégradée.

Pourtant, dès 1964, une réelle politique de l'eau a vu le jour, avec la mise en place d'une loi sur le régime et la répartition des eaux et la lutte contre la pollution (loi n° 64-1245). A partir de ce texte, qui encore aujourd'hui reste une référence de la politique de l'eau, de nombreux décrets et lois ont été proposés afin de protéger d'une part les eaux destinées à la consommation, et d'autre part, l'écosystème aquatique. Les industries étaient alors les principales responsables de la pollution de l'eau (rejet d'hydrocarbures, d'eaux de lavage de minerais, de solvants et d'autres produits toxiques). Les industries ont à leur passif de graves incidents écologiques et ont ainsi été soumises à des normes très strictes réglementant leurs rejets de polluants.

D'autres polluants, présents à de faibles concentrations mais hautement toxiques (micropolluants) ont par la suite été incriminés, entre autres, les métaux lourds, les détergents et les pesticides. En particulier 33 substances dites « prioritaires » ont été dénoncées par la directive européenne 2000/60/CE. Cette directive impose la suppression de 13 de ces substances d'ici à 2015, et la réduction de l'émission des 20 autres. Ces substances prioritaires comptent essentiellement des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), des métaux lourds, des composés halogénés et des phénols.

Par ailleurs, les scientifiques s'intéressent également à l'impact de nombreuses autres molécules, dites « émergentes », sur l'écosystème. Ces molécules sont d'origines très variées. Les retardateurs de flamme bromés utilisés dans les équipements électriques et électroniques, les plastifiants (phtalates), les fragrances, les pesticides, les détergents et les résidus pharmaceutiques font en particulier partie de la longue liste des substances émergentes discutées par la communauté scientifique internationale [1].

Comparativement à d'autres pays (Etats-Unis, Allemagne), très peu de données sont disponibles en France concernant l'occurrence de ces molécules émergentes dans les eaux territoriales. La Région Rhône-Alpes a alors financé un projet visant à étudier l'occurrence et le devenir de résidus

pharmaceutiques dans les eaux environnementales. Ce projet implique la Direction de l'eau du Grand Lyon ainsi que 3 laboratoires de l'agglomération lyonnaise : le Service Central d'Analyse (USR-CNRS 059), le laboratoire d'analyses physicochimiques des milieux aquatiques du Cemagref, ainsi que le Laboratoire des Sciences Analytiques (UMR5180, CNRS-Université Lyon 1) où ont été réalisés les travaux présentés dans ce document. Dans le cadre de ce projet, les résidus de  $\beta$ -bloquants, de corticostéroïdes et d'estrogènes ont plus particulièrement été étudiés. Trois objectifs principaux ont été ciblés :

- développer de nouvelles méthodologies analytiques permettant le suivi environnemental de ces molécules,
- appliquer ces méthodes sur les eaux de station d'épuration de l'agglomération lyonnaise, afin d'avoir une première estimation des quantités déversées dans l'environnement,
- évaluer la stabilité de ces résidus pharmaceutiques sous irradiation UV-vis, afin d'obtenir de premières informations sur le devenir de ces contaminants dans l'environnement.

Ce document s'articule autour de 5 chapitres. Une étude bibliographique (Chapitre 1) explique l'intérêt scientifique de rechercher des résidus pharmaceutiques à l'état de traces dans l'environnement. Elle permet également de choisir et présenter les molécules étudiées. Ce chapitre présente de plus un état de l'art des méthodes développées pour le suivi environnemental de ces contaminants ainsi que des données proposées dans la littérature quant à la stabilité photochimique des molécules ciblées.

Deux chapitres (Chapitres 2 et 3) sont consacrés au développement de nouvelles méthodes analytiques permettant le dosage de traces de molécules pharmaceutiques dans les matrices environnementales. Les méthodes développées sont ensuite appliquées à des échantillons provenant de différentes stations d'épuration de l'agglomération lyonnaise (Chapitre 4). Enfin, un dernier chapitre est consacré à l'étude du comportement photolytique de ces molécules dans l'environnement (Chapitre 5).

# Chapitre 1

## Etude Bibliographique





# Chapitre 1 Etude bibliographique

## **1 Médicaments et environnement**

Les scientifiques, et plus récemment le grand public, s'intéressent au devenir des médicaments dans l'environnement. Même à l'état de trace, ces molécules ont un impact environnemental car elles sont conçues pour produire un effet biologique. La plupart des substances pharmaceutiques ont des caractéristiques physico-chimiques communes. Elles sont en particulier lipophiles afin de pouvoir pénétrer les membranes cellulaires et produire leur activité curative. Elles doivent également être stables afin de ne pas être détruites avant d'avoir agi sur leur cible dans l'organisme. Les médicaments possèdent donc des caractéristiques pouvant conduire à leur bioaccumulation par les écosystèmes aquatiques et terrestres. Les médicaments sont principalement déversés dans l'environnement par le biais des urines et des fèces humaines et animales. N'étant généralement que partiellement métabolisés, les composés pharmaceutiques sont rejetés dans l'environnement sous leur forme initiale et de métabolites.

Les études scientifiques concernant les résidus pharmaceutiques dans l'environnement visent essentiellement à répondre aux questions suivantes :

- A quelles concentrations les résidus pharmaceutiques sont-ils détectés dans les eaux environnementales ? Comment peut-on estimer statistiquement ces concentrations ? Comment peut-on les mesurer ?
- Quels sont les risques liés à l'exposition des organismes aquatiques aux résidus pharmaceutiques ? A quelles teneurs ces composés sont-ils écotoxiques ?

- Quelles sont les substances présentant potentiellement les risques les plus importants et devant donc être étudiées de façon prioritaire ?

## **1.1 Historique**

La capacité des résidus pharmaceutiques à atteindre l'environnement et à produire des effets néfastes pour l'écosystème a été rapportée dans la littérature scientifique depuis plusieurs dizaines d'années, sans être spécialement remarquée. En effet, Hignite *et al.* [2] ont observé dès 1977 la contamination des effluents d'une station d'épuration (STEP) de Kansas City (Etats-Unis) par le chlorophénoxybutyrate et l'acide salicylique, qui sont respectivement des métabolites du clofibrate et de l'aspirine. Ils démontraient ainsi de façon empirique que les résidus médicamenteux étaient rejetés dans les eaux environnementales. Les efforts déployés avant les années 1990 n'ont rencontré qu'un faible succès du fait des performances limitées des outils analytiques alors utilisés. Les efficacités des méthodes séparatives étaient parfois insuffisantes et les faibles limites de détection (de l'ordre du ng/L) n'étaient pas couramment atteintes. De plus la faible disponibilité des standards analytiques et/ou leur coût élevé ont freiné la recherche dans ce domaine.

Aujourd'hui, de plus en plus de chercheurs s'intéressent à cette problématique. Ceci a conduit récemment à la publication de plusieurs revues [3-10] concernant les médicaments dans l'environnement. La presse grand public commence également à s'intéresser à ce sujet, avec en particulier des articles parus dans *L'Express*, *Le Nouvel Observateur* ou *Le Figaro* [11-13].

## **1.2 Devenir des médicaments dans l'environnement**

### **1.2.1 Sources de contamination et voies de dispersion**

Suite à leur production, leur utilisation et leur mise au rebut (médicaments non consommés, périmés), les résidus pharmaceutiques (principes actifs, métabolites et produits de dégradation) sont continuellement déversés dans l'environnement, en quantité importante. Les voies de diffusion des médicaments dans l'environnement ainsi que les principales sources de contamination sont présentées Figure 1.

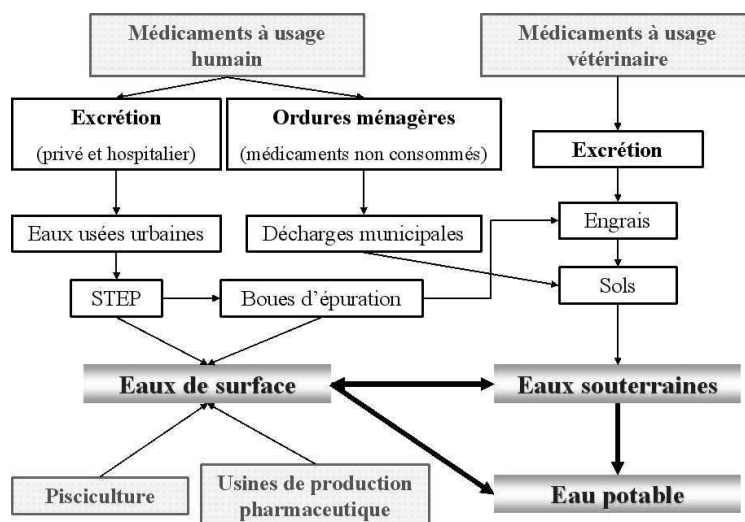


Figure 1: Principales voies de diffusion des résidus pharmaceutiques dans l'environnement

### 1.2.1.1 Médication humaine

Les français font figure de mauvais élèves au niveau Européen puisqu'ils y sont les premiers consommateurs de médicaments [3]. Les médicaments sont consommés en grande quantité dans un objectif thérapeutique, mais de nombreuses molécules pharmaceutiques sont également utilisées de façon illégale, en tant que produit dopant dans le milieu sportif par exemple. Cette consommation illégale n'est pas un phénomène négligeable, ce qui rend difficile l'estimation des tonnages en produits pharmaceutiques consommés en France. Après ingestion ces composés sont excrétés sous leur forme mère ou de métabolites (voir partie 1.2.1.3 page 10) et atteignent les STEP via le système d'égout. Selon leur polarité, les médicaments peuvent passer outre les traitements et être déversés dans les eaux de surface par les effluents de STEP. De plus, il a été observé que les traitements biologiques utilisés lors du traitement des eaux usées hydrolysent les métabolites conjugués [14], ce qui conduit à libérer la molécule sous sa forme active. Les composés les moins polaires peuvent s'adsorber sur les particules en suspension et être retenus dans les boues d'épuration. Toutefois, une partie de ces boues est utilisée comme engrais, ce qui conduit à la diffusion dans les sols de ces substances.

Enfin, il existe un échange entre eaux de surface et souterraines qui peut conduire à la dispersion des micropolluants. Force est de constater que le traitement des eaux potables ne permet pas non plus de s'affranchir de cette contamination. En effet, si l'efficacité de ces traitements n'a pas été évaluée pour les résidus pharmaceutiques, il s'avère que certaines études réalisées à l'étranger dénotent des quantités relativement importantes de composés médicamenteux dans l'eau du robinet [15, 16].

Les médicaments non consommés sont parfois jetés dans les ordures ménagères, et sont récoltés dans les décharges municipales. Par le biais des eaux de ruissellement, ces substances pénètrent les sols jusqu'à atteindre les eaux souterraines.

### 1.2.1.2 Médication vétérinaire

De nombreux médicaments sont utilisés dans les élevages ou les bassins de pisciculture à but curatif ou préventif. Les anthelminthiques sont les composés pharmaceutiques les plus utilisés en médecine vétérinaire au niveau européen, en tant que parasitocides [17]. Les antibiotiques sont également utilisés à des tonnages très importants à but curatif majoritairement mais également en tant que promoteurs de croissance. Comme en médecine humaine, certains composés sont utilisés de façon illégale afin de promouvoir la croissance des élevages (corticostéroïdes par exemple).

Une fois assimilés par les animaux, ces médicaments sont, comme chez l'homme, excrétés sous leur forme mère et de métabolites (voir partie 1.2.1.3).

Les animaux laissés en pâture rejettent donc directement les résidus pharmaceutiques dans les prés. Pour les élevages porcins ou bovins, le lisier et le purin sont épandus dans les champs en tant qu'engrais, ce qui libère les résidus pharmaceutiques dans l'environnement. Ils pénètrent ainsi les sols où ils peuvent affecter les organismes terrestres et sont entraînés jusqu'aux nappes phréatiques par les eaux de ruissellement. Si les couches d'argile forment des filtres naturels supposés préserver les eaux souterraines de ce type de pollution, il s'avère que les substances pharmaceutiques, comme d'autres polluants organiques, les traversent et y ont effectivement été détectées dans plusieurs études [18].

### 1.2.1.3 De l'ingestion à l'environnement

Après ingestion par l'homme ou l'animal, le médicament effectue son activité curative dans l'organisme, puis est excrété. Certains composés pharmaceutiques sont principalement excrétés inaltérés, sous leur forme libre, d'autres sont métabolisés en quantité variable selon la substance. Chez les mammifères comme chez les espèces vertébrées du milieu aquatique deux types de métabolisation ont lieu, dites de phase I et de phase II.

La métabolisation de phase I conduit à l'addition ou à la modification de groupes fonctionnels de la molécule qui augmentent sa réactivité (hydroxylation par exemple). Les enzymes impliquées dans cette métabolisation sont :

- les monooxygénases (cytochrome P450),
- les réductases,
- les hydrolases (hydrolyse des fonctions ester ou époxyde).

La métabolisation de phase II conduit à la formation de liaisons covalentes de conjugaison (glucuronidation) rendant la molécule plus hydrophile et donc plus facilement excrétable. Les enzymes suivantes catalysent la métabolisation de phase II :

- les glycotransférases et les sulfotransférases (fonctions hydroxyaromatique et carbonyle),
- les glutathion S-transférases (groupes fonctionnels électrophiles tels que les halogènes, les groupements nitrés ou les sites insaturés ou conjugués),
- les acétyltransférases (amines primaires ou hydrazines),
- les aminoacétyltransférases (conjugaison des fonctions carbonyle aux peptides en utilisant les acides aminés libres).

Ces voies de métabolisation génèrent des métabolites de plus en plus polaires ce qui facilite leur excrétion [19]. D'un point de vue analytique, ces métabolites sont très solubles dans l'eau car très polaires et sont difficiles à extraire de matrices aqueuses.

Si la médication humaine représente la principale source de contamination de l'environnement par les résidus pharmaceutiques, il existe également d'autres sources de contamination.

#### **1.2.1.4 Production industrielle**

Quand on parle de pollution environnementale, les sites de production industrielle sont souvent incriminés. Dans le cas des résidus médicamenteux, les industries pharmaceutiques ne représentent qu'une source secondaire de contamination. Les effluents industriels sont effectivement très réglementés et contrôlés. De faibles teneurs en composés pharmaceutiques peuvent toutefois y être présentes, et s'ajouter à ce qui est déjà déversé par les autres sources de contamination. Les sites de production industrielle représentent essentiellement un risque ponctuel puisqu'en cas d'accident, de fortes teneurs sont susceptibles d'être déversées dans l'environnement

#### **1.2.1.5 Bassins de pisciculture**

Les traitements réalisés dans les bassins de pisciculture conduisent à une contamination directe des eaux de surface (Figure 1). Les composés pharmaceutiques y sont directement déversés pour le traitement des poissons élevés.

#### **1.2.1.6 Conclusions**

La principale source de contamination des eaux de STEP par les résidus pharmaceutiques est la médication humaine. Il apparaît que pour une unique substance ingérée, un mélange très complexe constitué de la molécule libre et de ses métabolites est excrété. Le suivi environnemental de ces contaminants s'en retrouve donc compliqué. De plus cette complexité va encore s'accroître dans l'environnement où les résidus excrétés vont subir des dégradations secondaires, biotiques et abiotiques.

## 1.2.2 Voies de dégradation

### 1.2.2.1 Dégradation biotique

Sous l'action des micro-organismes présents dans l'environnement, ou utilisés dans les stations d'épuration, les résidus pharmaceutiques peuvent être biodégradés. Les métabolites ainsi formés sont également susceptibles d'être toxiques pour l'environnement. La biodégradation des composés pharmaceutiques n'implique donc pas la perte de leur potentiel toxique. Dans de rares cas, une minéralisation de la molécule (transformation en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, N<sub>2</sub>, *etc.*) est observée suite à sa biodégradation.

### 1.2.2.2 Dégradation abiotique

Certaines molécules pharmaceutiques présentent des groupements facilement hydrolysables qui sont donc susceptibles d'être clivés dans l'environnement.

Dans les eaux de surface, les micropolluants sont soumis au rayonnement solaire. Les photons excitent les molécules et initient leur dégradation. Les photoproduits formés peuvent parfois s'avérer plus toxiques que les molécules dont ils sont issus. Della Greca *et al.* [20] montrent que c'est notamment le cas de certains photoproduits de la prednisolone et de la dexaméthasone. Le devenir photochimique des résidus pharmaceutiques est abordé de façon plus précise en partie 4 (page 46).

## 1.3 Occurrence

Plus d'une centaine de composés d'origine pharmaceutique ont été détectés dans les eaux continentales internationales. Les tableaux présentés pages 13, 15 et 16 recensent les études les plus marquantes réalisées ces 5 dernières années sur la mesure de résidus pharmaceutiques dans les différents compartiments aquifères.

Les classes pharmaceutiques les plus étudiées sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofène, naproxène) ainsi que les antibiotiques de différentes familles chimiques, telles que les macrolides (érythromycine, clarithromycine), les quinolones (ciprofloxacine, norfloxacine), les sulfamides (sulfadiméthoxine, sulfaméthoxazole) et les tétracyclines (oxytétracycline, triméthoprim). Toutefois de nombreuses autres familles ont été détectées telles que les  $\beta$ -bloquants (aténolol, propranolol), les hypolipémiants (bézafibrate, gemfibrozil), les anticonvulsants (carbamazépine, primidone), les anti-histaminiques (cimétidine, ranitidine), les psycholeptiques (diazépam, fluoxétine) ou encore les anti-hypertenseurs (diltiazem, énalapril). Les stéroïdes font également l'objet d'une surveillance environnementale, en particulier les stéroïdes endogènes (cholestérol, estriol). Les agents de contraste (iopromide, diatrizoate) sont également analysés en tant que marqueurs des effluents hospitaliers.

La majorité des études réalisées concernent les effluents de stations d'épuration ou les eaux de surface. Les effluents ont un intérêt particulier puisqu'ils sont l'un des principaux points de décharge des résidus pharmaceutiques dans les eaux environnementales. Des études ont également été conduites dans les autres compartiments aquatiques tels que les eaux souterraines, les eaux de surface et les eaux potables. Quelques études ont aussi été réalisées sur les influents de STEP.

### 1.3.1 Stations d'épuration

Les STEP sont conçues pour retraiter les rejets humains, principalement d'origine naturelle, par l'action dégradante de certains micro-organismes et par coagulation/floculation sur des matières solides en suspension. Un traitement tertiaire (chimique, UV ou ozonation par exemple) est parfois utilisé [9] (le fonctionnement des stations d'épuration est présenté de façon plus détaillée en Annexe 1).

Deux mécanismes primaires permettent l'épuration des eaux de rejet urbaines :

- la dégradation microbienne qui conduit au clivage des molécules polluantes, allant parfois jusqu'à une complète minéralisation,
- l'adsorption sur des matières solides qui sont par la suite éliminées dans les boues.

#### 1.3.1.1 Influent de STEP

Les études publiées montrent l'arrivée massive de résidus pharmaceutiques dans les influents de stations d'épuration (Tableau 1).

**Tableau 1 : Teneurs en résidus pharmaceutiques détectées dans les influents de STEP**

| <b>molécule</b>              | <b>influent<br/>(ng/L)</b> | <b>références</b> | <b>molécule</b>                                 | <b>influent<br/>(ng/L)</b> | <b>références</b> |
|------------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------------------|----------------------------|-------------------|
| <b><u>Antibiotiques</u></b>  |                            |                   | <b><u>Analgésiques, anti-inflammatoires</u></b> |                            |                   |
| azithromicine                | 260                        | [21]              | aminophénazone                                  | 200                        | [18]              |
| clarithromicine              | 647                        | [21]              | diclofenac                                      | 12 - 3 020                 | [18, 22, 23]      |
| lévofloxacine                | 552                        | [21]              | ibuprofène                                      | 2 640 - 5 518              | [22, 24-26]       |
| ciprofloxacine               | 313 - 568                  | [27]              | indométhacine                                   | 800                        | [18]              |
| norfloxacine                 | 255 - 553                  | [27]              | kétoprofène                                     | 300                        | [18]              |
| sulfaméthoxazole             | 580                        | [24]              | naproxène                                       | 440 - 4 500                | [18, 22, 24, 26]  |
| <b><u>Hypolipémiants</u></b> |                            |                   | phénazone                                       | 920                        | [18]              |
| bézafibrate                  | 1 738                      | [22]              | propyphénazone                                  | 10 - 1 080                 | [18, 23]          |
| acide clofibrique            | 98-680                     | [18, 22, 28]      | acide salicylique                               | 340                        | [18]              |
| <b><u>Stéroïdes</u></b>      |                            |                   | <b><u>Agents de contraste</u></b>               |                            |                   |
| cholestérol                  | 200 000                    |                   | iopromide                                       | 6 600                      | [24]              |
| coprostanol                  | 1 430 000                  | [18]              | <b><u>Anticonvulsants</u></b>                   |                            |                   |
| 17β-estradiol                | 2,4 - 26                   | [18]              | carbamazépine                                   | 1 780                      | [18]              |
| estrone                      | 19 - 78                    | [29]              | phénytoïne                                      | 50                         | [18]              |
| sitostérole                  | 15 900                     | [24, 29]          | primidone                                       | 1 080                      | [18]              |

Les concentrations mesurées sont dans la majorité des études de l'ordre de plusieurs centaines de ng/L. La clarithromycine a par exemple été détectée à 647 ng/L [21] et l'acide clofibrique à 680 ng/L [28]. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens atteignent souvent des concentrations de l'ordre du µg/L. Par exemple, des concentrations de 5 700 ng/L en ibuprofène et en naproxène ont été relevées par Rodríguez *et al.* [26]. Ces composés ne nécessitant généralement pas d'ordonnance médicale sont davantage consommés. Pour certains composés des teneurs de l'ordre du mg/L sont mesurées. Par exemple, une teneur 1,4 mg/L en coprostanol a été détectée par Heberer *et al.* [18] dans les influents de station d'épuration. Le coprostanol étant un stéroïde endogène, sa présence dans les influents de STEP est directement liée à l'urbanisation et non au traitement médicamenteux d'une partie de la population. Ceci pourrait expliquer les très importantes teneurs détectées.

### 1.3.1.2 Effluents de STEP

Les effluents devraient être moins chargés en résidus pharmaceutiques, mais ceci n'est vrai que pour une minorité de composés (Tableau 2 page 15). Ces études tendraient donc à montrer que l'efficacité d'épuration pour ce type de contaminants est faible. Les STEP n'ont en effet pas été conçues pour éliminer ces micropolluants. Les concentrations mesurées atteignent généralement plusieurs centaines de ng/L. Le sulfaméthoxazole a, par exemple, été détecté à des teneurs allant de 46 à 900 ng/L [18, 30]. Les teneurs en carbamazépine et en naproxène peuvent atteindre 2 100 ng/L [31] et 14 000 ng/L [32] respectivement. Les  $\beta$ -bloquants sont détectés jusqu'à 1 900 ng/L [33]. Les estrogènes sont rencontrés à des teneurs généralement moindres puisque généralement comprises entre 1 et 100 ng/L.

### 1.3.1.3 Efficacité d'épuration

L'efficacité d'épuration des STEP est mal connue et un nombre très restreint d'études est dédié à ce thème. Elle est en effet difficile à évaluer car un très grand nombre de paramètres doivent être pris en compte.

En effet, lorsqu'une molécule pharmaceutique est détectée, il est très probable que ses métabolites soient également présents. Or certains métabolites, en particulier les conjugués, sont susceptibles d'être dégradés au cours des traitements, et peuvent relarguer la molécule libre. La quantité détectée dans les effluents provient dès lors à la fois des molécules détectées dans les influents et qui n'ont pas été dégradées au cours des traitements, mais également des produits de dégradation des métabolites (hydrolyse des conjugués en particulier). La connaissance des stoechiométries molécule libre / métabolite et les voies de dégradation des métabolites dans les STEP sont donc nécessaires à la détermination de l'efficacité des stations d'épuration.



Tableau 2 : Teneurs en résidus pharmaceutiques détectées dans les effluents de STEP

| molécule                                        | effluents (ng/L) | références                                   | molécule                         | effluents (ng/L) | références                  |
|-------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|------------------|-----------------------------|
| <b><u>Antibiotiques</u></b>                     |                  |                                              | <b><u>β-bloquants</u></b>        |                  |                             |
| azithromicine                                   | 138              | [21]                                         | aténolol                         | 27-1168          | [30, 34]                    |
| clarithromycine                                 | 8-140            | [30, 31, 34]                                 | bétaxolol                        | 57               | [31]                        |
| lévofloxacine                                   | 152-323          | [21]                                         | bisoprolol                       | 57               | [31]                        |
| érythromycine                                   | 47 353           | [30, 34-36]                                  | métoprolol                       | nd-1200          | [31, 33]                    |
| déhydratoérythromycine                          | 250              | [31]                                         | nadolol                          | nd-360           | [33]                        |
| roxithromycine                                  | 680              | [31]                                         | propranolol                      | nd-1900          | [31, 33, 35, 36]            |
| ciprofloxacine                                  | 27-514           | [27, 30, 34, 37]                             | <b><u>Hypolipémiants</u></b>     |                  |                             |
| spiramycine                                     | 1-161            | [30, 34]                                     | bezafibrate                      | 0,3 - 2 200      | [22, 30, 31, 34, 38, 39]    |
| tylosine                                        | nd-0,9           | [30]                                         | acide clofibrique                | nd-680           | [18, 22, 23, 28, 30-32, 40] |
| norfloxacine                                    | 36-370           | [27, 37]                                     | acide fénofibrique               | 380              | [31]                        |
| ofloxacine                                      | 150-1081         | [30, 34]                                     | gemfibrozil                      | nd-1400          | [18, 31, 32]                |
| sulfadiazine                                    | 50               | [18]                                         | <b><u>Anticonvulsants</u></b>    |                  |                             |
| acétyl-sulfaméthoxazole                         | 161- 2 200       | [35, 36]                                     | carbamazépine                    | nd - 2 100       | [18, 28, 30-32, 34, 40]     |
| sulfaméthoxazole                                | 46 - 900         | [18, 24, 30, 31, 34, 38]                     | phénytoïne                       | 100              | [18]                        |
| triméthoprim                                    | 12 - 320         | [31, 35, 36, 38]                             | primidone                        | 140              | [18]                        |
| lincomycine                                     | 11-846           | [30, 34]                                     | <b><u>Psycholeptiques</u></b>    |                  |                             |
| amoxycilline                                    | nd-120           | [30, 34]                                     | deméthyl diazépam                | nd-62            | [30]                        |
| <b><u>Antihistaminiques</u></b>                 |                  |                                              | oxazépam                         | 250              | [18]                        |
| ranitidine                                      | 36-610           | [30, 34]                                     | <b><u>Anti hypertenseurs</u></b> |                  |                             |
| <b><u>Agents de contraste</u></b>               |                  |                                              | enalapril                        | 40 - 110         | [38]                        |
| diatrizoate                                     | 80               | [31]                                         | furosémide                       | 26-2102          | [30, 34]                    |
| iomeprol                                        | 370              | [31]                                         | hydrochlorothiazide              | 60-1253          | [30, 34]                    |
| iopamidol                                       | 660              | [31]                                         | <b><u>Stéroïdes</u></b>          |                  |                             |
| iopromide                                       | 750 - 9 300      | [24, 31]                                     | camprestol                       | 80-260           | [41]                        |
| <b><u>Analgésiques, anti-inflammatoires</u></b> |                  |                                              | cholesterol                      | nd - 6 750       | [18, 41]                    |
| acétaminophène                                  | nd-900           | [32]                                         | coprostanol                      | 380-6800         | [18, 41]                    |
| aminophénazone                                  | 100              | [18]                                         | estriol                          | 2-4              | [42]                        |
| dextropropoxyphène                              | 110 - 260        | [35, 36]                                     | 17α-estradiol                    | 0,15-4,5         | [43]                        |
| diclofenac                                      | nd - 5 450       | [18, 22, 23, 25, 28, 31, 32, 35, 36, 39, 40] | 17β-estradiol                    | 0,15-14,7        | [29, 41-43]                 |
| fenoprofen                                      | nd-190           | [32]                                         | estrone                          | nd - 96          | [24, 29-31, 41-43]          |
| ibuprofène                                      | nd-22 000        | [18, 24, 26, 31, 32, 34-36, 39, 40]          | 17α-éthinyloestradiol            | 0,1-8,9          | [41, 43]                    |
| indométhacine                                   | nd - 800         | [18, 31, 32]                                 | sitostérole                      | nd - 1 900       | [18, 41]                    |
| ketoprofène                                     | nd-310           | [18, 31, 32, 40]                             | stigmastanol                     | 80-1200          | [41]                        |
| acide méfenamique                               | 273 - 1 100      | [35] [35, 36]                                | <b><u>Antinéoplastiques</u></b>  |                  |                             |
| naproxène                                       | nd-14 000        | [18, 24, 26, 31, 32, 39, 40]                 | methotrexate                     | nd-1206          | [30]                        |
| phénazone                                       | 160 - 520        | [18, 31]                                     | cyclophosamide                   | nd - 9           | [30, 34]                    |
| propyphénazone                                  | 180 - 390        | [18, 31]                                     | <b><u>Hypnogènes</u></b>         |                  |                             |
| acide salicylique                               | nd - 35 000      | [18, 31, 32]                                 | phenobarbital                    | 30               | [18]                        |
| <b><u>Anti-coagulants</u></b>                   |                  |                                              | <b><u>Bronchodilatateurs</u></b> |                  |                             |
| pentoxifylline                                  | nd-36            | [32]                                         | Salbutamol                       | 1-18             | [30, 34]                    |

Par ailleurs, les traitements peuvent conduire à une modification chimique de la molécule (dégradation) et non à son épuration (adsorption sur les boues, minéralisation, *etc.*). Il est donc également nécessaire de connaître les produits de dégradation de ces composés pour pouvoir réaliser un bilan de matière acceptable. Il est toutefois difficile d'identifier structurellement les produits de dégradation, car une molécule peut conduire à une multitude de métabolites et produits dégradés. De plus, les standards correspondants ne sont pas toujours commercialisés et sont très onéreux.

En outre, chaque STEP diffère par sa capacité, ses traitements, ou la composition des eaux qu'elle reçoit (industrielles, hospitalières, urbaines, *etc.*). De ce fait les données acquises pour une STEP particulière ne peuvent pas être transposées aux autres.

Il apparaît donc que de très importants travaux doivent être réalisés pour estimer l'efficacité d'épuration d'une STEP donnée pour une molécule donnée, sans possibilité d'extrapolation à d'autres molécules ou d'autres STEP. Ceci explique le manque d'informations disponibles dans la littérature.

Néanmoins, certaines études ont été réalisées pour évaluer l'efficacité d'épuration des STEP sur les résidus pharmaceutiques. Ces études ne prennent généralement en compte que la molécule mère et ne s'intéressent ni aux produits de dégradation ni aux métabolites. Ternes *et al.* [44] ont notamment évalué une efficacité d'épuration de 7% pour la carbamazépine, et de 96% pour le propranolol avec une moyenne de 60% pour les 14 produits pharmaceutiques pris en compte dans cette étude. Les auteurs soulignent que ces valeurs sont évaluées pour un fonctionnement normal de la STEP et peuvent, largement varier par temps sec ou au contraire en cas de flux important.

### 1.3.2 Eaux de surface

Dans les eaux de surface, qu'il s'agisse de rivières, lacs, estuaires ou mers, les concentrations rencontrées sont beaucoup plus faibles. Le facteur de dilution dans ces compartiments y est effectivement accru. Les teneurs relevées restent toutefois non négligeables puisque de l'ordre de plusieurs dizaines de ng/L. Dans quelques études des concentrations de l'ordre du µg/L peuvent être

**Tableau 3: Teneurs en résidus pharmaceutiques détectés dans les eaux de surface**

| molécule                          | eaux de surface<br>(ng/L) | références                       | molécule                | eaux de surface<br>(ng/L) | références       |
|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|
| <b><u>Anti-coagulants</u></b>     |                           |                                  | <b><u>Stéroïdes</u></b> |                           |                  |
| pentoxifylline                    | nd-2,2 <sup>b</sup>       | [45]                             | cis-androstérone        | 17 <sup>a</sup>           | [46]             |
| <b><u>Antihistaminiques</u></b>   |                           |                                  | androstènedione         | nd-1,1 <sup>b</sup>       | [45]             |
| cimétidine                        | nd-338 <sup>a</sup>       | [46, 47]                         | camprestol              | nd-1 400 <sup>a</sup>     | [41, 46]         |
| diphénhydramine                   | nd-23 <sup>a</sup>        | [47]                             | coprostanol             | 700-1 500 <sup>a</sup>    | [46]             |
| ranitidine                        | nd-39 <sup>a</sup>        | [30, 34, 46]                     | équilépine              | 140 <sup>a</sup>          | [46]             |
| <b><u>Agents de contraste</u></b> |                           |                                  | équiline                | 147 <sup>a</sup>          | [46]             |
| diatrizoate                       | 230 <sup>a</sup>          | [31]                             | estriol                 | nd-190 <sup>a</sup>       | [42, 46]         |
| iomeprol                          | 100 <sup>a</sup>          | [31]                             | 17α-estradiol           | nd-30 <sup>a</sup>        | [46]             |
| iopamidol                         | 490 <sup>a</sup>          | [31]                             | 17β-estradiol           | nd-160 <sup>a</sup>       | [41-43, 46]      |
| iopromide                         | 100 <sup>a</sup>          | [31]                             | estrone                 | 0,1-27 <sup>a</sup>       | [30, 42, 43, 46] |
|                                   | nd-12 <sup>b</sup>        | [45]                             |                         | 0,08-0,53 <sup>c</sup>    | [48]             |
| <b><u>β-bloquants</u></b>         |                           |                                  | 17α-éthinyloestradiol   | 0,1-73 <sup>a</sup>       | [46]             |
| aténolol                          | 3,4-241 <sup>a</sup>      | [31, 34, 49]                     |                         | nd-17,9 <sup>c</sup>      | [48]             |
| propranolol                       | nd-51 <sup>a</sup>        | [31, 36, 50]                     | mestranol               | 74 <sup>a</sup>           | [46]             |
| <b><u>Bronchodilatateurs</u></b>  |                           |                                  | 19-norethisterone       | 48 <sup>a</sup>           | [46]             |
| salbutamol                        | 1-2,5 <sup>a</sup>        | [34, 49]                         | progestérone            | nd-110 <sup>a</sup>       | [41, 46]         |
| <b><u>Anticonvulsants</u></b>     |                           |                                  |                         | 3,9-44 <sup>b</sup>       | [45]             |
| carbamazépine                     | nd-263 <sup>a</sup>       | [31, 32, 34, 40, 45, 47, 51, 52] | stigmastanol            | 110-340 <sup>a</sup>      | [41, 46]         |
|                                   | 5-10 <sup>b</sup>         | [40]                             | testostérone            | 116 <sup>a</sup>          | [46]             |
| dilantil                          | 2,6-52 <sup>a</sup>       | [45]                             |                         |                           |                  |

Tableau 3 (suite): Teneurs en résidus pharmaceutiques détectés dans les eaux de surface

| molécule                     | eaux de surface<br>(ng/L) | références               | molécule                                        | eaux de surface<br>(ng/L) | références                           |
|------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| <b><u>Antibiotiques</u></b>  |                           |                          | <b><u>Analgésiques, anti-inflammatoires</u></b> |                           |                                      |
| clarithromycine              | 0,5-20 <sup>a</sup>       | [34, 49]                 | acétaminophène                                  | nd-3 600 <sup>a</sup>     | [32, 46, 47]                         |
| érythromycine                | 0,1-100 <sup>a</sup>      | [34, 36, 51]             |                                                 | nd-16 <sup>b</sup>        | [45]                                 |
| déhydratoérythromycine       | nd-220 <sup>a</sup>       | [31, 45-47]              | codéine                                         | nd-240 <sup>a</sup>       | [47]                                 |
| oléandomycine                | nd-2,8 <sup>a</sup>       | [49]                     | dextropropoxyphène                              | nd-33 <sup>a</sup>        | [32]                                 |
| roxithromycine               | 50 <sup>a</sup>           | [46]                     | diclofenac                                      | nd-390 <sup>a</sup>       | [31, 32, 36, 39, 40, 50, 52, 53]     |
| spiramycine                  | 10-74 <sup>a</sup>        | [34]                     |                                                 | nd-528 <sup>b</sup>       | [40, 45, 53]                         |
| tilmicosine                  | nd-0,4 <sup>a</sup>       | [49]                     | diflunisal                                      | 95-123 <sup>a</sup>       | [53]                                 |
| tylosine                     | nd-40 <sup>a</sup>        | [46, 49]                 |                                                 | nd-85 <sup>b</sup>        | [53]                                 |
| ciprofloxacine               | nd-30 <sup>a</sup>        | [34, 46, 47, 49]         | fénoprofène                                     | 55-84 <sup>a</sup>        | [53]                                 |
| enrofloxacin                 | nd-10 <sup>a</sup>        | [47]                     |                                                 | 20-24 <sup>b</sup>        | [53]                                 |
| norfloxacine                 | nd-120 <sup>a</sup>       | [46, 47]                 | ibuprofène                                      | nd-6 400 <sup>a</sup>     | [31, 32, 34, 39, 40, 45, 46, 49, 50] |
| ofloxacine                   | 33-306 <sup>a</sup>       | [34]                     |                                                 | 5-104 <sup>b</sup>        | [40, 53]                             |
| sulfachloropyridazine        | nd-20 <sup>a</sup>        | [51]                     | indométhacine                                   | nd-150 <sup>a</sup>       | [31, 32]                             |
| sulfadiméthoxine             | 10-60 <sup>a</sup>        | [46, 47]                 | ketoprofène                                     | nd-79 <sup>a</sup>        | [32, 40]                             |
| sulfaméthazine               | 0,5-220 <sup>a</sup>      | [51]                     | acide méfénamique                               | nd-196 <sup>a</sup>       | [36, 50, 52]                         |
| sulfaméthizole               | 130 <sup>a</sup>          | [46]                     | naproxène                                       | nd-4 500 <sup>a</sup>     | [32, 39, 40, 51, 52]                 |
| acétyl-sulfaméthoxazole      | 240 <sup>a</sup>          | [36]                     |                                                 | nd-10 <sup>b</sup>        | [40, 45]                             |
| sulfaméthoxazole             | nd-150 <sup>a</sup>       | [31, 46, 47]             | phénazone                                       | 24 <sup>a</sup>           | [31]                                 |
|                              | 5,4-33 <sup>b</sup>       | [45]                     | acide salicylique                               | 25 -17 000 <sup>a</sup>   | [31, 32]                             |
| chlorotétracycline           | 30-420 <sup>a</sup>       | [46, 47]                 | hydrocodone                                     | nd-19 <sup>b</sup>        | [45]                                 |
| oxytétracycline              | 0,2-310 <sup>a</sup>      | [46, 49]                 | <b><u>Anti-anxiété</u></b>                      |                           |                                      |
| tétracycline                 | 20-300 <sup>a</sup>       | [46, 47]                 | méprobamate                                     | 14-220 <sup>a</sup>       | [45]                                 |
| triméthoprim                 | nd-569 <sup>a</sup>       | [36, 46, 47, 50, 51]     | <b><u>Ionophores</u></b>                        |                           |                                      |
|                              | 1,1-25 <sup>b</sup>       | [45]                     | monensin                                        | nd-210 <sup>a</sup>       | [51]                                 |
| lincomycine                  | nd-249 <sup>a</sup>       | [34, 46, 47, 49, 51]     | <b><u>Anti hypertenseurs</u></b>                |                           |                                      |
| <b><u>Hypolipémiants</u></b> |                           |                          | diltiazem                                       | nd-106 <sup>a</sup>       | [46, 47]                             |
| bézafrate                    | nd-470 <sup>a</sup>       | [31, 32, 34, 39, 49, 52] | énalapril                                       | 0,12-0,54 <sup>a</sup>    | [34, 49]                             |
| acide clofibrigue            | nd-111 <sup>a</sup>       | [31, 40, 49, 50]         | énalaprilat                                     | 46 <sup>a</sup>           | [46]                                 |
|                              | 5-10 <sup>b</sup>         | [40]                     | furosémide                                      | 2-255 <sup>a</sup>        | [34, 49]                             |
|                              | nd-18,6 <sup>c</sup>      | [54, 55]                 | hydrochlorothiazide                             | nd-256 <sup>a</sup>       | [34, 49]                             |
| acide fénofibrigue           | 45 <sup>a</sup>           | [31]                     | <b><u>Psycholéptiques</u></b>                   |                           |                                      |
| gemfibrozil                  | nd-420 <sup>a</sup>       | [31, 32, 46, 51]         | diazépam                                        | 0,1-2,13 <sup>a</sup>     | [49]                                 |
|                              | 1,8-56 <sup>b</sup>       | [45]                     |                                                 | nd-1,3 <sup>b</sup>       | [45]                                 |
|                              |                           |                          | fluoxétine                                      | nd-12 <sup>a</sup>        | [45, 46]                             |

a : rivières

b : lacs

c : mers

atteintes, mais ces mesures font figure d'exception. C'est notamment le cas de l'acide salicylique ou de l'ibuprofène dans une étude publiée par Brun *et al.* [32]. Dans cette étude particulière les quantifications en résidus pharmaceutiques ont été réalisées sur des eaux de rivière en aval de stations d'épuration, c'est-à-dire sur des échantillons où la probabilité de détecter d'importantes teneurs de résidus pharmaceutiques est élevée.

La grande majorité des mesures dans les eaux de surface ont été réalisées sur les eaux de rivière (Tableau 3). Quelques études récentes montrent toutefois que les résidus pharmaceutiques atteignent

les lacs [40, 45] et les mers [48], ce qui met en exergue la persistance de ces molécules dans l'environnement et l'importance de leur dispersion.

### 1.3.3 Eaux souterraines et potables

Très peu d'études ont été consacrées à la quantification de résidus pharmaceutiques dans les eaux souterraines ou potables. Ceci est probablement lié à la difficulté d'atteindre des limites de quantification suffisamment basses pour leur mesure (inférieures au ng/L). Ce type d'analyse requiert en effet des outils de détection très sensibles (dernières générations de spectromètres de masse) dont relativement peu de laboratoires d'analyses environnementales sont équipés. D'autre part, ces matrices présentent un intérêt environnemental moindre puisque la présence de micropolluants dans ces compartiments ne conduit *a priori* pas à des risques écotoxicologiques. De plus, les scientifiques s'accordent à affirmer que la santé humaine n'est pas concernée par les faibles teneurs aujourd'hui mesurées dans les eaux potables.

Ces études sont néanmoins intéressantes puisqu'elles complètent les données sur la dispersion des résidus pharmaceutiques dans l'environnement. Il est également important de suivre l'évolution des résidus pharmaceutiques dans l'eau potable, car si aujourd'hui aucun risque pour l'homme ne semble dû à la consommation de produits pharmaceutiques via l'eau du robinet, plusieurs auteurs soulignent que le principe de précaution prévaut [56-58].

Les teneurs mesurées peuvent parfois être importantes puisque Zühlke *et al.* [15] ont rapporté des concentrations pouvant atteindre 1,10 µg/L lors d'une étude de dérivés de la phénazone et leurs métabolites dans l'eau du robinet.

Loos *et al.* [16] ont détecté des concentrations plus modestes en carbamazépine, gemfibrozil et bézafibrate, respectivement de 3 à 9,1 ng/L, 0,1 à 0,8 ng/L et 0,2 à 1,9 ng/L. Ils ont également détecté le bézafibrate à 0,8 ng/L dans l'eau de pluie, ce qui pourrait suggérer que les médicaments peuvent être entraînés lors du cycle de l'eau. Toutefois, cette étude étant à ce jour la seule à présenter des quantifications de résidus pharmaceutiques dans les eaux de pluie, il n'est pas possible de tirer de conclusions générales sur le transport atmosphérique de ces molécules, une contamination de l'échantillon en laboratoire étant une autre interprétation possible.

Heberer est probablement l'un des auteurs qui s'est le plus intéressé aux eaux souterraines et potables. Il a notamment publié un document reprenant ses principales mesures [18]. Les teneurs qu'il a relevées dans les eaux souterraines sont présentées Tableau 4. Ces valeurs sont parfois très élevées, de l'ordre du µg/L ce qui montre que l'infiltration dans les sols ne permet pas de retenir ces contaminants.

Toutefois il convient de préciser que les sites d'échantillonnage ont été sélectionnés dans des zones particulièrement polluées en résidus pharmaceutiques de la région de Berlin (Allemagne). Dans cette

publication, il a rapporté des teneurs en acide clofibrique de l'ordre de quelques dizaines de ng/L dans l'eau du robinet, avec un maximum de 170 ng/L pour l'un des échantillons.

**Tableau 4: Teneurs en résidus pharmaceutiques mesurées par Heberer [18] dans les eaux souterraines**

| <b>molécule</b>                                | <b>eaux souterraines<br/>(ng/L)</b> |
|------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <b><u>Analgésiques-anti-inflammatoires</u></b> |                                     |
| diclofenac                                     | nd-380                              |
| Ibuprofène                                     | nd-200                              |
| ketoprofène                                    | nd-30                               |
| phénazone                                      | nd-1250                             |
| acide salicylique                              | nd-1225                             |
| <b><u>Hypolipémiants</u></b>                   |                                     |
| acide clofibrique                              | nd-7300                             |
| fénofibrate                                    | nd-45                               |
| gemfibrozil                                    | nd-340                              |
| <b><u>Anticonvulsants</u></b>                  |                                     |
| primidone                                      | nd-690                              |

### 1.3.4 Conclusions

Les études réalisées au niveau international ont montré que les résidus pharmaceutiques sont omniprésents dans les compartiments aquatiques. Il est donc important de connaître les risques environnementaux qui en résultent.

## 1.4 Risques

### 1.4.1 Ecotoxicité des résidus pharmaceutiques

Bien que les molécules pharmaceutiques soient conçues pour suivre des voies métaboliques spécifiques chez l'homme comme chez les animaux, elles conduisent souvent à des effets indésirables du fait d'interactions non recherchées sur d'autres cibles. Introduites dans l'environnement elles peuvent affecter par les mêmes voies les animaux présentant des organes, tissus ou cellules similaires. Les modes d'action des médicaments sont souvent mal connus et multiples. Etant donnée la variété des mécanismes d'action possible des médicaments et le manque d'information sur les récepteurs présents chez les organismes environnementaux, il est difficile de réaliser des tests de toxicité spécifiques sur des organismes test [59]. La littérature propose de nombreux tests de toxicité aiguë pour les composés pharmaceutiques, sur des organismes vivants de différents niveaux trophiques [4, 57, 59]. Ces tests ne permettent pas d'évaluer le risque lié à l'exposition des organismes du milieu naturel puisqu'ils se rapportent à une courte exposition à des teneurs importantes. Seuls les tests de toxicité chronique permettent d'évaluer ce risque en exposant des organismes test à de faibles

concentrations en polluant durant une longue période (plusieurs générations). La littérature donne très peu d'informations sur la toxicité chronique des médicaments et quasiment aucune sur la toxicité des métabolites. Des informations peuvent toutefois être obtenues en réalisant des tests en laboratoire ou par l'utilisation de modèles mathématiques. Certains modèles ont en particulier été développés pour estimer ou prévoir les effets écotoxicologiques. Le programme ECOSAR [60] par exemple, utilise les relations structure activité (SAR) pour prévoir la toxicité des composés chimiques en se basant sur leur similarités structurales avec d'autres molécules organiques de toxicité connue.

Les toxicités chroniques mesurées sont souvent inférieures aux concentrations maximales détectées dans l'environnement, ce qui met en évidence le risque environnemental lié à l'introduction de résidus pharmaceutiques dans l'environnement. A titre d'exemple, Lange *et al.* ont montré que la concentration minimale produisant un effet (LOEC) sur l'organisme test (*Gammarus pulex* dans cette étude) était de 10 ng/L pour l'ibuprofène et la carbamazépine [61]. Les concentrations maximales mesurées dans les rivières pour ces deux composés sont respectivement 6 400 et 263 ng/L, soient des valeurs très supérieures à la LOEC. Pawlovski *et al.* [62] ont observé des effets toxiques chez *Pimephales promelas* exposé à 0,1 ng/L de 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol, alors que cette molécule est détectée dans l'environnement à des teneurs pouvant atteindre plusieurs ng/L.

Flippin *et al.* [63] ont en particulier observé une modification du temps de reproduction de *Oryzias latipes* après une exposition chronique à l'ibuprofène.

### 1.4.2 Bioaccumulation et persistance

Des données physicochimiques telles que la solubilité ou le coefficient de partage octanol-eau (logP) peuvent donner des indications sur la capacité d'une molécule à être assimilée par les organismes environnementaux. Notamment, toute substance ayant un logP supérieur à 3 est considérée comme bioaccumulable [64].

La persistance des résidus pharmaceutiques dans l'environnement n'est pas un bon indicateur de l'exposition des organismes environnementaux à ces substances. En effet, les médicaments sont continuellement déversés dans les eaux territoriales, donc leur instabilité n'empêche pas l'exposition continue des organismes vivants à leurs effets, à moins que la cinétique de dégradation de la molécule ne soit significativement plus rapide que son flux environnemental.

### 1.4.3 Effets

La dispersion des antibiotiques dans l'environnement a soulevé un problème de santé publique. En effet, dans les eaux environnementales, les bactéries se retrouvent en présence des antibiotiques conçus pour les combattre, ce qui a accru le phénomène de résistance aux antibiotiques [65, 66].

De plus, de nombreuses molécules d'origine pharmaceutique peuvent influencer la production d'hormones des différentes espèces de l'écosystème et sont donc des perturbateurs du système endocrinien [67]. Cette perturbation peut conduire à un développement anormal de l'espèce, comme une féminisation ou plus rarement une masculinisation [68, 69]. Par exemple, une féminisation de certaines espèces de poissons a été observée suite à leur exposition continue à des résidus médicamenteux, en particulier aux estrogènes [70].

### **1.5 Conclusions**

La médication humaine conduit à la diffusion de nouveaux polluants dans l'environnement. Des résidus pharmaceutiques ont effectivement été détectés dans les différents compartiments aquatiques terrestres. Ces contaminants présentant un risque démontré par plusieurs études pour l'écosystème, il est nécessaire de réaliser un suivi environnemental de ces polluants. La littérature manque de données sur l'écotoxicité des résidus pharmaceutiques ainsi que sur leur devenir (stabilité, produits de dégradation, toxicité des produits de dégradation), des efforts doivent donc être poursuivis en ce sens.

Dans le cas de nombreux polluants (pesticides par exemple), l'utilisation d'une substance trop dangereuse pour l'écosystème peut être interdite ou très fortement réglementée pour limiter ses effets sur l'environnement. Dans le cas de résidus pharmaceutiques le problème ne peut évidemment pas être abordé sous cet angle. Daughton *et al.* [9] ont souligné dès 1999 que la majorité des composés médicamenteux sont utilisés sous forme de mélanges racémiques dans les formulations pharmaceutiques alors que seul l'un des isomères est thérapeutiquement actif. La tendance des industries pharmaceutiques (soutenue par la FDA), est de ne produire que l'isomère optiquement pur. D'un point de vue médical ceci devrait permettre de réduire les doses ainsi que les effets indésirables. En effet, la dose en énantiomère actif resterait inchangée, mais du fait de l'absence de l'isomère inactif, la quantité globale de racémique consommée serait divisée de moitié. D'un point de vue environnemental, cette tendance pourrait conduire à une réduction importante des résidus pharmaceutiques rejetés dans l'environnement. Les concentrations pourraient alors s'en retrouver divisées d'un facteur 2. Toutefois, l'isomère inactif au niveau thérapeutique est également *a priori* le moins écotoxique. Le suivi environnemental serait donc plus difficile, et nécessiterait une meilleure sensibilité des méthodes d'analyse.

La meilleure voie pour s'affranchir de cette pollution reste toutefois le développement de procédés d'épuration efficaces pour ces micropolluants. Des recherches sont en particulier menées au niveau international afin d'évaluer l'efficacité de différents traitements tertiaires (ozonation, photolyse, *etc.*) sur la dégradation de ces molécules [71-74].

## 2 Molécules étudiées

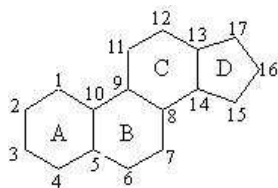
Le choix des molécules étudiées a été réalisé à partir d'une analyse statistique de la consommation française de produits pharmaceutiques. La toxicité des molécules a également été prise en compte, en choisissant des composés qui conduisent à des modifications biologiques déjà révélées par les études écotoxicologiques ou qui sont considérés comme potentiellement toxiques pour les organismes environnementaux par des modèles statistiques.

Les familles pharmaceutiques retenues sont les  $\beta$ -bloquants, les corticostéroïdes et les estrogènes.

### 2.1 Stéroïdes

#### 2.1.1 Généralités

L'IUPAC définit les stéroïdes comme étant des composés possédant un squelette cyclopentanophénantrène (Figure 2).



**Figure 2 : noyau perhydro-1,2-cyclopentanophénantrène**

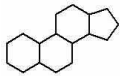
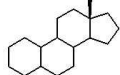
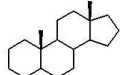
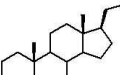
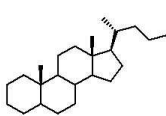
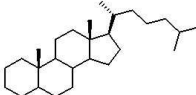
La plupart des composés présentent des groupes méthyle aux jonctions de cycles (C10 et C13). Une chaîne latérale alkyle peut également être présente en C17. Si le carbone C3 est substitué par un groupement hydroxyle, le terme stérol est alors utilisé. Les stéroïdes se divisent en plusieurs familles de molécules, selon le nombre d'atomes de carbone qui composent leur squelette [75] (Tableau 5).

En particulier, les estranes sont des stéroïdes en C<sub>18</sub> où le squelette cyclopentanophénantrène est substitué par un groupement méthyle en C13. Les prégnanes sont des stéroïdes en C<sub>21</sub>, où des groupements méthyle substituent les positions C10 et C13, et une chaîne carbonée en C<sub>2</sub> substitue la position C17.

Les stéroïdes endogènes sont issus de la métabolisation du cholestérol (voir Annexe 2).



**Tableau 5 : Classification des stéroïdes selon l'IUPAC**

| Famille<br>nombre de<br>carbone (C <sub>n</sub> ) | structure                                                                         | exemple                    |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Gonanes<br>(C <sub>17</sub> )                     |  | lévonorgestrel             |
| Estranes<br>(C <sub>18</sub> )                    |  | estrone, estradiol         |
| Androstanes<br>(C <sub>19</sub> )                 |  | testostérone               |
| Pregnanes<br>(C <sub>21</sub> )                   |  | progestérone,<br>cortisone |
| Cholanes<br>(C <sub>24</sub> )                    |  | Acides biliaires           |
| Cholestanes<br>(C <sub>27</sub> )                 |  | cholestérol                |

## 2.1.2 Corticostéroïdes

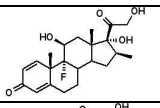
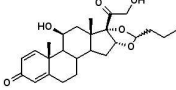
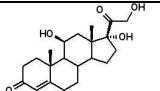
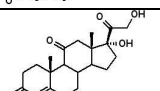
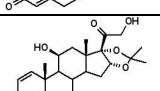
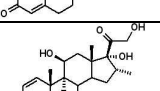
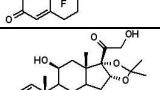
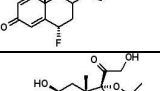
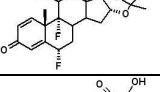
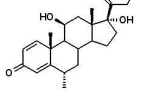
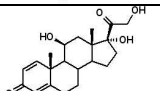
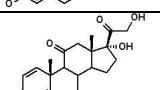
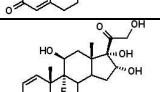
Les corticostéroïdes sont des molécules dérivées du noyau prégénane présentant une fonction carbonyle en position C3 et en position C20 (chaîne latérale, voir Figure 3).

### 2.1.2.1 Propriétés physico-chimiques

Pour la classe des corticostéroïdes, 13 molécules représentatives de cette famille sont considérées. Leurs principales propriétés physico-chimiques sont listées Tableau 6.

Leurs solubilités dans l'eau sont comprises entre 10 mg/L pour la fluocinolone acétonide et 322 mg/L pour la cortisone. Bien que ces solubilités soient faibles, au regard des concentrations usuellement rencontrées dans l'environnement (de l'ordre du ng au µg/L), ce n'est pas un facteur limitant la diffusion de ces composés. D'une part, ces molécules ont des masses relativement faibles puisque inférieures à 500 g/mol. D'autre part elles sont relativement apolaires avec des logP compris entre 1,61 et 3,14 pour le cortisol et la budésonide respectivement. Ces deux propriétés font donc des corticostéroïdes des molécules susceptibles d'être bioaccumulées par les organismes environnementaux, puisque aptes à pénétrer les pores cellulaires. Les corticostéroïdes ont un caractère acide faible, par la présence d'une fonction alcool en C21, avec des pK<sub>a</sub> de l'ordre de 12.

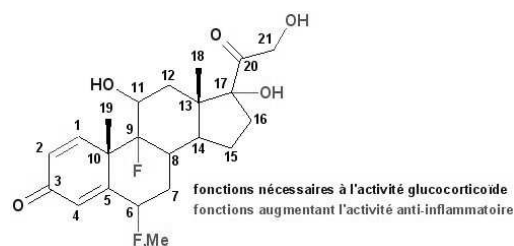
**Tableau 6: Propriétés physico-chimiques des corticostéroïdes étudiés (données calculées par le logiciel ACD/Labs v 8.14)**

| Molécule<br>(abréviation)          | CAS          | Structure                                                                           | Masse<br>molaire<br>(g/mol) | Solubilité<br>dans l'eau<br>(mg/L) | logP | pK <sub>a</sub> |
|------------------------------------|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|------|-----------------|
| Bétaméthasone<br>(Be)              | [378-44-9]   |    | 392,5                       | 43                                 | 1,9  | 12,1            |
| Budésonide<br>(Bu)                 | [51333-22-3] |    | 430,6                       | 15                                 | 3,1  | 12,9            |
| Cortisol<br>(Hy)                   | [50-23-7]    |    | 362,5                       | 160                                | 1,4  | 12,5            |
| Cortisone<br>(C)                   | [53-06-5]    |    | 360,4                       | 140                                | 1,4  | 12,3            |
| Désonide<br>(Ds)                   | [638-94-8]   |    | 416,5                       | 32                                 | 2,6  | 12,9            |
| Dexaméthasone<br>(D)               | [50-02-2]    |    | 392,5                       | 43                                 | 1,9  | 12,1            |
| Flunisolide<br>(Fs)                | [3385-03-3]  |    | 434,5                       | 33                                 | 2,2  | 12,8            |
| Fluocinolone<br>acétonide<br>(Fc)  | [67-73-2]    |   | 452,5                       | 17                                 | 2,2  | 12,5            |
| Méthylprednisolone<br>(MePl)       | [83-43-2]    |  | 374,5                       | 67                                 | 2,0  | 12,5            |
| Prednisolone<br>(Pl)               | [50-24-8]    |  | 360,5                       | 130                                | 1,5  | 12,5            |
| Prednisone<br>(P)                  | [53-03-2]    |  | 358,4                       | 100                                | 1,6  | 12,3            |
| Triamcinolone<br>(T)               | [124-94-7]   |  | 394,4                       | 150                                | 0,8  | 11,6            |
| Triamcinolone<br>acétonide<br>(TA) | [76-25-5]    |  | 434,5                       | 21                                 | 2,5  | 12,7            |

### 2.1.2.2 Pharmacologie

Les corticostéroïdes sont utilisés en thérapeutique depuis les années 1950 pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Les corticostéroïdes naturels comme la cortisone ou le cortisol sont synthétisés dans le cortex des glandes corticosurrénales. A partir du cortisol ont été synthétisés des corticostéroïdes de durée d'action plus longue et de propriétés anti-inflammatoires accrues. Il a notamment été montré que l'activité anti-inflammatoire des corticostéroïdes était augmentée par la présence d'une insaturation en

C1-C2, d'un atome de fluor en C6 ou C9, ou encore d'un groupement méthyle en C6 ou hydroxyle en C17 et en C21. Les fonctions nécessaires à l'activité glucocorticoïde sont des groupements carbonyle en C3 et en C20, une insaturation en C4–C5 sur le cycle A et une fonction hydroxyle en C11 (Figure 3). Parmi les 15 molécules étudiées, seules la cortisone et la prednisone ne répondent pas à ces critères puisqu'elles présentent une fonction carbonyle et non hydroxyle en C11. Ces molécules sont en fait des précurseurs du cortisol et de la prednisolone respectivement, métabolites pharmacologiquement actifs. Le cortisol et la cortisone sont des molécules endogènes sécrétées simultanément (voir Annexe 2), et il existe un équilibre chimique entre les deux espèces. La prednisone, qui est une molécule exogène subit dans l'organisme une 11 $\beta$ -hydroxylation hépatique qui conduit à la libération de prednisolone. La prednisolone est la forme active de nombreux autres corticostéroïdes comme la dexaméthasone, la triamcinolone et son acétonide.



**Figure 3: Fonctions permettant l'activité glucocorticoïde / augmentant l'activité anti-inflammatoire des corticostéroïdes**

Au cours de la métabolisation des corticostéroïdes, les modifications chimiques les plus fréquemment rencontrées sont la réduction des doubles liaisons du cycle A et des fonctions carbonyle en C3 et C20 [76, 77].

Les molécules les plus prescrites sont la prednisone, la prednisolone et la méthylprednisolone du fait de leur application plus souple d'un point de vue médical.

Les corticostéroïdes sont principalement éliminés par voie urinaire. Ces composés sont hautement métabolisés. En effet les pourcentages urinaires de forme libre par rapport à la quantité ingérée relevés pour la dexaméthasone, la méthylprednisolone, la prednisolone et la prednisone sont respectivement de 2,6%, 4,9%, 26% et 3%. Ces valeurs peuvent paraître faibles mais ne reflètent pas ce qui est réellement déchargé dans l'environnement puisque l'hydrolyse des conjugués dans les traitements biologiques des STEP en particulier, permet de relarguer la molécule initiale.

### 2.1.2.3 Ecotoxicité

Aujourd'hui aucune étude ne concerne l'écotoxicité des corticostéroïdes. Néanmoins, Sanderson *et al.* [78] ont révélé que cette classe pharmaceutique était potentiellement dangereuse pour l'environnement à partir d'une étude statistique basée sur des modèles de prédiction d'écotoxicité (ECOSAR). Sur 51 classes pharmaceutiques étudiées, Sanderson *et al.* ont démontré que les corticostéroïdes font partie des 10 familles devant être étudiées de façon prioritaire, car présentant le plus de risques pour l'environnement.

Un autre modèle consistant à estimer la capacité d'une molécule à se lier aux récepteurs androgènes et par conséquent à perturber la production d'androstanes a été proposé par Fang *et al.* [79]. Ce modèle

montre que la majorité des corticostéroïdes se lie faiblement à ces récepteurs. Ils sont donc des perturbateurs du système endocrinien.

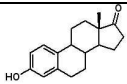
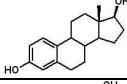
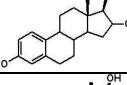
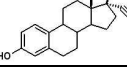
### 2.1.3 Estrogènes

Les estrogènes sont des dérivés du noyau estrane. Ils présentent une aromaticité du cycle A et une fonction hydroxyle en C3.

#### 2.1.3.1 Propriétés physico-chimiques

Pour la classe des estrogènes, 4 molécules sont considérées. Ces molécules ainsi que leurs principales propriétés physico-chimiques sont listées Tableau 7.

**Tableau 7: Propriétés physico-chimiques des estrogènes étudiés (données calculées par le logiciel ACD/Labs v 8.14)**

| Molécule (abréviation) | CAS       | Structure                                                                           | Masse molaire (g/mol) | Solubilité dans l'eau (mg/L) | logP | pK <sub>a</sub> |
|------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------|------|-----------------|
| Estrone (E1)           | [53-16-7] |    | 270,4                 | 5                            | 3,7  | 10,3            |
| Estradiol (E2)         | [50-28-2] |  | 272,4                 | 3                            | 4,1  | 10,3            |
| Estriol (E3)           | [50-27-1] |  | 288,4                 | 15                           | 2,9  | 10,3            |
| Ethinylestradiol (EE2) | [57-63-6] |  | 296,4                 | 2                            | 4,5  | 10,2            |

Comme pour les corticostéroïdes, bien que les solubilités dans l'eau des estrogènes soient faibles (inférieures à 15 mg/L), elles sont largement supérieures aux concentrations environnementales de ces composés et ne sont donc pas un facteur limitant la diffusion de ces molécules. Les faibles masses moléculaires, ainsi que les logP élevés (supérieurs à 2,9) font de ces molécules des composés potentiellement bioaccumulables.

La fonction phénol confère un caractère acide aux estrogènes, avec des pK<sub>a</sub> de l'ordre de 10.

#### 2.1.3.2 Pharmacologie

Les estrogènes sont des hormones sexuelles nécessaires au développement des organes sexuels féminins. L'estriol, l'estradiol et l'estrone sont des hormones endogènes alors que l'éthinylestradiol est un dérivé synthétique couramment employé dans les contraceptifs oraux.

L'estradiol est un métabolite de la testostérone. Avant la ménopause, l'estradiol est sécrétée par le follicule en première partie de cycle (avant l'ovulation), puis par le corps jaune en deuxième partie du

cycle menstruel chez la femme. Cette molécule maintient la fertilité et les caractères sexuels secondaires chez la femme.

L'estrone est un métabolite de l'androstènedione. Elle est synthétisée au niveau des ovaires et déclenche la prolifération de la muqueuse de l'utérus avant l'ovulation. Comme le montre le métabolisme du cholestérol, présenté en Annexe 2, il existe un équilibre chimique entre estrone et estradiol.

L'estriol est issu du métabolisme de l'estradiol. Il est exclusivement sécrété pendant la grossesse.

De plus Mes *et al.* rappellent que chaque femme excrète quotidiennement 10 à 100 µg d'estrogènes, dont 7 µg d'estrone, 2,4 µg d'estradiol, et 4,6 µg d'estriol, en moyenne, sous leur forme libre [80]. Ils précisent également que les estrogènes sont majoritairement excrétés sous forme conjuguée, à des quantités quotidiennes moyennes par femme de 32, 14 et 106 µg d'estrone, d'estradiol et d'estriol conjugués, respectivement.

### 2.1.3.3 Ecotoxicité

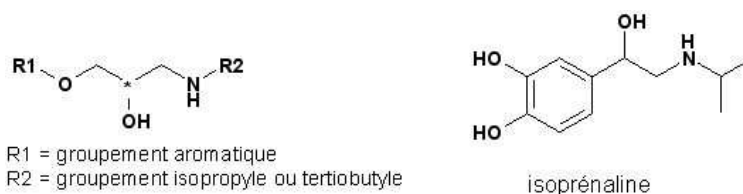
Comparativement à d'autres classes pharmaceutiques la famille des estrogènes a fait l'objet d'un nombre important d'études d'écotoxicité. Ces études concluent notamment que les estrogènes peuvent avoir des effets néfastes pour l'écosystème à des teneurs inférieures au ng/L.

En particulier, même à de très faibles teneurs (0,1 ng/L), les estrogènes sont capables d'affecter la production d'œufs et de spermatozoïdes chez certaines espèces de poissons [70, 81-83]. Il a également été observé une féminisation chez plusieurs espèces de poissons [67, 84] et un phénomène de bioaccumulation.

La bioaccumulation des estrogènes par les poissons peut conduire à leur dispersion aux niveaux trophiques supérieurs.

## 2.2 $\beta$ -bloquants

Les antagonistes bêta-adrénergiques, couramment appelés  $\beta$ -bloquants, sont des dérivés de l'isoprénaline. Leur structure générale est présentée Figure 4.



**Figure 4 : Squelette général des  $\beta$ -bloquants et structure de la molécule d'isoprénaline dont ils sont dérivés**

Les  $\beta$ -bloquants présentent au moins un carbone asymétrique (Figure 4), et sont utilisés en mélange racémique.

### 2.2.1 Propriétés physico-chimiques

15  $\beta$ -bloquants incluant les molécules consommées aux plus forts tonnages en France (Tableau 8) sont considérés. Ces molécules et leurs propriétés physico-chimiques sont listées Tableau 9.

**Tableau 8 : Tonnage annuel des  $\beta$ -bloquants les plus consommés en France (données AFSSAPS 1999)**

| molécule    | Tonnage annuel |
|-------------|----------------|
| Acébutolol  | 45,6           |
| Propranolol | 34,6           |
| Métoprolol  | 110,8          |
| Bisoprolol  | 1,6            |
| Oxprénolol  | 1,0            |
| Nadolol     | 0,9            |
| Bétaxolol   | 0,5            |

Les  $\beta$ -bloquants présentent une fonction alcool sur le carbone asymétrique. Cette fonction a un caractère acide, avec un  $pK_a$  proche de 13,9, à l'exception du labétalol et du sotalol. On peut donc raisonnablement considérer que cette fonction est toujours présente sous sa forme acide dans l'eau. Les  $\beta$ -bloquants sont des composés basiques du fait de la présence d'une fonction amine sur le squelette des  $\beta$ -bloquants (Figure 4). Cette fonction a un  $pK_a$  de l'ordre de 9, ainsi, ces composés sont majoritairement présents sous leur forme acide dans les STEP et les eaux environnementales. Le pindolol et le sotalol présentent une deuxième fonction basique dont les constantes de dissociation ont été rapportées dans un article de Ruiz Angel *et al.* [85]. L'amine secondaire du groupement R1 a un  $pK_a$  de 8,8 pour le pindolol et le groupement sulfamide du sotalol a un  $pK_a$  de 8,1. Les solubilités intrinsèques des  $\beta$ -bloquants (Tableau 9), peuvent être faibles, 83 mg/L pour le propranolol par exemple. Toutefois, il convient de souligner qu'étant donnés les  $pK_a$  de ces molécules, les solubilités des  $\beta$ -bloquants peuvent varier de façon importante en fonction du pH du milieu.

**Tableau 9: Propriétés physico-chimiques des  $\beta$ -bloquants étudiés (données calculées par le logiciel ACD/Labs v 8.14)**

| Molécule<br>(abréviation) | CAS          | Structure | Masse<br>molaire<br>(g/mol) | Solubilité<br>dans l'eau<br>(mg/L) | logP | pK <sub>a</sub><br>(fonction alcool)<br>(fonction amine) |
|---------------------------|--------------|-----------|-----------------------------|------------------------------------|------|----------------------------------------------------------|
| Acébutolol<br>(Ac)        | [37517-30-9] |           | 336,4                       | 150                                | 2,0  | 13,8<br>9,1                                              |
| Alprénolol<br>(Al)        | [13655-52-2] |           | 249,4                       | 250                                | 2,9  | 13,9<br>9,2                                              |
| Aténolol<br>(At)          | [29122-68-7] |           | 266,3                       | 3 200                              | 0,1  | 13,9<br>9,2                                              |
| Betaxolol<br>(Bx)         | [63659-18-7] |           | 307,4                       | 160                                | 2,7  | 13,9<br>9,2                                              |
| Bisoprolol<br>(Bi)        | [66722-44-9] |           | 325,5                       | 390                                | 2,1  | 13,9<br>9,2                                              |
| Bupranolol<br>(Bp)        | [14556-46-8] |           | 271,8                       | 140                                | 3,0  | 13,8<br>9,1                                              |
| Cartéolol<br>(Ct)         | [51781-06-7] |           | 292,4                       | 470                                | 1,4  | 13,8<br>9,1                                              |
| Labétalol<br>(L)          | [36894-69-6] |           | 328,4                       | 360                                | 2,3  | 8,2<br>9,2                                               |
| Métoprolol<br>(M)         | [56392-17-7] |           | 267,4                       | 910                                | 1,8  | 13,9<br>9,2                                              |
| Nadolol<br>(N)            | [42200-33-9] |           | 309,4                       | 710                                | 1,3  | 13,9<br>9,2                                              |
| Oxprénolol<br>(Ox)        | [6452-71-7]  |           | 265,4                       | 420                                | 2,3  | 13,9<br>9,2                                              |
| Pindolol<br>(Pi)          | [13523-86-9] |           | 248,3                       | 300                                | 2,0  | 13,9<br>9,2                                              |
| Propranolol<br>(Pr)       | [525-66-6]   |           | 259,4                       | 83                                 | 3,1  | 13,8<br>9,1                                              |
| Sotalol<br>(S)            | [3930-20-9]  |           | 272,4                       | 2 600                              | 0,3  | 9,6<br>9,2                                               |
| Timolol<br>(Ti)           | [26839-75-8] |           | 316,4                       | 2 300                              | 0,1  | 13,4<br>8,9                                              |

## 2.2.2 Pharmacologie

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques sont des récepteurs du système sympathique, ou plus généralement du système nerveux autonome qui assure le fonctionnement des différents organes.

On distingue 2 types de récepteurs  $\beta$ -adrénergiques nommés  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Leur proportion varie en fonction des tissus. Ainsi, les récepteurs  $\beta_1$  sont prédominants au niveau cardiaque, alors que les récepteurs  $\beta_2$  sont majoritaires au niveau des bronches et des vaisseaux.

La stimulation  $\beta_1$  adrénergique est à l'origine de l'augmentation de la force des contractions cardiaques et de leur fréquence. Elle augmente également la vitesse de conduction auriculo-ventriculaire et l'excitabilité ventriculaire. Cette stimulation est à l'origine de certains troubles du rythme cardiaque.

La stimulation  $\beta_2$  adrénergique permet la relaxation des fibres lisses, telles que les vaisseaux, les bronches, l'intestin ou l'utérus. Ces effets sont notamment mis à profit dans le traitement de l'asthme et les menaces d'accouchement précoce.

Comme leur nom l'indique, les  $\beta$ -bloquants antagonisent la stimulation des récepteurs  $\beta$ . Ils peuvent agir sélectivement sur les récepteurs  $\beta_1$  (acébutolol, aténolol, métoprolol, bisoprolol), ou être non sélectifs, dans ce cas, ils agissent sur les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  (oxprénolol, pindolol, alprénolol, propranolol, timolol, nadolol, sotalol, labétalol).

Pour ces propriétés, les  $\beta$ -bloquants sont utilisés dans les principaux domaines de pathologie cardiovasculaire, tels que l'hypertension, l'insuffisance coronaire ou l'insuffisance cardiaque. Certaines molécules sont également utilisées comme anti-arythmique (sotalol) ou anti-migraineux (propranolol).

Les  $\beta$ -bloquants sont principalement excrétés par voie urinaire. Les pourcentages de molécules excrétées inchangées par les urines sont présentés Tableau 10 [77].

**Tableau 10: Excrétion urinaire des  $\beta$ -bloquants (% forme libre par rapport à la quantité ingérée)**

| molécule | % excrété inchangé dans les urines   | molécule | % excrété inchangé dans les urines     |
|----------|--------------------------------------|----------|----------------------------------------|
| Ac       | 14                                   | L        | <5                                     |
| Al       | <10                                  | N        | 73                                     |
| At       | >90                                  | Ox       | Sous forme inchangée et de glucuronide |
| Bi       | 50                                   | Pi       | 40                                     |
| Bx       | <10                                  | S        | 75-80                                  |
| Ct       | Essentiellement sous forme inchangée | Ti       | 20                                     |

Ce tableau montre que l'excrétion sous forme inchangée est très variable d'une molécule à l'autre. Si l'on rapproche ces valeurs des tonnages annuels (Tableau 8), on constate, que même si certaines molécules sont très métabolisées, comme l'acébutolol qui n'est excrété qu'à 14% sous sa forme inchangée. Le tonnage pondéré par le taux de métabolisation reste important puisque cela représenterait 6,4 tonnes d'acébutolol excrétées annuellement dans les urines de la population française.

### 2.2.3 Ecotoxicité

Les études d'écotoxicité publiées pour les  $\beta$ -bloquants ciblent particulièrement une molécule : le propranolol.



Cleuvers s'est intéressé à trois molécules: le propranolol, le métoprolol et l'aténolol [86]. Il a mis en évidence la toxicité des deux premiers composés. Cleuvers ne constatait pas de toxicité particulière pour l'aténolol. Toutefois, cette étude étant basée sur des tests de toxicité aiguë, une toxicité à long terme de l'aténolol reste possible.

Dzialowski *et al.* ont observé une diminution du rythme cardiaque des organismes tests exposés au métoprolol ou au propranolol [87]. Ils ont également constaté une diminution de la croissance d'*Oryzias Latipes* et une modification des teneurs plasmatiques en testostérone et en estradiol chez cette espèce lorsqu'elle était exposée au propranolol.

Huggett *et al.* ont souligné le fait que les poissons possèdent des récepteurs  $\beta_1$ , en particulier au niveau des tissus reproductifs, ce qui suggère que l'impact des  $\beta$ -bloquants sur ces animaux peut suivre le même type de mécanisme que chez l'homme, donc produire un effet. Ils ont en particulier observé des anomalies et une diminution de la mobilité des spermatozoïdes chez les poissons exposés au propranolol [88].

### **3 Moyens analytiques**

Les résidus pharmaceutiques ont fait l'objet de nombreux développements analytiques dans le domaine de la bioanalyse, mais ces méthodes ne peuvent pas être appliquées directement aux échantillons environnementaux. En effet, les concentrations recherchées y sont beaucoup plus faibles, ce qui se traduit expérimentalement par des prises d'essai plus importantes pour atteindre les limites de détection nécessaires. De plus, les matrices environnementales diffèrent en tout point des matrices biologiques. En effet, en plus des résidus biologiques (protéines par exemple) les matrices environnementales contiennent de nombreux autres polluants organiques tels que des pesticides, des hydrocarbures ou des tensioactifs. La méthodologie de préparation d'échantillon et d'analyse doit donc être adaptée.

Cette partie vise à présenter et discuter les stratégies analytiques mises en œuvre pour le suivi environnemental de résidus pharmaceutiques. Les techniques utilisées plus spécifiquement pour les molécules étudiées (corticostéroïdes,  $\beta$ -bloquants et estrogènes) seront ensuite présentées.

#### **3.1 Analyse de résidus pharmaceutiques dans les eaux environnementales**

##### **3.1.1 Méthodologies**

Les faibles concentrations relevées ainsi que la complexité des matrices environnementales nécessitent une purification et une préconcentration de l'échantillon. Cette étape a été réalisée dans une grande

majorité d'études par extraction sur phase solide (SPE). Les supports les plus utilisés étaient des phases apolaires telles que des silices greffées octadécyle ou des supports polymère. Une préférence semble souvent portée aux supports polymères du fait de leur plus grande capacité de charge, et de leur simplicité d'utilisation. Ces phases sont effectivement moins sensibles à l'assèchement que les silices greffées car des monomères hydrophiles peuvent être utilisés dans ces copolymères, ce qui facilite leur mise en œuvre expérimentale. L'analyse des extraits était ensuite réalisée par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (MS) dans plus de 99% des études. La chromatographie en phase gazeuse (GC) a souvent été utilisée. Les analytes étant généralement peu volatils une dérivation (silylation dans la plupart des cas) s'avérait nécessaire, ce qui alourdissait considérablement la préparation d'échantillon. Cette technique continue à être très appliquée même si la tendance actuelle est d'utiliser préférentiellement la chromatographie en phase liquide (LC), qui requiert une préparation d'échantillon plus rapide. Cette évolution vers l'utilisation de la LC/MS est directement liée à l'évolution des sources d'ionisation à pression atmosphérique qui permettent une meilleure introduction de l'analyte dans le spectromètre de masse et donc une meilleure sensibilité.

La SPE associée à une détection par LC/MS/MS conduit à des méthodes de quantification satisfaisantes avec entre autres des limites de quantification de l'ordre du ng/L et de bonnes reproductibilités.

### 3.1.2 Préparation d'échantillon

A titre d'exemple, Castiglioni *et al.* [30] ont proposé une méthode multirésidus permettant l'analyse de 30 ingrédients pharmaceutiques de polarités et propriétés acido-basiques très différentes dans les eaux de STEP. Après extraction sur support Oasis MCX (support copolymère échangeur mixte cationique) et Lichrolut EN (poly[styrène-divinylbenzène]) l'analyse LC/ESI/MS/MS permettait d'atteindre des limites de quantification comprises entre 0,7 et 2,1 ng/L.

D'autres méthodologies ont été proposées dans la littérature. Wen *et al.* [89] ont par exemple proposé une préparation d'échantillon par LPME (microextraction en phase liquide) pour l'extraction de résidus pharmaceutiques acides dans les eaux de STEP. Suedee *et al.* [90] ont extrait des tétracyclines (antibiotiques) au moyen de polymères imprimés. Cette voie de préparation d'échantillon est intéressante car très sélective, mais sa mise en œuvre est beaucoup plus coûteuse qu'une SPE sur des supports classiques. Grant *et al.* [91] ont proposé une analyse rapide de la sulfaméthazine et de ses métabolites dans les eaux environnementales utilisant une immunoextraction (SPIE) et une détection par MALDI-TOF-MS. Cette méthode permet une extraction très sélective des analytes mais est également très onéreuse.

En plus du coût de mise en œuvre élevé pour les polymères imprimés ou les supports d'immunoextraction, leur usage est limité par leur faible disponibilité commerciale. Ainsi, la synthèse

de supports spécifiques en laboratoire s'avère souvent nécessaire pour cette stratégie d'extraction. De ce fait, la reproductibilité de la préparation d'échantillon pourrait s'en retrouver affectée car la reproductibilité de synthèse du support entrerait alors en jeu. De plus, dans le cadre d'analyses de routine, cette stratégie ne peut pas être envisagée car trop longue à mettre en œuvre.

### 3.1.3 Technique séparative

En terme de séparation chromatographique, les colonnes de silice greffée C<sub>18</sub> ont couramment été utilisées. Bones *et al.* [92] ont montré l'apport de phases de silice monolithiques à l'analyse de résidus pharmaceutiques dans les eaux environnementales en développant une méthode permettant l'analyse simultanée de 21 molécules pharmaceutiques acides, basiques et neutres. L'intérêt de cette méthodologie réside dans la possibilité d'une part d'analyser de nombreux composés de propriétés acido-basiques variables en une seule injection, et d'autre part d'utiliser des colonnes très efficaces, comme les supports monolithiques qui permettent de diminuer les temps d'analyse et d'abaisser les limites de détection, même si ce critère n'a pas été vérifié par Bones *et al.* qui travaillaient en détection UV.

Quintana *et al.* [25] ont quantifié 11 résidus pharmaceutiques acides par LC/ESI/MS/MS dans les eaux de rejet de STEP. L'utilisation de la chromatographie d'appariement d'ions permettait dans cette étude d'améliorer la sensibilité de la méthode, par l'utilisation d'un agent d'appariement d'ions (tri-n-butylamine) conduisant à une augmentation de signal pour chaque analyte. Ce phénomène a été rapporté dans plusieurs études relatives à l'analyse de sels d'acides forts tels que des sulfonates [93] ou des phosphonates [94] en ESI(-)/MS et en présence d'ions alkylammonium. Ballantine *et al.* [94] ont suggéré que les cations alkylammonium défavorisent l'appariement de l'analyte aux ions sodium dans la source du spectromètre de masse, ce qui revient à favoriser la formation de l'ion moléculaire. Une interprétation similaire pourrait être réalisée pour l'étude menée par Quintana *et al.* même si les molécules pharmaceutiques considérées sont des acides faibles (fonctions carboxyliques). Les limites de détection atteintes par Quintana *et al.* étaient de 6 à 200 ng/L sans préconcentration. Par cette méthode ils ont quantifié des résidus pharmaceutiques dans les eaux environnementales en injectant directement l'échantillon en LC/MS/MS sans extraction préliminaire. Cette méthode est intéressante car elle permet un gain de temps considérable sur le temps d'analyse total. Cependant les limites de quantification semblent relativement élevées pour réaliser un suivi environnemental performant. Elles pourraient potentiellement être abaissées en utilisant un spectromètre de masse plus sensible. Pour abaisser davantage les limites de détection, ils ont toutefois développé une procédure d'extraction sur support Oasis HLB (copolymère), mais ont observé un effet matrice plus important pour les échantillons extraits que par injection directe.

Van der Ven *et al.* [95] ont également proposé une méthode d'analyse ne nécessitant pas de préparation d'échantillon en injectant directement l'échantillon de STEP filtré en LC-capillaire/MS/MS. Des limites de détection de 100 ng/L étaient atteintes, ce qui montre qu'un gain important de sensibilité peut être obtenu par cette méthode d'analyse. En effet, la réduction du diamètre interne de la colonne chromatographique permet de gagner en efficacité. Toutefois là encore la sensibilité semble un peu faible pour une analyse environnementale.

Quelques études proposent l'utilisation de l'électrophorèse capillaire (CE) couplée à la spectrométrie de masse, mais ces méthodes sont peu sensibles (limites de détection à 100 ng/L) [96]. Si les bénéfices de faibles diamètres internes sont prouvés, la capacité de charge sur les colonnes capillaires est beaucoup plus faible que sur les colonnes classiques. La réduction des volumes injectés explique alors les sensibilités insuffisantes observées en CE comme en LC-capillaire.

### 3.1.4 Détection

#### 3.1.4.1 Spectrométrie de masse

L'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) sont les sources d'ionisation les plus couramment utilisées. L'analyseur était un triple quadripôle dans la majorité des méthodes qui permet une détection spécifique et sensible des analytes via un suivi en mode MRM.

##### 3.1.4.1.1 Modes de balayage possibles avec un triple quadripôle

Un analyseur à triple quadripôle permet de réaliser plusieurs types d'expériences. Le premier et le dernier quadripôle (respectivement Q1 et Q3) peuvent opérer de 2 façons différentes :

- balayer toutes les masses sur un domaine donné,
- filtrer des masses spécifiques.

Le deuxième quadripôle (Q2) couramment appelé cellule de collision, peut être rempli d'un gaz (azote) permettant la fragmentation des ions transmis par Q1.

Les combinaisons de chaque fonction permettent de réaliser différents balayages. Les principaux modes utilisés avec un triple quadripôle sont présentés Tableau 11 .

Les modes « full scan », « ion précurseur », « ion produit », « perte de neutre » sont généralement utilisés pour obtenir des informations structurales lorsque des mélanges inconnus sont analysés.

Le mode « ion produit » permet d'analyser la fragmentation d'un ion (moléculaire) donné. Le mode « ion précurseur », permet de déterminer « l'origine » d'un fragment particulier.

Le mode « perte de neutre » permet de déterminer si un ion précurseur peut au cours de sa fragmentation dans Q2 perdre une molécule neutre de masse spécifique. Le balayage de Q3 doit donc être assujéti au balayage de Q1. Par exemple, si on cherche à déterminer les ions précurseurs

susceptibles de perdre une molécule d'eau, lorsque Q1 transmet une masse M, Q3 ne transmet que les ions de masse M-18.

**Tableau 11: Principaux modes de balayage avec un analyseur à triple quadripôle**

| mode            | Q1                              | Q2                         | Q3                                                     |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------------------------------|
| full scan       | balaye un domaine de masses     | pas de gaz                 | transmet tous les ions                                 |
| ion produit     | transmet des masses spécifiques | rempli de gaz de collision | balaye un domaine de masses                            |
| ion précurseur  | balaye un domaine de masses     | rempli de gaz de collision | transmet des masses spécifiques                        |
| perte de neutre | balaye un domaine de masses     | rempli de gaz de collision | balaye un domaine de masses assujetti au réglage de Q1 |
| SIM             | transmet des masses spécifiques | pas de gaz                 | transmet tous les ions                                 |
| MRM             | transmet des masses spécifiques | rempli de gaz de collision | transmet des masses spécifiques                        |

Les modes SIM et MRM peuvent être utilisés pour faire de la quantification, les ions précurseurs, et le cas échéant, les ions fragments étant déjà connus. Le mode MRM est le plus sélectif et le plus spécifique des modes de balayages cités ci-dessus, ce qui en fait un mode de choix pour la quantification de traces dans des matrices complexes. Les paires de masses filtrées par Q1 et Q3, typiquement appelées transitions, sont connues pour chaque analyte.

Lors d'analyses environnementales, le mode « full scan » est intéressant car il permet de détecter l'ensemble des composés présents. Toutefois ce mode est peu sensible car toutes les masses arrivent au détecteur ce qui génère de très importants bruits de fond. Les atouts du mode MRM en terme de sensibilité et de spécificité sont établis. Toutefois, ce mode nécessite de rester vigilant car seules les molécules que l'on cherche à analyser sont détectées, et d'autres composés de la matrice peuvent influencer les réponses des analytes (effet matrice).

#### *3.1.4.1.2 Avantages et inconvénients de la LC/MS*

Si la détection par LC/MS présente de nets avantages sur d'autres techniques (simplification de la préparation d'échantillon, hautes sensibilités et sélectivités), elle présente quelques inconvénients, le principal étant l'effet matrice qui peut être observé, en particulier avec une source électrospray. Cet effet de la matrice sur la réponse n'est pas spécifique de la spectrométrie de masse. Toutefois compte

tenu qu'en mode MRM on ne voit que ce que l'on cherche, l'effet matrice ne peut être apprécié que si des études spécifiques à sa détermination sont conduites.

En sortie de colonne chromatographique, des composés de la matrice sont coélués avec les analytes et ne sont pas détectés en mode MRM. Ces molécules peuvent interférer sur le processus d'ionisation dans la source du spectromètre de masse et générer une augmentation ou une diminution artificielle du signal de l'analyte, susceptible de fausser la quantitativité de la mesure. Afin de comprendre ce phénomène, il est nécessaire de comprendre les processus d'ionisation dans la source. Nous nous limiterons ici au cas de la source électrospray.

#### *3.1.4.1.3 Processus d'ionisation en électrospray*

En ionisation par électrospray, le liquide est une solution d'électrolyte qui est introduite dans la source au travers d'une aiguille métallique, ce qui conduit à la nébulisation de la solution et à la formation d'un aérosol. Du fait de la différence de potentiel appliquée (4-6 kV), les gouttelettes de l'aérosol sont chargées. Les ions chargés de la gouttelette migrent alors vers sa surface tandis que le centre reste neutre. A l'aide d'un flux d'azote et d'un chauffage, le solvant s'évapore ce qui conduit à une diminution de la taille des gouttelettes, à charge constante. Les forces de répulsions coulombiennes conduisent alors à l'explosion de la gouttelette en gouttelettes secondaires de plus petites tailles. La répétition de ce processus conduit à la formation d'ions en phase gazeuse. Ces ions peuvent subir des réactions telles que des neutralisations ou transferts de charges. Seuls les ions sont introduits dans le spectromètre de masse alors que les composés neutres ou liquides sont bloqués par différents moyens (gaz rideau, skimmer).

Tout composé de la matrice pouvant interférer sur l'une de ces étapes est susceptible de générer un effet matrice.

#### *3.1.4.1.4 Mécanismes possibles de l'effet matrice*

##### *- Limitation de l'excès de charge de surface*

Dans les gouttelettes primaires de l'aérosol, certains composants de la matrice peuvent avoir des propriétés favorisant leur charge, aux dépens de l'analyte. Par exemple, les surfactants se positionnent préférentiellement à l'interface liquide/gaz et sont connus pour entraîner d'importantes suppressions de signal. Tout composé présentant à la fois des fonctions hydrophiles et lipophiles est donc susceptible d'altérer le processus d'ionisation par cette voie.

##### *- Evaporation incomplète*

Les composants non volatils de la matrice sont susceptibles de modifier la volatilité, la viscosité et la conductivité de l'aérosol. Ils peuvent ainsi limiter le processus d'évaporation. Il a notamment été démontré que les matrices polaires génèrent des effets matrices essentiellement à cause de la limitation du processus d'évaporation.

- Appariement d'ions

Les ions moléculaires formés en phase liquide peuvent s'apparier à un contre ion présent dans la matrice. Ce phénomène limite alors la migration de l'analyte vers la surface de la gouttelette et son transfert en phase gazeuse. En effet, les ions appariés présentent une meilleure affinité pour le centre de la gouttelette, électriquement neutre.

- Compétition au transfert de protons en phase gazeuse

Les molécules interférentes de la matrice peuvent entrer en compétition avec l'analyte lors des réactions en phase gazeuse. Elles peuvent donc influencer sur la neutralisation des molécules ou leur protonation.

### 3.1.4.2 Autres détecteurs

Quelques publications proposent un couplage LC/fluorimétrie. Par exemple, Prat *et al.* [97] ont atteint des limites de détections comparables à la LC/MS/MS (quelques ng/L) pour l'analyse de fluoroquinolones dans des échantillons environnementaux. Cette méthode ne peut pas être généralisée à d'autres classes pharmaceutiques mais reste intéressante car elle nécessite un équipement relativement peu coûteux. Par ailleurs, la majorité des composés pharmaceutiques n'étant pas fluorescents, l'utilisation de ce détecteur nécessiterait une étape de dérivation de l'analyte au cours de la préparation d'échantillon.

### 3.1.5 Conclusions

Ces études montrent qu'une préparation d'échantillon, par SPE par exemple, est nécessaire pour obtenir un facteur d'enrichissement important, permettant d'atteindre des limites de détection de l'ordre du ng/L. Une détection par spectrométrie de masse semble impérative pour l'analyse de résidus pharmaceutiques dans les matrices environnementales, afin d'obtenir des sélectivités, sensibilités et spécificités optimales. Les études proposées plus spécifiquement pour l'analyse des corticostéroïdes, des estrogènes et des  $\beta$ -bloquants sont présentées ci-après.

## 3.2 Analyse des corticostéroïdes

Le suivi des corticostéroïdes dans les matrices environnementales, n'a jamais été étudié. Ces composés ont par contre fait l'objet de nombreux développements analytiques pour d'autres matrices telles que les formulations pharmaceutiques et cosmétiques, ainsi que les milieux biologiques (sérum et urines essentiellement).

### 3.2.1 Préparation d'échantillon

Les méthodes de préparation d'échantillon utilisées pour les milieux biologiques ne présentent pas d'intérêt particulier pour un transfert vers des matrices environnementales. Ces méthodes font essentiellement intervenir des précipitations de protéines, avec dans de nombreuses méthodes, des purifications par SPE. Les supports utilisés sont majoritairement des phases de silices greffées C<sub>18</sub> [98-102]. Certains auteurs ont également rapporté l'utilisation de supports polymères, Oasis HLB en particulier [103, 104].

### 3.2.2 Analyse chromatographique

#### 3.2.2.1 Chromatographie en phase gazeuse

L'analyse était dans certains cas réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (en tandem) ou à un détecteur à ionisation de flamme [100, 103, 105]. Les corticostéroïdes étant peu volatils, une modification chimique de la molécule s'avérait nécessaire à leur analyse. Ce traitement consiste à oxyder la molécule afin d'obtenir une rupture de la chaîne latérale en C17 et une oxydation de la fonction hydroxyle en C11 (voir Figure 3 page 25). Cette modification permet d'une part de diminuer la masse molaire de la molécule et d'autre part de la rendre moins polaire. La chaîne carbonée en C17 présente effectivement des groupements hydroxyle et carbonyle qui contribuent à la faible volatilité des corticostéroïdes. Ce traitement nécessite plusieurs étapes (traitement oxydatif, élimination des réactifs par extraction liquide/liquide par exemple, reprise des molécules oxydées par un solvant adapté à une injection en GC) qui alourdissent la procédure de préparation d'échantillon. D'autres auteurs ont proposé une dérivation de la molécule, mais cette option n'en est pas moins contraignante [106]. L'analyse par chromatographie liquide a donc souvent été préférée.

#### 3.2.2.2 Chromatographie en phase liquide

La majorité des publications récentes proposent l'utilisation de la chromatographie à polarité des phases inverses. Les phases stationnaires C<sub>18</sub> de différents fournisseurs ont couramment été utilisées [101, 102, 104, 107, 108], plus rarement les phases C<sub>8</sub> [98, 99, 109, 110]. Quel que soit le greffage C<sub>18</sub> ou C<sub>8</sub>, les colonnes utilisées présentent la caractéristique commune d'un greffage terminal (« end-capping ») permettant d'éviter les interactions secondaires avec les silanols résiduels qui peuvent générer des traînées de pic. La majorité des colonnes utilisées possèdent un important taux de carbone, suggérant la nécessité d'utiliser des colonnes très hydrophobes pour séparer les analytes. Van den Hauwe *et al.* ont proposé l'utilisation d'une phase carbone graphitisé poreux pour la séparation de 2 diastéréoisomères, la bétaméthasone et la dexaméthasone [111]. Ils mettaient ainsi à profit le caractère très rétentif de ces supports. Toutefois la méthode proposée ne s'intéresse qu'à 2 composés et n'est pas nécessairement le meilleur choix pour séparer les 11 molécules traitées dans notre étude.



Capeilla-Peró *et al.* ont atteint des limites de détection de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$  en injectant directement l'échantillon (sans extraction préliminaire) en chromatographie liquide micellaire associée à une détection UV [107]. L'utilisation d'un additif micellaire absorbant en UV permet d'augmenter la sensibilité ; toutefois, une optimisation est nécessaire pour cette approche. En effet, l'utilisation d'une quantité trop importante d'additif génèrerait un bruit de fond important, diminuant le rapport signal sur bruit. Inversement, une quantité trop faible ne permettrait pas de piéger correctement l'analyte, et l'intensité du pic chromatographique ne serait pas optimale. Cette approche est intéressante car elle ne nécessite pas un appareillage coûteux et est très sensible, même si dans une problématique environnementale une extraction de l'échantillon s'avérerait nécessaire pour atteindre un facteur d'enrichissement de 1000 et descendre à des limites de détection de l'ordre du  $\text{ng/L}$ . Cette méthodologie nécessiterait toutefois une extraction très sélective et spécifique (immunoaffinité, polymères imprimés) pour contrecarrer le manque de sélectivité et spécificité du détecteur utilisé.

Plus récemment, Toubert *et al.* ont proposé une analyse rapide de 17 corticostéroïdes par UPLC (séparation en 6 min) [112]. Cette technique permet effectivement l'utilisation de colonnes chromatographiques de très faible granulométrie, générant un gain d'efficacité et une augmentation de la vitesse d'analyse et de la sensibilité. L'UPLC semble donc une méthode de choix pour les analyses environnementales.

### 3.2.2.3 Détection

Si plusieurs types de détecteurs ont été mentionnés dans la littérature pour les matrices biologiques, seule la détection par spectrométrie de masse sera discutée dans cette partie. En effet au vu des méthodologies adoptées pour l'analyse de résidus pharmaceutiques dans l'environnement cet outil semble le plus adapté.

Les auteurs détectant les corticostéroïdes par spectrométrie de masse ont utilisé en majorité un analyseur à triple quadripôle, afin de suivre les analytes en mode MRM. Le mode MRM permet en effet de gagner en sensibilité et en spécificité. Les interfaces d'ionisation à pression atmosphérique ont couramment été utilisées. Les corticostéroïdes étant des molécules peu polaires ( $\log P$  compris entre 1,8 et 3,1), ils peuvent être aussi bien ionisés par ionisation chimique ou par électrospray. On constate que l'ESI [110, 113-115] est beaucoup plus souvent utilisé que l'APCI [99, 104, 109]. Plus récemment, l'utilisation de sources à photoionisation (APPI) a été rapportée [116].

Dans quelques études une ionisation négative des corticostéroïdes a été réalisée, car une déprotonation des fonctions hydroxyle est effectivement possible. Toutefois, de meilleures sensibilités ont été généralement observées en ionisation positive (protonation des fonctions carbonyle). Cette polarité est donc plus couramment utilisée.

L'analyse des corticostéroïdes en UPLC/TOF/MS a été reportée par Toubert *et al.* [112]. Ils ont en particulier montré l'apport d'un temps de vol pour l'analyse multirésidus dans des matrices

complexes. Toubert *et al.* ont atteint des limites de détection inférieures au  $\mu\text{g/L}$  pour la majorité des 17 corticostéroïdes étudiés. Cette sensibilité est tout à fait satisfaisante pour une application à des échantillons environnementaux, car un facteur de concentration de 1000 peut-être obtenu au cours de la préparation d'échantillon. De plus ils n'observaient pas ou peu d'effet matrice sur des échantillons d'urine. Les matrices environnementales étant très différentes, rien n'indique que cette méthode ne produirait pas d'effet matrice sur des échantillons environnementaux, mais cette approche reste intéressante.

Récemment l'utilisation d'une trappe d'ions par Noppe *et al.* [117] a permis d'atteindre des limites de détection de l'ordre de la dizaine de  $\text{ng/L}$  pour les corticostéroïdes. Par son fonctionnement, ce type d'analyseur permet de gagner en sensibilité, cependant il est moins spécifique qu'un triple quadripôle.

### **3.3 Analyse des estrogènes**

Un très grand nombre de publications traitent de l'analyse des estrogènes dans la littérature scientifique. Les estrogènes ayant fait l'objet de nombreux développements analytiques pour des matrices environnementales, seules ces méthodes seront présentées dans cette partie.

#### **3.3.1 Préparation d'échantillon**

L'extraction sur phase solide est la méthode de préparation d'échantillon la plus couramment utilisée pour l'analyse des estrogènes dans les matrices environnementales. Des supports de silice greffée  $\text{C}_{18}$  ont souvent été utilisés [118-125] ainsi que différents supports polymères : Lichrolut EN [43, 119], Oasis HLB [126] ou SDB-XC [127, 128].

Certains auteurs ont en particulier publié des tests comparatifs concernant l'extraction des estrogènes sur différents supports (Tableau 12).

Liu *et al.* ont montré que les supports polaires (DSC-Si, Strata SI-1, Strata CN) ne permettaient pas la rétention des estrogènes dans les matrices aqueuses [126]. Ces résultats ne sont pas surprenants puisque l'eau (solvant de charge) est plus polaire que ces supports, usuellement utilisés en polarité des phases normale. Ils se prêtent donc mal à une rétention en polarité des phases inverse. Les supports apolaires (silices greffées ou polymères) donnaient en revanche des rendements d'extraction satisfaisants.

Avec un  $\log P$  de 2,9, l'estriol est beaucoup plus polaire que les 3 autres estrogènes étudiés ( $\log P$  compris entre 3,5 et 4,5). L'estriol est par conséquent souvent moins retenu sur les phases apolaires que l'estrone, l'estradiol ou l'éthinylestradiol. López de Alda *et al.* ont effectivement observé une moins bonne rétention de l'estriol sur les phases polymères testées. Les meilleurs rendements d'extraction étaient obtenus sur le support Lichrolut RP18 [124].

**Tableau 12: Supports SPE proposés pour l'extraction des estrogènes dans l'environnement et performance des extractions**

| cartouche        | support                                         | masse de phase (g) | rendement d'extraction (%) |           |                   |         | ref.  |
|------------------|-------------------------------------------------|--------------------|----------------------------|-----------|-------------------|---------|-------|
|                  |                                                 |                    | estrone                    | estradiol | éthinyloestradiol | estriol |       |
| Strata CN        | cyanopropyl                                     | 1                  | 40                         | 40        | 5                 | nm      | [126] |
| Strata X         | polymère (breveté)                              | 0,2                | 110                        | 100       | 75                | nm      |       |
| Strata SI-1      | silice                                          | 1                  | 10                         | 10        | 1                 | nm      |       |
| DSC-18           | polymère greffé C18                             | 1                  | 90                         | 90        | 90                | nm      |       |
| DSC-Si           | silice                                          | 1                  | 0                          | 0         | 0                 | nm      |       |
| DPA-6S           | résine polyamide                                | 0,5                | 100                        | 95        | 40                | nm      |       |
| Isolute C18      | silice greffée octadécyl                        | 1                  | 120                        | 95        | 105               | nm      |       |
| Isolute C18-ENV+ | polystyrène divinylbenzène greffé hydrolysé C18 | 0,4                | 105                        | 90        | 135               | nm      |       |
| Oasis HLB        | poly(divinylbenzène co-N-vinylpyrrolidone)      | 0,2                | 115                        | 95        | 110               | nm      |       |
| Isolute ENV      | copolymère styrène-divinylbenzène               | non spécifiée      | 67                         | 44        | 73                | 10      | [124] |
| Lichrolut EN     | poly(styrène-divinylbenzène)                    | 0,2                | 91                         | 81        | 84                | 25      |       |
| Lichrolut RP18   | silice greffée C18                              | 0,5                | 98                         | 97        | 96                | 78      |       |

nm : non mesuré

Plusieurs auteurs ont proposé une purification supplémentaire des extraits, en particulier pour éliminer les acides humiques. Diverses méthodes ont été proposées, en particulier l'extraction liquide-liquide [121], la chromatographie d'exclusion stérique [129], l'extraction sur support NH<sub>2</sub> [118] ou la combinaison de supports florisil puis NH<sub>2</sub> [122, 130] ainsi que C<sub>18</sub> puis NH<sub>2</sub> [127]. Une purification sur immunosorbant (anticorps 17β-estradiol) a également été mentionnée par Noppe *et al.* [118]. Dans certaines études, la SPE a été couplée au système d'analyse LC/MS. L'extraction en ligne présente de nombreux avantages parmi lesquels une diminution du temps total d'analyse et une plus grande simplicité au niveau expérimental. De plus, l'automatisation permet de limiter les erreurs liées à la manipulation d'échantillons. L'extraction en ligne permet en outre d'injecter la totalité de l'échantillon sur la colonne chromatographique, diminuant ainsi le volume de prise d'essai nécessaire.

Certains auteurs ont extrait l'échantillon en ligne par microextraction sur phase solide (SPME) [131-133]. Ces méthodes présentent les avantages d'une totale automatisation. Elles sont plus rapides que les extractions sur phase solide et les prises d'essai nécessaires sont très faibles (quelques mL alors qu'avec une préparation d'échantillon par SPE plusieurs centaines de mL voire plusieurs litres sont utilisés).

Heisterkamp *et al.* [129] ont proposé une extraction liquide-liquide de l'échantillon. Outre le fait que ce type d'extraction soit peu sélectif, il semble contraignant d'un point de vue expérimental puisqu'Heisterkamp *et al.* utilisaient des aliquotes de 1,5 L.

### 3.3.2 Analyse par LC/MS

Les colonnes chromatographiques employées étaient en grande majorité des silices greffées C<sub>18</sub> [119-121, 124, 130, 132-135].

Des analyseurs à simple [119, 122, 125, 134] ou triple [129, 131, 135] quadripôle ont souvent été utilisés. L'utilisation de trappes ioniques a également été rapportée [120, 121, 125]. L'interface utilisée était presque systématiquement une source à électrospray. Les études comparatives ESI/APCI en mode d'ionisation positif ou négatif, concluent unanimement à une meilleure réponse des estrogènes en ESI (-). Benjits *et al.* [120] ont montré que la sensibilité pouvait encore être améliorée par l'utilisation d'une source d'ionisation à spray sonore (SSI).

Ingrand *et al.* [121] ont observé une réponse des estrogènes du même ordre de grandeur en APCI (+) qu'en ESI (-). Ils ont également mentionné que de meilleurs rapports signal sur bruit étaient obtenus pour l'électrospray. López de Alda *et al.* [124] obtenaient en revanche de meilleures réponses en APCI (-) qu'en (+), mais observaient une sensibilité 10 à 50 fois meilleure avec l'utilisation de l'ESI (-).

D'une façon générale, des sensibilités relativement faibles sont obtenues pour les estrogènes en spectrométrie de masse. Afin d'obtenir des limites de détection satisfaisantes pour des mesures environnementales (1 ng/L ou inférieures), un facteur d'enrichissement important doit être obtenu au cours de la préparation d'échantillon. Des facteurs de concentration compris entre 1 000 [124, 129] et 20 000 [127] sont usuellement présentés, ce qui nécessite des prises d'essai importantes, pouvant atteindre plusieurs litres [130].

Dans le domaine de la bioanalyse, Anari *et al.* [136] ont proposé une dérivation des estrogènes pour améliorer leur ionisation dans la source à électrospray, en introduisant une fonction amine, facilement ionisable. Cette stratégie n'a jamais été adoptée pour des matrices environnementales. Bien que l'étape de dérivation alourdisse souvent la procédure de préparation d'échantillon, cette approche permettrait de réduire les prises d'essai de façon importante. Une étude plus approfondie s'avérerait nécessaire pour apprécier les éventuels avantages d'une telle stratégie.

### 3.3.3 Autres méthodes d'analyse

L'analyse par GC/MS(/MS) a été rapportée par plusieurs auteurs [43, 118, 127]. Les avantages et les inconvénients de cette technique ont été discutés précédemment (voir 3.2.2.1 page 38).

Pour l'analyse des estrogènes dans l'environnement, certains auteurs ont utilisé un couplage LC/DAD [124, 132-134] et obtenaient, avec des préparations d'échantillon similaires à celles rencontrées pour l'analyse par LC/MS/MS, des limites de détection de l'ordre de la dizaine de ng/L. La détection UV-vis est peu spécifique mais nécessite un appareillage beaucoup moins coûteux que la spectrométrie de masse. Les limites de détection obtenues semblent un peu élevées pour un suivi environnemental

performant, toutefois une extraction en ligne permettrait une augmentation significative de la sensibilité. Les couplages LC/fluorimétrie ont été mentionnés par Wen *et al.* [133] ainsi que par Snyder *et al.* [128] avec des sensibilités relativement faibles (limites de détection de l'ordre de 50 ng/L dans la méthode proposée par Snyder *et al.* et 6 µg/L pour celle présentée par Wen *et al.*). Les performances de ces méthodes pourraient être améliorées en dérivant les estrogènes par un groupement fluorescent.

Snyder *et al.* [128] ont également rapporté l'utilisation d'un détecteur RIA (radioimmunoessai) qui permet la détection spécifique des estrogènes. Les limites de détection obtenues restaient élevées pour des mesures environnementales (50 à 100 ng/L). Elles pourraient potentiellement être abaissées en obtenant de meilleurs facteurs d'enrichissement au cours de la préparation d'échantillon. Toutefois, ce facteur est déjà élevé dans cette méthode (2 500) et nécessite une prise d'essai de 5 L. L'amélioration de l'étape de préconcentration semble donc très contraignante d'un point de vue expérimental.

Enfin, Li *et al.* [123] ont obtenu une sensibilité satisfaisante en analysant les extraits SPE sur plaques ELISA. Cette stratégie analytique est spécifique et rapide. Le manque de sensibilité de la méthode ELISA est souvent un frein à son application pour des mesures environnementales. Toutefois, si les auteurs n'annoncent pas de limites de détection, ils ont quantifié les estrogènes à hauteur de 10 ng/L dans les matrices environnementales.

### **3.4 Analyse des $\beta$ -bloquants**

Les  $\beta$ -bloquants ont fait l'objet de suivis environnementaux, principalement dans le cadre d'analyses multi-résidus. Les méthodes développées pour des applications environnementales ne sont donc généralement pas optimales pour les  $\beta$ -bloquants, mais un compromis permettant l'analyse de plusieurs molécules de classes pharmaceutiques et de propriétés différentes. Cette partie vise à présenter les outils analytiques utilisés pour l'analyse des  $\beta$ -bloquants dans les matrices environnementales.

#### **3.4.1 Préparation d'échantillon**

Toutes les méthodes proposées pour l'analyse de  $\beta$ -bloquants dans les eaux environnementales proposent une préparation d'échantillon par extraction sur phase solide.

Dans de rares cas, des supports de silice greffée C<sub>18</sub> ont été utilisés [31, 44, 137, 138], les supports polymères étant largement préférés. Certains auteurs ont proposé la mise en jeu de rétentions hydrophobes, par des interactions  $\pi$ - $\pi$  par exemple, en utilisant des supports copolymères styrène divinylbenzène (SDB-XC [33], StrataX [36]) ou divinylbenzène-N-vinylpyrrolidone (Oasis HLB)

[139-142]. D'autres auteurs ont utilisé le caractère basique des  $\beta$ -bloquants en mettant en jeu des rétentions ioniques par l'utilisation de cartouches MCX en milieu acide [30, 49, 143].

### 3.4.2 Analyse

#### 3.4.2.1 Méthodes chromatographiques

La chromatographie en phase gazeuse a souvent été utilisée mais requiert une dérivation de l'analyte qui alourdit la procédure de préparation d'échantillon. Le couplage avec un spectromètre de masse permettait, à partir d'une prise d'essai d'1 L (facteurs d'enrichissement compris entre 1 000 [138] et 10 000 [33]) d'atteindre des limites de détection de l'ordre du ng/L dans les matrices environnementales.

Ces limites de détection ont également été atteintes avec un couplage LC/MS/MS. Les colonnes chromatographiques utilisées étaient dans la majorité des études des colonnes de silice greffée C<sub>18</sub> [31, 137]. L'interface était une source à électrospray en mode d'ionisation positif (protonation de la fonction amine). Quelques auteurs ont rapporté l'utilisation d'une source APCI pour l'analyse de  $\beta$ -bloquants dans des matrices biologiques [144, 145]. Toutefois les sensibilités observées étaient très inférieures à celles obtenues avec une source à électrospray. Du fait de son fonctionnement, l'électrospray semble effectivement plus approprié à l'analyse de  $\beta$ -bloquants, qui sont des molécules cationiques en milieu neutre ou acide. Le triple quadripôle était l'analyseur le plus fréquemment utilisé [30, 36, 137, 138, 142, 146] pour un suivi MRM des analytes. L'utilisation du Q-TOF (analyseur hybride quadripôle-temps de vol) a également été rapportée par Stolker *et al.* [143] pour l'analyse de résidus de  $\beta$ -bloquants dans les STEP.

#### 3.4.2.2 Méthodes électrophorétiques

Les  $\beta$ -bloquants ayant des pK<sub>a</sub> de l'ordre de 9 (Tableau 9, page 29), ils sont présents sous leur forme acide (cationique) dans les conditions classiques d'analyse. Certains auteurs ont donc proposé l'utilisation de méthodes électrophorétiques pour leur analyse. Toutefois, ces techniques n'ont jamais été appliquées pour l'analyse de  $\beta$ -bloquants dans des matrices environnementales. Coragem *et al.* ont obtenu une séparation satisfaisante des  $\beta$ -bloquants par électrophorèse capillaire de zone [147]. D'autres techniques, hautement résolutives ont également été proposées telles que l'électrochromatographie [148], ou l'électrochromatographie micellaire [149, 150]. Ces méthodes pourraient permettre de gagner en sensibilité du fait de leur grande efficacité. Akbay *et al.* [149] sont parvenus à séparer énantiosélectivement 8  $\beta$ -bloquants par électrochromatographie micellaire. Le temps d'analyse de cette technique restait toutefois important (1 h), mais les limites de détection obtenues avec un couplage à un spectromètre de masse étaient très faibles, de l'ordre de la dizaine de ng/L. Dans un contexte environnemental, les scientifiques ne s'intéressent actuellement pas à la séparation des énantiomères, le temps d'analyse pourrait donc potentiellement être restreint et par

conséquent la sensibilité améliorée. Les limites de détection obtenues par Akbay *et al.* étant très faibles, les prises d'essais pourraient être fortement diminuées puisque un facteur d'enrichissement de 10 à 100 devrait être suffisant pour atteindre des limites de détections satisfaisantes pour une application environnementale.

### **3.5 Conclusions**

Les études proposées dans la littérature mettent en évidence une problématique différente pour l'analyse des estrogènes (faible réponse massique) et celle des corticostéroïdes ou des  $\beta$ -bloquants (peu ou pas de méthodes spécifiques à ces familles).

Aucune méthode n'est proposée pour l'analyse des corticostéroïdes dans les matrices environnementales. Pour les  $\beta$ -bloquants, les méthodes proposées sont généralement des méthodes multi-résidus qui ne sont donc pas toujours optimales pour cette famille. Un développement analytique spécifique à ces classes pharmaceutiques est donc nécessaire. En terme d'extraction, sur phase solide, l'utilisation de supports échangeurs mixtes cationiques pourrait potentiellement retenir chaque famille de façon spécifique, en faisant intervenir des interactions hydrophobes pour la rétention des corticostéroïdes et des interactions ioniques pour la rétention des  $\beta$ -bloquants.

L'extraction des estrogènes sur phase solide suivie d'une analyse par LC/ESI/MS/MS permet leur analyse environnementale. Le principal inconvénient des méthodes proposées est la faible réponse massique des estrogènes. Ce problème n'est pas résolu par l'utilisation d'autres moyens de détection. De ce fait des prises d'essai importantes sont nécessaires, ce qui se traduit expérimentalement par un temps de préparation d'échantillon élevé. La dérivation des estrogènes pour améliorer leur ionisation en spectrométrie de masse semble une voie intéressante à explorer. Cette option permettrait de diminuer les prises d'essai. De plus conjuguer cette stratégie avec une extraction en ligne pourrait potentiellement permettre, d'une part de diminuer de façon très importante les prises d'essai, et d'autre part de réduire le temps d'analyse total.

Par ailleurs, le suivi environnemental des résidus pharmaceutiques ne se limite pas à la quantification des molécules libres. Il est également nécessaire de connaître leur stabilité dans l'environnement, en particulier leur comportement photolytique.

## 4 Photodégradation

### 4.1 Notions théoriques

#### 4.1.1 Processus photochimiques et photophysiques

Une molécule soumise à un rayonnement photonique possédant une bande d'absorption correspondant à l'énergie des photons incidents, passe de l'état fondamental (ABC) à un état excité (ABC\*). La molécule excitée peut soit revenir à l'état fondamental par fluorescence ou phosphorescence, soit subir de nombreuses réactions conduisant à sa dégradation.

Les différents processus photochimiques primaires sont présentés Figure 5.

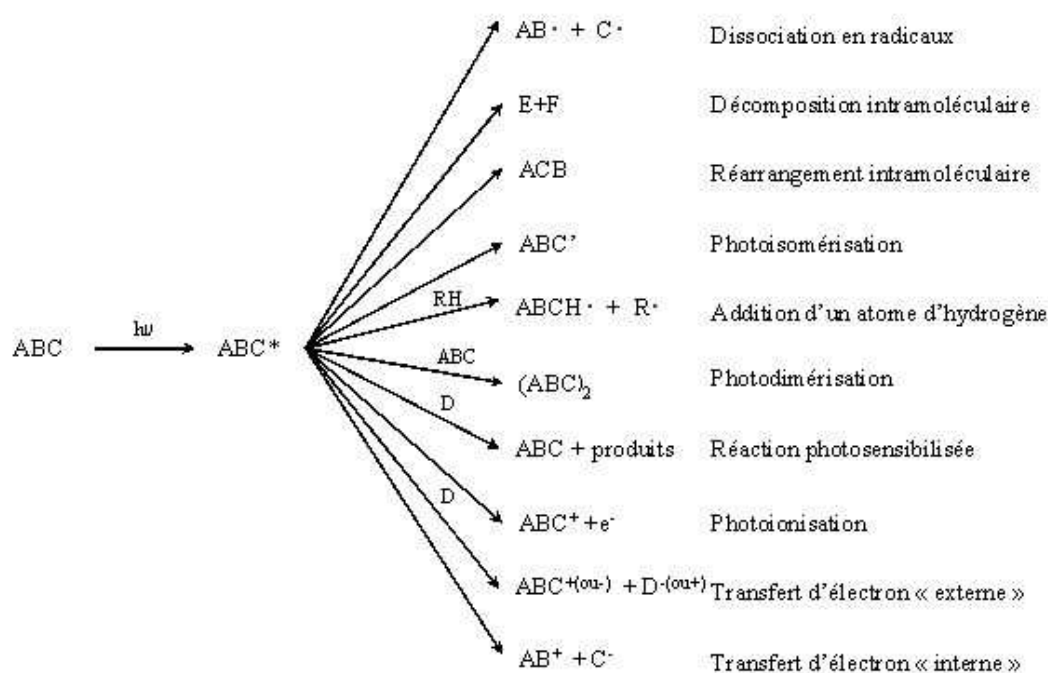


Figure 5: Processus photochimiques primaires [151]

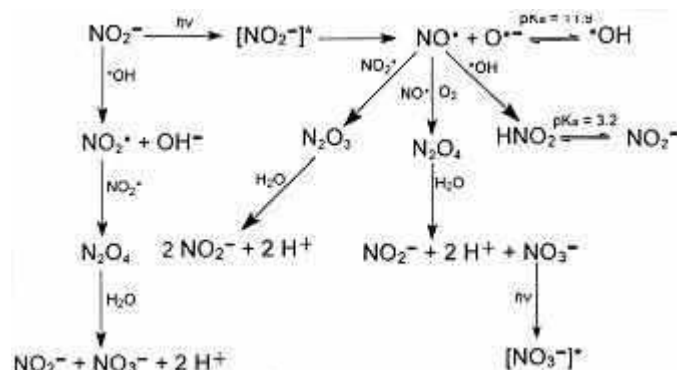
Ainsi, l'irradiation d'une molécule peut conduire à la formation de photoproduits qui peuvent être des molécules neutres ou des entités hautement réactives telles que des ions ou des radicaux libres. Les molécules neutres ainsi formées peuvent être photochimiquement stables si elles n'absorbent pas le rayonnement UV-vis ou peuvent se dégrader à nouveau selon le même schéma. La photodégradation consécutive d'une molécule organique et de ses photoproduits de dégradation peut donc aboutir à sa minéralisation (dégradation en  $CO_2$ ,  $H_2O$ , *etc.*).



### 4.1.2 Photochimie des molécules simples

Afin d'expliciter les processus de photolyse, l'exemple de molécules simples comme, les nitrites ou les nitrates seront présentées. Ces molécules présentent un intérêt environnemental particulier puisque étant présents dans les matrices environnementales, leurs photoproduits sont susceptibles d'influencer la dégradation des molécules organiques étudiées.

La photolyse des nitrites et des nitrates illustre bien la complexité des processus photochimiques. La photodégradation des nitrites est représentée Figure 6.



**Figure 6 : Procédés photochimiques primaires et réactions consécutives à la photolyse des nitrites dans le domaine 200 à 400 nm [152]**

La molécule de nitrite excitée par un photon de longueur d'onde de l'UV peut se dissocier selon l'équation suivante :



Les ions radicaux  $\text{O}^{\bullet-}$  ainsi formés se protonnent au contact de molécules d'eau à pH inférieur à 12 [153, 154].



Les radicaux hydroxyle ainsi formés peuvent alors se recombinaison avec les radicaux  $\text{NO}^*$  issus de la réaction (7) ou avec les nitrites [154-156] :



Les radicaux  $\text{NO}_2^{\bullet}$  formés lors de la réaction (10) peuvent réagir avec les radicaux  $\text{NO}^*$  pour former  $\text{N}_2\text{O}_3$ , qui en s'hydrolysant régénèrent les ions  $\text{NO}_2^-$ .



Les radicaux  $\text{NO}_2^{\bullet}$  peuvent également se dimériser en  $\text{N}_2\text{O}_4$ , qui par hydrolyse conduit à la formation de nitrites et nitrates [155, 156]:



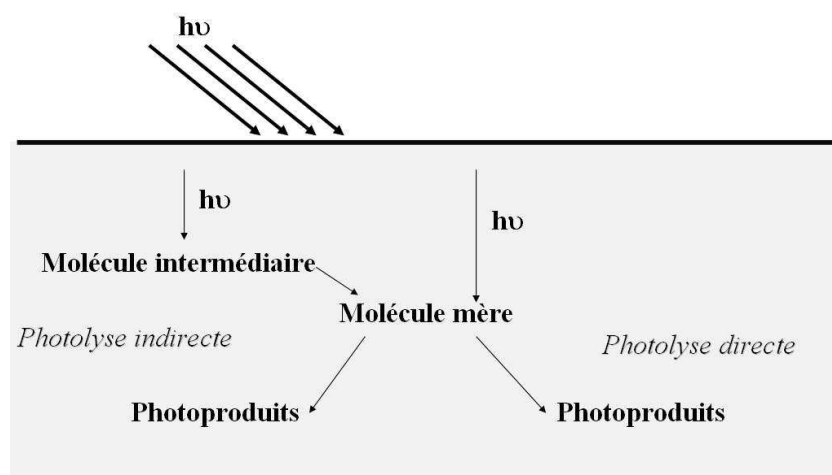


Figure 8 : Processus de photodégradation

#### 4.2.2 Photodégradation des molécules pharmaceutiques

Les études de photodégradation dans l'environnement visent dans un premier temps à évaluer les temps de demi-vie des molécules sous irradiation solaire. Certains travaux ont démontré le rôle de différents composants de la matrice sur la photolyse indirecte, tels que la matière organique dissoute (acides humiques par exemple) ou les nitrates. Plus rarement les auteurs ont caractérisé un ou plusieurs produits de dégradation et dans de très rares cas ont évalué leur écotoxicité. La littérature propose relativement peu d'études sur le devenir photochimique des résidus pharmaceutiques dans l'environnement.

Dans des conditions de photolyse directe, les temps de demi-vie des composés pharmaceutiques peuvent différer de façon importante d'une molécule à l'autre (Tableau 13), y compris pour des composés de structure chimique très proche (exemple des sulfamides). Les valeurs présentées ci-dessous ne peuvent pas être directement comparées étant donné que les conditions d'irradiation (lampe, géométrie du réacteur, volume et concentration de la solution dégradée) varient d'un auteur à l'autre.

Dans les matrices environnementales, les cinétiques de photodégradation des molécules pharmaceutiques sont significativement accélérées [158-163]. Andreozzi *et al.* [164] rappellent en particulier que la présence de nitrates dans les eaux environnementales favorise la formation de radicaux hydroxyle via la réaction d'ion radical  $O^{\bullet-}$  avec l'eau (équation 8). Les radicaux hydroxyle sont des entités connues pour accélérer les processus photochimiques.

Certaines études s'intéressent à l'impact de la matière organique dissoute (MOD) sur la cinétique de photodégradation des résidus pharmaceutiques. Latch *et al.* [162] ont montré que les MOD conduisaient à la formation de dioxygène excité qui va jouer le rôle de photosensibilisateur et accélérer la photodégradation des composés pharmaceutiques. Doll *et al.* [163] ont également observé un

processus d'accélération de la cinétique de photodégradation en présence de MOD. Andreozzi *et al.* [164] ont quant à eux étudié l'influence des acides humiques sur la photodégradation de principes actifs pharmaceutiques. Ils ont observé un effet catalytique sur la photodégradation du sulfaméthoxazole, du propranolol, de l'ofloxacin et de l'acide clofibrique et un effet stabilisateur sur la photodégradation du diclofenac et de la carbamazépine. Les acides humiques interviennent donc sur la photodégradation des micro-polluants organiques, mais leurs effets sur les cinétiques de dégradation ne peuvent pas être prédits *a priori*.

**Tableau 13: Stabilité des résidus pharmaceutiques dans des conditions de photolyse directe**

| molécule                                      | conditions d'irradiation | $t_{1/2}$ | référence |
|-----------------------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| <b><u>Antibiotiques</u></b>                   |                          |           |           |
| sulfaméthazine                                | Hg-MP                    | 23-28 h*  | [165]     |
| sulfamérazine                                 | Hg-MP                    | 31-71h*   | [165]     |
| sulfadiazine                                  | Hg-MP                    | 14-21 h*  | [165]     |
| sulfachloropyridazine                         | Hg-MP                    | 5-6 h*    | [165]     |
| sulfadiméthoxine                              | Hg-MP                    | 22-69 h*  | [165]     |
| sulfaméthoxazole                              | Hg-MP                    | 3-32 h*   | [160]     |
| sulfisoxazole                                 | Hg-MP                    | 3-11 h*   | [160]     |
| sulfaméthizole                                | Hg-MP                    | 15-64 h*  | [160]     |
| sulfathiazole                                 | Hg-MP                    | 1- 8h*    | [160]     |
| <b><u>Anticonvulsants</u></b>                 |                          |           |           |
| carbamazépine                                 | Xe                       | 61 h      | [163]     |
| <b><u>Hypolipémians</u></b>                   |                          |           |           |
| acide clofibrique                             | Xe                       | 128 h     | [163]     |
|                                               | Hg-MP                    | 144 h     | [159]     |
| gemfibrozil                                   | Xe                       | 91,4 h    | [158]     |
| <b><u>Analgsiques-anti-inflammatoires</u></b> |                          |           |           |
| diclofenac                                    | lumière solaire          | 32 min    | [166]     |
|                                               | Hg-MP                    | 35 min    | [159]     |
| acide mfénamique                              | Hg-MP                    | 19 h      | [161]     |
| ibuprofène                                    | Hg-MP                    | 12 h      | [159]     |
|                                               | Xe                       | 205 h     | [158]     |
| kétoprofène                                   | Xe                       | 2,5 min   | [158]     |
| naproxène                                     | Hg-MP                    | 33 min    | [159]     |
|                                               | Xe                       | 1,9 h     | [158]     |

\*  $t_{1/2}$  varie avec le pH de la solution dégradée

Hg-MP : lampe à vapeur de mercure moyenne pression

Xe : lampe à arc de xénon

### 4.3 Photochimie des stéroïdes

#### 4.3.1 Estrogènes

La photostabilité des estrogènes dans les matrices environnementales a été étudiée par Lin *et al.* [158]. Du fait de la présence d'un site chromophore, ces molécules sont susceptibles d'être photolabiles. Des

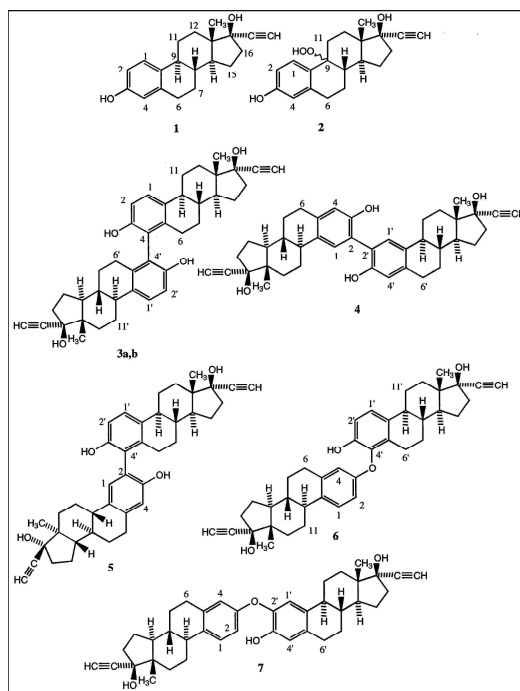
temps de demi-vies de 5 à 42 heures ont effectivement été mesurés dans cette étude dans des conditions de photolyse directe. Toutefois Lin *et al.* ont montré que la photolyse indirecte de ces molécules était un phénomène important dans l'environnement puisque les temps de demi-vie mesurés dans l'eau de rivière n'étaient plus que de 2 h pour ces mêmes composés.

**Tableau 14: Temps de demi-vie (exprimés en h) observés par Lin *et al.* [158] pour les estrogènes (solutions irradiées par une lampe à arc de Xénon)**

| molécule                      | eau milli-Q | eau de rivière |
|-------------------------------|-------------|----------------|
| 17 $\beta$ -estradiol         | 41,7        | 2              |
| estriol                       | 38,2        | 2,9            |
| estrone                       | 4,7         | 2,3            |
| 17 $\alpha$ -éthinyलेstradiol | 28,4        | 2,3            |

D'autres études confirment ces résultats, en particulier, Liu *et al.* ont mesuré des temps de demi-vie comparables pour la photolyse directe de l'estrone et du 17 $\beta$ -estradiol [167] ainsi que de l'éthinylestradiol [168]. Zhang *et al.* [169] ont observé un effet catalytique de la matière organique dissoute sur la photodégradation de l'estrone et l'estradiol .

Par ailleurs, Segmuller *et al.* ont identifié 6 photoproduits de l'éthinylestradiol. La plupart de ces photoproduits sont issus de réactions de dimérisation [170]. Toutefois cette étude a été conduite dans un contexte pharmaceutique et non environnemental. La photodégradation de l'éthinylestradiol était ici étudiée à 4 g/L dans l'acétonitrile. Les réactions de dimérisation ont donc une plus grande probabilité d'avoir lieu qu'aux concentrations environnementales.



**Figure 9: Structure des photoproduits de l'éthinylestradiol identifiés par Segmuller *et al.* [170]**

### 4.3.2 Corticostéroïdes

Les études concernant la photodégradation des corticostéroïdes proposées dans la littérature ne sont généralement pas réalisées dans un objectif environnemental. Elles ne visent donc pas à évaluer la stabilité de ces molécules dans l'environnement ni l'efficacité d'un traitement UV sur leur élimination mais à déterminer la structure des photoproduits formés. Les schémas de dégradation publiés seront présentés ici.

#### 4.3.2.1 Mécanismes réactionnels intervenant dans la photodégradation des corticostéroïdes

##### 4.3.2.1.1 Photochimie des cyclohexadiénones

Sous irradiation UV, les cyclohexadiénones peuvent se réarranger selon une réaction dite « réarrangement lumicétone ». L'existence de ce réarrangement est établie et constatée depuis les années 1970 [171]. Toutefois, les mécanismes réactionnels impliqués n'ont toujours pas été élucidés.



Figure 10: Réarrangement lumicétone des cyclohexadiénones

Le réarrangement « lumi » est initié par la rupture homolytique de la liaison C1-C10 et se produit de façon stéréospécifique.

##### 4.3.2.1.2 Ruptures de type Norrish

La rupture de type Norrish I (Figure 11) est une rupture homolytique des aldéhydes et cétones, issue de leur état excité  $n\pi^*$  :



Figure 11: Rupture de type Norrish I

La rupture de type Norrish II (Figure 12) est également une réaction issue de l'état excité  $n\pi^*$  des aldéhydes et des cétones. Cette rupture correspond au réarrangement de Mac Lafferty. Suite à la rupture homolytique de la liaison C-C en  $\alpha$  du carbonyle, il y a migration de l'hydrogène en  $\gamma$  qui conduit à la formation d'une oléfine et d'un émol. Cet émol donne lieu à la cétone correspondante.

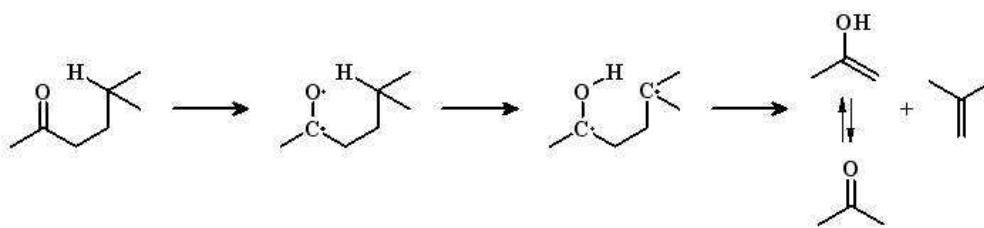


Figure 12 : Rupture de type Norrish II

#### 4.3.2.2 Photodégradations en milieu organique sous atmosphère inerte

Les études récemment menées par Ricci *et al.* [172, 173], en irradiant une solution de corticostéroïde dans l'acétonitrile à diverses longueurs d'onde, ont permis de mettre en évidence la compétition entre le réarrangement lumicétone et la rupture de type Norrish. L'influence de certains paramètres sur cette compétition a été évaluée. Il apparaît que la présence d'un halogène en C9 diminue fortement le rendement du réarrangement lumicétone, et le diminue d'autant plus que cet halogène est lourd. Ainsi, la présence d'un chlore en cette position, comme c'est le cas dans la béclo méthasone 17,21-dipropionate, empêche la formation du lumiproduit et seule la rupture de type Norrish a lieu. Alors que la présence d'un atome de fluor (triamcinolone acétonide, fluméthasone, fluocinolone acétonide, difluorocotolone 21-valérate) permet la compétition entre les deux réactions et les deux types de photoproduits sont observés. La présence d'un substituant oxygéné en C17 (alcoxyde, hydroxyle ou acétal) rigidifie la molécule et favorise ainsi la rupture de type Norrish I. En l'absence de substituant oxygéné en cette position, la molécule se dégrade suivant une rupture de type Norrish II. Une nuance est apportée dans le cas où la molécule présente un groupement oxygéné en C17 et en C21. Dans ce cas la rupture de type Norrish I a lieu au niveau de la liaison C20-C21. Les photoproduits obtenus pour chacun des 6 corticostéroïdes étudiés par Ricci *et al.* sont présentés Figure 13.

Cette étude permet de prévoir le comportement des corticostéroïdes dans les eaux urbaines. Toutefois, des réactions d'oxydation peuvent également avoir lieu, ce qui n'a pas été pris en compte dans cette étude.

En terme de toxicité, lors du réarrangement lumicétone, seule la toxicité du photoproduit est à prendre en compte, par contre dans le cas de ruptures homolytiques de type Norrish, la toxicité des radicaux libérés est également à considérer.

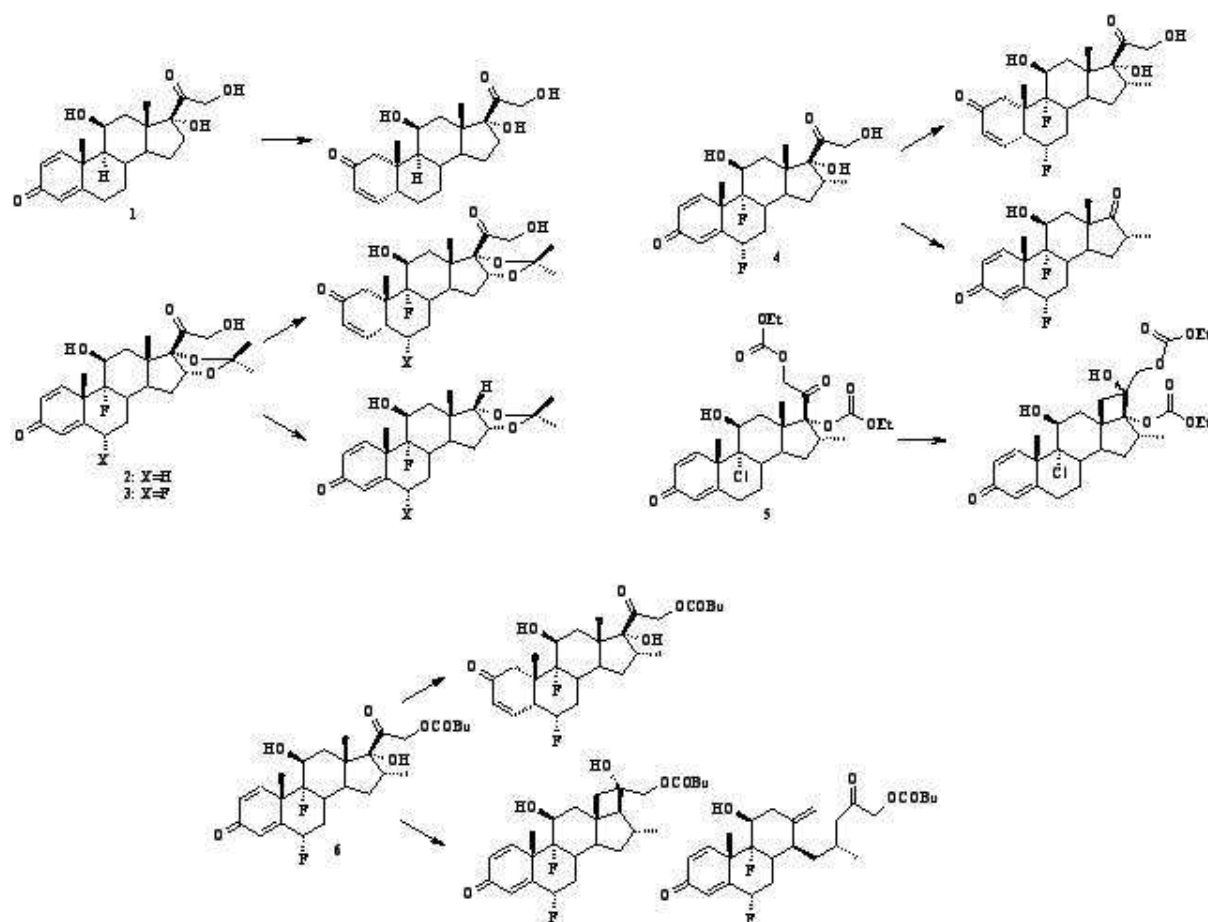


Figure 13: Photodégradation des corticostéroïdes, d'après Ricci *et al.* [172, 173] : prednisolone (1), triamcinolone acétonide(2), fluocinolone acétonide(3), fluméthasone (4), bécloéthasone 17-21-dipropionate (5), difluorocortolone 21-valérate (6)

#### 4.3.2.3 Photodégradations en milieu aqueux

Dans l'objectif de prévoir la toxicité liée aux rejets de corticostéroïdes dans les eaux territoriales, Della Greca *et al.* ont étudié la photodégradation de 3 corticostéroïdes et leur toxicité sur les micro-organismes aquatiques [20, 174]. Les produits formés après 8 h d'irradiation par une lampe à arc de xénon sont présentés Figure 14, Figure 15 et Figure 16.

De nombreux photoproduits sont issus de réarrangements de la molécule (composés 8, 9, 13, 14, 17, 21, 22, 24, 25). Les photoproduits 10 pour la prednisone et 18 pour la prednisolone sont issus de ruptures de type Norrish I au niveau de la fonction carbonyle en C20 (voir Figure 3 page 25). Enfin, l'hydrolyse de la liaison C4-C5 est observée pour les photoproduits 11,12, 19 et 20.



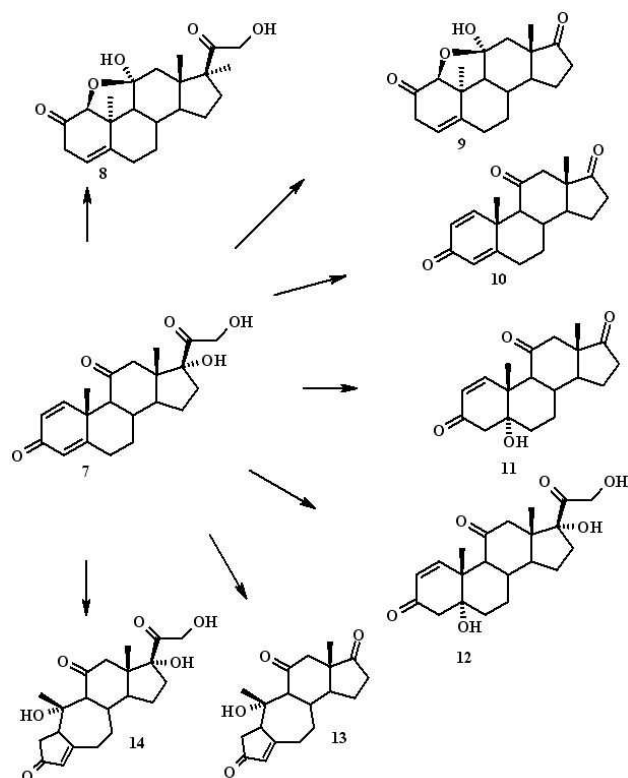


Figure 14: Photodégradation de la prednisone (7) d'après Della Greca *et al.* [174]

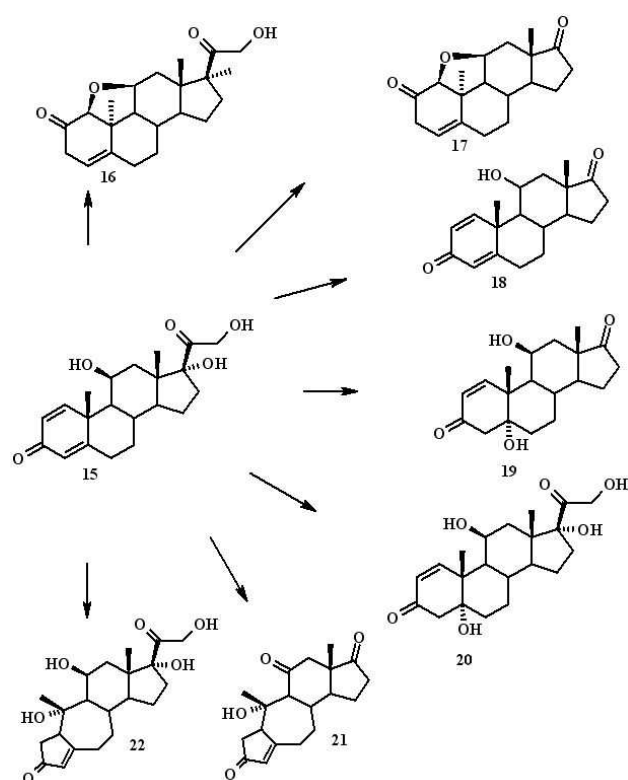


Figure 15: Photodégradation de la prednisolone (15), d'après Della Greca *et al.* [20]

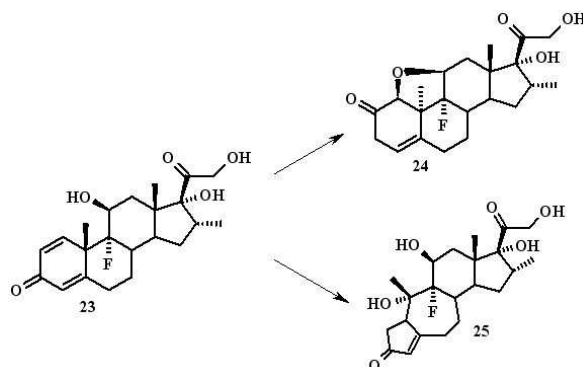


Figure 16 : Photodégradation de la dexaméthasone (22) d'après Della Greca *et al.* [20].

Ces études ont été complétées par des mesures de toxicité ( $EC_{50}$ ,  $LC_{50}$ ) sur des micro-organismes aquatiques. Certains photoproduits se sont montrés plus toxiques que la molécule mère, ce qui souligne l'importance de les considérer, lorsque l'on souhaite évaluer la pollution et la toxicité causée par les corticostéroïdes dans les milieux naturels.

### 4.3.3 Conclusions

La littérature propose une quantité relativement importante de données sur la photochimie des estrogènes. Les temps de demi-vie de ces composés ont été évalués dans des conditions de photolyse directe comme indirecte. Certains photoproduits ont également été caractérisés. La photodégradation des estrogènes ne semble donc pas prioritaire à étudier.

Par contre, les temps de demi-vie des corticostéroïdes n'ont été évalués ni dans des conditions de photolyse directe, ni dans des conditions de photolyse indirecte. Des données doivent donc être acquises en ce sens. D'autre part il semble intéressant de caractériser les photoproduits d'autres molécules comme la cortisone. Cette molécule étant un composé endogène, il est très probable qu'elle contamine les eaux environnementales, et ses photoproduits doivent être caractérisés afin de pouvoir envisager des études d'écotoxicité sur ces composés de dégradation.

## 4.4 Photochimie des $\beta$ -bloquants

Peu de  $\beta$ -bloquants ont été étudiés d'un point de vue photochimique. Un intérêt particulier a cependant été porté à la molécule de propranolol, pour laquelle plusieurs articles sont proposés dans la littérature. Ces articles étudient la photodégradation du propranolol tant d'un point de vue mécanistique qu'environnemental. Quelques informations peuvent également être obtenues sur la photodégradation d'autres molécules telles que le labétalol ou l'aténolol.

### 4.4.1 Stabilité photochimique

Peu d'auteurs se sont intéressés à la stabilité photochimique des  $\beta$ -bloquants dans l'environnement. Liu *et al.* ont rapporté des temps de demi-vie de 21 h, 630 h et 365 h pour le propranolol, le métoprolol et l'aténolol respectivement [175]. Ces valeurs étaient obtenues dans des conditions de photolyse directe suite à l'irradiation de solutions à 1 mg/L par une lampe à arc de xénon.

La variation saisonnière des temps de demi-vie du propranolol (Figure 17) a été étudiée par Andreozzi *et al.* [164]. Ils montraient ainsi qu'en hiver la photodégradation du propranolol était significativement plus lente qu'aux saisons chaudes (printemps, été).

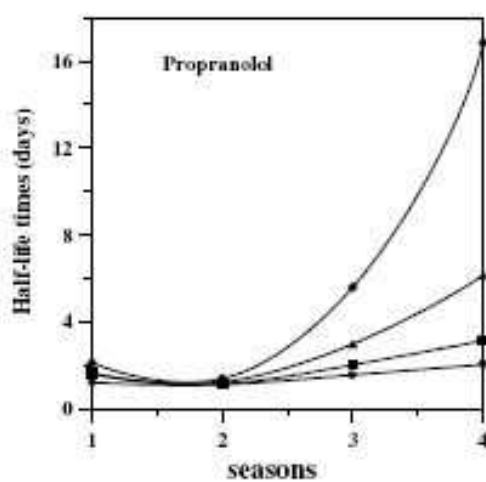


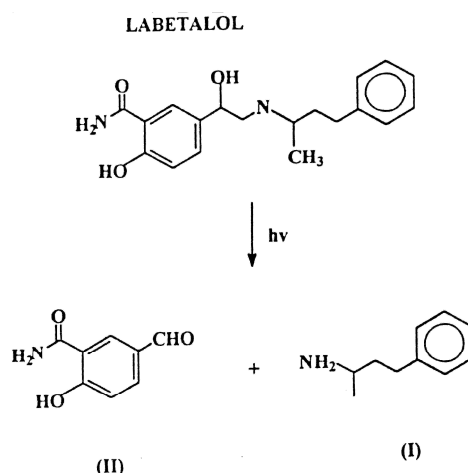
Figure 17: Temps de demi-vie pour la photolyse directe du propranolol à différentes saisons et latitudes : (1) printemps, (2) été, (3) automne, (4) hiver (●: 20°N, ■ : 30°N, ▲ : 40°N, ◆: 50°N)

De plus, Robinson *et al.* ont montré que la photolyse directe du propranolol conduisait à une réduction significative des concentrations environnementales, ce phénomène étant maximisé pour les longs fleuves et dans des conditions de faible turbidité et de faible flux [176]. Ils ont en particulier montré que la photolyse directe du propranolol pouvait diminuer jusqu'à 68% la concentration de cette molécule dans les grands fleuves américains, en été.

Cette étude sous-estime vraisemblablement le phénomène puisque seule la photolyse directe est ici prise en compte, la cinétique de photodégradation des micropolluants étant généralement accélérée dans les matrices environnementales.

### 4.4.2 Schémas de dégradation

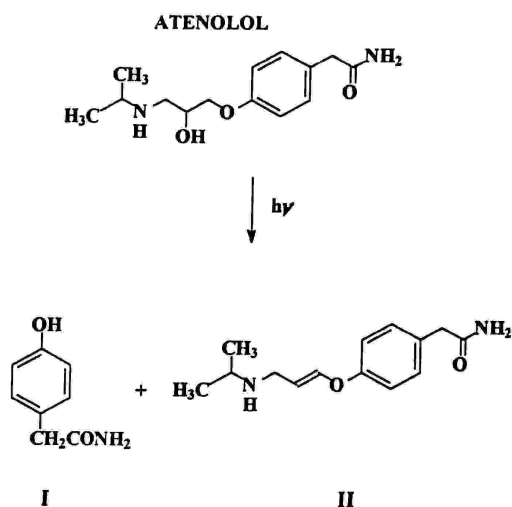
Andrisano *et al.* [177] ont observé la formation de 2 principaux photoproduits suite à l'irradiation UV par une lampe à arc de xenon d'une solution de labétalol à 1g/L (Figure 18).



**Figure 18: Schéma de photodégradation du labétalol d'après Andrisano *et al.* [177]**

Il est intéressant de remarquer que le produit I (Figure 18) est également un métabolite du labétalol, ainsi un même résidu pharmaceutique est susceptible d'être généré à la fois par la métabolisation de la molécule et sa photodégradation.

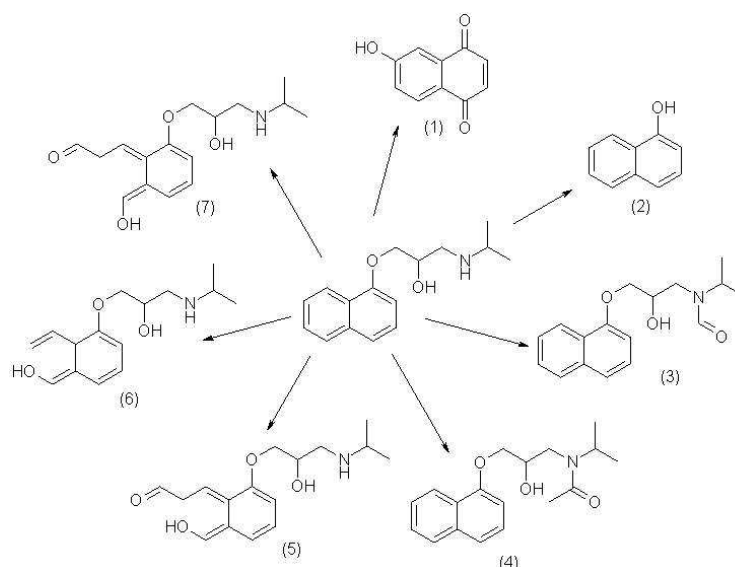
Les études menées par cette même équipe sur la photodégradation de l'aténolol [178] ont également montré la formation de 2 principaux photoproduits (Figure 19).



**Figure 19: Schéma de photodégradation de l'aténolol d'après Andrisano *et al.* [178]**

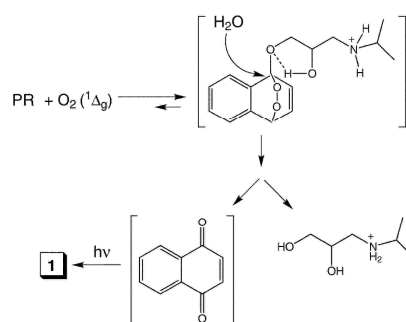
Les photoproduits formés dans ces études proviennent d'une décomposition intramoléculaire. De plus, l'analyse des produits de dégradation ayant été réalisée par LC/UV, il est possible que d'autres composés soient également formés mais non détectés dans ces conditions d'analyse.

La photodégradation du propranolol a intéressé davantage d'auteurs. Les photoproduits du propranolol caractérisés par différents auteurs sont présentés Figure 20.



**Figure 20: Structures des photoproduits du propranolol caractérisés dans la littérature [175, 179, 180]**

Sortino *et al.* ont caractérisé le photoproduit (1) (Figure 20) du propranolol [179] et ont proposé le mécanisme réactionnel suivant (Figure 21) :



**Figure 21: Mécanisme de formation du photoproduit (1) d'après Sortino *et al.* [179]**

La formation de ce photoproduit n'a pas été mentionnée dans les autres études. Uwai *et al.* ont observé et caractérisé 3 principaux photoproduits [180]. Les produits étaient extraits du mélange réactionnel sur colonne de silica gel puis analysés par RMN. Les structures (2), (3) et (4) (Figure 20) ont été obtenues.

Liu *et al.* ont détecté plus d'une dizaine de photoproduits [175]. Ils en ont isolé 3 par chromatographie préparative et ont proposé les structures (5), (6) et (7) (Figure 20) suite à leurs analyses RMN.

### 4.4.3 Conclusions

La photodégradation des  $\beta$ -bloquants semble être très complexe et difficile à modéliser. Les temps de demi-vie peuvent varier de façon très importante d'une molécule à l'autre. Une photodégradation rapide du propranolol a en effet été rapportée alors que d'autres composés de structure proche (métoprolol) semblent être photochimiquement stables. Il apparaît alors nécessaire d'évaluer la

photolabilité des différents  $\beta$ -bloquants étudiés dans des conditions de photolyse directe. La littérature ne proposant pas de données sur la photolyse indirecte des  $\beta$ -bloquants dans les matrices environnementales, il est intéressant d'étudier cette thématique. D'autre part, relativement peu d'analyses structurales ont été réalisées sur les photoproduits des  $\beta$ -bloquants, des recherches doivent donc être effectuées dans ce sens.

## **5 Conclusions**

La présence de résidus pharmaceutiques dans l'environnement et les risques écologiques que cela comporte sont avérés. Le choix d'étudier les classes des estrogènes, corticostéroïdes et  $\beta$ -bloquants a pour objectif d'améliorer la connaissance du comportement environnemental de ces composés.

Les estrogènes nécessitent effectivement des méthodes d'analyse très sensibles, ce qui est rendu difficile par leur faible réponse en spectrométrie de masse. Le développement de méthodes d'analyse rapides et sensibles semble donc nécessaire. D'un point de vue photochimique, ces composés ne semblent pas prioritaires à étudier du fait du nombre relativement important de résultats déjà proposés dans la littérature.

Les corticostéroïdes n'ont, quant à eux, jamais été étudiés dans les matrices environnementales. Il est donc nécessaire de développer des protocoles analytiques pour leur mesure. Par ailleurs, la littérature ne propose aucune donnée sur leur stabilité dans l'environnement, une étude du devenir photochimique de ces molécules est donc nécessaire.

Les  $\beta$ -bloquants, par contre, ont fait l'objet de nombreuses mesures de terrain en Europe et en Amérique du Nord. Il est toutefois nécessaire d'acquérir des données quant à la contamination des eaux de la région lyonnaise, par ces substances. De plus le comportement photochimique des  $\beta$ -bloquants est mal connu. Aucune étude n'a en particulier été publiée sur la photolabilité de ces molécules dans les matrices environnementales.

# Chapitre 1

1 développement analytique :  
Corticostéroïdes et  $\beta$ -bloquants





## Chapitre 2 – Développement analytique : corticostéroïdes et $\beta$ -bloquants

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 (partie 3.4 page 43), la littérature propose plusieurs méthodes pour l'analyse de  $\beta$ -bloquants dans les eaux environnementales. Toutefois, ces méthodes ont souvent été développées pour le dosage simultané de résidus provenant de différentes classes pharmaceutiques. Elles n'ont donc pas été optimisées pour la famille des  $\beta$ -bloquants en particulier, mais sont un compromis permettant le dosage d'un grand nombre de substances pharmaceutiques. En effet, il est parfois nécessaire, lors du développement de méthodes multi-résidus, de diminuer le rendement d'extraction et/ou la purification pour certaines molécules afin de conserver une extraction satisfaisante de l'ensemble des composés.

Par ailleurs, aucune méthode n'a été proposée pour l'analyse des corticostéroïdes dans les matrices environnementales.

Un développement analytique spécifique à ces deux classes a donc été nécessaire. La stratégie la plus simple qui peut être envisagée consiste à extraire et analyser ces deux familles séparément. Cette stratégie permettrait d'éviter de réaliser des compromis sur l'extraction des composés comme c'est généralement le cas lors du développement de méthodes multi-résidus. Toutefois, étant données les propriétés acido-basiques très différentes des deux familles et la disponibilité commerciale de supports SPE particuliers, une seconde stratégie peut également être envisagée. L'utilisation de supports échangeurs mixtes cationiques pourrait effectivement permettre le développement d'une unique procédure d'extraction. En jouant sur le pH des mélanges éluants, il serait alors possible d'éluer sélectivement chaque famille du support sans avoir à réaliser de compromis ni sur les rendements, ni sur les purifications. Cette seconde stratégie qui permet de diviser par 2 les volumes de prises d'essai ainsi que le temps de préparation d'échantillon, a été explorée et sera présentée dans ce chapitre.

## **1 Matériels et méthodes**

### **1.1 Réactifs et solvants**

La bétaméthasone (97,8%), la budénoside (99,2%), le cortisol (98%), la cortisone (98,3%), la dexaméthasone (98%), le flunisolide (98,6%), la fluocinolone acétonide (99,6%), la prednisolone (99%), la prednisone (99%), la triamcinolone (98,2%), la triamcinolone acétonide (99,3%), le chlorhydrate d'acébutolol (100%), le chlorhydrate d'alprénolol (99%), l'aténolol (99%), le tartrate de métoprolol (100%), le nadolol (100%), le chlorhydrate de propranolol (99%), le pindolol (99%), le chlorhydrate de sotalol (99%), et le maléate de timolol (99,9%) provenaient de Sigma-Aldrich. L'hémifumarate de bisoprolol (100%) provenait de Sequoia Research. Le chlorhydrate de bétaxolol (100%), le chlorhydrate de cartéolol (100%) et le chlorhydrate de bupranolol (100%) ont été fournis par Lipha. Le chlorhydrate d'oxprénolol (100%) était fourni par Sandoz.

Le méthanol de qualité HPLC (MeOH) provenait de SDS-Carlo-Erba. L'acétonitrile de qualité LC/MS (AcN), l'acide formique (FOA) et le formiate d'ammonium provenaient de Fisher Scientific. Une solution d'ammoniaque RP Normapur (28%) a été acquise chez Prolabo. L'eau ultra pure était générée par un appareil Elgastat UHQ PS d'Elga LabWater.

Pour chaque corticostéroïde, une solution mère à 1 g/L a été préparée dans l'AcN. Des solutions à 0,25 g/L ont été préparées pour la triamcinolone et la triamcinolone acétonide en raison de leurs plus faibles solubilités. Pour chaque  $\beta$ -bloquant, une solution mère à 1 g/L a été préparée dans le MeOH. En effet, étant donné le caractère basique de ces composés, ils sont davantage solubles dans les solvants protiques.

Une première solution de travail contenant l'ensemble des corticostéroïdes a été préparée dans l'AcN. Une seconde solution de travail contenant l'ensemble des  $\beta$ -bloquants a été préparée dans le MeOH. Ces solutions ont été conservées à 4°C à l'abri de la lumière.

### **1.2 Prélèvement des échantillons environnementaux**

Les échantillons environnementaux ont été collectés à la STEP de Pierre-Bénite (en aval de Lyon) qui reçoit principalement des effluents urbains et hospitaliers.

Pour les analyses environnementales, des échantillons moyens sur 24 h ont été collectés, alors que des prélèvements ponctuels ont été utilisés comme matrice pour le développement de méthodes.

Les échantillons de STEP (influent et effluent) ont été filtrés à 0,45  $\mu$ m sur des filtres à membrane de nitrocellulose fournis par Millipore. Les matrices ont été utilisées sur une période maximale de 5 jours consécutifs au prélèvement. Les mesures environnementales sur les échantillons moyens étaient

réalisées dans un délai de 2 jours après la collecte. Durant ce délai, les échantillons étaient stockés à 4°C.

### 1.3 LC/MS/MS

Une chaîne chromatographique Agilent 1100 series constituée d'une pompe quaternaire basse pression, d'un passeur d'échantillons et d'un dégazeur a été utilisée. Elle était couplée à un spectromètre de masse à triple quadripôle API 300 fourni par MDS Sciex, par l'intermédiaire d'une source TurboIonSpray (TIS) fonctionnant en mode positif.

Le contrôle de l'instrument, l'acquisition et le traitement de données ont été réalisés en utilisant le logiciel associé Analyst 1.4.1. Le spectromètre de masse a initialement été calibré par une solution standard de polypropylène-glycol, en réglant la résolution, telle que la largeur à mi-hauteur soit de  $0,7 \pm 0,1$  amu.

Le gaz rideau (azote) et le gaz de nébulisation (air) étaient fixés à un débit de 10 unités arbitraires. La source TIS était chauffée à 400°C pour l'analyse des corticostéroïdes et à 500°C pour l'analyse des  $\beta$ -bloquants. Un gaz desséchant (air) était introduit à un débit de 8 L/min.

**Tableau 15: Paramètres de masse pour l'analyse des corticostéroïdes**

| molécule                   | Ion parent - ion fils<br>(m/z) | Tension<br>d'orifice (eV) | Potentiel de<br>focalisation (eV) | Energie de<br>collision (eV) |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| Bétaméthasone              | 393,0-373,1<br>393,0-355,0*    | 41                        | 240                               | 13<br>17                     |
| Budésonide                 | 431,0-413,3<br>431,0-323,2*    | 6                         | 140                               | 15<br>19                     |
| Cortisol                   | 362,9-327,2<br>362,9-121,2*    | 31                        | 200                               | 29<br>23                     |
| Cortisone                  | 361,0-163,1<br>361,0-343,2*    | 26                        | 160                               | 31<br>23                     |
| Désonide                   | 417,0-399,2<br>417,0-322,8*    | 16                        | 150                               | 15<br>19                     |
| Dexaméthasone              | 393,0-373,1<br>393,0-355,0*    | 41                        | 240                               | 13<br>17                     |
| Flunisolide                | 435,0-321,1<br>435,0-339,1*    | 6                         | 150                               | 19<br>19                     |
| Fluocinolone<br>acétonide  | 453,1-413,2<br>453,1-337,2*    | 11                        | 160                               | 17<br>21                     |
| Méthylprednisolone         | 375,0-357,1<br>375,0-339,1*    | 51                        | 240                               | 15<br>17                     |
| Prednisolone               | 360,9-343,1<br>360,9-325,0*    | 11                        | 140                               | 15<br>15                     |
| Prednisone                 | 358,9-313,0<br>358,1-341,2*    | 21                        | 180                               | 17<br>15                     |
| Triamcinolone              | 391,2-375,0<br>391,2-357,1*    | 46                        | 270                               | 15<br>14                     |
| Triamcinolone<br>acétonide | 435,0-415,1<br>435,0-397,1*    | 6                         | 150                               | 15<br>21                     |

\* : transition de confirmation

Tableau 16: Paramètres de masse pour l'analyse des  $\beta$ -bloquants

| molécule    | Ion parent - ion fils<br>(m/z) | Tension<br>d'orifice (eV) | Potentiel de<br>focalisation<br>(eV) | Energie de<br>collision (eV) |
|-------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| Acébutolol  | 337,0-116,2<br>337,0-319,2*    | 21                        | 150                                  | 29<br>23                     |
| Alprénolol  | 249,9-116,2<br>249,9-72,1*     | 16                        | 140                                  | 23<br>27                     |
| Aténolol    | 267,0-145,1<br>267,0-190,1*    | 21                        | 150                                  | 33<br>25                     |
| Bétaxolol   | 308,0-116,1<br>308,0-161,0*    | 26                        | 140                                  | 29<br>27                     |
| Bisoprolol  | 326,1-116,2<br>326,1-74,2*     | 21                        | 140                                  | 25<br>33                     |
| Bupranolol  | 272,1-216,0<br>272,1-180,9*    | 16                        | 120                                  | 21<br>27                     |
| Cartéolol   | 292,9-236,7<br>292,9-202,0*    | 11                        | 120                                  | 19<br>29                     |
| Labétalol   | 328,8-311,2<br>328,8-162,0*    | 21                        | 150                                  | 17<br>33                     |
| Métoprolol  | 268,0-116,3<br>268,0-74,2*     | 21                        | 150                                  | 23<br>27                     |
| Nadolol     | 310,1-254,1<br>310,1-201,0*    | 21                        | 140                                  | 23<br>29                     |
| Oxprénolol  | 265,8-225,0<br>265,8-116,2*    | 16                        | 110                                  | 19<br>25                     |
| Pindolol    | 248,9-116,2<br>248,9-172,0*    | 16                        | 130                                  | 23<br>33                     |
| Propranolol | 259,9-116,3<br>259,9-183,1*    | 16                        | 140                                  | 23<br>23                     |
| Sotalol     | 272,9-255,1<br>272,9-213,1*    | 6                         | 120                                  | 17<br>25                     |
| Timolol     | 317,0-261,1<br>317,0-244,1*    | 16                        | 140                                  | 23<br>29                     |

\* : transition de confirmation

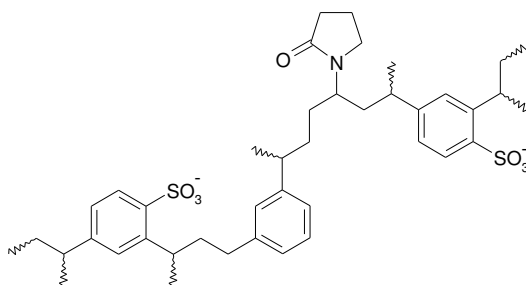
La tension d'aiguille de l'électrospray a été réglée à 5 000 V et des « dwell time » de 80 ms et 50 ms ont été respectivement utilisés pour les corticostéroïdes et les  $\beta$ -bloquants. Les autres paramètres de masse, dépendant de chaque analyte, sont présentés Tableau 15 pour les corticostéroïdes et Tableau 16 pour les  $\beta$ -bloquants. Ils ont été déterminés en infusant chaque analyte séparément de manière à optimiser la détection de chaque molécule, en faisant varier les tensions des différentes lentilles de l'instrument. Cette optimisation a permis la mise en place de la méthode MRM en sélectionnant les fragments les plus intenses.

Les transitions de confirmation indiquées Tableau 16 et Tableau 17 ont été utilisées uniquement lors du développement de la méthode, afin de s'assurer de la bonne spécificité dans des extraits de STEP. Ces transitions n'ont pas été suivies par la suite. En effet, le suivi d'un grand nombre de transitions nécessite de diminuer le « temps de résidence » ou « dwell time », afin de maintenir un nombre de points suffisant (au moins 20) pour caractériser chaque pic chromatographique. Sur l'instrument utilisé, ce « dwell time » ne doit pas être inférieur à 50 ms, car alors, la vitesse des ions fragment dans la chambre de collision est plus lente que la vitesse de balayage et risque de générer un effet « cross-talk ».

## 1.4 Extraction

### 1.4.1 Choix du support

Les corticostéroïdes sont des molécules modérément polaires alors que les  $\beta$ -bloquants sont des composés basiques avec des  $pK_a$  de l'ordre de 9 (voir Tableau 6 page 24 et Tableau 9 page 29). En tenant compte de ces propriétés, et dans l'objectif d'une procédure d'extraction unique, un support échangeur mixte (cationique et hydrophobe) a été retenu pour l'extraction des 2 familles : le support commercial Oasis MCX. Cette phase est constituée d'un copolymère divinylbenzène-N-vinylpyrrolidone où les noyaux benzéniques sont substitués par des fonctions sulfoniques (Figure 22).



**Figure 22: Structure du support Oasis MCX**

Ce support permet la rétention des molécules apolaires (corticostéroïdes) selon un mécanisme de partage, et des cations ( $\beta$ -bloquants en milieu acide) selon un mécanisme d'échange d'ions. Cette phase peut donc potentiellement permettre l'élution séquentielle de chaque famille, puisque tant que les mélanges éluants percolés sont acidifiés, les  $\beta$ -bloquants sont présents sous forme cationique et donc susceptibles de rester fixés aux sites échangeurs d'ions. Ceci permettrait alors de récupérer uniquement les corticostéroïdes en laissant les  $\beta$ -bloquants fixés au support d'extraction. Les  $\beta$ -bloquants pourraient ensuite être élués en milieu basique, où ils sont présents sous leur forme moléculaire.

### 1.4.2 Matériel

Les échantillons étaient extraits sur des cartouches Oasis MCX (60 mg, 3 cc, 30  $\mu$ m) fournies par Waters. La procédure a été réalisée sur un extracteur automatique ASPEC XL4 équipé d'une pompe à seringue 404 et d'une vanne à 8 positions valvemate fournis par Gilson. Le contrôle de l'appareil est réalisé à partir du logiciel associé 735 sampler.

## 2 Développement de la méthode d'extraction

### 2.1 Tests de faisabilité

Afin d'estimer la faisabilité d'une élution séquentielle de chaque famille sur le support Oasis MCX, 3 mL d'une solution acidifiée contenant chaque corticostéroïde et chaque  $\beta$ -bloquant à 10 mg/L sont chargés sur la cartouche MCX préalablement conditionnée par du MeOH puis de l'eau.

Dans un premier temps, l'influence du pourcentage de MeOH dans des mélanges hydro-organiques acidifiés sur l'élution des molécules est évaluée. Le volume de mélange éluant utilisé est fixé à 1 mL. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour la triamcinolone et la budésonide, respectivement le moins et le plus polaire des corticostéroïdes étudiés, sont présentés Figure 23.

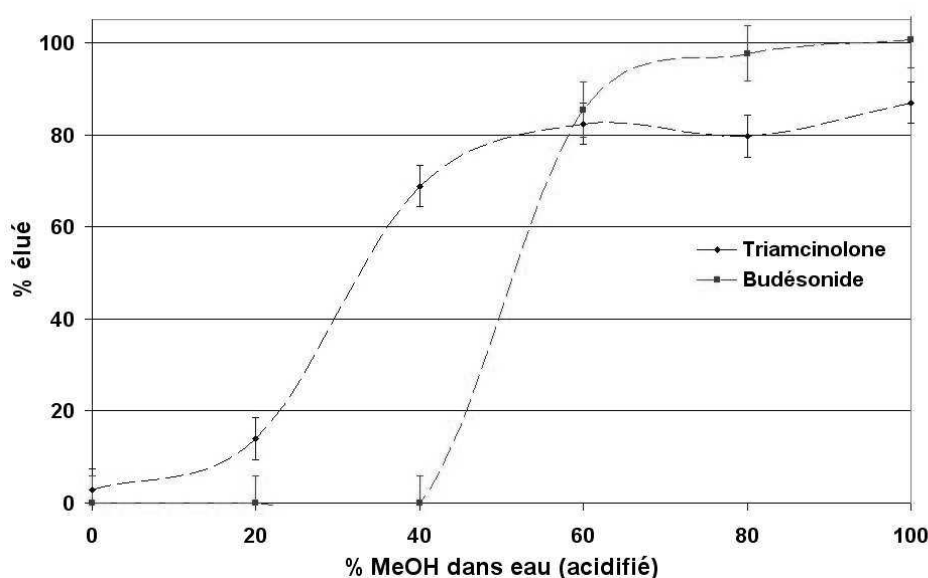


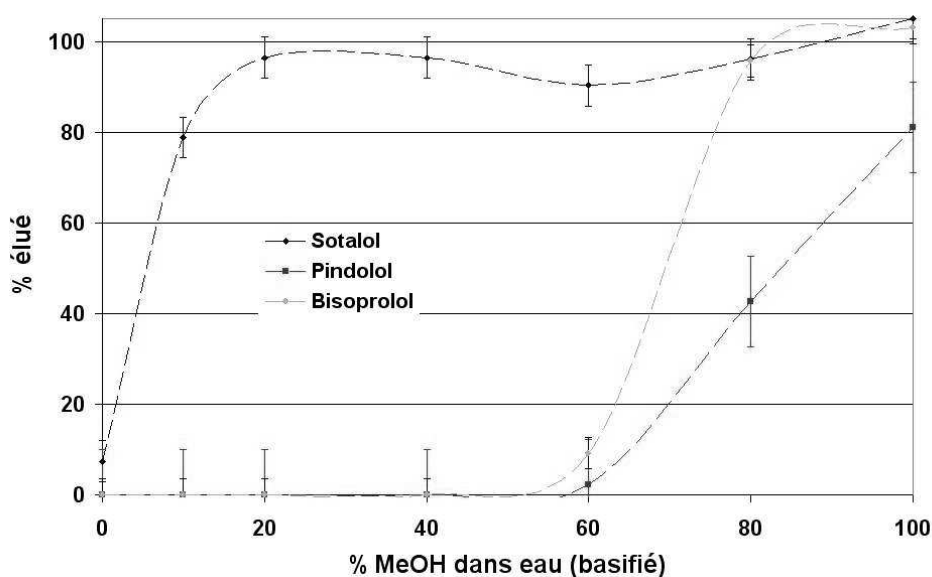
Figure 23: Influence du pourcentage de MeOH dans des mélanges hydro-organiques acidifiés par 0,1% d'acide formique sur l'élution des corticostéroïdes

Comme on pouvait s'y attendre, la triamcinolone ( $\log P = 0,8$ ) qui est le plus polaire des corticostéroïdes analysés est le moins retenu par interaction hydrophobe. On constate effectivement qu'à partir de 20% de MeOH la triamcinolone est éluée. Lors de l'étape de lavage cette teneur ne devra donc pas être dépassée pour ne pas éluer la triamcinolone. Par ailleurs, l'élution de la budésonide ( $\log P = 3,1$ ), qui est le corticostéroïde le moins polaire étudié, donc le plus retenu, requiert une teneur de MeOH supérieure à 60%.

Au cours de ces essais, aucun  $\beta$ -bloquant n'a été détecté dans les éluats. Conformément à ce qui avait été postulé, ces molécules restent fixées aux sites échangeurs de cations en milieu acide, ce qui permet

d'éluer uniquement les corticostéroïdes. Ces résultats sont intéressants car ils montrent qu'une purification par 100% de MeOH acidifié peut être réalisée pour purifier les fractions de  $\beta$ -bloquants.

L'influence du pourcentage de MeOH dans des mélanges hydro-organiques basifiés sur l'élution des  $\beta$ -bloquants a ensuite été évaluée. Ceci permet d'acquérir des informations sur la composition des solvants pouvant être utilisée pour les étapes de lavage et d'élution des  $\beta$ -bloquants en milieu basique. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour le sotalol et le pindolol, respectivement le moins et le plus retenu des  $\beta$ -bloquants étudiés, sont présentés Figure 24.



**Figure 24: Influence du pourcentage de MeOH dans des mélanges hydro-organiques basifiés par 0,5% d'ammoniaque sur l'élution des  $\beta$ -bloquants**

Les fractions de  $\beta$ -bloquants peuvent être purifiées par un lavage à 100% de MeOH acidifié ce qui permet d'éliminer les impuretés apolaires et/ou acides. Toutefois aucun lavage ne semble possible en milieu basique puisqu'à partir de 10% de MeOH, le sotalol est élué à plus de 80%. Avec un  $\log P$  de 0,3, le sotalol est effectivement peu retenu par interaction hydrophobe et présente une forte affinité pour les phases éluantes polaires. Par ailleurs, 100% de MeOH basifié s'avère nécessaire pour une élution correcte du pindolol. L'hydrophobicité du pindolol ( $\log P = 2,0$ ) ne suffit pas à expliquer la forte rétention de cette molécule sur le support Oasis MCX puisque le bisoprolol ( $\log P = 2,1$ ) de polarité comparable est plus facilement élué. Le caractère basique du pindolol pourrait alors encore jouer un rôle dans sa rétention. Le pindolol possède deux fonctions amine de  $pK_a$  proche de 9 dans l'eau. Dans le MeOH basifié par 0,5% d'ammoniaque ( $pH = 11$ ), le pindolol est présent sous forme basique de façon majoritaire, toutefois, la faible proportion de forme protonée est susceptible de subir des interactions ioniques. La rétention par échange ionique est d'autant plus probable pour cette

molécule qu'elle présente deux sites possibles d'accroche contrairement aux autres  $\beta$ -bloquants étudiés.

De façon générale, les  $\beta$ -bloquants sont présents sous leur forme neutre en milieu basique. Ils peuvent ainsi être décrochés des sites échangeurs de cations en milieu MeOH basifié, et sont essentiellement sujets à des interactions apolaires.

Cette première approche montre que les corticostéroïdes et les  $\beta$ -bloquants peuvent être extraits d'échantillons environnementaux en une procédure d'extraction unique. En effet, à partir d'une unique charge, la fraction de corticostéroïdes peut être purifiée puis éluée. Dans un second temps, la fraction de  $\beta$ -bloquants est purifiée puis éluée. Néanmoins, ces premiers résultats peuvent être améliorés. En effet, d'importants paramètres n'ont pas été pris en compte, tels que le volume chargé sur la cartouche, ou l'efficacité de la purification. Celle-ci pourrait être évaluée en mesurant l'effet matrice. Une optimisation de la méthode sur des échantillons environnementaux s'avère donc nécessaire.

## ***2.2 Développement de la méthode d'extraction***

### **2.2.1 Apport de la chimométrie**

L'efficacité de l'extraction sur phase solide (purification et facteur d'enrichissement) est liée à un grand nombre de paramètres tels que les débits, les compositions et volumes des solvants d'élution utilisés à chaque étape de la procédure. L'étude indépendante de chaque paramètre nécessiterait un nombre très important d'essais, qui requiert beaucoup de temps. L'évaluation simultanée de plusieurs paramètres s'avère donc intéressante pour le développement et l'optimisation de la méthode. En ce sens, une approche chimométrique est intéressante car elle permet d'évaluer l'influence d'un grand nombre de paramètres en un nombre restreint d'expériences. Pour cela, il est nécessaire d'avoir quelques informations sur la rétention des analytes sur le support SPE. Ces informations ont été obtenues au cours des tests de faisabilité.

### **2.2.2 Choix des paramètres à cribler**

Pour améliorer le protocole SPE, toutes les expériences sont réalisées en utilisant comme matrice des influents provenant de la STEP de Pierre Bénite, afin de se positionner dans les conditions les plus défavorables. En effet, les influents de STEP sont probablement les matrices environnementales aqueuses les plus complexes, et donc potentiellement les plus problématiques.



Les 9 paramètres suivants ont été criblés dans un premier temps :

- le débit appliqué pour percoler l'échantillon sur la cartouche,
- le volume d'échantillon chargé,
- le volume de mélange éluant utilisé au cours du premier lavage,
- le pourcentage de MeOH utilisé au cours du premier lavage,
- le volume de mélange éluant utilisé pour l'élution des corticostéroïdes,
- le pourcentage de MeOH utilisé pour l'élution des corticostéroïdes,
- le volume de MeOH acidifié utilisé au cours du second lavage,
- le volume de MeOH basifié utilisé pour l'élution des  $\beta$ -bloquants,
- le pourcentage d'ammoniaque utilisé pour l'élution des  $\beta$ -bloquants.

Cette étude a permis de fixer 5 paramètres.

Le débit de charge a été étudié entre 5 et 15 mL/min. Il s'est avéré que le débit n'influence ni la rétention des analytes, ni celle des interférents. Il a donc été fixé à 15 mL/min pour réduire le temps de charge, donc la durée de préparation d'échantillon.

Le volume d'échantillon percolé, étudié entre 100 et 1 000 mL, n'affecte pas le rendement d'extraction. Afin de pouvoir d'une part obtenir un facteur d'enrichissement de 1 000 et d'autre part réaliser 4 injections de 100  $\mu$ L par échantillon en LC/MS/MS, ce volume a été fixé à 400 mL. En effet, la reprise de l'extrait sec par 400  $\mu$ L de solvant permet de répondre aux critères cités ci-dessus.

L'augmentation du volume de MeOH acidifié percolé pour purifier la fraction  $\beta$ -bloquant (1 à 5 mL) n'améliore pas la purification. Ce volume est donc maintenu à 1 mL. Ce lavage permet l'élution des interférents apolaires encore présents sur la cartouche.

Les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus pour les  $\beta$ -bloquants en utilisant 1,5 mL de MeOH basifié par 1,5% d'ammoniaque, quand des volumes de 0,5 à 1,5 mL de MeOH basifié par 0,5 ou 1,5% d'ammoniaque (pH 11,0 et 11,2 respectivement) sont testés. Ces conditions conduisent à des purifications satisfaisantes.

### 2.2.3 Etude de criblage

Les 4 paramètres restant ont été étudiés de façon plus précise par une étude de criblage (matrice factorielle fractionnaire). Le plan d'expérimentation utilisé est présenté Tableau 17.

**Tableau 17: Plan d'expérimentation utilisé pour le développement de la méthode SPE**

| étape | 1 <sup>er</sup> lavage |        | 1 <sup>ère</sup> élution |        |
|-------|------------------------|--------|--------------------------|--------|
| exp.  | V (mL)                 | % MeOH | V (mL)                   | % MeOH |
| 1     | 0,5                    | 10     | 0,5                      | 65     |
| 2     | 1,5                    | 10     | 1,5                      | 65     |
| 3     | 0,5                    | 15     | 1,5                      | 65     |
| 4     | 1,5                    | 15     | 0,5                      | 65     |
| 5     | 0,5                    | 10     | 1,5                      | 70     |
| 6     | 1,5                    | 10     | 0,5                      | 70     |
| 7     | 0,5                    | 15     | 0,5                      | 70     |
| 8     | 1,5                    | 15     | 1,5                      | 70     |

L'étude préliminaire a montré qu'un lavage par 1 mL de mélange éluant acidifié contenant 20% de MeOH conduit à l'élution de certains corticostéroïdes. Des teneurs moindres doivent donc être utilisées. De plus percoler un plus faible volume de solvant peut potentiellement permettre de maximiser la teneur de MeOH dans le mélange éluant, de même qu'à teneur de MeOH fixe, l'augmentation de ce volume pourrait permettre de meilleures purifications. Suite à ces constatations, 2 volumes et 2 teneurs de MeOH différents ont été testés. Le volume du mélange éluant utilisé pour le lavage de la fraction corticostéroïde (nommé  $X_1$ ) varie entre 0,5 (niveau -1) et 1,5 mL (niveau +1) ; sa composition (nommée  $X_2$ ) est de 10 % (niveau -1) ou 15% (niveau +1). Par ailleurs, les tests préliminaires ont montré qu'1 mL de mélange éluant acidifié contenant 60% de MeOH ne suffisait pas à éluer totalement l'ensemble des corticostéroïdes. Par un raisonnement analogue, les volumes et compositions à tester pour l'étape d'élution ont été déterminés. Le volume de mélange éluant utilisé pour l'élution des corticostéroïdes (nommé  $X_3$ ) varie entre 0,5 (niveau -1) et 1,5 mL (niveau +1), sa composition (nommée  $X_4$ ) est de 65% (niveau -1) ou 70% (niveau +1).

Pour chaque analyte, deux réponses sont considérées. D'une part, le rendement d'extraction (Rdt) est calculé de la façon suivante :

$$Rdt (\%) = \frac{A_1}{A_2} \times 100$$

où  $A_1$  représente l'aire chromatographique mesurée quand une matrice dopée est extraite.  $A_2$  est l'aire chromatographique mesurée lorsqu'une matrice non dopée est extraite et son extrait repris par une solution standard correspondant à la quantité de produit chargé sur la cartouche.

Cette façon de procéder permet de s'affranchir de l'effet matrice puisque les mêmes interférents sont présents dans les solutions comparées.

D'autre part l'effet matrice a été évalué de la façon suivante :

$$Effet\ Matrice (\%) = \left( \frac{A_2}{A_3} - 1 \right) \times 100$$

où  $A_3$  représente l'aire chromatographique de l'analyte dans un solvant pur.

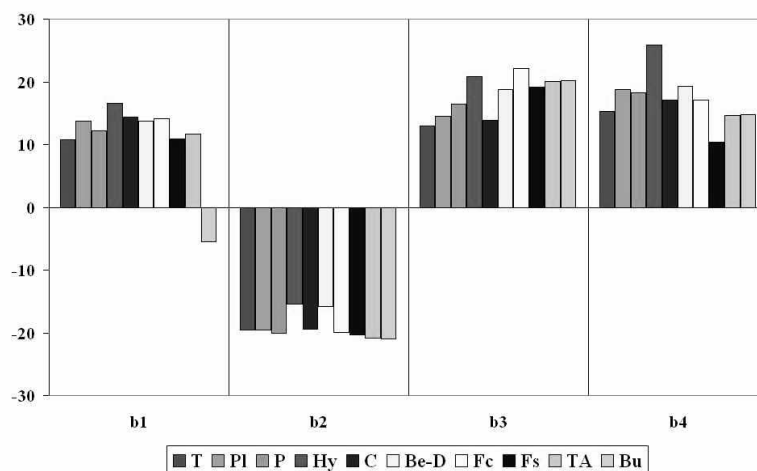
En effet, la présence d'interférents de la matrice dans l'échantillon extrait, comparée à une solution standard en solvants purs, peut générer des erreurs sur la précision, et en conséquence, fausser les résultats du dosage. Ces interférents peuvent effectivement se manifester par une suppression ou une augmentation artificielle du signal en modifiant l'ionisation de l'analyte dans la source du spectromètre de masse (voir Chapitre 1, partie 3.1.4.1, page 34). Il est donc important de réduire au maximum cet effet par des purifications efficaces.

Pour l'interprétation des résultats, le rendement d'extraction est considéré de façon prioritaire, et l'effet matrice n'est considéré qu'en deuxième lieu car il peut être compensé par différentes méthodes de dosage (étalonnage interne, ajouts dosés, *etc.*). Les rendements d'extraction obtenus pour chaque expérience du plan d'expérimentation sont présentés Tableau 18.

**Tableau 18: Rendements d'extraction des corticostéroïdes mesurés pour le plan d'expérimentation**

| exp. | Pl | T  | Fc | Be-D | C  | P  | Hy  | Bu  | Fs | TA |
|------|----|----|----|------|----|----|-----|-----|----|----|
| 1    | 6  | 5  | 5  | 3    | 13 | 7  | 8   | 2   | 8  | 6  |
| 2    | 82 | 70 | 70 | 66   | 84 | 74 | 82  | 38  | 52 | 59 |
| 3    | 16 | 13 | 8  | 15   | 23 | 16 | 19  | 10  | 10 | 14 |
| 4    | 1  | 1  | 1  | 1    | 7  | 1  | 1   | 6   | 3  | 4  |
| 5    | 79 | 75 | 91 | 81   | 79 | 86 | 92  | 129 | 81 | 92 |
| 6    | 74 | 69 | 86 | 73   | 84 | 77 | 73  | 52  | 90 | 90 |
| 7    | 7  | 5  | 12 | 6    | 10 | 6  | 8   | 18  | 7  | 5  |
| 8    | 61 | 44 | 72 | 75   | 65 | 61 | 104 | 19  | 48 | 57 |

La réplication de ces essais a montré que ces expériences étaient répétables, exceptées celles qui conduisent à de très faibles rendements d'extraction (inférieurs à 5%), mais cela ne fausse pas l'interprétation. Les effets du modèle de criblage ( $Rdt = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_4$ ) sont présentés Figure 25.



**Figure 25: Influence des paramètres testés sur le rendement d'extraction ; b1 : volume utilisé pour le premier lavage, b2 : % MeOH utilisé pour le premier lavage, b3 : volume utilisé pour la première élution, b4 : % MeOH utilisé pour la première élution**

Plus la valeur absolue de l'effet ( $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_4$ ) est importante, plus l'influence du paramètre correspondant sur la réponse est importante. La Figure 25 montre que tous les paramètres testés ont une forte influence sur le rendement d'extraction, car les valeurs des effets sont importantes. De plus, le signe de l'effet indique quel est le niveau du paramètre qui augmente la réponse.  $b_1$ ,  $b_3$  et  $b_4$  sont positifs pour la majorité des analytes, par conséquent le niveau « +1 » des paramètres  $X_1$ ,  $X_3$  et  $X_4$  augmente la réponse.  $b_2$  est négatif, par conséquent le paramètre  $X_2$  doit être fixé au niveau « -1 » afin d'augmenter la réponse. En d'autres termes, laver avec 1,5 mL ( $X_1 = +1$ ) d'un mélange hydro-organique acidifié contenant 10% de MeOH ( $X_2 = -1$ ) et éluer avec 1,5 mL ( $X_3 = +1$ ) d'un mélange hydro-organique acidifié contenant 70% de MeOH ( $X_4 = +1$ ) conduit à une augmentation des rendements d'extraction.

Afin de réduire le volume de solvant utilisé pour l'élution des corticostéroïdes, une dernière amélioration est réalisée en utilisant le module d'optimisation du logiciel Modde v.7. Cette étude montre qu'il est possible d'obtenir une élution satisfaisante de tous les corticostéroïdes en fixant  $X_3$  au niveau 0, c'est-à-dire en n'utilisant qu'1 mL de mélange MeOH/eau/FOA (70/30/0,1, v/v/v).

## 2.2.4 Bilan

Le protocole finalement retenu est présenté Tableau 19.

**Tableau 19: Protocole d'extraction optimisé**

| étape           | Solution percolée                  | Volume (mL) | Débit (mL/min) | Remarque                                             |
|-----------------|------------------------------------|-------------|----------------|------------------------------------------------------|
| Conditionnement | MeOH                               | 3           | 5              | Préparation de la cartouche à recevoir l'échantillon |
|                 | Eau 0,1% FOA                       | 3           | 5              |                                                      |
| Charge          | Echantillon                        | 400         | 15             | Fixation des analytes sur la cartouche               |
|                 | 0,1% FOA                           |             |                |                                                      |
| Lavage 1        | MeOH/eau/FOA<br>(10/90/0,1, v/v/v) | 1,5         | 0,3            | Purification la fraction corticostéroïdes            |
| Elution 1       | MeOH/eau/FOA<br>(70/30/0,1, v/v/v) | 1           | 0,3            | Elution des corticostéroïdes                         |
| Lavage 2        | MeOH, 0,1%FOA                      | 1           | 0,3            | Purification de la fraction $\beta$ -bloquants       |
| Elution 2       | MeOH 1,5%NH <sub>3</sub>           | 1,5         | 0,3            | Elution des $\beta$ -bloquants                       |

Les rendements d'extraction et les coefficients de variation obtenus par ce protocole sur des échantillons d'influents dopés à 500 ng/L sont présentés Tableau 20.

De plus, d'importants effets matrice ont été observés pour chaque expérience, excepté lorsque des rendements inférieurs à 10% étaient obtenus. Pour éviter cet effet matrice, une meilleure purification devrait être effectuée. Cependant, cette étude a montré qu'il n'était pas possible d'améliorer la purification sans perte importante de rendement.

La stratégie de dosage des échantillons réels devra donc soit compenser (standardisation interne, ajouts dosés) soit prendre en compte (étalonnage externe) cet effet matrice pour conduire à des résultats fiables. Ce point sera discuté de façon plus précise en partie 5.1 page 102.

**Tableau 20: Rendements d'extraction et coefficients de variation des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants évalués pour des influents dopés à 500 ng/L (n=5)**

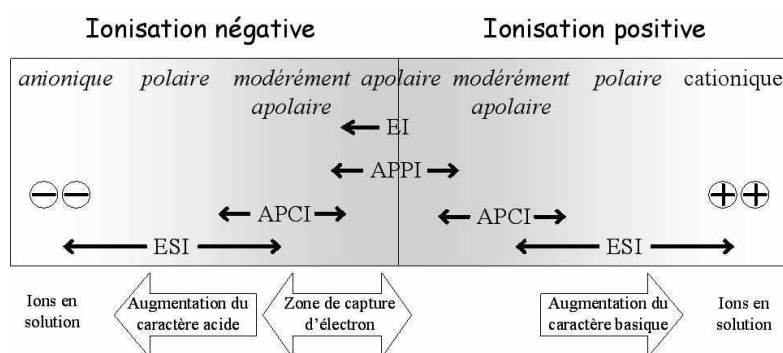
| <b>Corticostéroïdes</b> | <b>Rendement (%)</b> | <b>CV (%)</b> | <b><math>\beta</math>-bloquants</b> | <b>Rendement (%)</b> | <b>CV (%)</b> |
|-------------------------|----------------------|---------------|-------------------------------------|----------------------|---------------|
| Bétaméthasone           | 67                   | 10            | Acébutolol                          | 68                   | 4             |
| Budésonide              | 86                   | 12            | Alprénolol                          | 61                   | 6             |
| Cortisone               | 71                   | 10            | Aténolol                            | 68                   | 24            |
| Cortisol                | 70                   | 22            | Bisoprolol                          | 60                   | 7             |
| Dexaméthasone           | 75                   | 11            | Métoprolol                          | 62                   | 7             |
| Flunisolide             | 54                   | 19            | Nadolol                             | 60                   | 9             |
| Fluocinolone acétonide  | 84                   | 24            | Pindolol                            | 10                   | 24            |
| Prednisolone            | 62                   | 16            | Propranolol                         | 66                   | 7             |
| Prednisone              | 55                   | 13            | Sotalol                             | 68                   | 9             |
| Triamcinolone           | 63                   | 11            | Timolol                             | 62                   | 9             |
| Triamcinolone acétonide | 70                   | 10            |                                     |                      |               |

### 3 Développement de la méthode LC/MS/MS

#### 3.1 Choix de la source

Les techniques d'ionisation les plus utilisées pour les couplages LC/MS sont l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Ces deux techniques d'ionisation sont douces et produisent des molécules protonées ou déprotonées, selon la polarité.

De façon générale, l'APCI favorise la réponse des molécules apolaires telles que les corticostéroïdes, alors que l'électrospray convient mieux aux molécules polaires comme les  $\beta$ -bloquants (Figure 26). Ces observations sont directement liées au fonctionnement des deux types de source.



**Figure 26: Choix de la source d'ionisation**

Ces affirmations sont confortées par les stratégies adoptées dans différentes études proposées dans la littérature. Les  $\beta$ -bloquants sont en effet généralement introduits dans le spectromètre de masse par le biais d'une source ESI [148, 149]. Pour les corticostéroïdes les deux types de sources ont été utilisés [109, 113]. Des tests ont alors été réalisés pour déterminer quelle source permet la meilleure ionisation de cette famille. Aucune différence notable n'a été observée en terme de sensibilité, par contre un plus faible bruit de fond est observé avec la source ESI. Afin d'atteindre de meilleurs rapports signal/bruit et par conséquent de meilleures sensibilités, la source ESI a finalement été choisie.

Les molécules testées répondent très mal, voire pas du tout en mode négatif. En effet, les familles étudiées n'ont pas de caractère acide, alors que la présence de fonctions carbonyle ou amine favorise la protonation de la molécule et donc sa réponse en mode positif. Les transitions les plus intenses en mode positif ont donc été déterminées en infusant des solutions individuelles de chaque analyte dans le spectromètre de masse. Ces transitions connues (Tableau 15 page 65 et Tableau 16 page 66), l'influence de la composition de la phase mobile utilisée en chromatographie sur la réponse des molécules a été évaluée.

### 3.2 *Choix des phases mobiles*

Selon son solvant de dissolution une molécule introduite dans la source du spectromètre de masse est plus ou moins facilement ionisée ou désolvatée. Par exemple, la présence d'acides est susceptible de faciliter la protonation des molécules en mode positif, alors que la présence de bases pourrait générer une compétition entre la protonation de l'analyte ou de la base ajoutée. Etant données les très faibles limites de quantification à atteindre pour réaliser un suivi environnemental performant, tout paramètre permettant d'améliorer la sensibilité est important à prendre en compte. Le choix d'une phase mobile améliorant la réponse en spectrométrie de masse est l'un de ces paramètres.

Huit mélanges hydro-organiques ont donc été testés en mode FIA (Flow Injection Analysis), en utilisant les milieux suivants :

- 2 solvants organiques : méthanol et acétonitrile
- 4 phases aqueuses : eau acidifiée par 0,1% d'acide formique (pH 2,7), eau tamponnée à pH 3,8 (tampon formiate d'ammonium 10 mM acidifié à pH 3,8 par addition d'acide formique), eau basifiée à pH 11 par addition d'ammoniaque, eau non modifiée.

Le mode FIA consiste à injecter une solution sur un appareillage LC/MS ne comportant pas de colonne chromatographique. L'influence de la phase mobile peut alors être estimée en un temps très court. A titre d'exemple, les réponses massiques en fonction de la phase mobile obtenues pour deux corticostéroïdes (bétaméthasone et cortisone) et deux  $\beta$ -bloquants (propranolol et sotalol) sont présentées Figure 27. Les résultats présentés pour ces molécules sont représentatifs de l'ensemble de leurs familles respectives.

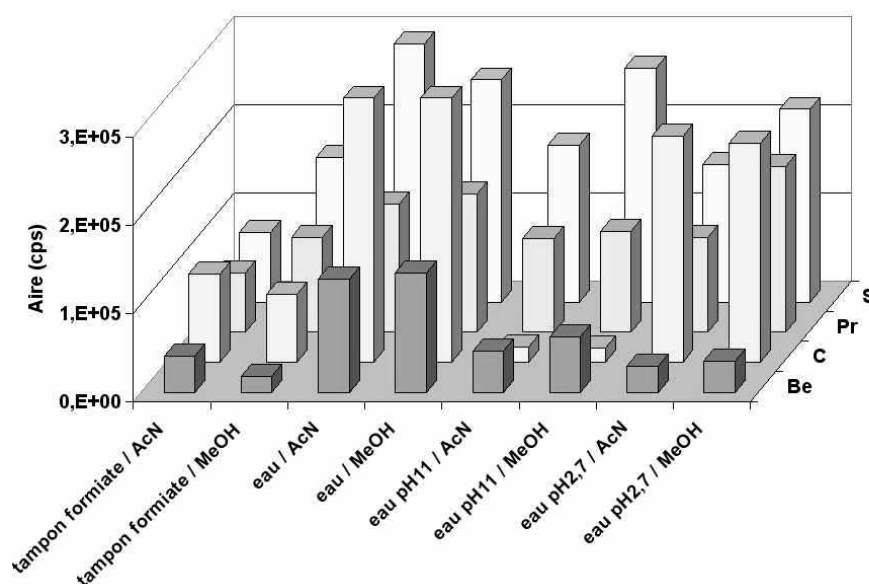


Figure 27: Influence de la phase mobile sur la réponse des corticostéroïdes (Be: bétaméthasone ; C: cortisone) et des  $\beta$ -bloquants (Pr: propranolol ; S: sotalol)

Pour les corticostéroïdes, l'utilisation d'eau ultra pure non modifiée comme solvant chromatographique, favorise la réponse des molécules. On constate en effet qu'avec une phase mobile contenant de l'eau non modifiée, le signal de la cortisone est en moyenne 5 fois plus élevé qu'avec un tampon formiate et 25 fois plus élevé qu'avec de l'eau basifiée à pH 11. Le signal de la bétaméthasone est en moyenne 4 fois plus élevé avec de l'eau non modifiée qu'avec les autres phases aqueuses testées. Le méthanol facilite l'ionisation mais des résultats satisfaisants sont également obtenus avec l'acétonitrile. Effectivement les réponses de la bétaméthasone et de la cortisone sont respectivement 1,1 et 1,5 fois plus élevées avec une phase mobile eau/MeOH qu'avec une phase mobile eau/AcN. Ce gain de sensibilité étant non significatif pour la bétaméthasone et relativement faible pour la cortisone, les phases mobiles eau/MeOH et eau/AcN peuvent donc être utilisées pour le développement des méthodes chromatographiques.

Pour les  $\beta$ -bloquants on constate également que l'absence de sels dans la phase aqueuse augmente leur réponse en spectrométrie de masse, puisqu'en général, un signal 2 à 3 fois plus faible est observé avec les autres phases aqueuses. Cependant étant donné le caractère basique de ces molécules, l'utilisation d'eau ultra pure sans contrôle du pH n'est pas un choix judicieux pour obtenir une méthode d'analyse robuste (risque de manque de répétabilité de la rétention en chromatographie). L'utilisation d'un tampon formiate (pH 3,8) diminuant la réponse en ESI, ce milieu est à éviter dans le développement de la méthode chromatographique. Cette perte de sensibilité peut s'expliquer par un phénomène de compétition lors de l'ionisation de l'analyte et des ions ammonium présents dans la phase mobile. Par ailleurs, l'influence du solvant organique sur l'ionisation des  $\beta$ -bloquants n'étant pas significative, les conditions d'élution retenues à partir de ces expériences sont donc : eau pH 2,7/MeOH ou eau pH 2,7/AcN.

Les phases mobiles à utiliser préférentiellement ayant été déterminées, la séparation chromatographique des  $\beta$ -bloquants et des corticostéroïdes a ensuite été développée.

### **3.3 Séparation chromatographique**

La détection par spectrométrie de masse en mode MRM permet l'élution rapide des analytes et ne nécessite pas une complète séparation chromatographique des molécules d'intérêt. Cependant certains aspects doivent être considérés lors du développement de méthodes multi-résidus, et dans certains cas, une séparation chromatographique reste nécessaire. C'est notamment le cas pour :

- les composés mesurés à la même transition MRM (par exemple, la bétaméthasone et la dexaméthasone sont des diastéréoisomères et sont détectés à la même transition ion précurseur / ion produit),



- les composés qui produisent des ions fragments similaires (la prednisolone et la cortisone présentent toutes deux un ion fragment de masse 343 uma),
- les composés détectés par le même ion produit mais provenant d'ions précurseurs différents afin d'éviter un phénomène de « cross-talk » conduisant à la détection de faux positifs. C'est notamment le cas de la majorité des  $\beta$ -bloquants qui présentent un ion produit de masse 116 uma (acébutolol, alprénolol, bisoprolol, métoprolol, pindolol et propranolol) et de 2 corticostéroïdes (la budésonide et la fluocinolone acétonide qui sont détectées toutes deux par un ion produit de masse 413 uma).

Les couples de molécules cités ci-dessus doivent donc atteindre séparément le spectromètre de masse, c'est-à-dire être préalablement séparés par chromatographie.

### 3.3.1 Colonnes testées

Les phases mobiles à utiliser préférentiellement ont été déterminées en partie 3.2 page 77, il reste donc à choisir les phases stationnaires permettant d'atteindre ces critères de séparation. Pour cela 6 colonnes chromatographiques ont été utilisées et sont présentées Tableau 21.

**Tableau 21: Caractéristiques des colonnes utilisées**

|                      | <b>Sym</b>      | <b>HypC</b> | <b>Disc</b>        | <b>XB</b>       | <b>Aq</b>       | <b>Nucl</b>     | <b>Puro</b>               |
|----------------------|-----------------|-------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| Colonne              | Symmetry C18    | Hypercarb   | Discovery HSF5     | X-Bridge        | Aquasil C18     | Nucleosil C18   | Hibar Purospher star RP18 |
| Fabricant            | Waters          | Thermo      | Supelco            | Waters          | Thermo          | Macherey-Nagel  | Merck                     |
| Longueur (mm)        | 150             | 100         | 100                | 150             | 100             | 250             | 250                       |
| D.I. (mm)            | 2,1             | 2,1         | 4                  | 2,1             | 2,1             | 4,6             | 4,6                       |
| d <sub>p</sub> (μm)  | 5               | 5           | 3                  | 3,5             | 5               | 5               | 5                         |
| Greffage             | C <sub>18</sub> | /           | pentafluoro phényl | C <sub>18</sub> | C <sub>18</sub> | C <sub>18</sub> | C <sub>18</sub>           |
| Taille des pores (Å) | 100             | 250         | 120                | 135             | 100             | 300             | 80                        |
| Surface spécifique   | 341             | ns          | 300                | 185             | 310             | 350             | 300                       |
| Taux de carbone      | 19,5            | 100         | 12                 | 18              | 12              | 20              | 18                        |
| Greffage terminal    | apolaire        | /           | oui                | oui             | polaire         | apolaire        | oui                       |

Les colonnes de faibles diamètre interne (D. I. = 2,1 mm), plus efficaces, sont généralement utilisées pour l'analyse de traces dans les matrices complexes, car elles permettent d'abaisser les limites de détection du fait de meilleurs rapports signal/bruit. 4 phases de silices greffées C<sub>18</sub> ont été testées (Sym, XB, Aq, Nucl, Puro).

Ces phases diffèrent par :

- leur porosité,
- leur hydrophobicité (taux de carbone),
- les interactions secondaires qu’elles peuvent générer (greffage terminal).

Une colonne de carbone graphitisé poreux (HypC) plus hydrophobe que les silices greffées C<sub>18</sub>, donc plus rétentive, ainsi qu’une colonne de silice greffée pentafluorophényle (Disc) susceptible de générer des interactions analyte/phase stationnaire différentes des colonnes de silice greffée octadécyle classiques sont également testées. Ainsi, ces 6 colonnes sont susceptibles de différer à la fois par leur sélectivité et leur caractère rétentif.

Le choix de la colonne chromatographique la plus appropriée à l’analyse des  $\beta$ -bloquants ou des corticostéroïdes en LC/MS/MS s’effectue à partir de différents critères. Tout d’abord, les conditions chromatographiques doivent permettre la rétention de toutes les molécules cibles. En effet, les analytes élués dans le volume mort sont généralement sujets à de plus importants effets matrice et à un bruit de fond accru du fait de la coélution de nombreux interférents. La sélectivité de la colonne est également un critère primordial à prendre en compte afin d’assurer la séparation des paires critiques pour la spectrométrie de masse, précédemment citées. Ces critères doivent donc impérativement être pris en compte pour le développement d’une méthode chromatographique fiable. En second lieu, d’autres paramètres tels que l’efficacité de la colonne ou la symétrie des pics chromatographiques peuvent être considérés. En effet, l’augmentation de l’efficacité permet d’améliorer la sensibilité de la méthode via l’augmentation des rapports signal sur bruit, et, par ailleurs, de bonnes symétries permettent une intégration plus fiable des pics chromatographiques. Ainsi, si les critères de rétention et de sélectivité sont satisfaisants pour plusieurs colonnes, le choix pourra être effectué sur des considérations de symétrie et d’efficacité.

### 3.3.2 Séparation des $\beta$ -bloquants

Les phases mobiles eau pH 2,7/MeOH favorisent l’ionisation des  $\beta$ -bloquants dans la source du spectromètre de masse. Toutefois, le MeOH génère de fortes traînées de pic sur les colonnes testées, et les phases mobiles eau pH 2,7/AcN ont finalement été retenues. Les colonnes de faible diamètre interne (2,1 mm), plus efficaces, ont été étudiées prioritairement.

#### 3.3.2.1 Séparation sur les colonnes de faibles dimensions

Les  $\beta$ -bloquants étant ionisés en milieu acide (phases mobiles acidifiées) ils sont très hydrophiles. Il est donc nécessaire d’utiliser des colonnes très rétentives pour permettre les interactions analyte-phase stationnaire. La colonne Symmetry C18 présentant un important taux de carbone (19,5%) est théoriquement la plus rétentive des colonnes de faible diamètre interne testées. Toutefois, même en

pallier isocratique contenant 90% d'eau acidifiée, certains composés ne sont pas retenus et élués dans le volume mort. La technologie de greffage de cette colonne n'a pas permis de travailler avec de plus importants pourcentages d'eau. En revanche, la colonne Aquasil peut d'après le fabricant supporter des phases mobiles 100% aqueuses. Cette colonne présente un faible taux de carbone (12%) et possède par ailleurs un greffage terminal polaire pouvant permettre la rétention des analytes par des interactions secondaires. Effectivement, avec 90% d'eau aucun composé n'est détecté dans le volume mort. La colonne Aquasil permet ainsi la rétention des  $\beta$ -bloquants. Toutefois, elle n'est pas suffisamment sélective pour permettre une correcte résolution des analytes. Une colonne de carbone graphitisé (Hypercarb), préconisée pour la rétention des composés très polaires, a par la suite été testée. Cette colonne est la plus rétentive des colonnes testées. Une forte rétention des  $\beta$ -bloquants est effectivement observée, toutefois de fortes asymétries de pic (symétrie de l'ordre de 0,3) ayant été observées lors des premiers essais, l'étude sur cette colonne n'a pas été poursuivie. Ces 3 colonnes n'ayant pas permis la séparation correcte des  $\beta$ -bloquants, une dernière colonne de faible dimension a été testée, la colonne X-Bridge.

### 3.3.2.2 Cas de la colonne X-Bridge

Finalement la séparation des  $\beta$ -bloquants sur la colonne X-Bridge avec des phases mobiles eau pH 2,7/AcN a été étudiée. Cette colonne est très rétentive avec un taux de carbone de 18% et supporte également des phases mobiles 100% aqueuses du fait d'un greffage trifonctionnel des chaînes  $C_{18}$ . Cette colonne permet la rétention de tous les analytes puisque aucun composé n'est détecté dans le volume mort. Toutefois des symétries de pics de l'ordre de 0,5 sont mesurées, ne permettant pas l'obtention d'une méthode séparative performante. Par ailleurs, d'après le fabricant, cette colonne est stable sur la gamme de pH 1-12. Il a donc été envisagé de séparer les  $\beta$ -bloquants en milieu basique sur la colonne X-Bridge, c'est-à-dire sous leur forme neutre. D'après l'étude présentée en partie 3.2 page 77, l'utilisation d'eau basifiée à pH 11 conduit à une légère perte de sensibilité de l'analyse des  $\beta$ -bloquants.

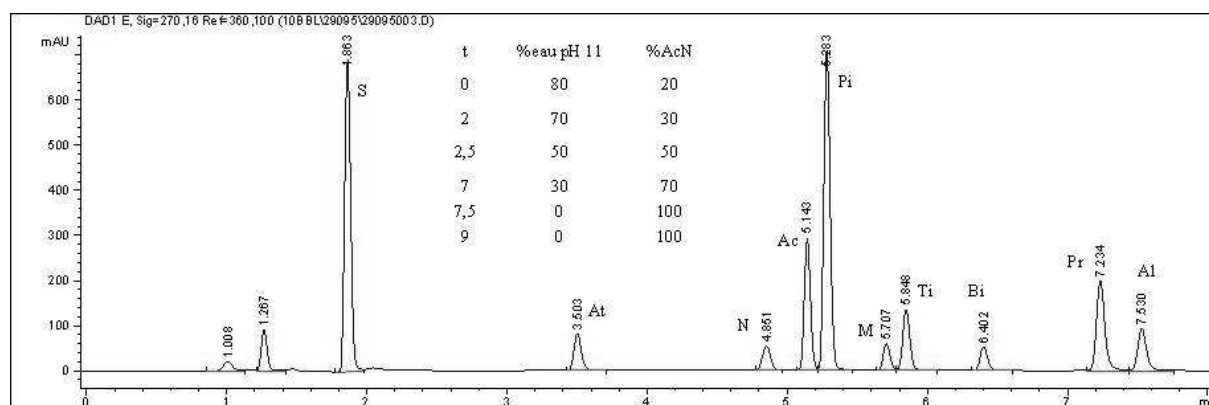


Figure 28: Séparation LC/DAD des  $\beta$ -bloquants sur colonne X-Bridge en gradient eau pH 11/AcN, détection à  $\lambda = 270$  nm

Toutefois le gain apporté par l'utilisation d'une colonne de faible diamètre interne pourrait compenser cette perte. Le chromatogramme issu de l'analyse des  $\beta$ -bloquants en gradient eau pH 11/AcN, à un débit de 0,3 mL/min est présenté Figure 28.

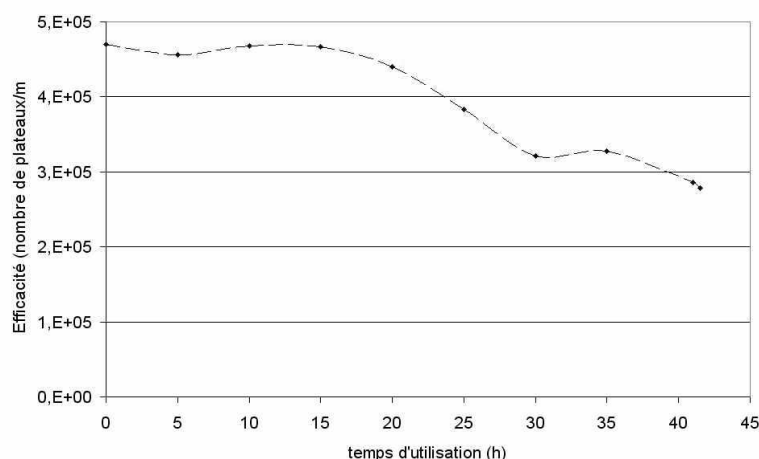
Les paramètres chromatographiques calculés à partir de ce chromatogramme sont présentés Tableau 22.

**Tableau 22: Facteurs de rétention (k), sélectivités ( $\alpha$ ), largeurs à mi-hauteur ( $2\sigma$ ), efficacités (N), symétries et résolutions (Rs) des pics chromatographiques résultant de l'analyse des  $\beta$ -bloquants sur colonne X-Bridge en gradient eau pH 11/AcN**

| ordre d'élution | k   | $\alpha$ | $2\sigma$ (min) | N      | symétrie | Rs   |
|-----------------|-----|----------|-----------------|--------|----------|------|
| S               | 0,1 | /        | 0,047           | 8 826  | 0,90     | /    |
| At              | 1,1 | 10,79    | 0,056           | 21 802 | 0,84     | 18,8 |
| N               | 1,9 | 1,75     | 0,064           | 31 661 | 0,93     | 13,2 |
| Ac              | 2,0 | 1,09     | 0,049           | 60 611 | 0,90     | 3,03 |
| Pi              | 2,1 | 1,04     | 0,050           | 61 843 | 0,88     | 1,66 |
| M               | 2,4 | 1,12     | 0,053           | 64 516 | 0,89     | 4,85 |
| Ti              | 2,5 | 1,04     | 0,054           | 64 807 | 0,87     | 1,55 |
| B               | 2,8 | 1,13     | 0,058           | 68 670 | 0,84     | 5,83 |
| Pr              | 3,3 | 1,18     | 0,061           | 78 733 | 0,79     | 8,26 |
| Al              | 3,4 | 1,05     | 0,063           | 78 310 | 0,79     | 2,8  |

La colonne X-Bridge permet la rétention de tous les  $\beta$ -bloquants. Le sotalol (S) est toutefois peu retenu, avec un facteur de rétention de 0,1. Il serait possible de le retenir davantage en augmentant la teneur en eau de la phase mobile initiale. En effet, comme cela a déjà été mentionné, une élution proche du volume mort est susceptible de générer des problèmes sur les échantillons environnementaux, puisque de nombreux interférents polaires pourraient alors être coélus avec cet analyte. Ceci est susceptible d'augmenter le bruit de fond ou de générer d'importants effets matrice.

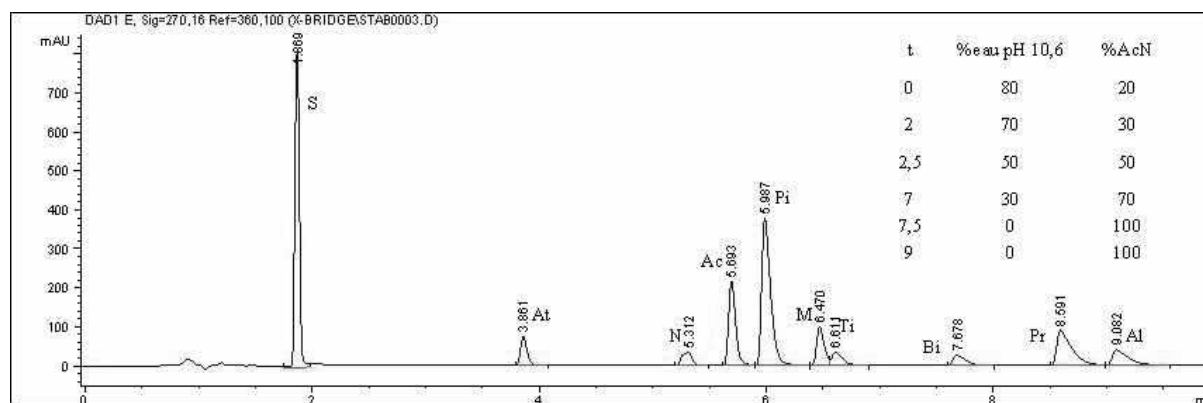
Cette séparation est sélective et efficace. Des pics chromatographiques symétriques (symétrie proche de 1,00) et très fins ( $2\sigma < 0,06$  min) sont observés. De plus, les grandes efficacités mesurées permettent l'amélioration des rapports signal/bruit de la méthode LC/MS/MS consécutive donc d'atteindre de meilleures limites de détection. Par ailleurs une bonne résolution ( $R_s > 1,50$ ) est observée pour tous les composés, ce qui dépasse les critères de résolution nécessaires pour la détection par spectrométrie de masse en mode MRM. Cette méthode de séparation permet donc une séparation satisfaisante des  $\beta$ -bloquants en vue d'une application à la quantification d'échantillons environnementaux. Toutefois, étant donné les conditions de pH extrêmes nécessaires pour réaliser cette séparation, la stabilité de la colonne dans les phases mobiles eau pH 11/ AcN a été évaluée (Figure 29).



**Figure 29: Evolution de l'efficacité de la colonne X-Bridge en fonction du temps d'utilisation en gradient eau pH 11/AcN**

Cette étude a montré qu'après 40 h d'analyse avec les conditions de gradient décrites Figure 28, l'efficacité de la colonne X-Bridge est diminuée d'un facteur 2. Cette durée correspond environ au temps d'analyse d'un batch contenant plusieurs réplicats de l'échantillon à doser, des échantillons de contrôle qualité, des blancs et une gamme étalon (voir Chapitre 4). La reproductibilité de la séparation chromatographique au cours d'une séquence d'analyse n'étant pas assurée du fait de la perte d'efficacité de la colonne, il ne sera pas possible d'utiliser cette colonne avec un gradient eau pH 11/AcN pour des analyses de routine dans l'environnement.

La diminution du pH de la phase mobile peut potentiellement permettre d'atteindre de meilleures stabilités de colonne. En appliquant ce même gradient sur la colonne X-Bridge, mais avec une phase aqueuse de pH 10,6 au lieu de 11, le chromatogramme présenté Figure 30 est obtenu.



**Figure 30: Séparation LC/DAD des  $\beta$ -bloquants sur colonne X-Bridge en gradient eau pH 10,6/AcN, détection à  $\lambda = 270$  nm**

Les paramètres chromatographiques calculés à partir de ce chromatogramme sont présentés Tableau 23.

**Tableau 23 : Facteurs de rétention (k), sélectivités ( $\alpha$ ), largeurs à mi-hauteur ( $2\sigma$ ), efficacités (N), symétries et résolutions (Rs) des pics chromatographiques résultant de l'analyse des  $\beta$ -bloquants sur colonne X-Bridge en gradient eau pH 10,6/AcN**

| ordre d'élution | k   | $\alpha$ | $2\sigma$ (min) | N     | symétrie | Rs    |
|-----------------|-----|----------|-----------------|-------|----------|-------|
| S               | 0,1 | /        | 0,043           | 10302 | 0,94     | /     |
| At              | 1,3 | 3,33     | 0,06            | 22943 | 0,73     | 1,72  |
| N               | 2,1 | 3,75     | 0,103           | 14642 | 1,51     | 10,44 |
| Ac              | 2,4 | 1,67     | 0,065           | 42493 | 0,66     | 2,66  |
| Pi              | 2,5 | 1,11     | 0,081           | 30185 | 0,52     | 2,37  |
| M               | 2,8 | 1,07     | 0,071           | 45646 | 0,65     | 3,73  |
| Ti              | 2,9 | 1,11     | 0,1             | 24214 | 0,50     | 0,97  |
| B               | 3,5 | 1,03     | 0,109           | 27320 | 0,40     | 5,99  |
| Pr              | 4,1 | 1,22     | 0,133           | 23002 | 0,32     | 4,42  |
| Al              | 4,4 | 1,07     | 0,147           | 21242 | 0,31     | 2,06  |

En utilisant de l'eau basifiée à pH 10,6 les sélectivités et résolutions restent satisfaisantes. Seul le couple Timolol-Métoprolol (Ti-M) est mal résolu ( $R_s = 0,97$ ). Toutefois ceci n'est pas gênant pour une détection par spectrométrie de masse en mode MRM. Dans ces conditions de phase mobile, les facteurs de rétention observés sont comparables à ceux obtenus en utilisant de l'eau basifiée à pH 11 et les efficacités sont plus faibles en raison de la plus grande largeur de pic. Toutefois, les fortes asymétries de pics observées (entre 0,3 et 1,5) ne permettent pas une application satisfaisante pour des dosages environnementaux du fait de la plus grande incertitude sur l'intégration des pics chromatographiques. La diminution de pH de la phase aqueuse en vue d'une meilleure stabilité de la colonne ne peut donc être effectuée qu'au détriment du chromatogramme, et la colonne X-Bridge n'a finalement pas été retenue.

### 3.3.2.3 Autres méthodes chromatographiques

La séparation des  $\beta$ -bloquants sur les colonnes Discovery HSF5, Nucleosil C18 et Hibar Purospher Star RP18e, de plus grandes dimensions, a par la suite été étudiée. Les chromatogrammes optimaux résultant de ces analyses sont présentés Figure 31.

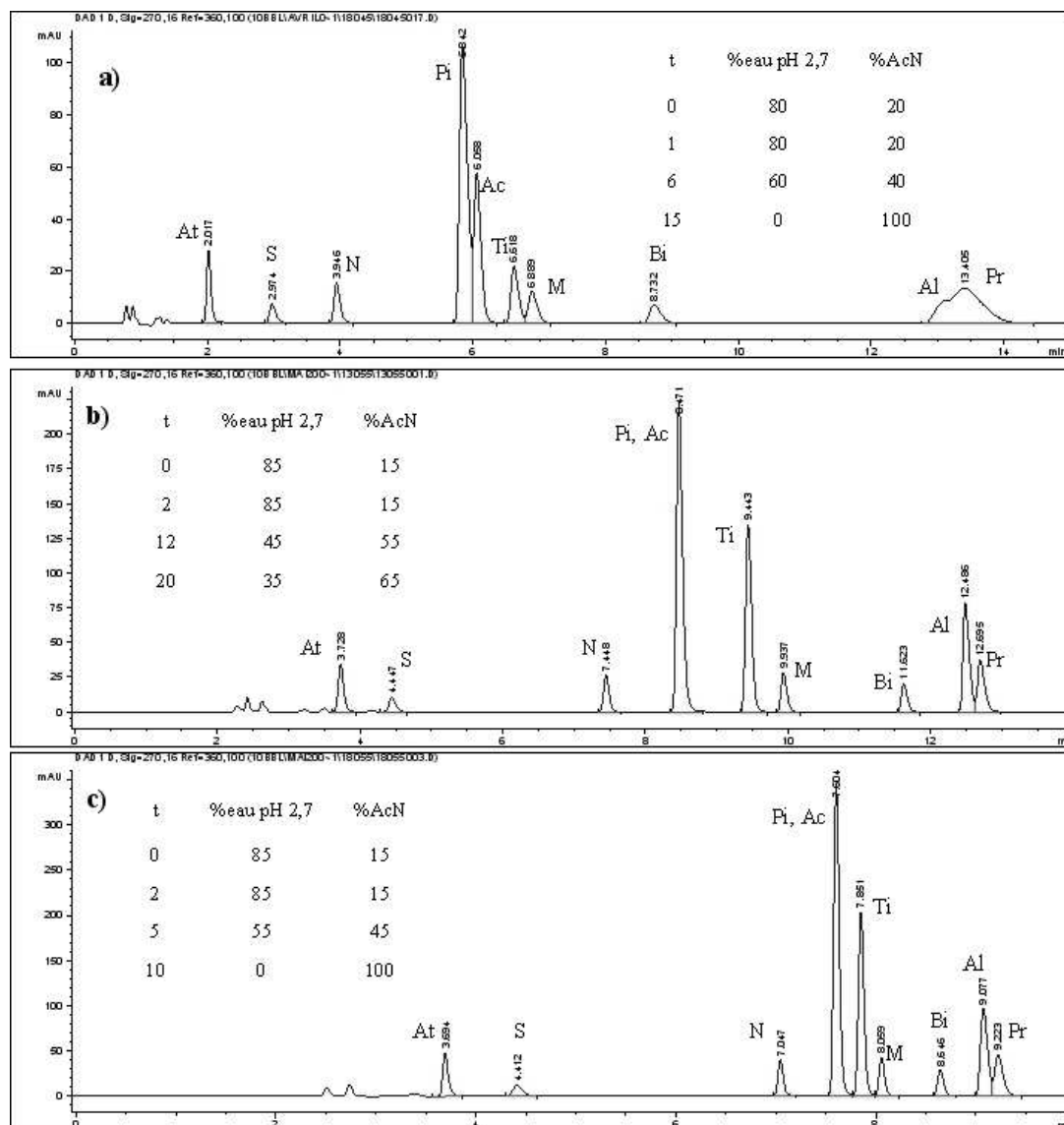


Figure 31: Séparation LC/DAD des  $\beta$ -bloquants sur colonne a) Discovery HSF5, b) Nucleosil C18, c) Hibar Purospher Star RP18e ; détection  $\lambda = 270$  nm

Les performances de ces séparations sont présentées Tableau 24.

**Tableau 24: Facteurs de rétention (k), sélectivités ( $\alpha$ ), largeurs à mi-hauteur ( $2\sigma$ ), efficacités (N) et symétries des pics chromatographiques sur les colonnes Discovery HSF5, Nucleosil C18, et Hibar Purospher Star RP18e**

| ordre d'élution | Discovery HSF5 |          |                 |       |          |
|-----------------|----------------|----------|-----------------|-------|----------|
|                 | k              | $\alpha$ | $2\sigma$ (min) | N     | symétrie |
| At              | 1,01           |          | 0,068           | 4827  | 0,7      |
| S               | 1,96           | 1,47     | 0,101           | 4792  | 0,63     |
| N               | 2,93           | 1,33     | 0,099           | 9023  | 0,68     |
| Pi              | 4,81           | 1,48     | 0,137           | 10053 | 0,59     |
| Ac              | 5,03           | 1,04     | 0,134           | 11250 | 0,72     |
| Ti              | 5,58           | 1,09     | 0,126           | 15393 | 0,67     |
| M               | 5,85           | 1,04     | 0,144           | 12678 | 0,65     |
| Bi              | 7,69           | 1,27     | 0,184           | 12417 | 0,68     |
| Al              | 12,11          | 1,51     | 0,224           | 19099 | 0        |
| Pr              | 12,33          | 1,02     | 0,513           | 3778  | 0,58     |

| ordre d'élution | Nucleosil C18 |          |                 |       |          |
|-----------------|---------------|----------|-----------------|-------|----------|
|                 | k             | $\alpha$ | $2\sigma$ (min) | N     | symétrie |
| At              | 0,12          |          | 0,081           | 11701 | 0,76     |
| S               | 0,34          | 1,19     | 0,098           | 11254 | 0,78     |
| N               | 1,24          | 1,67     | 0,081           | 46897 | 0,76     |
| Pi              | 1,55          | 1,14     | 0,092           | 46967 | 0,64     |
| Ac              | 1,55          | 1,14     | 0,092           | 46967 | 0,64     |
| Ti              | 1,84          | 1,11     | 0,091           | 59507 | 0,73     |
| M               | 1,99          | 1,05     | 0,084           | 76715 | 0,68     |
| Bi              | 2,50          | 1,17     | 0,088           | 97130 | 0,64     |
| Al              | 2,76          | 1,07     | 0,098           | 90861 | 0,57     |
| Pr              | 2,82          | 1,02     | 0,106           | 79897 | 0,55     |

| ordre d'élution | Hibar Purospher Star RP18e |          |                 |        |          |
|-----------------|----------------------------|----------|-----------------|--------|----------|
|                 | k                          | $\alpha$ | $2\sigma$ (min) | N      | symétrie |
| At              | 0,11                       |          | 0,057           | 23536  | 0,7      |
| S               | 0,33                       | 1,19     | 0,099           | 11027  | 0,75     |
| N               | 1,12                       | 1,6      | 0,056           | 86801  | 0,82     |
| Pi              | 1,29                       | 1,08     | 0,06            | 88975  | 0,78     |
| Ac              | 1,29                       | 1,08     | 0,061           | 88975  | 0,78     |
| Ti              | 1,36                       | 1,03     | 0,061           | 91145  | 0,81     |
| M               | 1,42                       | 1,03     | 0,059           | 104548 | 0,82     |
| Bi              | 1,60                       | 1,07     | 0,064           | 100585 | 0,76     |
| Al              | 1,73                       | 1,05     | 0,08            | 71317  | 0,67     |
| Pr              | 1,77                       | 1,02     | 0,09            | 57708  | 0,62     |

Les mêmes ordres d'élution sont observés sur chaque colonne. L'aténolol est peu retenu sur les colonnes de silice greffées C<sub>18</sub> du fait de son faible logP (0,1), et donc, de faibles facteurs de rétention, de l'ordre de 0,1 sont observés sur ces colonnes. La colonne pentafluorophényle permet une meilleure rétention de l'aténolol. Les  $\beta$ -bloquants présentent une fonction aromatique, donc une forte densité d'électrons  $\pi$ , or les groupements phényle greffés de la colonne Discovery HSF5 permettent des



interactions de type  $\pi$ - $\pi$ . Ces interactions supplémentaires permettent d'expliquer une rétention plus grande de l'aténolol sur la colonne pentafluorophényle que sur les colonnes de silice greffée C18.

Par ailleurs, les colonnes de silice greffées C<sub>18</sub> ne permettent pas la séparation du pindolol et de l'acébutolol du fait de leur polarité très proche (logP = 2,0 pour ces deux composés). Une faible séparation de ces composés est observée sur la colonne Discovery HSF5 du fait de la contribution des interactions  $\pi$ - $\pi$ . La résolution de ces composés reste insatisfaisante et est discutée ci-dessous.

De plus, les 3 colonnes testées séparent difficilement le propranolol de l'alprénolol avec des sélectivités de 1,02 sur ces 3 colonnes. Là encore, la faible sélectivité s'explique par les polarités proches de ces molécules qui ont des logP de 2,9 et 3,1 pour l'alprénolol et le propranolol respectivement.

Comme cela a été expliqué précédemment, une séparation chromatographique totale n'est pas nécessaire pour une détection par spectrométrie de masse en mode MRM. Cette séparation n'est nécessaire que pour l'acébutolol, l'alprénolol, le bisoprolol, le métoprolol, le pindolol et le propranolol.

Les résolutions obtenues pour ces paires critiques sont présentées Tableau 25. Ces résolutions sont calculées par la relation suivante :

$$Rs_{1-2} = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{2\sigma_1 + 2\sigma_2}$$

où  $Rs_{1-2}$  représente la résolution entre les composés 1 et 2,  $t_{r1}$  et  $t_{r2}$  représentent les temps de rétention des composés 1 et 2 respectivement,  $2\sigma_1$  et  $2\sigma_2$  représentent les largeurs à mi-hauteurs exprimées en min des pics chromatographiques des composés 1 et 2 respectivement.

**Tableau 25: Résolution des paires critiques pour la spectrométrie de masse**

| colonne                    | $Rs_{Pi-Ac}$ | $Rs_{M-Ac}$ | $Rs_{Bi-M}$ | $Rs_{Al-Bi}$ | $Rs_{Pr-Al}$ |
|----------------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Discovery HSF5             | 0,8          | 3,0         | 5,6         | 10,9         | 0,3          |
| Nucleosil C18              | 0,0          | 8,3         | 9,8         | 4,7          | 1,0          |
| Hibar Purospher Star RP18e | 0,0          | 3,8         | 4,8         | 3,0          | 0,9          |

La résolution est considérée comme satisfaisante pour une valeur supérieure à 1,50, qui indique un retour à la ligne de base. Le métoprolol (M) et le bisoprolol (Bi) sont correctement résolus sur les trois colonnes. En revanche, aucune colonne ne permet d'atteindre une résolution satisfaisante pour les couples pindolol-acébutolol (Pi-Ac) et propranolol-alprénolol (Pr-Al). Ces mauvaises résolutions s'expliquent par des logP proches pour chacun des couples considérés. La résolution des paires critiques ne permet donc pas de trancher sur le choix de la colonne. Quelle que soit la colonne choisie,

il sera donc nécessaire de vérifier l'absence d'effet « cross-talk » sur ces analytes, puisque ces composés présentent les mêmes ions fragments.

Il apparaît alors que la colonne Discovery serait la meilleure colonne pour la rétention de l'aténolol mais la plus mauvaise pour la séparation du propranolol et de l'alprénolol. Il est donc nécessaire de s'intéresser à d'autres paramètres pour choisir la colonne chromatographique, tels que l'efficacité.

Pour la majorité des analytes, la colonne Discovery HSF5 est 4 à 10 fois moins efficace que la colonne Hibar Purospher Star RP18e et 2 à 6 fois moins efficace que la colonne Nucleosil C18 (Figure 32).

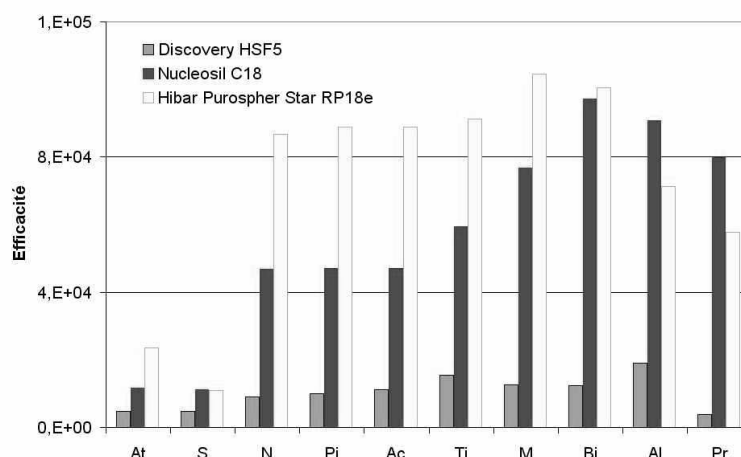


Figure 32: Nombre de plateaux pour chaque analyte sur les trois colonnes testées

Ce résultat n'est pas surprenant au vu des dimensions des colonnes. La colonne Discovery utilisée a une géométrie de 100 x 4 mm alors que les deux autres colonnes testées sont de 250 x 4,6 mm. La réduction du diamètre interne n'est pas suffisamment importante pour influencer de façon significative l'efficacité, par contre les plus grandes longueurs de colonnes permettent de disposer d'un nombre très supérieur de plateaux théoriques. Afin d'étayer cette hypothèse, les hauteurs équivalentes à un plateau théorique (HEPT) ont été calculées selon la relation suivante :

$$HEPT = \frac{\sigma^2 \times L}{t_r^2}$$

où L représente la longueur de la colonne,  $\sigma$  la variance exprimée en min, et  $t_r$  le temps de rétention de l'analyte correspondant.

Il apparaît alors que la colonne Discovery a une HEPT plus importante (17  $\mu$ m) que les deux autres colonnes (10  $\mu$ m pour la colonne Nucleosil et 8  $\mu$ m pour la colonne Hibar Purospher Star). La plus faible efficacité de cette colonne n'est donc pas uniquement liée à ses plus faibles dimensions mais également à sa plus grande HEPT. En effet, si la HEPT augmente, pour une longueur constante de colonne, le nombre de plateaux théorique est plus faible, et donc la séparation est moins bonne.

Par ailleurs, les symétries observées sur la colonne Discovery HSF5, Nucleosil C18 et Hibar Purospher Star RP18e sont respectivement incluses dans les domaines 0,6 - 0,8, 0,5 - 0,8, 0,6 - 0,8. Un pic chromatographique est parfaitement symétrique si la valeur de sa symétrie (Tableau 24) est de 1. Les symétries observées sont donc acceptables pour la plupart des composés. Les pics chromatographiques correspondant à l'alprénolol et au propranolol restent toutefois très asymétriques et n'atteignent des valeurs acceptables que sur la colonne Hibar Purospher Star.

### 3.3.2.4 Choix de la colonne

Nous avons pu constater que la colonne Discovery est avantageuse pour l'analyse de l'aténolol car elle permet une meilleure rétention de cette molécule. En revanche, cette colonne présente de beaucoup plus faibles efficacités pour l'ensemble des composés et n'a donc finalement pas été retenue. Les caractéristiques chromatographiques des  $\beta$ -bloquants sont proches pour les colonnes Nucleosil C18 et Hibar Purospher Star RP18e. Un temps d'analyse de 14 min est obtenu sur la colonne Nucleosil et de 8 min sur la colonne Purospher Star. De plus cette dernière colonne conduit à de meilleures symétries de pic. C'est pourquoi la colonne Hibar Purospher Star RP18e a finalement été retenue pour l'analyse des  $\beta$ -bloquants dans les matrices environnementales.

La séparation des  $\beta$ -bloquants est réalisée en moins de 10 min, en appliquant le gradient présenté Tableau 26. Un rinçage de la colonne par 100 % d'AcN permet par la suite d'éliminer les interférents présents dans les échantillons environnementaux. Finalement un palier isocratique à 15% d'AcN permet d'équilibrer la colonne. Le chromatogramme résultant de cette analyse est présenté Figure 31, c) page 85.

**Tableau 26: Gradient appliqué pour la séparation des  $\beta$ -bloquants**

| Temps (min) | % eau pH 2,7 | % AcN |
|-------------|--------------|-------|
| 0           | 85           | 15    |
| 2           | 85           | 15    |
| 5           | 55           | 45    |
| 10          | 55           | 45    |
| 10,1        | 0            | 100   |
| 15          | 0            | 100   |
| 15,1        | 85           | 15    |
| 25          | 85           | 15    |

Ce gradient permet la séparation satisfaisante de la majorité des  $\beta$ -bloquants. Comme nous l'avons décrit précédemment cette méthode conduit à la coélution du pindolol et de l'acébutolol, ainsi qu'à une mauvaise résolution de l'alprénolol et du propranolol. La résolution de ces composés pourrait être réalisée en retardant leur élution. Toutefois, étant données leurs proches polarités, la résolution de l'alprénolol et du propranolol conduit à un important élargissement des pics chromatographiques correspondants. Ceci entraînerait alors une perte de sensibilité sur ces molécules et une forte

augmentation du temps d'analyse. Ces conditions d'élutions ont donc été préférées et l'absence d'effet « cross-talk » a été vérifiée en analysant par cette méthode des solutions standard ne contenant qu'un  $\beta$ -bloquant.

### 3.3.3 Séparation des corticostéroïdes

#### 3.3.3.1 Méthodes chromatographiques

Comme nous l'avons vu précédemment, les sensibilités de l'analyse des corticostéroïdes sont comparables dans les mélanges hydro-organiques eau/AcN et eau/MeOH. L'utilisation de mélanges eau/AcN a été préférée pour simplifier le passage de l'analyse d'une famille à l'autre en laboratoire. Les performances de la séparation des corticostéroïdes sur les colonnes Symmetry C18, X-Bridge C18 et Discovery HSF5 ont été évaluées. Les chromatogrammes résultant de ces analyses sont présentés Figure 33.

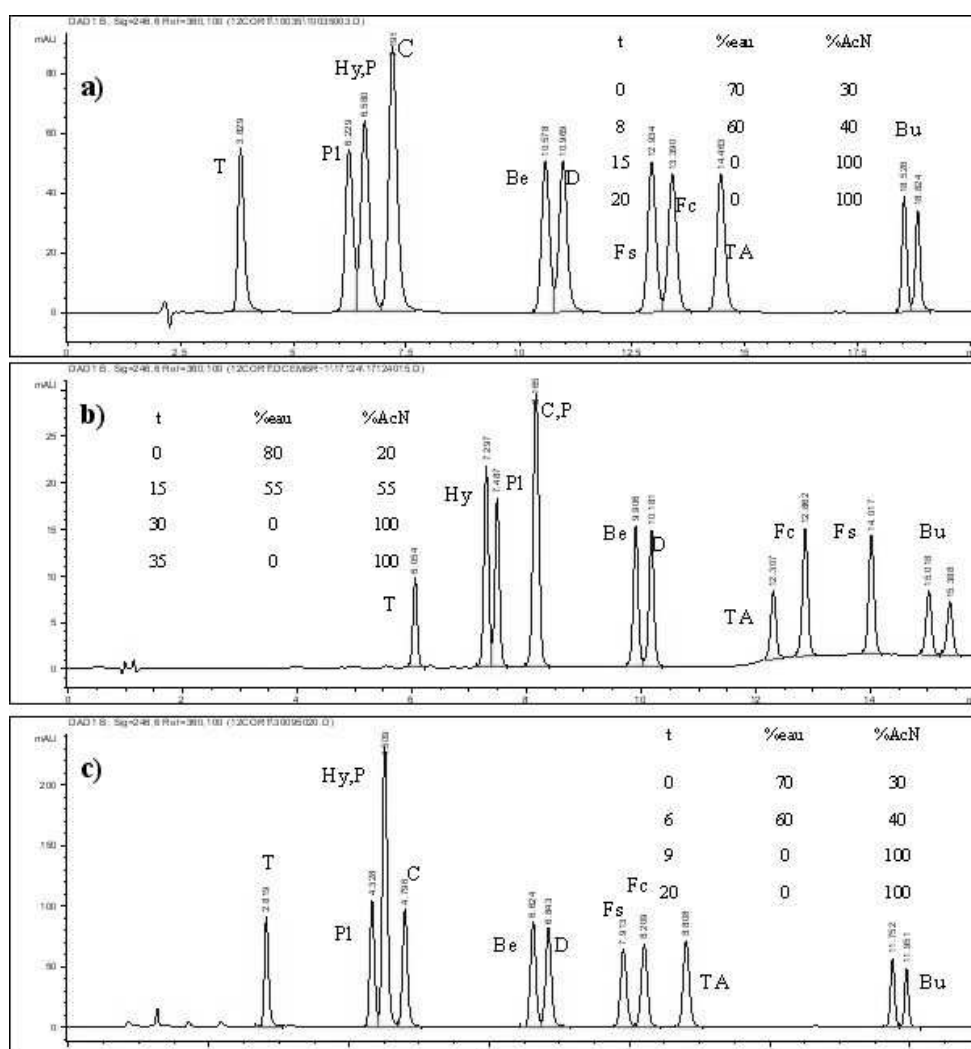


Figure 33: Séparation LC/DAD des corticostéroïdes sur colonnes a) Symmetry C18 , b) Discovery HSF5, c) X-Bridge ; détection  $\lambda = 246$  nm

Les sélectivités, efficacités et symétries de chaque pic sont présentées Tableau 27.

**Tableau 27: Facteurs de rétention (k), sélectivités ( $\alpha$ ), largeurs à mi-hauteur ( $2\sigma$ ), efficacités (N) et symétries des pics chromatographiques sur les colonnes Symmetry C18, Discovery HSF5 et X-Bridge C18**

| ordre<br>d'élution | k   | $\alpha$ | Symmetry C18 (Waters) |        |          |
|--------------------|-----|----------|-----------------------|--------|----------|
|                    |     |          | $2\sigma$ (min)       | N      | symétrie |
| T                  | 0,9 |          | 0,145                 | 3799   | 0,67     |
| Pl                 | 2,1 | 1,62     | 0,189                 | 5883   | 0,86     |
| Hy                 | 2,3 | 1,06     | 0,2                   | 5886   | 0,82     |
| P                  | 2,3 | 1,06     | 0,2                   | 5886   | 0,82     |
| C                  | 2,6 | 1,09     | 0,198                 | 7195   | 0,81     |
| Be                 | 4,2 | 1,45     | 0,18                  | 18274  | 0,91     |
| D                  | 4,4 | 1,03     | 0,182                 | 19199  | 0,88     |
| Fs                 | 5,3 | 1,17     | 0,176                 | 27774  | 0,92     |
| Fc                 | 5,5 | 1,03     | 0,18                  | 28328  | 0,9      |
| TA                 | 5,9 | 1,07     | 0,171                 | 35998  | 0,91     |
| Bu                 | 7,3 | 1,2      | 0,098                 | 156499 | 0,77     |

| ordre<br>d'élution | k    | $\alpha$ | Discovery HSF5 (Supelco) |        |          |
|--------------------|------|----------|--------------------------|--------|----------|
|                    |      |          | $2\sigma$ (min)          | N      | symétrie |
| T                  | 5,1  |          | 0,079                    | 32499  | 0,98     |
| Hy                 | 6,5  | 1,21     | 0,086                    | 39952  | 1,03     |
| Pl                 | 6,3  | 1,03     | 0,087                    | 41341  | 1,00     |
| C                  | 7,2  | 1,09     | 0,11                     | 30154  | 0,99     |
| P                  | 7,2  | 1,09     | 0,093                    | 63541  | 1,01     |
| Be                 | 8,9  | 1,21     | 0,092                    | 67520  | 1,03     |
| D                  | 9,2  | 1,03     | 0,098                    | 87769  | 1,02     |
| TA                 | 11,3 | 1,21     | 0,099                    | 94142  | 1,02     |
| Fs                 | 11,9 | 1,05     | 0,1                      | 108844 | 1,00     |
| Fc                 | 13,0 | 1,09     | 0,104                    | 114545 | 1,00     |
| Bu                 | 14,0 | 1,07     | 0,104                    | 121284 | 1,02     |

| ordre<br>d'élution | k    | $\alpha$ | X-Bridge C18 (Waters) |        |          |
|--------------------|------|----------|-----------------------|--------|----------|
|                    |      |          | $2\sigma$ (min)       | N      | symétrie |
| T                  | 1,0  |          | 0,062                 | 11486  | 0,79     |
| Pl                 | 2,1  | 2,3      | 0,072                 | 20019  | 0,90     |
| Hy                 | 2,2  | 1,1      | 0,076                 | 19354  | 0,87     |
| P                  | 2,2  | 1,1      | 0,076                 | 19354  | 0,87     |
| C                  | 2,4  | 1,1      | 0,075                 | 22510  | 0,88     |
| Be                 | 6,4  | 1,6      | 0,085                 | 33493  | 0,91     |
| D                  | 6,6  | 1        | 0,087                 | 34537  | 0,89     |
| Fs                 | 7,9  | 1,2      | 0,091                 | 41502  | 0,92     |
| Fc                 | 8,2  | 1        | 0,093                 | 42861  | 0,92     |
| TA                 | 8,9  | 1,1      | 0,094                 | 48190  | 0,92     |
| Bu                 | 10,8 | 1,4      | 0,064                 | 186807 | 0,96     |

Sur ces trois colonnes la séparation de la prednisolone (Pl), la prednisone (P), le cortisol (Hy) et la cortisone (C) pose des difficultés. En effet, une coélution de la cortisone et du cortisol est observée sur les colonnes Symmetry C18 et X-Bridge C18. La cortisone et la prednisone sont coéluees sur la colonne Discovery HSF5. Par ailleurs, de faibles résolutions sont observées pour les pics (Pl) et (Hy,

P) sur les colonnes Waters, ainsi que Hy et Pl sur la colonne Supelco. Des essais ont alors été réalisés sur une colonne Hypercarb. Cette colonne constituée de carbone graphitisé poreux est hautement rétentive et présente de meilleures reconnaissances géométriques que les phases de silice greffée C<sub>18</sub>. Elle est donc susceptible de permettre une meilleure séparation de ces 4 molécules (C, Hy, P, Pl). Toutefois, les premiers essais réalisés sur cette colonne ont conduit à des pics chromatographiques très asymétriques, ne permettant pas le développement d'une méthode d'analyse performante et n'ont pas été poursuivis.

Il est également à noter que la budésonide conduit à deux pics chromatographiques. Cette molécule est effectivement prescrite sous la forme de deux épimères, résolus par ces méthodes.

Des ordres d'élution identiques sont observés sur les deux colonnes de silice greffée C<sub>18</sub>. Les sélectivités sont différentes sur la colonne de silice greffée pentafluorophényle. De façon générale, les sélectivités sur les phases de silice greffée alkyle peuvent s'expliquer par des interactions hydrophobes. Marchand *et al.* [181] montrent que les interactions  $\pi$ - $\pi$  ainsi que l'induction dipolaire contribuent fortement à la sélectivité sur les colonnes phényle. Ils montrent également que les colonnes fluorophényle possèdent de meilleures sélectivités géométriques que les silices greffées alkyle, c'est-à-dire qu'elles séparent plus facilement les isomères de position.

L'inversion de rétention du cortisol et de la prednisolone peut être expliquée par les interactions  $\pi$ - $\pi$  qui peuvent avoir lieu sur la colonne Discovery HSF5. En effet, avec des polarités proches, le cortisol ne présente qu'une insaturation sur le cycle A contre 2 pour la prednisolone. Il sera donc moins retenu par les interactions  $\pi$ - $\pi$  que la prednisolone.

L'ordre d'élution du groupe Fs-Fc-TA est inversé sur la colonne Discovery HSF5. Ces composés ne diffèrent que par le nombre ou la position des atomes de fluor. Leur rétention sur les silices greffées C<sub>18</sub>, s'explique par leurs polarités, puisque ces composés sont élués par ordre de logP croissant. La polarité de ces composés étant comparable, la sélectivité de la flunisolide, la fluocinolone acétonide et la triamcinolone acétonide sur la colonne Discovery ne peut pas être expliquée par l'hydrophobicité de ces molécules. Il est donc probable que les interactions de Keesom (interactions dipôle-dipôle) soient à l'origine de cette sélectivité. Les liaisons C-F étant fortement polarisées, ces trois composés présentent vraisemblablement des moments dipolaires différents donc des interactions de Keesom avec la phase stationnaire différentes. Les moments dipolaires de ces molécules n'étant pas disponibles dans la littérature, il n'a pas été possible de vérifier cette hypothèse.

La sélectivité d'une méthode chromatographique ne suffit pas à estimer ses performances, la résolution des composés ainsi que l'efficacité de la séparation doivent également être prises en compte.

Comme cela a été expliqué précédemment, une séparation chromatographique totale n'est pas nécessaire pour une détection par spectrométrie de masse en mode MRM. Cette séparation n'est nécessaire que pour les couples :

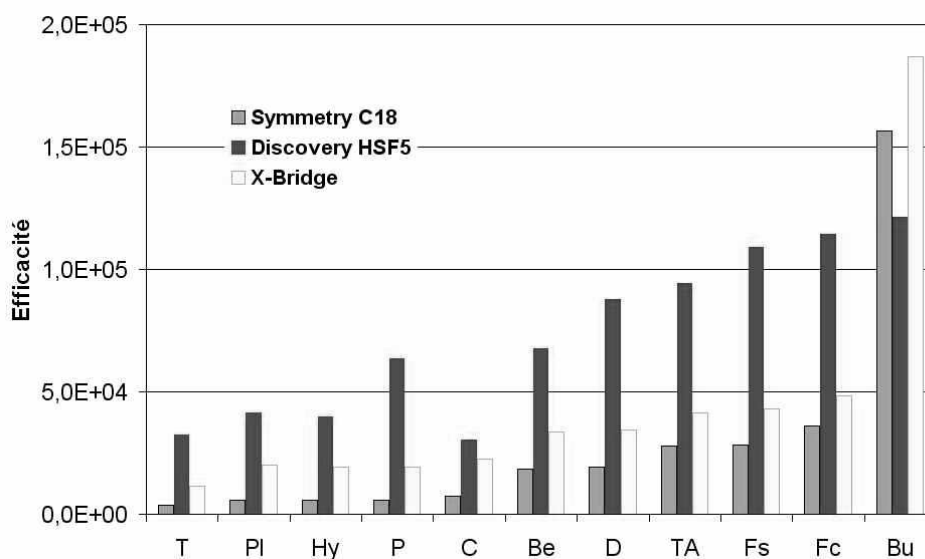
- Bétaméthasone-Dexaméthasone,
- Prednisolone-Cortisone,
- Fluocinolone acétonide-Budésonide.

Les résolutions obtenues pour ces paires critiques sont présentées Tableau 28.

**Tableau 28: Résolution des paires critiques pour la spectrométrie de masse**

| colonne | $Rs_{Be-D}$ | $Rs_{Pl-C}$ | $Rs_{Fc-Bu}$ |
|---------|-------------|-------------|--------------|
| Sym     | 0,98        | 2,47        | 3,56         |
| Disc    | 1,48        | 3,4         | 10,66        |
| XB      | 1,27        | 1,89        | 22,5         |

Les trois colonnes testées permettent la résolution satisfaisante des couples Cortisone-Prednisolone et Fluocinolone acétonide-Budésonide. Pour le couple Bétaméthasone-Dexaméthasone, aucune des colonnes testées ne permet d'atteindre le critère  $Rs = 1,50$ . Ces deux molécules sont des diastéréoisomères, qui diffèrent par l'orientation de la fonction méthyle en C16. De ce fait ces deux composés présentent les mêmes hydrophobicités rendant difficile leur séparation sur les silices greffées alkyle. Elles présentent de plus des moments dipolaires très proches et une même densité d'électrons  $\pi$ , ne permettant pas non plus leur résolution sur la phase pentafluorophényle.



**Figure 34: Nombre de plateaux pour chaque analyte sur les trois colonnes testées**

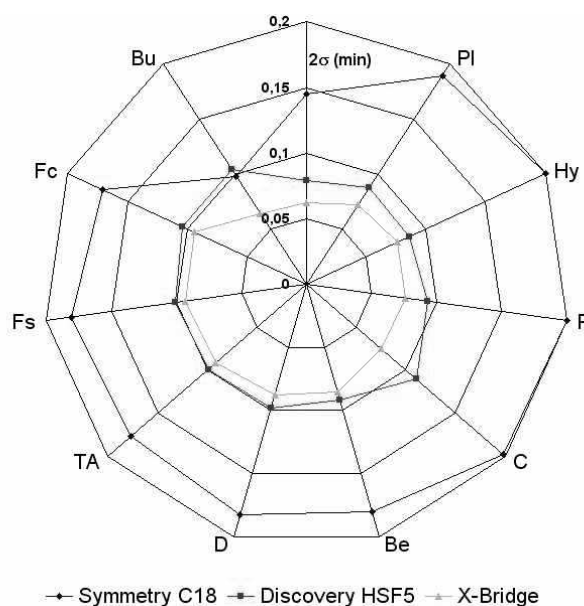
On constate par ailleurs que pour la majorité des analytes, la colonne Discovery HSF5 est 2 fois plus efficace que la colonne X-Bridge et 4 fois plus efficace que la colonne Symmetry C18 (Figure 34).

L'efficacité est calculée par la relation suivante :

$$N = \left( \frac{t_r}{\sigma} \right)^2$$

où  $t_r$  représente le temps de rétention de l'analyte et  $\sigma$  la variance du pic chromatographique correspondant.

La Figure 35 présente les largeurs à mi-hauteur des pics chromatographiques pour chaque analyte.



**Figure 35: Largeurs à mi-hauteur ( $2\sigma$ ) des pics chromatographiques de chaque corticostéroïde sur les colonnes testées**

Les variances ( $\sigma$ ) observées sur les colonnes X-Bridge et Discovery HSF5 sont comparables, de l'ordre de 0,05 min. Les meilleures efficacités observées sur la colonne Discovery HSF5 sont donc dues à l'élution plus tardive des analytes et non à des pics plus fins. La plus faible efficacité de la colonne Symmetry C18 est directement liée à la plus forte dispersion des analytes en sortie de colonne (variance de l'ordre de 0,1).

Les symétries observées sur la colonne Symmetry C18, Discovery HSF5 et X-Bridge C18 sont respectivement incluses dans les domaines 0,7-0,9, 0,98-1,02, 0,7-1. Les symétries observées sur la colonne Discovery sont très satisfaisantes, toutefois de bonnes symétries sont également obtenues sur les autres colonnes. Ce paramètre ne permet pas le choix de la colonne chromatographique.



### 3.3.3.2 Choix de la colonne chromatographique

La colonne Symmetry C18 conduit à de plus faibles sélectivités et efficacités que les colonnes X-Bridge et Discovery HSF5. Son pouvoir résolutif est également plus faible. Les deux autres colonnes ont des performances comparables. Le pouvoir résolutif de la colonne Discovery HSF5 est légèrement supérieur à celui de la colonne X-Bridge. Toutefois les paires critiques sont correctement séparées sur cette deuxième colonne. De plus des pics chromatographiques plus fins sont obtenus sur la colonne X-Bridge, permettant potentiellement d'abaisser les limites de détection de la méthode LC/MS/MS en augmentant les rapports signal/bruit. Par ailleurs, la plus faible géométrie de la colonne X-Bridge (D. I. = 2,1 mm) par rapport à la colonne Discovery (D. I. = 4 mm) est moins consommatrice de solvant. C'est pourquoi la colonne X-Bridge a finalement été choisie pour la séparation des corticostéroïdes. Le chromatogramme résultant est présenté Figure 33,c) page 90.

La séparation des corticostéroïdes est réalisée en 12 min en appliquant le gradient présenté Tableau 29, à un débit de 0,3 mL/min. Un rinçage de la colonne par 100 % d'AcN permet par la suite d'éliminer les composés interférents présents dans les échantillons environnementaux. Finalement un palier isocratique à 30% d'AcN permet d'équilibrer la colonne.

**Tableau 29: Gradient appliqué pour la séparation des corticostéroïdes**

| Temps (min) | % eau | % AcN |
|-------------|-------|-------|
| 0           | 70    | 30    |
| 6           | 60    | 40    |
| 9           | 0     | 100   |
| 20          | 0     | 100   |
| 20,1        | 70    | 30    |
| 28          | 70    | 30    |

## 3.4 Conclusions

Une méthode d'extraction unique permettant la récupération séquentielle des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants a été développée. Chaque famille est par la suite analysée séparément par LC/MS/MS. Il n'a pas été souhaitable de développer de méthode d'analyse unique pour les deux familles, car le spectromètre de masse utilisé ne permet pas le suivi d'un très grand nombre de transitions MRM. Toutefois, l'utilisation d'appareils plus récents est susceptible de permettre l'analyse simultanée des deux classes pharmaceutiques étudiées. Par ailleurs, l'élution séquentielle de chaque famille en SPE permet de bénéficier d'une meilleure purification pour la famille des  $\beta$ -bloquants. Analyser les deux classes pharmaceutiques simultanément reviendrait alors à mélanger les 2 extraits SPE, ce qui reviendrait à diminuer leur pureté, donc la sensibilité de l'analyse.

Une analyse unique permettrait donc un important gain de temps sur l'analyse mais au détriment de la sensibilité de la méthode. L'analyse séparée des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants a donc été préférée. Une fois la méthode d'analyse développée, il est nécessaire d'évaluer ses performances, en particulier en terme de répétabilité et linéarité.

## 4 Performances de la méthode

L'objectif de ce paragraphe n'est pas de réaliser une validation complète mais simplement d'estimer les performances de la méthode. Pour cela l'efficacité de l'extraction sur phase solide a été évaluée en terme de rendement, purification et répétabilité. Par la suite les performances de l'analyse LC/MS/MS seront présentées notamment en terme de linéarité, précision et répétabilité.

### 4.1 Extraction

Les rendements d'extraction ainsi que leurs répétabilités ont été évalués en dopant des effluents de STEP à 200 ng/L en chacun des analytes. Un facteur d'enrichissement de 1 000 étant obtenu au cours de la SPE, les effets matrices correspondants sont évalués en dopant des extraits SPE par une solution standard à 200  $\mu$ g/L.

Les résultats obtenus pour les  $\beta$ -bloquants sont présentés Tableau 30.

**Tableau 30: Rendements, répétabilités et effets matrices mesurés pour les  $\beta$ -bloquants (n=5)**

| molécule    | rendement<br>(%) | CV (%) | effet matrice<br>(%) |
|-------------|------------------|--------|----------------------|
| Acébutolol  | 109              | 9      | -5                   |
| Alprénolol  | 89               | 6      | -28                  |
| Aténolol    | 110              | 10     | -25                  |
| Bisoprolol  | 94               | 5      | -10                  |
| Métoprolol  | 92               | 7      | -20                  |
| Nadolol     | 79               | 10     | -55                  |
| Pindolol    | 7                | 50     | -8                   |
| Propranolol | 87               | 5      | -11                  |
| Sotalol     | 94               | 9      | -19                  |
| Timolol     | 82               | 6      | -43                  |
| Cartéolol   | 95               | 8      | -65                  |
| Bupranolol  | 86               | 5      | -18                  |
| Bétaxolol   | 90               | 5      | -11                  |
| Labétalol   | 93               | 2      | -16                  |
| Oxprénolol  | 88               | 10     | -28                  |

A l'exception du pindolol, de bons rendements d'extraction, supérieurs à 80% sont obtenus. Cette procédure permet donc la récupération quantitative des  $\beta$ -bloquants. L'extraction est répétable, avec des coefficients de variation sur les rendements inférieurs à 10 %. Pour le pindolol, ni le rendement (7%) ni la répétabilité (CV=50%) ne sont satisfaisants. Le pindolol étant peu polaire, il est probable que les conditions d'élution développées ne permettent pas sa correcte récupération. De plus, la mauvaise répétabilité de l'extraction du pindolol ne permet pas d'analyser quantitativement cette molécule. Les effets matrices observés sont très variables, par exemple une très faible suppression de signal est observée pour l'acébutolol. Avec une valeur de -5,1%, on peut considérer cet effet matrice comme négligeable. Pour d'autres molécules telles que le nadolol (effet matrice de 55 %), la suppression de signal ne peut pas être négligée, et il sera donc nécessaire de l'évaluer à chaque mesure.

Les résultats obtenus pour les corticostéroïdes sont présentés Tableau 31.

**Tableau 31: Rendement, répétabilité et effet matrices mesurés pour les corticostéroïdes (n=5)**

| molécule                | rendement<br>(%) | CV (%) | effet<br>matrice<br>(%) |
|-------------------------|------------------|--------|-------------------------|
| Bétaméthasone           | 80               | 9      | -80                     |
| Triamcinolone           | 82               | 9      | -92                     |
| Prednisone              | 73               | 12     | -87                     |
| Cortisol                | 89               | 15     | -92                     |
| Prednisolone            | 72               | 16     | -89                     |
| Budésonide              | 105              | 15     | -95                     |
| Flunisolide             | 86               | 8      | -87                     |
| Fluocinolone acétonide  | 85               | 6      | -84                     |
| Triamcinolone acétonide | 88               | 6      | -85                     |
| Cortisone               | 75               | 8      | -91                     |
| Désonide                | 82               | 15     | -85                     |
| Méthylprednisolone      | 83               | 13     | -81                     |
| Dexaméthasone           | 80               | 12     | -79                     |

Des rendements satisfaisants, supérieurs à 80% pour la majorité des composés, sont observés. Avec des coefficients de variation inférieurs à 16%, la procédure d'extraction est considérée comme répétable. On constate toutefois de très importantes suppressions de signal au cours de l'analyse LC/MS/MS avec des effets matrices supérieurs à 80% en valeur absolue. Il sera donc primordial d'estimer l'effet matrice pour chaque échantillon dosé.

## 4.2 Linéarité

### 4.2.1 Dans l'eau ultra pure

**Tableau 32: Linéarité et limite de quantification instrumentale (LQI) des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants**

| molécule                                   | Domaine de linéarité<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | Equation                   | Coefficient de<br>corrélation | LQI (pg) |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------|
| <b><u>Corticostéroïdes</u></b>             |                                             |                            |                               |          |
| Bétaméthasone                              | 1-400                                       | $Y = 0,0139 x - 0,00612$   | 0,999                         | 32,7     |
| Budésone                                   | 1-100                                       | $Y = 0,153 x + 0,0688$     | 0,999                         | 0,7      |
| Cortisol                                   | 4-400                                       | $Y = 0,0622 x + 0,0109$    | 0,991                         | 7,7      |
| Cortisone                                  | 1-400                                       | $Y = 0,0331 x + 0,163$     | 0,998                         | 1,3      |
| Dexaméthasone                              | 1-400                                       | $Y = 0,0157 x - 0,0026$    | 1,000                         | 32,0     |
| Flunisolide                                | 1-100                                       | $Y = 0,14 x + 0,0327$      | 0,999                         | 2,5      |
| Fluocinolone acétonide                     | 1-100                                       | $Y = 0,263 x + 0,227$      | 0,999                         | 0,6      |
| Prednisolone                               | 1-400                                       | $Y = 0,0309 x + 0,00722$   | 0,992                         | 9,1      |
| Prednisone                                 | 1-400                                       | $Y = 0,0304 x - 0,018$     | 1,000                         | 6,7      |
| Triamcinolone                              | 1-100                                       | $Y = 0,00253 x + 0,000448$ | 0,996                         | 77,3     |
| Triamcinolone acétonide                    | 1-100                                       | $Y = 0,392 x + 0,162$      | 0,998                         | 0,5      |
| Désonide                                   | 1-100                                       | $Y = 0,286 x + 0,0894$     | 1,000                         | 18       |
| Méthylprednisolone                         | 1-400                                       | $Y = 0,018 x - 0,00039$    | 0,998                         | 100      |
| <b><u><math>\beta</math>-bloquants</u></b> |                                             |                            |                               |          |
| Acébutolol                                 | 0,1-400                                     | $Y = 0,463 x + 0,00784$    | 0,992                         | 0,3      |
| Alprénolol                                 | 0,1-100                                     | $Y = 0,442 x - 0,00411$    | 0,995                         | 1,0      |
| Aténolol                                   | 0,1-400                                     | $Y = 0,296 x + 0,00625$    | 0,996                         | 0,4      |
| Bisoprolol                                 | 0,1-100                                     | $Y = 0,885 x - 0,0393$     | 0,985                         | 0,1      |
| Métoprolol                                 | 0,1-400                                     | $Y = 0,653 x + 0,0238$     | 0,990                         | 0,5      |
| Nadolol                                    | 0,1-400                                     | $Y = 0,842 x - 0,00889$    | 0,991                         | 0,3      |
| Pindolol                                   | 0,1-400                                     | $Y = 0,811 x - 0,0157$     | 0,992                         | 0,3      |
| Propranolol                                | 0,1-100                                     | $Y = 1,11 x + 0,0203$      | 0,990                         | 0,2      |
| Sotalol                                    | 0,1-400                                     | $Y = x - 0,0274$           | 0,991                         | 2,0      |
| Timolol                                    | 0,1-400                                     | $Y = 0,756 x - 0,0158$     | 0,989                         | 0,9      |
| Cartéolol                                  | 0,1-400                                     | $Y = 1,08x + 0,0139$       | 0,991                         | 0,8      |
| Bupranolol                                 | 0,1-100                                     | $Y = 1,04 x + 0,0237$      | 0,994                         | 14,4     |
| Bétaxolol                                  | 0,1-400                                     | $Y = 0,224 x - 0,00919$    | 0,993                         | 2,6      |
| Labétalol                                  | 0,1-100                                     | $Y = 2,71 x + 0,0873$      | 0,990                         | 1,1      |
| Oxprenolol                                 | 4-400                                       | $Y = 0,288 x - 0,24$       | 0,992                         | 5,9      |

Des droites d'étalonnage sont construites en analysant des solutions standard à 8 concentrations différentes pour chaque analyte. La linéarité de la méthode est admise avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0,99 en pondérant la régression linéaire par  $1/x^2$  pour les  $\beta$ -bloquants et  $1/x$  pour les corticostéroïdes (Tableau 32).

Des résidus inférieurs à 15 % sont obtenus pour chaque analyte dans la gamme de concentration testée. A titre d'exemple, les performances des solutions étalon sont présentées Tableau 33 pour l'acébutolol et la cortisone.

**Tableau 33: Performance des solutions étalon: exemple de l'acébutolol et de la cortisone**

| n° d'analyse   | concentration en acébutolol de la solution étalon |        |         |         |          |          |          |
|----------------|---------------------------------------------------|--------|---------|---------|----------|----------|----------|
|                | 4 µg/L                                            | 6 µg/L | 10 µg/L | 60 µg/L | 100 µg/L | 400 µg/L | 600 µg/L |
| 1              | 3,91                                              | 5,88   | 10,6    | 69,9    | 109      | 390      | 526      |
| 2              | 4,15                                              | 5,64   | 9,84    | 65,3    | 106      | 423      | 565      |
| 3              | 4,16                                              | 5,51   | 10,2    | 64,5    | 100      | 396      | 599      |
| 4              | 4,2                                               | 5,82   | 9,25    | 60,9    | 98,3     | 426      | 595      |
| 5              | 3,96                                              | 5,58   | 11,5    | 64,7    | 86,5     | 386      | 636      |
| Moyenne (µg/L) | 4,1                                               | 5,7    | 10,3    | 65,1    | 100,0    | 404,2    | 584,2    |
| Ecart type     | 0,1                                               | 0,2    | 0,8     | 3,2     | 8,7      | 18,9     | 41,2     |
| CV (%)         | 3,2                                               | 2,8    | 8,2     | 4,9     | 8,7      | 4,7      | 7,0      |
| Précision (%)  | 2                                                 | -5     | 3       | 8       | 0        | 1        | -3       |

| n° d'analyse   | concentration en cortisone de la solution étalon |        |         |         |         |          |          |
|----------------|--------------------------------------------------|--------|---------|---------|---------|----------|----------|
|                | 4 µg/L                                           | 6 µg/L | 10 µg/L | 40 µg/L | 60 µg/L | 100 µg/L | 400 µg/L |
| 1              | 4,16                                             | 5,71   | 9,67    | 47,7    | 50,7    | 102      | 402      |
| 2              |                                                  | 5,36   | 9,19    | 45,6    | 57,8    | 108      | 388      |
| 3              | 4,02                                             | 5,26   | 8,32    | 44,7    | 65,6    | 113      | 379      |
| 4              | 4,09                                             | 5,89   | 8,37    | 44,8    | 63,3    | 100      | 393      |
| 5              | 4,47                                             | 4,8    | 9,03    | 47,8    | 62,1    | 104      | 394      |
| Moyenne (µg/L) | 4,2                                              | 5,4    | 8,9     | 46,1    | 59,9    | 105,4    | 391,2    |
| Ecart type     | 0,198                                            | 0,423  | 0,572   | 1,529   | 5,872   | 5,177    | 8,468    |
| CV (%)         | 4,74                                             | 7,84   | 6,42    | 3,31    | 9,80    | 4,91     | 2,16     |
| Précision (%)  | 5                                                | -10    | -11     | 15      | 0       | 5        | -2       |

Les limites de quantifications instrumentales (LQI) sont déterminées comme étant la masse minimum injectée conduisant à un rapport signal sur bruit de 9. Les LQI varient entre 0,1 (bisoprolol) et 77,3 pg (triamcinolone) d'analyte injecté.

La précision de la méthode instrumentale est estimée en injectant à 5 reprises une solution standard à 100 µg/L. La variance, exprimée par le coefficient de variation de l'aire chromatographique du pic pour chaque analyte, est inférieure à 15%.

### 4.2.2 Dans les matrices environnementales

Etant donnée l'impossibilité de disposer de matrices environnementales blanches, il n'a pas été possible d'estimer les performances de la méthode d'analyse dans les eaux environnementales. La linéarité de la méthode a toutefois été estimée en reprenant les extraits SPE d'influents de STEP par des solutions standard contenant chaque analyte, à 8 concentrations différentes.

**Tableau 34: Linéarité de l'analyse des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants dans les matrices environnementales**

| molécule                                   | Domaine de linéarité*<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | Equation                 | Coefficient de<br>corrélacion |
|--------------------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| <b><u>Corticostéroïdes</u></b>             |                                              |                          |                               |
| Bétaméthasone                              | 10-400                                       | $Y = 0,00847 x - 0,0201$ | 0,995                         |
| Budésonide                                 | 10-100                                       | $Y = 0,0779 x + 0,185$   | 0,999                         |
| Cortisol                                   | 40-400                                       | $Y = 0,00895 x + 0,082$  | 0,997                         |
| Cortisone                                  | 1-400                                        | $Y = 0,0317 x + 0,142$   | 1,000                         |
| Dexaméthasone                              | 6-400                                        | $Y = 0,0184 x - 0,067$   | 0,999                         |
| Flunisolide                                | 4-400                                        | $Y = 0,0681 x + 0,063$   | 0,998                         |
| Fluocinolone acétonide                     | 1-100                                        | $Y = 0,48 x + 0,0553$    | 0,994                         |
| Prednisolone                               | 4-400                                        | $Y = 0,0337 x + 0,489$   | 0,999                         |
| Prednisone                                 | 1-400                                        | $Y = 0,0164 x - 0,00396$ | 0,999                         |
| Triamcinolone                              | 10-400                                       | $Y = 0,00369 x + 0,162$  | 0,997                         |
| Triamcinolone acétonide                    | 1-400                                        | $Y = 0,253 x + 0,319$    | 0,998                         |
| Désonide                                   | 10-400                                       | $Y = 0,165 x + 0,529$    | 0,999                         |
| Méthylprednisolone                         | 10-400                                       | $Y = 0,0277 x + 0,219$   | 0,996                         |
| <b><u><math>\beta</math>-bloquants</u></b> |                                              |                          |                               |
| Alprénolol                                 | 1-400                                        | $Y = 0,504 x + 0,0311$   | 0,991                         |
| Bisoprolol                                 | 1-400                                        | $Y = 1,06 x + 33,1$      | 0,986                         |
| Métoprolol                                 | 1-400                                        | $Y = 0,184 x + 13,4$     | 0,996                         |
| Nadolol                                    | 1-400                                        | $Y = 0,146 x + 0,474$    | 0,990                         |
| Pindolol                                   | 1-400                                        | $Y = 0,243 x + 0,0472$   | 0,996                         |
| Propranolol                                | 1-100                                        | $Y = 1,62 x + 53,8$      | 0,995                         |
| Timolol                                    | 1-400                                        | $Y = 0,305 x + 0,708$    | 0,994                         |
| Cartéolol                                  | 4-400                                        | $Y = 0,361 x + 0,73$     | 0,985                         |
| Bupranolol                                 | 1-400                                        | $Y = 1,27 x + 0,225$     | 0,995                         |
| Bétaxolol                                  | 1-400                                        | $Y = 0,326 x + 0,0754$   | 0,998                         |
| Labétalol                                  | 1-400                                        | $Y = 3,48 x + 29,1$      | 0,990                         |
| Oxprénolol                                 | 1-100                                        | $Y = 0,313 x + 3,33$     | 0,992                         |

\* valeurs d'ajouts dosés

Les domaines de linéarité présentés Tableau 34 sont donc issus d'ajouts dosés et ne correspondent pas aux concentrations réellement présentes.

La linéarité dans la matrice est admise avec des coefficients de corrélations supérieurs à 0,99 et des résidus inférieurs à 15%. Les régressions linéaires sont pondérées en  $1/x^2$  pour les  $\beta$ -bloquants et  $1/x$  pour les corticostéroïdes. Il est intéressant de constater que pour la majorité des molécules, la droite ne passe pas par l'origine. Ceci était prévisible puisque les matrices utilisées contiennent déjà les analytes à des teneurs inconnues. Ces teneurs se sont d'ailleurs avérées trop importantes pour permettre l'estimation de la linéarité du sotalol, de l'aténolol et de l'acébutolol dans les matrices environnementales, puisque la plupart des ajouts étaient négligeables par rapport aux teneurs déjà présentes dans l'échantillon. La présence d'analyte dans l'échantillon explique également le fait que les points de basse concentration ne soient pas inclus dans le domaine de linéarité pour plusieurs molécules.

### 4.3 Stabilité

La stabilité des échantillons environnementaux a été vérifiée sur 40 h, à température ambiante. Pour cela 4 L d'effluent de STEP préalablement filtrés à 0,45  $\mu\text{m}$  sont dopés à 200 ng/L en corticostéroïdes et en  $\beta$ -bloquants et acidifiés par 0,1% d'acide formique. L'échantillon dopé est conservé sur la paillasse dans une bouteille de verre ambrée afin de s'affranchir de la photodégradation des molécules. 8 extractions sont réalisées sur une période de 40 h en ayant eu soin d'homogénéiser l'échantillon avant chaque extraction. Les teneurs présentes dans les extraits sont déterminées par LC/MS/MS et normalisées par rapport à l'échantillon extrait à  $t=0$ . Les résultats obtenus pour deux corticostéroïdes (C, Fc) et deux  $\beta$ -bloquants (Pr, Ac) sont présentés Tableau 35 à titre d'exemple.

**Tableau 35: Stabilité de la cortisone (C), de la fluocinolone acétonide (Fc) de l'acébutolol (Ac) et du propranolol (Pr) dans les matrices environnementales, à température ambiante et à l'abri de la lumière**

| temps (h) | Corticostéroïdes |     | $\beta$ -bloquants |     |
|-----------|------------------|-----|--------------------|-----|
|           | C                | Fc  | Pr                 | Ac  |
| 0         | 100              | 100 | 100                | 100 |
| 1,35      | 80               | 95  | 104                | 101 |
| 2,97      | 94               | 93  | 89                 | 96  |
| 15,68     | 105              | 100 | 97                 | 108 |
| 18,22     | 112              | 101 | 89                 | 89  |
| 20,15     | 125              | 104 | 86                 | 86  |
| 23,29     | 113              | 105 | 92                 | 83  |
| 39,91     | 112              | 109 | 102                | 91  |
| Moyenne   | 105              | 101 | 95                 | 94  |
| CV (%)    | 13               | 5   | 7                  | 9   |

Les variations de concentration au cours du temps ne sont pas significatives ; les échantillons sont donc stables à température ambiante sur une période de 40 h. Il est donc possible de conserver les échantillons à température ambiante pendant 40 h avant de les analyser.

## **5 Application à des échantillons environnementaux**

De premiers essais ont été réalisés afin de s'assurer que ce protocole permettait effectivement le dosage d'échantillons environnementaux. Comme cela a été présenté précédemment, l'existence d'importants effets matrices nécessite une discussion sur la méthode de dosage à utiliser.

### **5.1 Choix de la méthode de dosage**

Etant donnés les importants effets matrices observés, la quantification des résidus pharmaceutiques dans les échantillons environnementaux ne peut pas être réalisée par un simple étalonnage externe. Plusieurs stratégies peuvent alors être envisagées.

#### **5.1.1 Etalonnage interne**

Le dosage par étalonnage interne consiste à ajouter à l'échantillon une quantité connue de solution standard. Afin de corriger correctement l'effet matrice, il est nécessaire de disposer des molécules marquées correspondant à chaque analyte. La molécule deutérée ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que la molécule naturelle, elle aura entre autres les mêmes rendements d'extraction, réponse en spectrométrie de masse et effet matrice que la molécule naturelle. Ainsi le rapport analyte/standard interne est indépendant à la fois du rendement d'extraction et de l'effet matrice. En travaillant avec ces rapports, la quantification peut alors être réalisée directement par rapport à une gamme étalon.

Cependant, ce procédé est coûteux car il nécessite l'acquisition d'un grand nombre de produits marqués. Par ailleurs, les molécules marquées ne sont pas disponibles commercialement pour tous les analytes étudiés. Cette stratégie de dosage ne peut donc pas être appliquée à la quantification de résidus de  $\beta$ -bloquants et de corticostéroïdes dans les matrices environnementales.

#### **5.1.2 Méthode des ajouts dosés**

Pour cette méthode, l'échantillon à doser est divisé en aliquotes. Une quantité croissante de solution standard contenant l'ensemble des molécules à analyser est ajoutée à chaque aliquote. Afin d'obtenir une mesure précise, le plus grand ajout doit être de l'ordre de grandeur de la concentration naturellement présente dans l'échantillon. Le rendement et l'effet matrice subis par l'analyte dans chaque aliquote dopée étant le même, ces paramètres n'entrent plus en jeu dans le calcul de la



concentration. Toutefois, cette méthode est délicate à appliquer car elle nécessite de connaître avant le dosage l'ordre de grandeur de la concentration à laquelle est présent chaque analyte dans l'échantillon. En effet, si l'ajout dosé est trop faible la pente de la droite résultante est également très faible et il y a alors une forte incertitude sur la mesure de la concentration. Au contraire, dans le cas d'un ajout trop fort, la pente de la droite est trop importante et l'incertitude sur la détermination de la concentration inclut la valeur 0, ce qui ne permet pas de prouver que la molécule était initialement présente dans l'échantillon.

### 5.1.3 Etalonnage externe

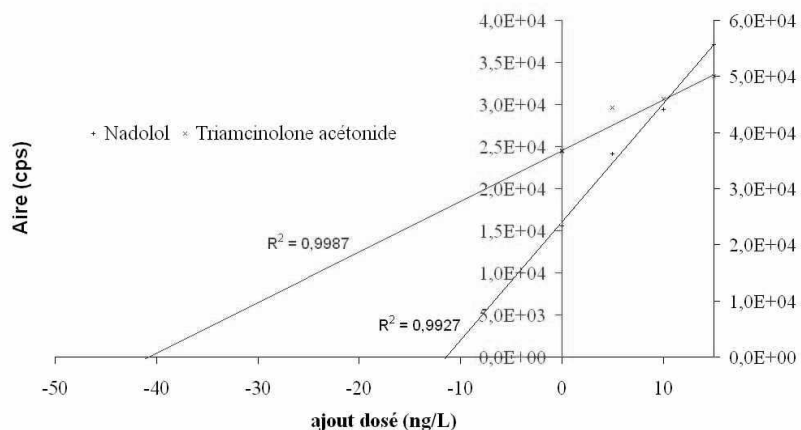
Cette méthode consiste à comparer les échantillons environnementaux à une gamme étalon de solutions standard. Ce mode de détermination de la concentration ne tient compte ni du rendement d'extraction ni de l'effet matrice. Il est donc nécessaire d'effectuer les corrections correspondantes aux résultats obtenus. La répétabilité de l'extraction ayant été démontrée, il n'est pas nécessaire d'ajouter des expériences pour la détermination du rendement, les valeurs présentées Tableau 30 et Tableau 31 peuvent être utilisées. Par contre, les effets matrices sont susceptibles de varier de façon importante d'un échantillon à l'autre. Il est donc nécessaire de l'évaluer conjointement à chaque analyse, ce qui augmente le nombre de manipulations nécessaires au dosage.

### 5.1.4 Conclusions

La stratégie *a priori* la plus simple à mettre en œuvre est la méthode des ajouts dosés. Ce protocole permet effectivement une manipulation moindre des données et un nombre d'expériences moins important que l'étalonnage externe. Des essais ont alors été réalisés, d'une part pour s'assurer que les classes pharmaceutiques analysées contaminent effectivement les eaux de la région lyonnaise, et d'autre part pour estimer la faisabilité de cette méthode en vue d'analyses de routine.

## 5.2 Faisabilité de la méthode des ajouts dosés

Des influents provenant de la STEP de Pierre Bénite sont extraits selon le protocole présenté en partie 2.2.4 page 74. 2,5 L d'échantillon sont divisés en 5 aliquotes de 400 mL. Une aliquote est extraite sans dopage préalable, les quatre autres sont dopées par une quantité croissante de solution standard, de sorte à atteindre le double de la concentration environnementale suspectée. Pour cette première approche, la linéarité de la méthode est vérifiée sur la seule base de coefficients de corrélation supérieurs à 0,99. A titre d'exemple, les droites obtenues pour le nadolol et la triamcinolone acétonide sont présentées Figure 36.



**Figure 36: Dosage de la triamcinolone acétonide et du nadolol par la méthode des ajouts dosés**

Les quantités mesurées par cette méthode sont présentées Tableau 36.

**Tableau 36: Concentrations mesurées dans les influents/effluents de la STEP de Pierre Bénite**

| molécule                       | Influents<br>(ng/L) | Effluents<br>(ng/L) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------|
| <b><u>Corticostéroïdes</u></b> |                     |                     |
| Bétaméthasone                  | 15                  | 7                   |
| Budésonide                     | nd                  | 3                   |
| Cortisone                      | 174                 | 229                 |
| Cortisol                       | 53                  | 63                  |
| Flunisolide                    | 7                   | 5                   |
| Fluocinolone acétonide         | 0,3                 | 11                  |
| Triamcinolone                  | 31                  | 30                  |
| Triamcinolone acétonide        | 40                  | 3                   |
| <b><u>β-bloquants</u></b>      |                     |                     |
| Aténolol                       | 170                 | 1,8                 |
| Bisoprolol                     | 73                  | 1                   |
| Métoprolol                     | 111                 | 1                   |
| Nadolol                        | 10                  | 0,1                 |
| Pindolol                       | 2                   | 0,4                 |
| Propranolol                    | 92                  | 2                   |
| Sotalol                        | 318                 | 65                  |
| Timolol                        | 32                  | 58                  |

nd : non détecté

Les β-bloquants étudiés sont détectés jusqu'à une valeur de 320 ng/L, pour le sotalol. Les concentrations mesurées pour les β-bloquants sont en accord avec les quantités précédemment

rapportées dans la littérature [33, 36, 44, 49, 139, 164]. Pour l'acébutolol et l'alprénolol, une mauvaise estimation des quantités environnementales n'a pas permis l'application correcte de la méthode des ajouts dosés (ajout négligeable ou au contraire trop important), ne permettant alors pas une correcte quantification. Tous les corticostéroïdes sont détectés dans les influents, exceptées la budésonide et la dexaméthasone. Les concentrations atteignent 175 ng/L pour la cortisone. La cortisone et le cortisol, qui sont des molécules endogènes, sont continuellement déversés dans les STEP par l'ensemble de la population. Il n'est donc pas surprenant que ces deux composés soient détectés à de plus fortes teneurs que les autres corticostéroïdes. Par ailleurs, certains corticostéroïdes (cortisone et budésonide) sont détectés à de plus fortes teneurs dans les effluents que dans les influents, ceci pourrait être lié à l'hydrolyse des conjugués lors des traitements de STEP.

## **6 Conclusions**

Une unique méthode d'extraction permettant l'élution séquentielle des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants a été développée. Cette méthode permet un gain de temps important sur la préparation d'échantillon et des volumes d'échantillon moindres puisque les deux familles sont extraites à partir d'une seule charge. Toutefois, d'importants effets matrices ont été observés, ce qui nécessite une stratégie de dosage adaptée. L'analyse consécutive des extraits par LC/MS/MS permet la quantification d'échantillons environnementaux aqueux. Du fait de l'impossibilité de disposer de matrices environnementales blanches, la procédure n'a pas pu être validée. Toutefois, des performances satisfaisantes ont été obtenues dans l'eau ultra-pure. De premiers essais de dosage par la méthode des ajouts dosés ont montré que les corticostéroïdes et les  $\beta$ -bloquants contaminent effectivement les eaux de STEP de la région lyonnaise, puisqu'ils y ont été détectés à des teneurs pouvant atteindre 320 ng/L. Ces essais ont de plus révélé la difficulté de quantifier les échantillons par la méthode des ajouts dosés. En effet pour réaliser un ajout satisfaisant il est nécessaire de connaître l'ordre de grandeur de concentration de l'analyte à doser. Les premiers essais réalisés se sont avérés trop hasardeux pour une application en routine puisque les ajouts réalisés n'étaient satisfaisants que pour une partie des molécules. Finalement la stratégie adoptée consiste à doser les échantillons par étalonnage externe en évaluant systématiquement l'effet matrice correspondant afin de pouvoir corriger les résultats.



# Chapitre □

## □ développement analytique : Estrogènes



## Chapitre 3 – Développement analytique : estrogènes

La littérature propose de nombreuses méthodes pour l'analyse des estrogènes dans les matrices environnementales [121, 132, 134, 135]. Les auteurs constatent unanimement une faible sensibilité pour la détection des estrogènes par spectrométrie de masse, du fait du manque de fonctions ionisables sur les estrogènes contrairement aux amines ou aux acides carboxyliques [121, 129, 131, 135]. Ceci a pour conséquence directe, la nécessité de prises d'essai importantes (pouvant atteindre plusieurs litres) afin d'obtenir un facteur d'enrichissement important lors de l'extraction des molécules et d'atteindre ainsi de basses limites de détection (de l'ordre du ng/L). Les procédures de préparation d'échantillon s'en retrouvent alors extrêmement alourdies du fait des grands volumes à manipuler et des temps d'extraction importants. Par ailleurs, les estrogènes se fragmentent difficilement en spectrométrie de masse ce qui ne permet pas la détermination de transitions MRM intenses, compliquant ainsi le développement de méthodes d'analyses. La stratégie que nous nous proposons de développer dans ce chapitre vise à réduire de façon importante le temps total d'analyse en diminuant les prises d'essai nécessaires, tout en gardant de bonnes sensibilités (limite de détection de l'ordre du ng/L). Pour cela deux aspects seront développés.

Dans un premier temps l'apport d'une dérivation des estrogènes par un groupement facilement ionisable sur la sensibilité de l'analyse sera évalué. Dans un deuxième temps, l'automatisation du protocole extraction/analyse sera réalisée, afin de pouvoir injecter la totalité de l'échantillon extrait en LC/MS/MS. Ces deux points permettront potentiellement de réduire de façon importante les prises d'essai.

## 1 **Matériels et méthodes**

### 1.1 **Réactifs et solvants**

L'estrone (100%), l'estradiol (100%), l'éthinylestradiol (99%), l'estriol (97%) et le chlorure de dansyle (99%) provenaient de Sigma Aldrich. L'estrone-d4 (97%), l'estradiol-d2 (98,5%), l'éthinylestradiol (97%) et l'estriol-d2 (97%) provenaient de Cluzeau Info Labo. L'acide formique de qualité LC/MS et l'acétonitrile de qualité LC/MS provenaient de Fisher Scientific. Le méthanol de qualité HPLC provenait de SDS-Carlo Erba. L'ammoniaque (28%) et le carbonate de sodium (99%) provenaient de Prolabo. L'hydrogénocarbonate de sodium provenait de Fluka. L'eau ultra-pure était générée par un appareil Elgastat UHQ PS d'Elga LabWater.

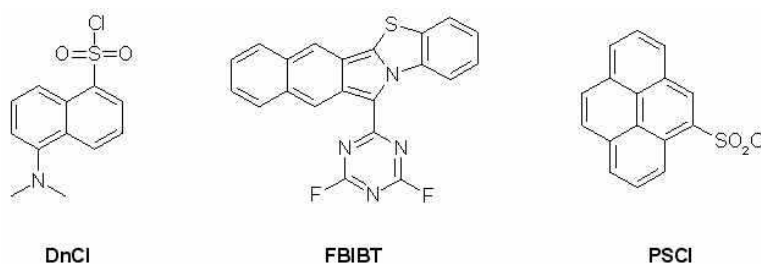
Des solutions mères à 1 g/L ont été préparées dans le méthanol pour chaque analyte.

### 1.2 **Dérivation des estrogènes**

#### 1.2.1 **Choix du dérivant**

Tous les estrogènes présentent une fonction phénol avec un  $pK_a$  de l'ordre de 10,3 (Tableau 7, page 26). La littérature propose plusieurs protocoles de dérivation spécifique des fonctions phénol en vue d'analyses par chromatographie en phase gazeuse (augmentation de la volatilité) ou de détection par fluorescence (introduction de groupements fluorophores). Pour une détection par spectrométrie de masse, la dérivation vise à augmenter le taux d'ionisation de l'analyte dans la source du spectromètre de masse (introduction d'une fonction facilement ionisable). Bien que dans chaque cas les propriétés recherchées pour le dérivant soient différentes, il serait intéressant d'appliquer un protocole de dérivation déjà utilisé pour d'autres techniques. En GC, les composés silylés comme le BSTFA (N, O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) ou le SOA (N-triméthylsilyl-2-oxazolidinone) sont couramment utilisés pour la dérivation des phénols [126]. Ces dérivants permettent effectivement d'augmenter la volatilité des analytes, donc de faciliter leur analyse en phase gazeuse, mais ne présentent pas de fonctions ionisables. Ces composés silylés ne présentent donc pas d'intérêt particulier pour une analyse par spectrométrie de masse (couplée à la chromatographie en phase liquide). En fluorescence, plusieurs dérivants fluorophores ont été rapportés dans la littérature pour la dérivation des phénols, parmi lesquels le FBIBT (benz[5,6]isoindolo[1,2-b]benzothiazole,12-(4,6-difluoro-1,3,5-triazin-2-yl)) [182], le PSCl (chlorure de pyrènesulfonyl) [183] ou le DnCl (chlorure de dansyle) [184]. Les structures chimiques de ces 3 composés sont présentées Figure 37.



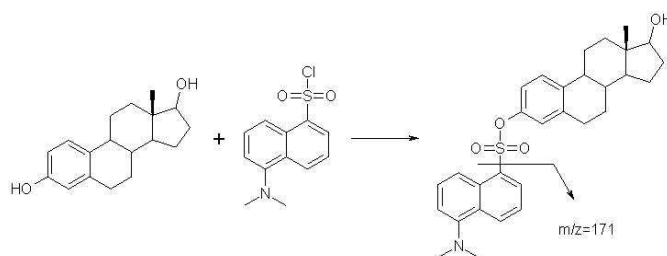


**Figure 37: Structures chimiques des dérivants fluorophores proposés dans la littérature pour la dérivation des phénols : chlorure de dansyle (DnCl), benz[5,6]isoindolo[1,2-b]benzothiazole,12-(4,6-difluoro-1,3,5-triazin-2-yl) (FBIBT), chlorure de pyrènesulfonyle (PSCI)**

Ces 3 dérivants sont effectivement fluorescents par la présence de plusieurs cycles conjugués. En outre, ces fluorophores ont fait l'objet de travaux rapportés dans la littérature pour la dérivation des estrogènes [136, 182, 183]. Le PSCI ne présente pas de fonction ionisable, contrairement au DnCl et au FBIBT qui présentent une ou plusieurs fonctions amines, facilement ionisables en mode positif dans la source du spectromètre de masse. Le DnCl et le FBIBT sont donc susceptibles d'augmenter la sensibilité de l'analyse des estrogènes par spectrométrie de masse. Le chlorure de dansyle a particulièrement retenu notre attention par son plus faible coût et sa plus grande disponibilité commerciale. En outre, une procédure de dérivation des estrogènes par le chlorure de dansyle a déjà été rapportée dans la littérature par Anari *et al.* [136] pour l'éthinylestradiol dans des échantillons biologiques.

## 1.2.2 Mode opératoire

La dérivation est réalisée en milieu basique selon le protocole proposé par Anari *et al.* [136]. Ce protocole consiste à mélanger 30  $\mu\text{L}$  de solution d'estrogène (de concentration de l'ordre du ng/L au mg/L), 270  $\mu\text{L}$  de tampon carbonate et 300  $\mu\text{L}$  de solution de chlorure de dansyle à 1 g/L. L'utilisation d'un tampon carbonate (pH 10,5) favorise la déprotonation de l'alcool phénolique et accélère donc la réaction de substitution sur le chlorure de dansyle. A titre d'exemple, la réaction de dérivation de l'estradiol par le chlorure de dansyle est présentée Figure 38.



**Figure 38: Réaction de dansylation sur l'estradiol**

La dérivation en solution peut être réalisée soit directement sur la matrice à analyser avant purification, soit sur la matrice purifiée. Dans le premier cas, la dérivation risque de ne pas être spécifique aux estrogènes puisque le chlorure de dansyle est susceptible de réagir sur toute fonction

phénol ou amine du milieu. Dans le deuxième cas, une contre extraction de l'extrait s'avérerait nécessaire afin d'éliminer l'excès de réactif de dérivation avant analyse. En particulier, le tampon carbonate est un sel non-volatil susceptible d'encrasser le spectromètre de masse. Enfin aucune de ces solutions ne permet l'automatisation complète de la procédure. Une autre stratégie consiste à dériver les estrogènes directement sur le support SPE. Il serait alors possible de purifier la matrice et d'éliminer l'excès de réactif sur le support SPE. Cette voie permettrait également de s'orienter vers l'automatisation SPE/dérivation/LC/MS/MS en ligne.

### 1.3 Matériel

#### 1.3.1 Extraction

L'étude bibliographique (Chapitre 1 partie 3.3.1, page 40) a montré que les supports de silice greffée  $C_{18}$  ainsi que les supports polymère permettent d'extraire quantitativement les estrogènes dans les matrices environnementales [124, 126]. Les phases de silice greffées  $C_{18}$  présentent des fonctions silanol résiduelles pouvant éventuellement réagir avec le chlorure de dansyle, les phases polymères ont donc été préférées. Le support Oasis HLB (Hydrophilic Lypophilic Balance) fourni par Waters a été utilisé pour évaluer la faisabilité d'une dérivation sur support. Cette phase stationnaire est un copolymère divinylbenzène-N-vinylpyrrolidone permettant la rétention des composés hydrophiles et lipophiles (Figure 39). Ce support est peu sensible à l'assèchement du fait de la présence de fonctions hydrophiles, il offre donc une plus grande souplesse d'utilisation. En outre, ce support est disponible commercialement sous forme de cartouches d'extraction hors-ligne comme en ligne, permettant de s'orienter par la suite vers une procédure d'extraction/dérivation/LC/MS/MS en ligne. De plus, ce support offre une plus grande capacité de charge du fait de sa grande surface spécifique.

Les extractions hors lignes ont été développées sur des cartouches 60 mg, 3 cc, 30  $\mu$ m. Les colonnes Oasis HLB en ligne 2,1 x 20 mm, 25  $\mu$ m, Oasis MAX 2,1 x 20 mm, 30  $\mu$ m fournies par Waters, ainsi que les colonnes Upti-Trap 90 Atoll XWP 2,1 x 15 mm, 90  $\mu$ m et Upti-Trap 30 Atoll XC 2,1 x 15 mm, 70  $\mu$ m fournies par Interchim ont été testées pour les extractions en ligne.

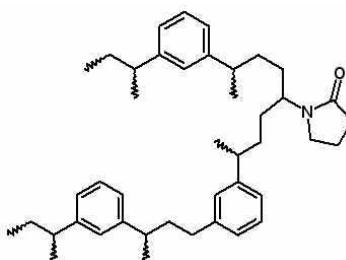


Figure 39: Structure chimique du support Oasis HLB

### 1.3.2 Analyse

Une chaîne chromatographique Agilent 1100 series constituée d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire basse pression, d'un passeur d'échantillons et d'un détecteur à barrette de diodes est couplée à un spectromètre de masse à triple quadripôle API 300 fourni par MDS Sciex, par l'intermédiaire d'une source TIS (TurboIon Spray). Le contrôle de l'appareil, l'acquisition et le traitement des données ont été réalisés par le biais du logiciel associé Analyst 1.4.1.

Le spectromètre de masse a préalablement été calibré en utilisant une solution standard de polypropylène glycol (fournie par Applied Biosystem), en réglant la résolution, telle que la largeur à mi-hauteur, soit de  $0,7 \pm 0,1$  uma

Le gaz de nébulisation (air) et le gaz rideau (azote) sont fixés à un débit de 10 unités arbitraires. La source est chauffée à 300°C et un gaz desséchant (air) est introduit à un débit de 8 mL/min. La tension de spray est fixée à 5 000 V.

Des solutions individuelles d'estrogènes et d'estrogènes dansylés ont été infusées en spectrométrie de masse de manière à optimiser la détection de chaque molécule en faisant varier les tensions des différentes lentilles de l'instrument. Cette optimisation permet la mise en place de la méthode MRM.

#### 1.3.2.1 Analyse des estrogènes non dérivés

La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Waters SunFire C<sub>18</sub> 150 x 2,1 mm, 3,5 µm en mode isocratique à un débit de 0,3 mL/min. La phase mobile était constituée d'un mélange eau/AcN (40/60, v/v) acidifiée par 0,1% d'acide formique. La méthode d'analyse des estrogènes non dérivés n'a été appliquée qu'au cours du développement de méthode. Seuls des échantillons d'eau pure dopée par des estrogènes ont été analysés dans ces conditions. La spécificité du mode MRM n'était donc pas nécessaire et le suivi a été réalisé en mode SIM afin de s'affranchir des problèmes de faible fragmentation des estrogènes.

**Tableau 37: Paramètres de masse pour l'analyse des estrogènes non dérivés**

| molécule                | [ M -H ] <sup>-</sup> | Tension d'orifice<br>(eV) |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------|
| E1 (estrone)            | 287,2                 | -146                      |
| E2 (estradiol)          | 271,1                 | -141                      |
| E3 (estriol)            | 295,2                 | -130                      |
| EE2 (éthinyloestradiol) | 269,1                 | -141                      |

Les expériences SIM ont été réalisées en mode négatif avec un « dwell-time » de 200 ms et un potentiel de focalisation de -310 eV. Les autres paramètres de spectrométrie de masse sont présentés Tableau 37.

### 1.3.2.2 Analyse des estrogènes dansylés

La séparation chromatographique a également été réalisée sur une colonne Waters SunFire C<sub>18</sub> 150 x 2,1 mm en mode isocratique à un débit de 0,3 mL/min. L'augmentation de l'hydrophobicité des analytes après dérivation a nécessité une diminution de la polarité de la phase mobile (augmentation de la teneur en solvant organique). De ce fait, la phase mobile était constituée d'un mélange eau/AcN (20/80, v/v) acidifié par 0,1% d'acide formique.

Les expériences MRM ont été réalisées en mode positif avec un « dwell-time » de 150 ms. Les autres paramètres de spectrométrie de masse sont présentés Tableau 38.

**Tableau 38: Paramètres de masse pour l'analyse des estrogènes dansylés**

| molécule | Ion parent-ion fils | Tension d'orifice<br>(eV) | Potentiel de<br>focalisation (eV) | Energie de<br>collision (eV) |
|----------|---------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| E1       | 504,2-171,1         | 51                        | 290                               | 43                           |
| E2       | 506,2-171,1         | 46                        | 250                               | 45                           |
| E3       | 522,2-170,9         | 41                        | 190                               | 51                           |
| EE2      | 508,2-171,1         | 46                        | 250                               | 49                           |
| E1-d4    | 508,2-171,1         | 51                        | 290                               | 43                           |
| E2-d2    | 508,2-171,1         | 40                        | 250                               | 45                           |
| E3-d2    | 524,2-170,9         | 51                        | 190                               | 51                           |
| EE2-d4   | 534,2-171,1         | 46                        | 250                               | 49                           |

Les transitions MRM suivies par cette méthode ne sont pas complètement spécifiques puisque tous les analytes sont détectés par un ion produit de masse 171 uma. L'absence d'effet « cross-talk » a été vérifiée. Toutefois, cette vérification ne suffit pas à assurer la spécificité de la méthode d'analyse totale puisque tout composé interférent de la matrice environnementale dérivé par le chlorure de dansyle est susceptible de produire un fragment de masse 171 uma. Il est donc nécessaire de développer une méthodologie de dérivation à la fois quantitative et spécifique. Comme cela a été décrit précédemment, de bonnes spécificités peuvent être obtenues par une dérivation sur support, qui permet une purification préalable de la matrice.

## 2 Développement analytique

L'apport de la dérivation sur la sensibilité de l'analyse des estrogènes a tout d'abord été vérifié. Afin d'évaluer la faisabilité d'une dérivation sur support, un protocole d'extraction hors-ligne a été développé. Des essais d'extraction/dérivation en ligne ont par la suite été conduits.

### 2.1 Apport de la dérivation

#### 2.1.1 Ionisation en solution

Du fait de la présence de l'amine tertiaire les estrogènes dansylés sont ionisés en solution acide, typiquement, dans des phases mobiles acidifiées. Ceci permet donc une meilleure ionisation de l'analyte dans la source du spectromètre de masse. En effet, les pourcentages d'ionisation d'un acide et d'une base en solution sont respectivement calculés par les équations suivantes [136]:

$$\% \text{ ionisé}_{\text{acide}} = \frac{100}{1 + 10^{(pK_a - pH)}} \quad \quad \quad \% \text{ ionisé}_{\text{base}} = \frac{100}{1 + 10^{(pH - pK_a)}}$$

Pour les estrogènes, la fonction phénol a un  $pK_a$  de l'ordre de 10,3. La fonction amine tertiaire introduite au cours de la dérivation a un  $pK_a$  de l'ordre de 3,3. L'effet de la dérivation sur le pourcentage d'ionisation des estrogènes en fonction du pH est présenté Tableau 39.

**Tableau 39: Effet de la dérivation sur l'ionisation des estrogènes en solution**

|                   | fonction          | % ionisé à pH 2,7 | % ionisé à pH 8 |
|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Estrogène         | Alcool phénolique | <0,001            | 0,397           |
| Estrogène dansylé | Amine tertiaire   | 67,1              | <0,001          |

Les estrogènes non dérivés ont un caractère acide (alcool phénolique), c'est pourquoi ils ne sont pas ionisés à pH 2,7. De même les estrogènes dansylés ont un caractère basique (amine tertiaire) et ne sont pas ionisés à pH 8.

Les phases mobiles basifiées (pH 8) favorisent la déprotonation de la fonction phénol. A pH 8 les estrogènes ne sont ionisés qu'à 0,4 %. Une augmentation du pH permettrait d'améliorer le taux d'ionisation. Toutefois, du fait des faibles stabilités des colonnes chromatographiques classiques en milieu basique, il est souvent impossible de travailler avec des pH de phase mobile supérieurs à 8.

Les phases mobiles acidifiées (pH 2,7) permettent d'ioniser à 67 % les estrogènes dansylés. Ces molécules étant majoritairement introduites sous forme ionique dans la source du spectromètre de masse, l'ionisation en électrospray est alors favorisée et laisse supposer de meilleures sensibilités de l'analyse.

### 2.1.2 Fragmentation

Les estrogènes non dérivés se fragmentent très peu (Figure 40). En revanche, les estrogènes dansylés se fragmentent facilement pour donner un ion produit de masse 171 uma correspondant au 5-(diméthylamino)-naphtalène (Figure 38 page 111). La dérivation permet ainsi de favoriser la fragmentation des estrogènes, permettant la détermination d'intenses transitions MRM (Figure 40).

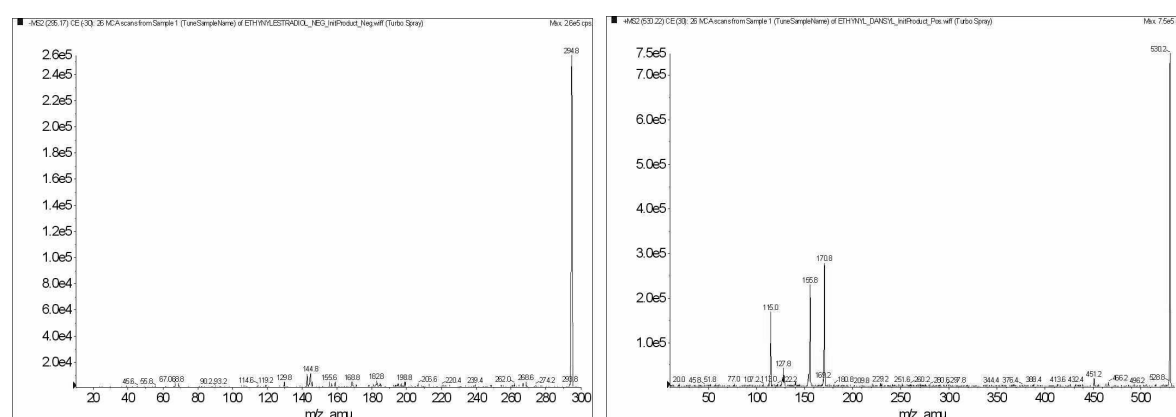


Figure 40: Spectres de fragmentation de l'éthinylestradiol non dérivé (à gauche) et de l'éthinylestradiol dansylé à droite

### 2.1.3 Sensibilité

Les limites de détection ont été déterminées pour l'analyse des estrogènes non dérivés en mode SIM et des estrogènes dansylés en mode MRM (Tableau 40). Le mode MRM est de façon général plus sensible que le mode SIM car un bruit de fond moins important est observé, permettant l'amélioration des rapports signal sur bruit. Toutefois, les résultats de cette étude ne laissent pas d'ambiguïté puisque l'analyse MRM des estrogènes dansylés conduit à des limites de détection 100 à 2 000 fois plus basses que les estrogènes non dérivés en mode SIM.

Tableau 40: Limites de détection des estrogènes et des estrogènes dansylés en mode SIM et MRM respectivement ( $V_{inj} = 20 \mu L$ )

| molécule                | E1     | E2    | E3     | EE2    |
|-------------------------|--------|-------|--------|--------|
| Estrogène (SIM)         | 2 ppm  | 5 ppm | 5 ppm  | 10 ppm |
| Estrogène dansylé (MRM) | 10 ppt | 5 ppt | 50 ppt | 5 ppt  |

### 2.1.4 Conclusions

Ces premiers essais ont montré que, conformément à ce qui avait été postulé, la dansylation des estrogènes permet un gain important en terme de sensibilité grâce à l'introduction d'une fonction facilement ionisable. Cette dérivation facilite également la détection en mode MRM puisque les estrogènes dérivés se fragmentent facilement pour conduire à des transitions MRM intenses. Toutefois, du fait du manque de spécificité de ces transitions, il est nécessaire de développer une méthode d'extraction permettant de bonnes purifications. Le développement d'un protocole de dérivation directement sur le support SPE s'avère intéressant puisqu'il permet une manipulation moindre des échantillons. Ceci limiterait alors les erreurs liées à la manipulation d'échantillon qui sont susceptibles de diminuer la répétabilité et la précision du protocole d'analyse.

## 2.2 Méthode d'extraction hors ligne

### 2.2.1 Principe

Afin de dériver les estrogènes directement sur le support, deux stratégies peuvent être envisagées.

La première consiste à saturer la cartouche par le chlorure de dansyle, en milieu tamponné, puis à déposer la solution d'estrogènes. Des étapes de lavage pour éliminer l'excès de réactif de dérivation et les impuretés apolaires suivies d'une élution peuvent alors être réalisées. Cette stratégie ne permet pas la purification préalable de la matrice et le chlorure de dansyle est susceptible de réagir sur d'autres molécules présentant des fonctions phénol ou amine.

La seconde stratégie consiste à déposer l'échantillon après avoir conditionné la cartouche. Un premier lavage peut ensuite être réalisé pour purifier la matrice. Cette purification permet d'éluer les interférents plus polaires que l'analyte. En particulier, certains composés présentant des fonctions phénol ou amine, susceptibles d'entrer en compétition avec l'analyte lors de la réaction de dérivation, peuvent ainsi être élués de la cartouche. Ce premier lavage permet ainsi d'augmenter la spécificité de la dérivation sur les estrogènes. Le réactif de dérivation est ensuite percolé sur la cartouche. Un second lavage permet alors l'élimination de l'excès de réactif de dérivation et des impuretés. Les estrogènes sont ensuite élués.

Ces deux stratégies permettent l'extraction des estrogènes dans l'eau ultra pure. Toutefois étant donnés les avantages soulignés ci-dessus pour la seconde approche, seul le développement d'une méthode consistant à fixer les estrogènes sur la cartouche puis à les dériver sera présenté. Ces premiers essais sont réalisés en utilisant comme support d'extraction des cartouches Oasis HLB.

### 2.2.2 Influence du dépôt et du premier lavage

Pour l'étude de cette première étape, les estrogènes ne sont pas dérivés, les analyses ont donc été réalisées par LC/MS selon le protocole présenté en partie 1.3.2.1 page 113.

Après avoir conditionné la cartouche, une solution aqueuse d'estrogène a été déposée. Il a tout d'abord été vérifié que les estrogènes restent fixés au support SPE au cours de cette étape. L'absence d'estrogènes dans les éluats obtenus au cours du dépôt montre effectivement que la totalité des molécules reste fixée sur la cartouche.

L'objectif de cette étude est de déterminer les conditions permettant l'élimination du maximum d'interférents tout en maintenant les estrogènes fixés sur la cartouche, afin de déterminer les conditions de lavage optimales.

L'influence du volume et de la composition de mélanges eau/MeOH sur l'élution des estrogènes a été évaluée. Le mélange hydro-organique utilisé doit contenir le maximum de méthanol pour éluer le maximum d'impuretés tout en laissant les estrogènes sur la cartouche. Des pourcentages de méthanol compris entre 10 et 100 % ont été testés. Le volume de lavage est étudié en effectuant cinq éluutions successives avec 1 mL de mélange hydro-organique. Les résultats obtenus sont présentés Figure 41.

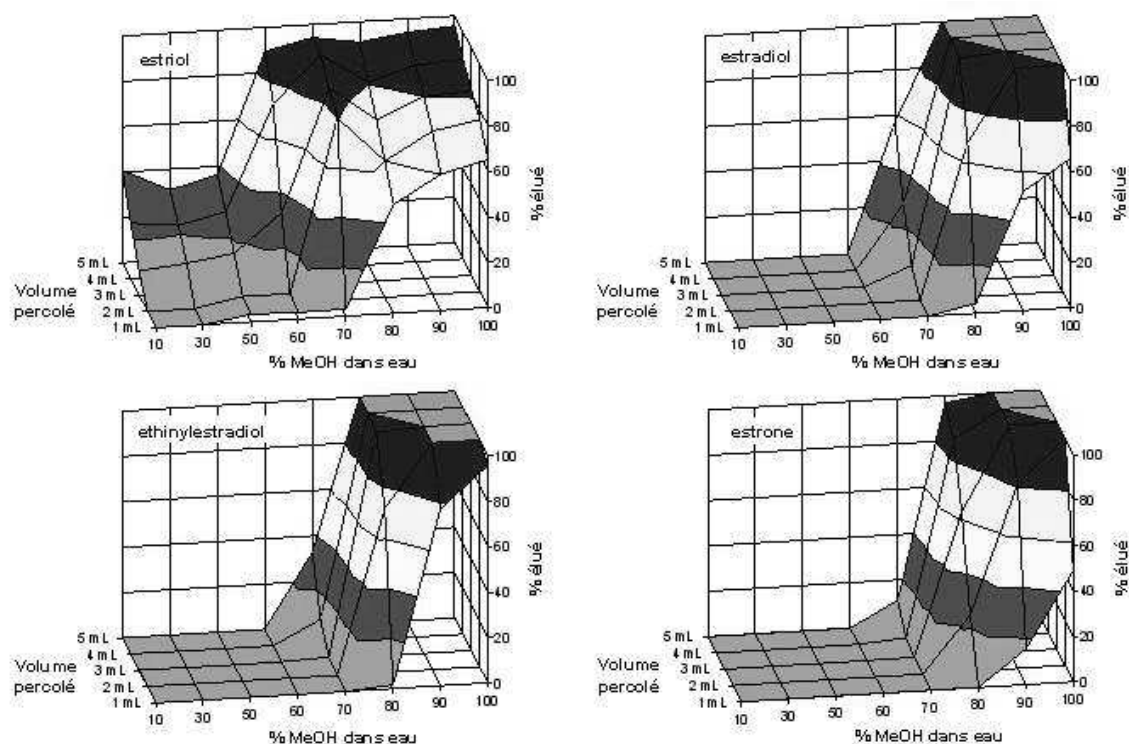


Figure 41: Etude du volume et de la composition de mélanges eau/MeOH sur l'élution des estrogènes

Ces graphes montrent que pour l'estradiol, l'éthinylestradiol et l'estrone, le lavage peut être effectué avec 60 % de méthanol et un volume de 5 mL sans risque d'élution des composés. En revanche,



l'estriol est élué dès que le volume de solvant utilisé dépasse 2 mL, y compris pour une composition de 10 % en méthanol. L'estriol est effectivement beaucoup plus polaire que les trois autres composés étudiés avec un logP de 2,9 contre 4,5 pour l'éthinylestradiol (voir Tableau 7, page 26). Le volume de lavage doit donc être limité à 1 mL de mélange eau/MeOH (60/40, v/v) pour ne pas élué les analytes au cours de cette première purification.

### 2.2.3 Dérivation sur support

Pour dériver les estrogènes, il est nécessaire de travailler en milieu basique (tampon carbonate par exemple). Cependant, le chlorure de dansyle n'est soluble que dans des solvants organiques (acétone, méthanol). Un protocole de dérivation, publié par Anari *et al.* [136] propose de diluer une solution d'estrogènes dans un tampon carbonate ; une solution de chlorure de dansyle à 1 g/L dans l'acétone est ensuite ajoutée au milieu réactionnel. Pour effectuer la dérivation sur support, il est donc nécessaire de percoler un mélange tampon carbonate/solution de chlorure de dansyle sur la cartouche. Ce mélange étant susceptible d'élué prématurément les estrogènes du fait de la force éluante de l'acétone, l'influence du volume et de la composition du mélange de dérivation a été évaluée selon un procédé similaire à celui mis en place pour la détermination de la composition du premier lavage. Les résultats obtenus sont présentés Figure 42.

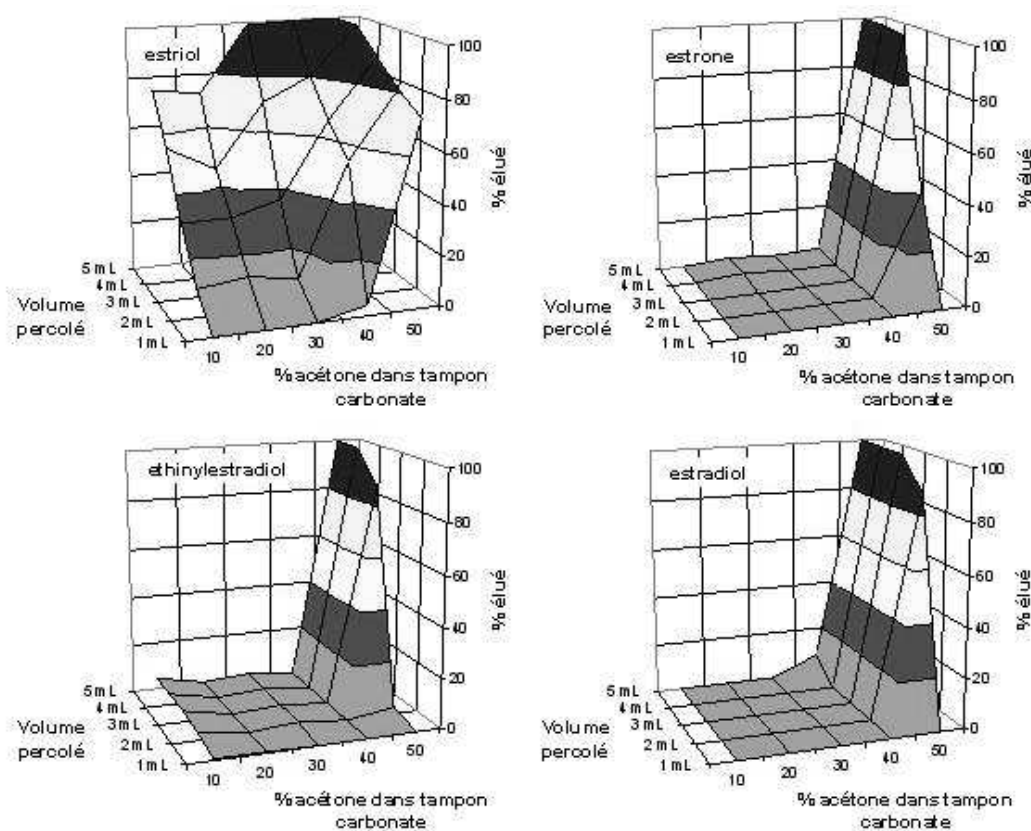


Figure 42: Influence de la composition du mélange de dérivation (acétone/tampon carbonate) sur l'éluion des estrogènes

Ces graphes montrent que l'estradiol, l'estrone et l'éthinylestradiol restent fixés sur la cartouche jusqu'à des teneurs de 40 % d'acétone. Comme précédemment, la molécule d'estriol est le composé limitant du fait de sa plus grande polarité. Toutefois, afin de maintenir une dérivation satisfaisante sur l'ensemble des molécules, les conditions retenues sont d'utiliser 3 mL de mélange tampon carbonate/solution de chlorure de dansyle dans l'acétone (70/30, v/v). Cependant, dans ces conditions un quart de l'estriol est élué. Les rendements d'extraction/dérivation seront donc plus faibles pour cette molécule.

### 2.2.4 Influence du second lavage

Un second lavage est nécessaire afin d'éliminer l'excès de réactif de dérivation. Par ailleurs, les estrogènes dérivés étant moins polaires que les molécules initiales, ce second lavage permet de supprimer davantage d'impuretés. Pour fixer les paramètres de ce lavage, des estrogènes préalablement dérivés par le chlorure de dansyle en milieu basique sont déposés sur la cartouche. Après s'être assuré que les éluats de charge ne contenaient pas d'analyte, l'influence du volume et de la composition de mélanges eau/MeOH sur l'élution des estrogènes dérivés a été évaluée. Un protocole similaire à celui développé pour les deux précédentes étapes est ici appliqué. Les résultats obtenus sont présentés Figure 43.

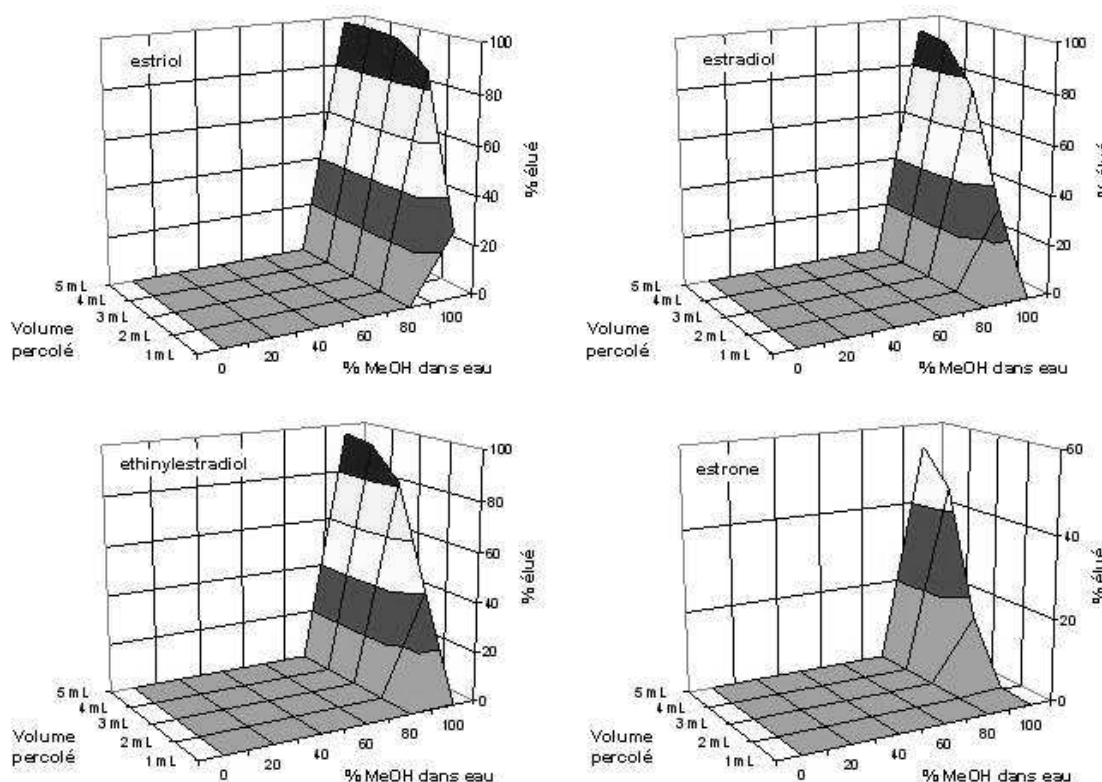


Figure 43: Etude du volume et de la composition de mélanges eau/MeOH sur l'élution des estrogènes dansylés

La dérivation des estrogènes augmentant leur hydrophobicité, des mélanges hydro-organiques de plus fort pouvoir éluant peuvent être utilisés pour le second lavage. Les impuretés plus hydrophobes que les estrogènes non dérivés, n'ayant donc pas pu être éliminées au cours du premier lavage, mais plus hydrophiles que les estrogènes dansylés sont ainsi éluées de la cartouche SPE.

Les graphes présentés Figure 43 montrent que d'importants pourcentages de MeOH peuvent être utilisés sans risque d'élution des estrogènes dérivés. En effet, il est possible d'utiliser 5 mL de mélange eau/MeOH (20/80, v/v) sans éluer les estrogènes de la cartouche SPE.

### 2.2.5 Elution des estrogènes

Les résultats présentés Figure 43 montrent qu'une élution par 5 mL de MeOH ne permet pas une récupération satisfaisante de l'estrone. Dans ces conditions d'élution, on observe effectivement un faible rendement d'extraction de l'estrone (54%). L'acétonitrile acidifié par 0,1% d'acide formique, de plus grand pouvoir éluant, a donc été utilisé. L'acidification permet la protonation de la fonction amine greffée aux estrogènes afin de les rendre plus hydrophiles, donc plus facilement décrochantes du support SPE. L'influence du volume d'acétonitrile acidifié sur l'élution des estrogènes est présentée Figure 44.

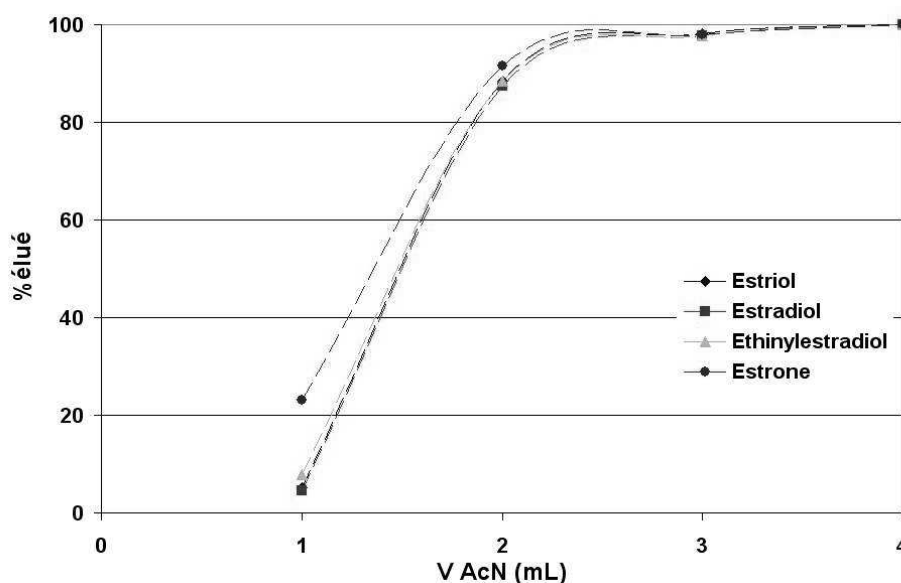


Figure 44: Influence du volume (mL) d'AcN, 0,1% FOA sur l'élution des estrogènes dansylés

Cette étude montre que 2 mL d'AcN, 0,1% FOA doivent au minimum être utilisés pour éluer de façon satisfaisante les analytes, c'est-à-dire pour obtenir des rendements d'extraction supérieurs à 80%. Afin d'obtenir un meilleur facteur de préconcentration, les éluats sont évaporés à sec sous flux d'azote. La reprise de l'extrait sec est effectuée dans un mélange hydro-organique moins éluant que la phase mobile chromatographique afin d'éviter un élargissement du créneau d'injection, donc des pics

chromatographiques, qui pourrait conduire à une diminution de sensibilité. Les extraits sont repris par 1 mL de mélange eau/AcN (50/50, v/v).

### 2.2.6 Bilan

Cette étude a montré qu'il est possible de dériver les estrogènes directement sur le support d'extraction SPE. Le protocole développé est synthétisé Tableau 41.

**Tableau 41: Protocole d'extraction/dérivation des estrogènes sur support Oasis HLB**

| Étape           | Conditions                                | Remarques                                                      |
|-----------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| Conditionnement | 1 mL de MeOH puis 1 mL d'eau              | Préparation de la cartouche pour recevoir l'échantillon        |
| Charge          | 1 mL d'échantillon dopé                   | Fixation des estrogènes sur la cartouche                       |
| Lavage 1        | 1 mL eau/MeOH 40/60, v/v                  | Elution des impuretés plus polaires que les estrogènes         |
| Dérivation      | 3mL sol. DnCl/tampon carbonate 30/70, v/v | Dérivation des estrogènes sur le support SPE                   |
| Lavage 2        | 1 mL eau/MeOH 20/80, v/v                  | Elution des impuretés plus polaires que les estrogènes dérivés |
| Elution         | 3 mL AcN, 0,1%FOA                         | Récupération des estrogènes dérivés                            |

Les rendements d'extraction/dérivation obtenus par ce protocole sont évalués en comparant les teneurs détectées dans les extraits SPE aux teneurs obtenues lors d'une dérivation en solution. Ils sont présentés Tableau 42.

**Tableau 42: Rendements d'extraction/dérivations des estrogènes**

|               | E1   | E2   | E3   | EE2  |
|---------------|------|------|------|------|
| Rendement (%) | 74,0 | 75,7 | 66,2 | 76,6 |
| CV (%)        | 5,6  | 6,0  | 30,3 | 1,0  |

Cette procédure d'extraction est répétable, avec des CV sur les rendements inférieurs à 10 % pour l'estrone, l'estradiol et l'éthinylestradiol. L'estriol conduit à un rendement d'extraction plus faible car il est partiellement élué au cours des différentes étapes de la SPE, en particulier lors de la dérivation. Par ailleurs, l'extraction de l'estriol est moins répétable avec un CV de 30% sur le rendement.

Cette étude a ainsi montré la faisabilité d'une méthode SPE/dérivation/LC/MS/MS en ligne pour l'analyse des estrogènes dans les matrices environnementales.

### 2.3 Méthode en ligne

L'automatisation complète de la procédure d'extraction/dérivation/analyse, permet d'injecter la totalité de l'échantillon extrait sur la colonne chromatographique, d'où une meilleure sensibilité, qui autorise une diminution de la prise d'essai, et par conséquent réduit le temps de préparation d'échantillon. Elle permet en outre d'atteindre d'excellentes répétabilités en minimisant les erreurs liées à la manipulation d'échantillon.

Une méthode a précédemment été développée pour l'extraction/dérivation hors ligne des estrogènes sur des cartouches Oasis HLB. Toutefois, ce protocole ne peut pas être directement transcrit pour une procédure en ligne. En effet la SPE en ligne est un système dynamique où le support d'extraction est continuellement traversé par un flux de mélange éluant, alors que la SPE hors ligne est un système statique soumis à un flux discontinu de mélange éluant. Le développement d'une méthode en ligne nécessite donc une étude qui lui est propre, et chaque étape du protocole doit être réoptimisée.

Ainsi cette partie s'attachera à présenter les différentes étapes du développement d'une méthode totalement automatisée permettant l'extraction/dérivation/LC/MS/MS en ligne de résidus d'estrogènes dans les matrices environnementales. Ce développement devrait permettre une réduction des prises d'essai à seulement 1 mL.

#### 2.3.1 Dispositif instrumental

Le montage présenté Figure 45 est utilisé pour le développement du protocole en ligne.

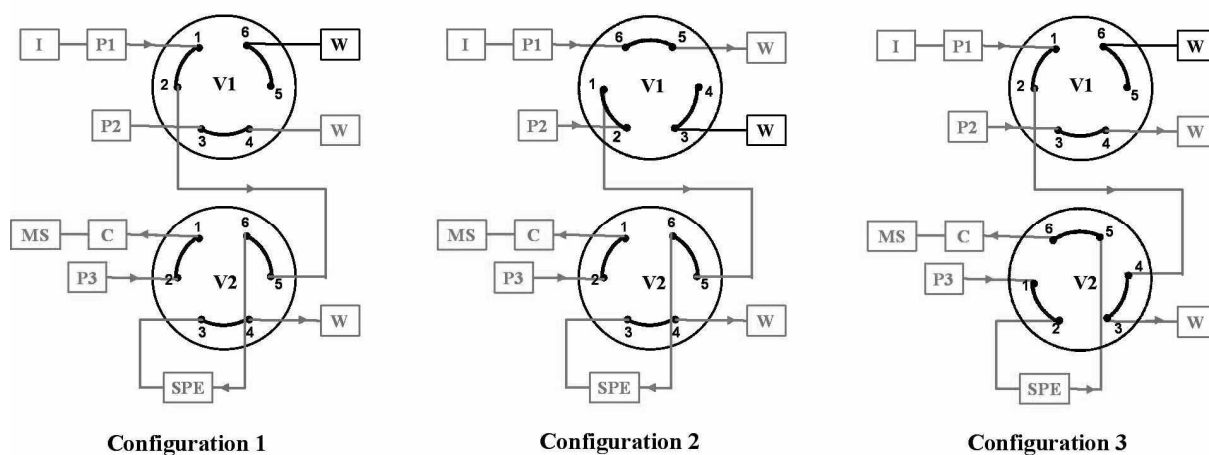


Figure 45: Dispositif d'extraction en ligne couplé à la LC/MS/MS

Deux vannes V1 et V2 sont utilisées. L'injecteur I du chromatographe permet l'introduction de l'échantillon sur la cartouche SPE. La pompe binaire P1 du chromatographe est utilisée pour réaliser les différentes étapes de lavage eau/MeOH. Une pompe binaire P2 permet l'introduction du mélange de dérivation tampon carbonate/solution de chlorure de dansyle. Enfin, une pompe P3 permet le passage de la phase mobile eau/AcN (20/80, v/v) 0,1% FOA vers la colonne chromatographique

connectée au spectromètre de masse MS. Ainsi en commutant de façon appropriée chaque vanne, les différentes étapes d'extraction sur phase solide peuvent être réalisées.

Dans cette configuration chaque étape de la procédure d'extraction doit être réoptimisée. Le débit utilisé pour chacune de ces étapes est fixé à 1 mL/min.

### 2.3.2 Choix du support d'extraction

Quatre supports d'extraction en ligne ont été testés. Ces colonnes ainsi que leurs caractéristiques sont présentées Tableau 43.

**Tableau 43: Caractéristiques des colonnes d'extraction testées**

| Colonne SPE | nature                  | Taille des pores (Å) | Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g) | Diamètre des particules (µm) | Géométrie   |
|-------------|-------------------------|----------------------|----------------------------------------|------------------------------|-------------|
| Oasis MAX   | PDVB-N-VP<br>alkylamine | 80                   | 810                                    | 30                           | 20 x 2,1 mm |
| Oasis HLB   | PDVB-N-VP               | 80                   | 810                                    | 25                           | 20 x 2,1 mm |
| Atoll XWP   | PS-DVB                  | n.c.                 | 1200                                   | 90                           | 15 x 2,1 mm |
| Atoll XC    | PS-DVB                  | n.c.                 | 1500                                   | 70                           | 15 x 2,1 mm |

PDVB-N-VP : poly-(divinylbenzène-N-vinylpyrrolidone)

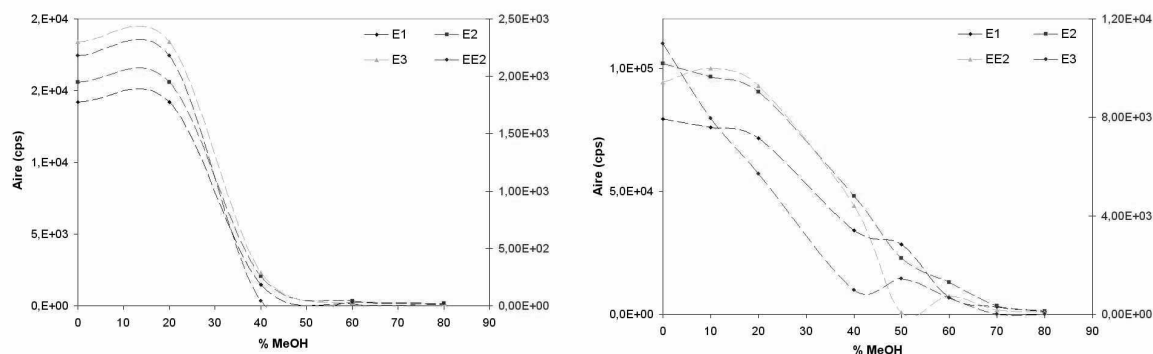
PS-DVB : poly-(styrène-divinylbenzène)

n.c. : non communiqué

Les cartouches MAX sont des supports échangeurs mixtes anioniques. Ces phases sont constituées d'un copolymère poly(divinylbenzène-n-vinylpyrrolidone) (Figure 39) où des fonctions alkylamine substituent les noyaux benzéniques. Ce support permet la rétention de molécules apolaires selon un mécanisme de partage et d'anions selon un mécanisme d'échange d'ions. Les tests de faisabilité ayant montré la mauvaise rétention de l'estriol sur les supports apolaires, la mise en jeu d'interactions ioniques pourrait potentiellement permettre une meilleure rétention de l'estriol.

Dans l'hypothèse d'une rétention des estrogènes par interactions ioniques, l'utilisation de mélanges éluants basifiés devrait favoriser la formation du phénolate, donc la rétention par échange ionique. Ceci permettrait alors un lavage avec de plus grandes teneurs de MeOH. L'influence du pourcentage de MeOH dans des mélanges hydro-organiques basifiés ou non a été étudiée. Les résultats présentés Figure 46 montrent que le même comportement est observé pour les analytes lorsqu'un lavage est réalisé en milieu neutre ou basique. Les analytes sont élués par un lavage à 20% de MeOH ou plus. On constate toutefois que 40% de MeOH suffisent à éluer totalement les estrogènes de la cartouche en

milieu neutre, alors que 70% de MeOH sont nécessaires en milieu basique. Ces résultats peuvent s'expliquer par la mise en jeu d'interactions secondaires de type ionique.



**Figure 46: Influence de la teneur en MeOH sur l'élution des estrogènes sur une colonne d'extraction Oasis MAX, en mélange avec l'eau (à gauche) ou une solution d'ammoniaque (à droite)**

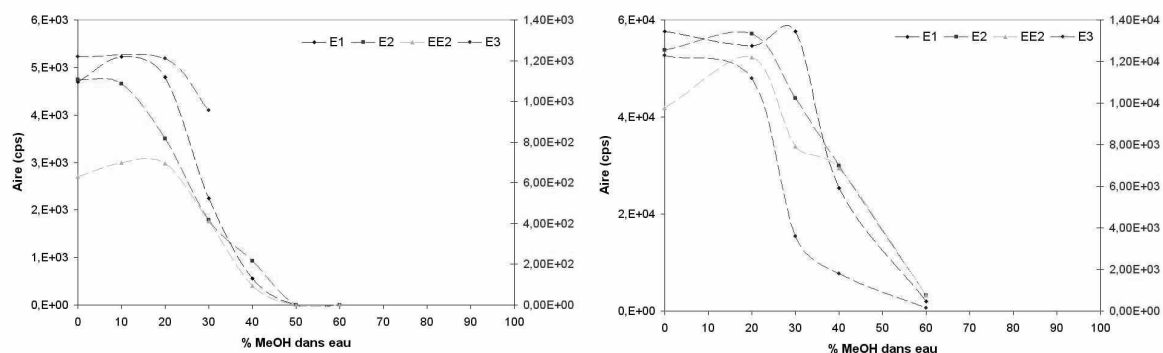
Ces tests infirment donc l'hypothèse d'une rétention par échange ionique. Ces interactions n'étant pas mises en jeux de façon prédominante, l'utilisation d'un support Oasis MAX ne présente pas d'intérêt par rapport aux supports mettant en jeu des interactions hydrophobes.

Les 3 autres supports testés sont des phases polymères apolaires qui diffèrent par leur structure (Oasis et Atoll) ou leur réticulation (Atoll XC ou XWP).

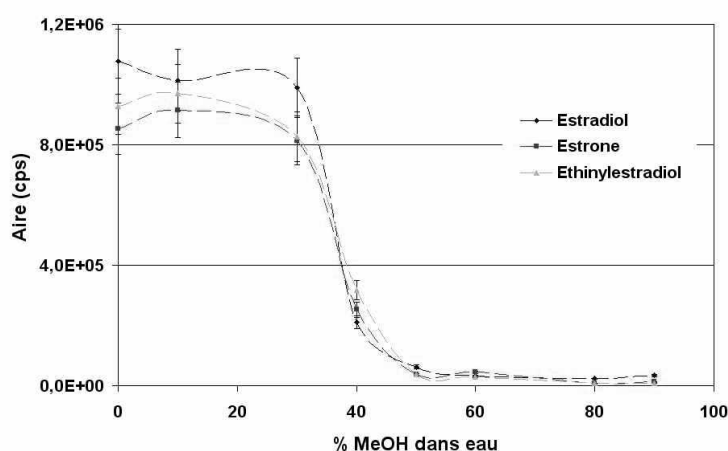
Le support Oasis HLB est disponible commercialement sous forme de colonnes d'extraction en ligne. Cette phase stationnaire a déjà montré de bons résultats pour l'extraction/dérivation sur support des estrogènes dans une configuration de cartouche hors-ligne (résultats présentés dans la partie 2.2 page 117). Il est alors intéressant d'évaluer les performances de ce support pour une procédure en ligne.

Deux autres supports (Atoll) ont également été testés. Ces supports se sont avérés intéressants pour la rétention d'autres composés (capécitabine et ses métabolites par exemple) [185]. La société Interchim s'est donc proposée de nous remplir des cartouches d'extraction en ligne pour évaluer ces supports.

L'influence de la teneur en MeOH sur l'élution des estrogènes a été évaluée pour ces trois supports. Les résultats obtenus sont présentés Figure 47 pour les supports Atoll et Figure 48 pour le support Oasis HLB.



**Figure 47: Influence de la teneur en MeOH sur l'élution des estrogènes avec un support Atoll XC (à droite) et Atoll XWP (à gauche) ; (D = 1mL/min, t = 2,6min)**



**Figure 48: Influence du pourcentage de MeOH sur l'élution des estrogènes avec une colonne d'extraction Oasis HLB et détermination de la composition pour le premier lavage (D = 1mL/min, t = 2,6min)**

Les supports Atoll XC et XWP ne permettent la rétention des estrogènes que jusqu'à des teneurs de 20% de MeOH dans le mélange hydro-organique percolé. Le support Oasis HLB est plus rétentif vis-à-vis de ces composés car 30% de MeOH peuvent être utilisés sans décrocher les estrogènes.

L'estriol reste toutefois problématique, du fait de sa polarité très supérieure aux autres estrogènes analysés. Quelle que soit la surface spécifique du support, la mauvaise rétention de cette molécule ne permet pas son analyse en ligne.

Par ailleurs, l'utilisation des supports Atoll (XC et XWP) conduit à des pics chromatographiques dissymétriques et très larges (plusieurs minutes). Il semble donc difficile de développer une méthode d'analyse robuste à partir de ces colonnes d'extraction. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le diamètre de particule élevé des supports Atoll (Tableau 43). L'augmentation de la granulométrie conduit effectivement à une plus grande diffusion des analytes dans la cartouche, générant ainsi une perte d'efficacité sur la méthode globale, avec d'importants phénomènes de dispersions externes.

Le support Oasis HLB a donc été finalement retenu.



### 2.3.3 Influence du premier lavage

Les vannes sont positionnées dans la configuration 1 (Figure 45) afin de permettre le conditionnement de la cartouche SPE par du MeOH puis de l'eau, et la charge de l'échantillon depuis l'injecteur. Une étape de lavage par des mélanges eau/MeOH peut également avoir lieu. Ce lavage permet d'éliminer les impuretés plus hydrophiles que les estrogènes et de gagner ainsi en spécificité sur l'étape de dérivation. L'influence du pourcentage de MeOH sur la rétention des estrogènes a été étudiée (Figure 47) en percolant 2,6 mL de mélanges MeOH/eau à un débit de 1 mL/min.

Pour cette étape, il est possible d'utiliser jusqu'à 30% de MeOH sans risque d'élution des estrogènes.

### 2.3.4 Dérivation

Pour réaliser l'étape de dérivation la vanne V1 est commutée, le système est alors dans la configuration 2 (Figure 45) permettant l'introduction du mélange de dérivation sur la cartouche SPE.

Pour s'assurer de la bonne reproductibilité et efficacité de la dérivation, un excès de réactif de dérivation doit être utilisé. L'acétone s'est avérée être un solvant trop éluant pour maintenir les estrogènes fixés sur le support SPE au cours de la dérivation. Il n'a donc pas été utilisé comme solvant de préparation de la solution de chlorure de dansyle, conformément au protocole proposé par Anari *et al.* [136]. Toutefois, le chlorure de dansyle n'est pas suffisamment soluble dans d'autres solvants organiques pour atteindre une concentration de 1 g/L. L'utilisation d'un autre solvant implique donc de travailler à de plus faibles concentrations de réactif de dérivation. Toutefois, ceci ne doit pas affecter le rendement de la dérivation. L'effet de la concentration en réactif dérivant a donc été étudiée (Figure 49).

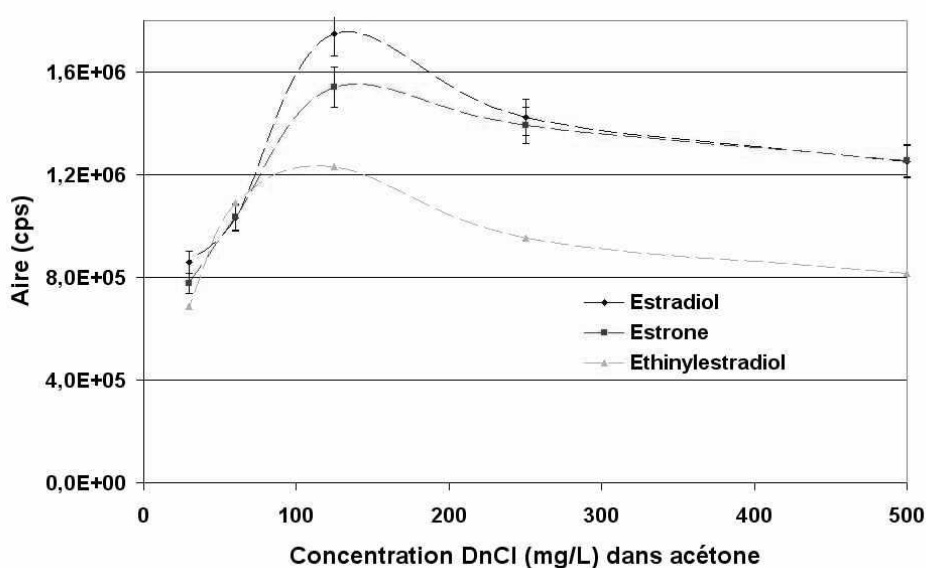
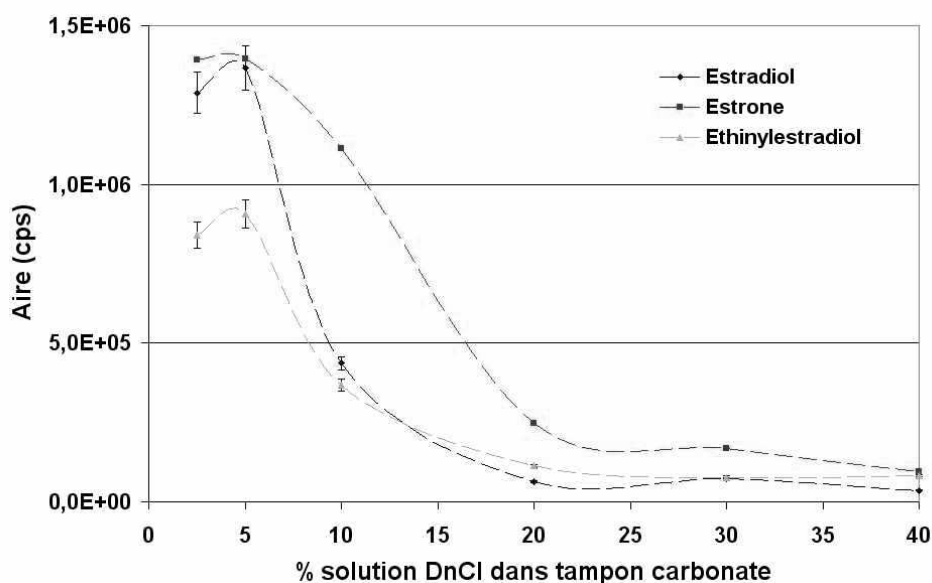


Figure 49: Effet de la concentration en chlorure de dansyle sur la dérivation des estrogènes

Une rapide augmentation de la réponse des 3 estrogènes dérivés est observée entre 30 et 150 mg/L puis une stabilisation. Ainsi, une concentration de 150 mg/L est suffisante pour réaliser la dérivation des estrogènes. A cette concentration, le chlorure de dansyle est soluble dans un plus large panel de solvants. Des tests ont été réalisés avec du MeOH ou de l'AcN. Les meilleurs résultats ayant été obtenus avec le MeOH ce solvant a finalement été retenu.

Comme pour le protocole hors-ligne, l'influence du pourcentage de solution de chlorure de dansyle sur l'élution des estrogènes a été évaluée. Il apparaît qu'au-delà de 5% de solution dérivante dans le tampon carbonate, une perte de signal est observée montrant que les estrogènes sont élués de la cartouche d'extraction (Figure 50).



**Figure 50: Influence de la composition du mélange de dérivation sur l'élution des estrogènes**

L'influence du temps de dérivation a été étudié entre 2 et 10 min (Figure 51). Il est intéressant de noter que la dérivation des estrogènes est très rapide. On constate qu'entre 2 et 4 min de dérivation, le signal des estrogènes est doublé, et qu'au-delà de 4 min aucune amélioration n'est apportée. Ce temps de dérivation a donc été choisi afin de permettre un rendement de dérivation maximal en un temps minimal.

Contrairement aux cartouches d'extraction hors-ligne, les cartouches en ligne peuvent être chauffées dans un four chromatographique, permettant le contrôle de la température du milieu. L'influence de la température sur l'efficacité de la dérivation a donc été étudiée (Figure 52). Il s'est avéré qu'un chauffage doux permet d'améliorer le rendement de dérivation. Toutefois, au delà de 40°C aucune amélioration n'est apportée. Cette température a donc été retenue afin de faciliter la dérivation des estrogènes et de s'affranchir d'éventuels problèmes de thermolabilité qui peuvent survenir lors de chauffages trop importants.

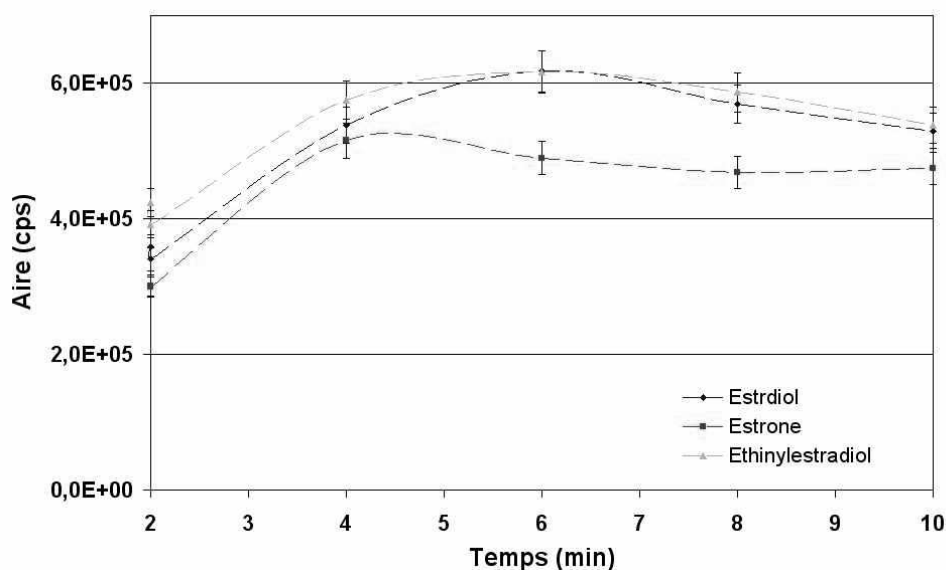


Figure 51: Influence du temps de dérivation

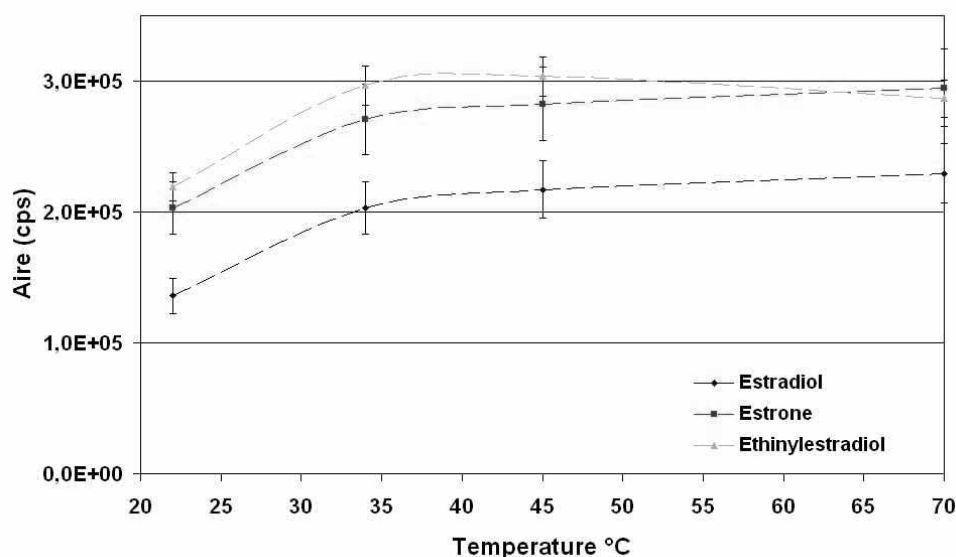


Figure 52: Influence de la température sur la dérivation des estrogènes

### 2.3.5 Influence du deuxième lavage

La vanne V1 est commutée de façon à revenir dans la configuration 1 (Figure 45, page 123) permettant de réaliser des lavages eau/MeOH.

Cette étape vise à éliminer l'excès de réactif de dérivation ainsi que les impuretés plus hydrophiles que les estrogènes dansylés.

L'influence du pourcentage de MeOH utilisé au cours de ce second lavage sur la rétention des estrogènes est présentée Figure 53

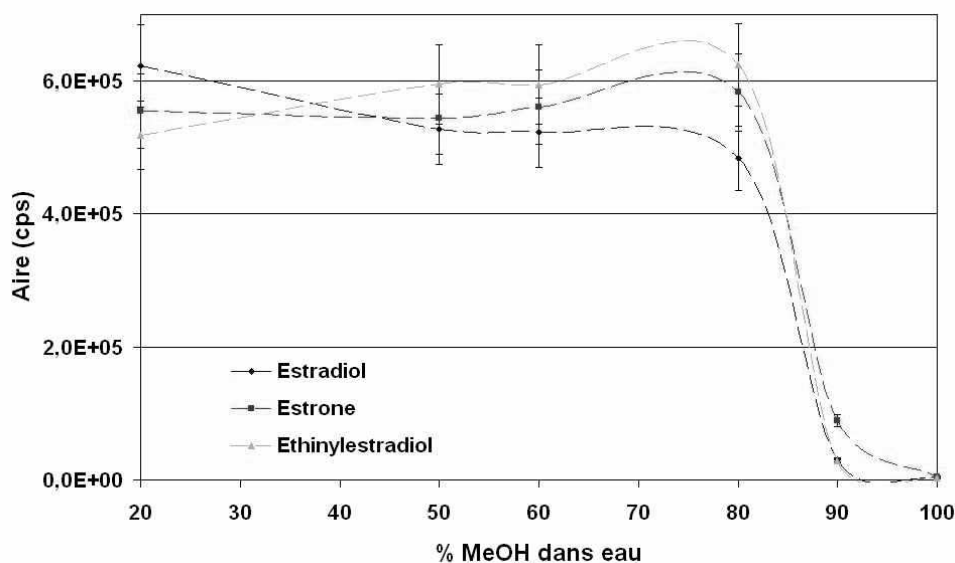


Figure 53: Influence du pourcentage de MeOH sur la rétention des estrogènes au cours du second lavage

Cette étude montre qu'il est possible de laver la cartouche avec des mélanges hydro-organiques pouvant atteindre 80% de MeOH sans risque d'élution des estrogènes dérivés. La dérivation par le chlorure de dansyle diminue la polarité des estrogènes. Les molécules dansylées peuvent alors rester fixées sur la cartouche pour de fortes teneurs en solvant organique. Ainsi une importante purification a lieu puisque cela permet d'éluer la majorité des interférents polaires de la cartouche.

### 2.3.6 Elution

La vanne V2 est commutée (configuration 3, Figure 45). Les estrogènes sont alors élués en sens inverse de la charge par la phase mobile chromatographique, ce qui permet de limiter les phénomènes de dispersion externe. Le chromatogramme résultant est présenté Figure 54.

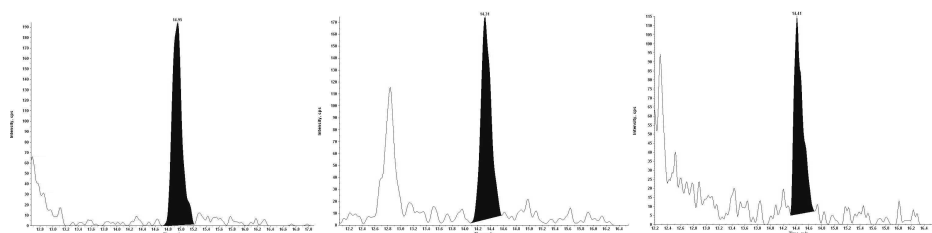


Figure 54: Chromatogramme LC/MS/MS d'un échantillon dopé à 2ng/L (à gauche : estrone, au centre : estradiol, à droite : éthinylestradiol)

### 2.3.7 Conclusions

Cette étude a permis d'établir un protocole d'extraction/dérivation/LC/MS/MS en ligne. Le temps total d'analyse (extraction, dérivation, analyse) n'est que de 17 min, ce qui est beaucoup plus rapide que les méthodes proposées dans la littérature.

Le protocole final est synthétisé Tableau 44.

**Tableau 44: Séquence de la procédure SPE/dérivation/LC/MS/MS en ligne**

| Temps<br>(min) | description                     | position des<br>vannes |            | composition de<br>solvant (P1)<br>eau/MeOH (v/v) |
|----------------|---------------------------------|------------------------|------------|--------------------------------------------------|
|                |                                 | vanne<br>1             | vanne<br>2 |                                                  |
| 0              | injection de l'échantillon      | 1                      | 1          | 100/0                                            |
| 0,3            | injection de l'échantillon      | 1                      | 1          | 100/0                                            |
| 0,4            | lavage 1                        | 1                      | 1          | 80/20                                            |
| 3              | dérivation                      | 2                      | 1          | 80/20                                            |
| 3,5            | préparation du lavage 2         | 2                      | 1          | 50/50                                            |
| 7              | lavage 2                        | 1                      | 1          | 50/50                                            |
| 10             | élution des estrogènes dansylés | 1                      | 2          | 50/50                                            |
| 10,1           | rinçage de la cartouche         | 1                      | 2          | 0/100                                            |
| 12             | rinçage de la cartouche         | 1                      | 2          | 0/100                                            |
| 13             | conditionnement                 | 1                      | 1          | 100/0                                            |

Il est intéressant de noter qu'au cours de l'extraction, la colonne chromatographique est court-circuitée, ce qui permet de réaliser le conditionnement de la colonne pendant l'extraction des analytes (configurations 1 et 2, Figure 45).

Pour ce développement chaque paramètre a été étudié de façon indépendante. Il pourrait être intéressant d'optimiser ce protocole par une étude chimiométrique, ceci permettrait notamment de s'intéresser à l'influence du débit sur les différentes étapes de l'extraction, qui n'a pas été étudié ici. En outre, cette approche permettrait de prendre en compte les interactions entre différents paramètres, par exemple entre le temps de dérivation et la température du milieu réactionnel.

### 3 Performances de la méthode

#### 3.1 Effet matrice

Lors du développement de méthodes d'analyse en LC/MS/MS, il est important de considérer l'effet matrice. Certains composants de la matrice peuvent être co-élus avec les analytes et générer une augmentation ou une suppression artificielle du signal (voir Chapitre 1, partie 3.1.4.1.4, page 36). De ce fait, l'effet matrice peut affecter la répétabilité et la précision de la méthode. Le meilleur moyen de contrecarrer l'effet matrice est d'utiliser comme standard interne les molécules deutérées correspondant aux analytes. Bien que ces standards soient utilisés dans ce protocole, l'effet matrice a été estimé. Pour évaluer ce phénomène, les aires résultant de l'analyse de solutions standard d'estrogènes dans des solvants purs ( $A_{STD}$ ) sont comparées à celles d'influents de STEP dopés ( $A_{Mat}$ ). L'effet matrice est alors calculé selon l'équation :

$$Effet\ Matrice = \left( \frac{A_{Mat} - A_i}{A_{STD}} - 1 \right) \times 100$$

Une valeur de 0% indique qu'il n'y a pas d'effet matrice. Un effet d'augmentation de signal se traduit par une valeur positive et une suppression de signal par une valeur négative. L'effet matrice est déterminé en dopant des influents de STEP à 20 ng/L. Du fait de l'impossibilité d'obtenir des matrices blanches, le signal de la matrice non dopée ( $A_i$ ) est préalablement soustrait de  $A_{Mat}$ . Les valeurs obtenues sont présentées Tableau 45.

**Tableau 45: Effets matrice calculés pour les estrogènes**

| Molécule         | Effet Matrice |
|------------------|---------------|
| Estrone          | -12,1%        |
| Estradiol        | -0,8%         |
| Éthinylestradiol | 2,3%          |

Ces mesures sont révélatrices de l'efficacité de la purification puisque les mesures présentées Tableau 45 permettent de considérer qu'il n'y a pas d'effet matrice. Ainsi, le dosage d'échantillons environnementaux peut être réalisé par étalonnage externe et ne justifie pas l'utilisation de molécules marquées, généralement utilisées pour compenser l'effet matrice.

Néanmoins, il serait nécessaire de confirmer ces résultats sur différents lots de matrices environnementales, provenant de plusieurs STEP différant par la nature des eaux de rejet reçues et les traitements d'épuration appliqués. Cette vérification n'ayant pas été réalisée, il nous a alors paru prudent d'utiliser des molécules marquées pour le dosage en routine des estrogènes dans les eaux de STEP (Chapitre 4).

### **3.2 Rendement, reproductibilité et linéarité**

Des courbes d'étalonnage ont été construites en extrayant 1 mL d'eau pure dopée par les estrogènes. La linéarité est étudiée pour des concentrations variant de 1 à 400 ng/L.

**Tableau 46: Coefficients de corrélation des droites d'étalonnage ( $R^2$ ), limites de détection (LOD, ng/L), rendements et répétabilités des analyses en ligne d'estrogènes**

| Molécule         | $R^2$          | Rendement (%) | Précision (%) | LOD |
|------------------|----------------|---------------|---------------|-----|
| Estrone          | 0,999          | 79,7          | 5,1           | 0,4 |
| Estradiol        | 0,968 (0,989)* | 90,8          | 10,8          | 0,4 |
| Éthinylestradiol | 0,999          | 95,3          | 4,6           | 0,7 |

\* linéarité de 1 à 100 ng/L

Les coefficients de corrélation ( $R^2$ ) sont supérieurs à 0,99 (Tableau 46), ce qui démontre la relation de proportionnalité entre la quantité extraite et sa concentration dans l'échantillon, excepté pour l'estradiol. Pour ce composé, en présence de son standard interne, la linéarité n'est vérifiée que jusqu'à 100 ng/L. Cette limitation est liée à l'utilisation de l'isotope  $D_2$  comme standard interne. En effet, lorsque la concentration d'estradiol augmente, la concentration de l'isotope M+2 devient significative. Comme l'isotope M+2 de l'estradiol est détecté à la même transition MRM que le standard interne  $D_2$ , les deux signaux s'additionnent, ce qui explique la perte de linéarité aux fortes concentrations (Figure 55).

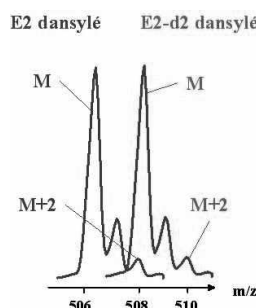


Figure 55: Contribution de l'isotope M+2 de l'estradiol (E2) dansylé au signal de l'E2-d2

La précision de la procédure est évaluée en injectant successivement 5 échantillons d'influent dopés à 10 ng/L. Les déviations standard observées varient entre 4,6 et 10,8%. Les limites de détection (rapport signal sur bruit de 3) et les rendements d'extraction sont présentés Tableau 46. Les rendements moyens des estrogènes sont compris entre 79 et 95%. Les limites de détection sont inférieures au ng/L ce qui est satisfaisant au vu des concentrations usuellement rencontrées dans l'environnement [30, 43, 186].

Les rendements d'extraction et la précision de la méthode ont été déterminés par une méthode d'étalonnage externe. De bons rendements d'extraction sont obtenus pour les 3 analytes (supérieurs à 80%). La précision de la méthode est également satisfaisante.

## 4 Conclusions

Une méthode d'analyse totalement automatisée, basée sur la SPE/dérivation/LC/ESI/MS/MS en ligne, a été développée pour la quantification d'estrogènes dans les matrices environnementales. Cette méthode présente une nette amélioration en terme de simplicité et de sensibilité, sur les méthodes publiées précédemment. Cette méthode nécessite un volume d'échantillon particulièrement faible (1 mL), ce qui conduit à un temps total d'analyse très court (17 min).

Ce protocole a été appliqué pour des analyses de routine sur les eaux de STEP de la région lyonnaise. Les résultats obtenus sont présentés Chapitre 4.





Chapitre □

Mesures de terrain



## Chapitre □ Mesures de terrain

Les études réalisées au niveau international démontrent la contamination des eaux environnementales (eaux de STEP en particulier) par des résidus de  $\beta$ -bloquants ou d'estrogènes. Cependant à ce jour, aucune étude n'est rapportée concernant l'occurrence des corticostéroïdes dans l'environnement. Les premiers essais réalisés dans le Chapitre 2 tendent toutefois à montrer que ces composés sont effectivement présents dans les eaux de STEP. Par ailleurs, le niveau de contamination des eaux de l'agglomération lyonnaise par des résidus de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes et estrogènes reste à déterminer.

Les méthodes d'analyse développées dans les chapitres 2 et 3 ont donc été appliquées à des échantillons provenant des STEP du Grand Lyon (influent et effluent). Les objectifs de cette étude sont multiples. Dans un premier temps, les concentrations mesurées sur ces échantillons seront comparées aux teneurs environnementales rapportées dans la littérature. Nous chercherons également à déterminer quels sont les composés déchargés de façon prépondérante dans l'agglomération lyonnaise et quels sont les points majeurs de contamination (STEP aux effluents les plus chargés). Enfin, l'efficacité d'épuration des STEP sera évaluée pour ces résidus pharmaceutiques.

Il faut souligner que les résultats présentés dans ce chapitre ne constituent qu'une première approche du suivi des résidus de  $\beta$ -bloquants, de corticostéroïdes et d'estrogènes dans les STEP. En effet, dans cette approche les métabolites conjugués ne sont pas pris en compte et la phase particulière n'est pas analysée. Les métabolites conjugués peuvent s'hydrolyser au cours des traitements épuratifs des STEP et libérer la molécule initiale. De ce fait les bilans de matière effectués entre les influents et les effluents peuvent s'en retrouver faussés. De plus les résidus pharmaceutiques sont susceptibles de s'adsorber sur les matières en suspension ce qui peut également occasionner des erreurs sur les bilans de matière.

## 1 Matériels et méthodes

### 1.1 Réactifs et solvants

Les réactifs et solvant utilisés pour l'analyse des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants dans les matrices environnementales, ainsi que les solutions mère ou de travail préparées sont présentés Chapitre 2 page 64. Pour l'analyse des estrogènes, ces données sont présentées Chapitre 3 page 110.

### 1.2 Echantillons environnementaux

#### 1.2.1 Stations d'épuration

Pour les mesures de terrain, nous nous sommes intéressés aux 5 plus grandes stations du Grand Lyon, c'est-à-dire aux STEP de plus grande capacité situées à Saint Fons, Pierre Bénite, Meyzieu, Fontaines s/ Saône et Neuville s/ Saône (Figure 56).

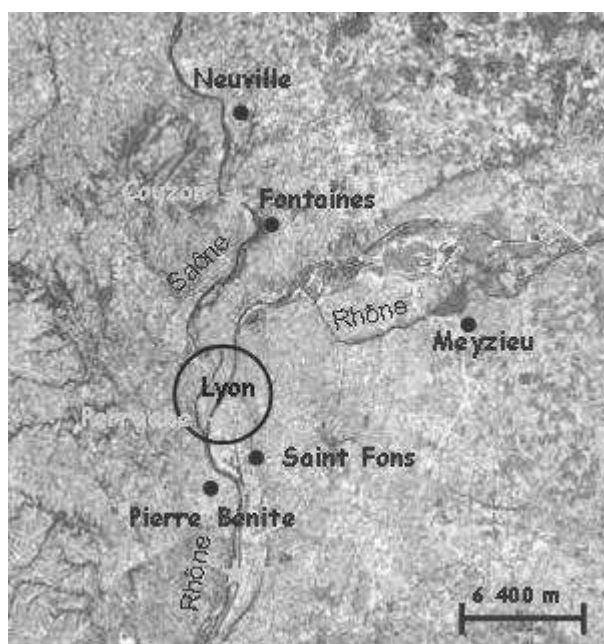


Figure 56: Emplacement géographique des STEP étudiées

Les caractéristiques de ces STEP sont présentées Tableau 47 [187].

**Tableau 47: Caractéristiques des 5 stations d'épuration du Grand Lyon étudiées**

| STEP<br>(abréviation)        | Equivalent<br>habitant* | Nombre<br>d'effluents<br>hospitaliers | Capacité<br>(m <sup>3</sup> /j) | Type de traitement                      |
|------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|
| Saint Fons<br>(S-F)          | 1 037 000               | 8                                     | 335 000                         | Prétraitements physiques                |
|                              |                         |                                       |                                 | Décantation primaire                    |
|                              |                         |                                       |                                 | Boues activées (moyenne charge)         |
|                              |                         |                                       |                                 | Filtres biologiques (1/4 des effluents) |
| Pierre Bénite<br>(P-B)       | 950 000                 | 13                                    | 180 000                         | Décantation primaire                    |
|                              |                         |                                       |                                 | Prétraitements physiques                |
|                              |                         |                                       |                                 | Boues activées (moyenne charge)         |
| Meyzieu<br>(Mey)             | 33 000                  | 0                                     | 6 000                           | Prétraitements physiques                |
|                              |                         |                                       |                                 | Physico-chimiques                       |
|                              |                         |                                       |                                 | Filtres biologiques                     |
| Fontaines s/ Saône<br>(Ftai) | 30 000                  | 1                                     | 9 760                           | Prétraitements physiques                |
|                              |                         |                                       |                                 | Physico-chimiques                       |
|                              |                         |                                       |                                 | Filtres biologiques                     |
| Neuville s/ Saône<br>(Neu)   | 20 000                  | 0                                     | 6 000                           | Prétraitements physiques                |
|                              |                         |                                       |                                 | Décantation primaire                    |
|                              |                         |                                       |                                 | Boues activées (moyenne charge)         |

\*chiffre théorique pour le dimensionnement des stations à leur construction

Les deux grandes stations étudiées (Pierre Bénite et Saint Fons) reçoivent chacune des effluents mixtes, c'est-à-dire urbains et industriels. Parmi ces effluents industriels, on compte 8 effluents hospitaliers pour Saint Fons et 13 pour Pierre Bénite. Les 3 autres STEP étudiées sont des stations de moyenne capacité. Meyzieu et Neuville s/Saône reçoivent chacune les effluents d'une dizaine d'industries mais d'aucun établissement hospitalier. Fontaines s/Saône est, quant à elle, connectée à un hôpital. Par ailleurs, on peut constater que les STEP de Fontaines et Meyzieu ont des caractéristiques très proches puisqu'elles ont été dimensionnées pour le même nombre d'habitants et utilisent les mêmes types de traitement d'épuration.

### 1.2.2 Echantillonnage

L'échantillonnage des effluents et influents de chaque STEP étudiée a été assuré par les personnels du Grand Lyon. Il était réalisé sur une période de 24 heures au moyen d'échantillonneurs automatiques asservis au débit.

Les échantillons de STEP (influent et effluent) ont été filtrés à 0,45  $\mu\text{m}$  sur des filtres à membrane de nitrocellulose fournis par Millipore et conservés à 4°C, au maximum 2 jours, avant l'analyse.

Les échantillons de STEP ont été collectés durant les mois de mars et avril 2007. D'importantes précipitations sont généralement observées à cette période. Ceci peut poser des problèmes d'interprétation puisque les eaux de pluie génèrent une dilution des polluants. Dans ce cas une correction doit être réalisée pour corriger ce facteur de dilution. Toutefois, les précipitations mesurées aux dates de prélèvements, ainsi que sur les 3 jours précédant les prélèvements, ont été très faibles (inférieures à 2,2 mm). Les échantillons peuvent donc être comparés sans avoir à réaliser de correction liée au facteur de dilution dans l'environnement (dilution négligeable).

**Tableau 48: Provenance et dates de prélèvement des échantillons analysés**

| date       | provenance | STEP          |
|------------|------------|---------------|
| 19/03/2007 | influent   | Saint Fons    |
| 19/03/2007 | effluent   | Saint Fons    |
| 26/03/2007 | influent   | Saint Fons    |
| 26/03/2007 | effluent   | Saint Fons    |
| 20/03/2007 | influent   | Pierre Bénite |
| 20/03/2007 | effluent   | Pierre Bénite |
| 27/03/2007 | influent   | Meyzieu       |
| 27/03/2007 | effluent   | Meyzieu       |
| 13/03/2007 | influent   | Fontaines     |
| 13/03/2007 | effluent   | Fontaines     |
| 18/04/2007 | influent   | Fontaines     |
| 18/04/2007 | effluent   | Fontaines     |
| 02/04/2007 | influent   | Neuville      |
| 02/04/2007 | effluent   | Neuville      |
| 11/04/2007 | influent   | Neuville      |
| 11/04/2007 | effluent   | Neuville      |

Pour une STEP donnée, un échantillon d'influent et un échantillon d'effluent ont été analysés à une même date afin de pouvoir comparer les quantités apportées en amont des STEP aux teneurs déversées par celles-ci.

Par ailleurs, des dates de prélèvement différentes sont choisies pour chaque STEP afin de ne pas avoir à conserver les échantillons plus de 40 h, délai au-delà duquel la stabilité des échantillons n'a pas été vérifiée. Du fait de l'absence de précipitations sur la période des prélèvements, ainsi que de la proximité des dates de prélèvement, ceci n'empêche *a priori* pas la comparaison des résultats entre les STEP.

Les eaux de STEP de Saint Fons, Neuville et Fontaines ont été analysées à 2 dates différentes, alors que les échantillons de Pierre Bénite et Meyzieu n'ont été collectés qu'à une seule date. Les différents prélèvements réalisés sont présentés Tableau 48.

Ainsi 8 échantillons d'influents et 8 échantillons d'effluents ont été analysés.

### **1.3 Analyses**

#### **1.3.1 Analyses physico-chimiques**

Les services de la direction de l'eau du Grand Lyon effectuent de manière systématique des analyses physico-chimiques sur les échantillons collectés. Les protocoles d'analyse correspondants ne nous ont pas été communiqués, toutefois les rapports d'autosurveillance regroupant l'ensemble des analyses réalisées par le laboratoire de la Direction de l'eau sont fournis avec chaque échantillon. Ces données contiennent tout ou partie des mesures suivantes :

- Débit
- Précipitations
- pH
- Conductivité
- MES (Matières En Suspension)
- DCO (Demande Chimique en Oxygène)
- DBO5 (Demande Biologique en Oxygène)
- Concentration massique d'azote sous différentes formes ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )
- Concentration totale en phosphore

Ces mesures sont imposées par l'arrêté du 22 décembre 1994, afin de suivre des paramètres permettant de s'assurer de la fiabilité du système et de mesurer les performances épuratoires. Ces mesures permettent également à la STEP de vérifier la conformité des eaux rejetées aux normes imposées (directive européenne du 21 mai 1991 : 91/271/CEE, loi sur l'eau du 3 janvier 1992). En effet, les composés azotés et phosphorés sont susceptibles de générer une eutrophisation (prolifération de végétaux) des systèmes aquatiques. Par ailleurs la matière organique dissoute est susceptible de générer un surcroît de consommation d'oxygène dans l'environnement, entraînant ainsi l'asphyxie des espèces naturellement présentes.

Dans cette étude, les mesures citées ci-dessus, permettent d'une part de discuter de l'efficacité d'épuration des STEP considérées et d'autre part le calcul du nombre d'habitants reliés à la STEP. En effet, Servais *et al.* [188] montrent qu'un habitant consomme quotidiennement une moyenne de 150 L d'eau, et génère une demande chimique en oxygène de l'ordre de 110 g.

### 1.3.2 Analyse des corticostéroïdes et des $\beta$ -bloquants

Les échantillons environnementaux sont préconcentrés par SPE sur des cartouches Oasis MCX (60 mg, 3 cc, 30  $\mu$ m) provenant de Waters, selon le protocole présenté Tableau 19, page 74. Les extractions sont réalisées par un extracteur automatique d'échantillon ASPEC XL4 équipé d'une vanne 8 positions et d'une pompe à seringue de type 404 fournis par Gilson. A partir d'une même charge ( $V = 400$  mL), une élution séquentielle des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants permet la récupération de chaque classe pharmaceutique dans 2 fractions différentes. Ces extraits sont évaporés à sec sous flux d'azote et repris par 400  $\mu$ L de mélange eau/AcN (75/25, v/v), conduisant à un facteur d'enrichissement proche de 1 000, en tenant compte du rendement.

Les effets matrices sont évalués pour chaque échantillon par un protocole similaire. Dans ce cas, les extraits secs sont repris par une solution standard contenant chaque molécule de la famille correspondante à une concentration de 100  $\mu$ g/L, en solution dans un mélange eau/AcN (75/25, v/v). La comparaison de cet échantillon à 100  $\mu$ g/L en solution dans un extrait environnemental, à une solution en solvant pur à la même concentration permet la détermination de l'effet matrice.

Pour chaque extrait, un échantillon dilué 10 fois est préparé afin de pouvoir doser les éventuels points de concentration supérieure au maximum de la gamme étalon. Les effets matrices sont alors réévalués pour ces extraits dilués.

Pour chaque échantillon, 10 extractions sont réalisées. Une moitié des extraits est utilisée pour le dosage des échantillons et la détermination de l'incertitude sur la mesure. L'autre moitié permet la détermination de l'effet matrice.

Les fractions de corticostéroïdes sont ensuite analysées par LC/MS/MS, en appliquant le gradient eau/AcN présenté Tableau 29, page 95, sur une colonne X-Bridge C18 150 x 2,1 mm, 5 $\mu$ m provenant



de Waters. Le chromatogramme résultant de cette analyse est présenté Figure 33, c) page 90. Les paramètres de masse permettant l'analyse des corticostéroïdes en mode MRM positif sont présentés Chapitre 2 en partie 1.3, page 65.

Les fractions de  $\beta$ -bloquants sont quant à elles analysées sur une colonne Hibar Purospher Star RP18e 250 x 4,6, 5 $\mu$ m provenant de Merck, selon le gradient eau 0,1% FOA/AcN présenté Tableau 26, page 89. Le chromatogramme résultant de cette analyse est présenté Figure 31, c) page 85. Les paramètres de masse permettant l'analyse des  $\beta$ -bloquants en mode MRM positif sont présentés Chapitre 2 en partie 1.3, page 5.

Pour chaque séquence d'analyse, des échantillons de contrôle qualité (QC) à 100  $\mu$ g/L sont injectés régulièrement afin de s'assurer de la stabilité de la mesure dans un même lot d'analyse. De même, des blancs sont régulièrement injectés pour vérifier d'une part que les échantillons dopés ne contaminent pas l'appareillage (absence d'effet mémoire) et d'autre part, que les échantillons environnementaux ne génèrent pas d'augmentation du bruit de fond au cours des analyses.

### 1.3.3 Analyses des estrogènes

Les estrogènes sont analysés selon une procédure totalement automatisée d'extraction/dérivation/LC/MS/MS en ligne, développée dans le Chapitre 3. A partir d'une charge d'1 mL, les échantillons de STEP sont extraits et dérivés sur support par du chlorure de dansyle, en utilisant une cartouche d'extraction en ligne Oasis HLB 20 x 2,1 mm, 25 $\mu$ m fournie par Waters. L'analyse LC/MS/MS est réalisée en ligne sur une colonne Sunfire 100 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m provenant de Waters en élution isocratique eau/AcN/FOA (20/80/0,1, v/v/v). Les paramètres de masse permettant la détection des estrogènes dansylés sont présentés Chapitre 3 en partie 1.3.2.2, page 114.

## 1.4 Méthodologie de dosage et calcul des concentrations environnementales

### 1.4.1 Corticostéroïdes et $\beta$ -bloquants

#### 1.4.1.1 Méthodologie

D'importants effets matrices ont été observés pour les corticostéroïdes et les  $\beta$ -bloquants. Nous avons vu, Chapitre 2 partie 5.1, page 102, que les méthodologies permettant la compensation de l'effet matrice (standardisation interne ou ajout dosés), ne pouvaient pas être appliquées. De ce fait le dosage a été réalisé par étalonnage externe en injectant avant chaque série d'analyse une gamme étalon.

### 1.4.1.2 Calcul des concentrations environnementales

Le calcul de la concentration par rapport à la gamme ne tient compte ni du rendement d'extraction, ni de l'effet matrice. Il est donc nécessaire de corriger cette concentration calculée selon la relation suivante :

$$c_{env} = \frac{c_{gam}}{(1 + EM) \times Rdt \times FE}$$

où  $c_{env}$  représente la concentration environnementale de l'analyte considéré,  $c_{gam}$  est la concentration calculée par rapport à la gamme étalon, sans correction préalable, EM est l'effet matrice et Rdt le rendement d'extraction de l'analyte. FE représente le facteur d'enrichissement obtenu au cours de la procédure d'extraction (1 000 dans cette étude).

## 1.4.2 Estrogènes

Les teneurs en estrogènes présents dans les échantillons sont déterminées par une méthode d'étalonnage interne. Bien que les essais réalisés aient montré l'absence d'effet matrice, les échantillons environnementaux sont dopés à 60 ng/L de standard deutéré. Une gamme étalon est extraite préalablement à chaque série d'analyses. Un échantillon est dosé à 4 reprises afin de pouvoir déterminer l'incertitude sur la mesure. La gamme étalon subit les mêmes étapes d'analyse (extraction, dérivation) que les échantillons environnementaux. De plus la présence de standards deutérés compense l'éventuelle apparition d'effet matrice. De ce fait, les concentrations environnementales peuvent être directement évaluées à partir de la gamme étalon :

$$c_{env} = c_{gam}$$

## 2 Résultats et discussion

### 2.1 Concentrations dans les STEP

En première approche, les concentrations des 31 analytes étudiés ont été déterminées pour chacun des 8 échantillons d'influent et des 8 échantillons d'effluent analysés. Ces résultats sont présentés de façon détaillée en Annexe 3. La discussion réalisée dans ce paragraphe ne portera que sur des valeurs moyennes calculées pour l'ensemble des STEP.

## 2.1.1 Analyse des influents

### 2.1.1.1 $\beta$ -bloquants

Les concentrations moyennes, minimales et maximales en  $\beta$ -bloquants mesurées sur l'ensemble des échantillons d'influents analysés sont présentées Tableau 49.

**Tableau 49: Concentrations moyennes, minimales et maximales mesurées pour les  $\beta$ -bloquants dans l'ensemble des influents de STEP et fréquence de détection (n = 8)**

|             | Présence des $\beta$ -bloquants dans les influents |                |                |               |
|-------------|----------------------------------------------------|----------------|----------------|---------------|
|             | Moyenne (ng/L)                                     | Minimum (ng/L) | Maximum (ng/L) | Fréquence (%) |
| Acébutolol  | 2 312                                              | 1 134          | 5 353          | 100           |
| Alprénolol  | 16                                                 | 16             | 16             | 13            |
| Aténolol    | 1512                                               | 702            | 2063           | 100           |
| Bisoprolol  | 436                                                | 180            | 1056           | 100           |
| Bétaxolol   | 12                                                 | 2              | 32             | 88            |
| Bupranolol  | 7                                                  | 7              | 7              | 13            |
| Cartéolol   | 5                                                  | 3              | 14             | 100           |
| Labétalol   | 66                                                 | 27             | 118            | 100           |
| Métoprolol  | 267                                                | 215            | 322            | 100           |
| Nadolol     | 61                                                 | 2              | 172            | 100           |
| Oxprénolol  | 11                                                 | 4              | 38             | 75            |
| Pindolol    | 52                                                 | 33             | 106            | 38            |
| Propranolol | 402                                                | 178            | 892            | 100           |
| Sotalol     | 1 332                                              | 291            | 3 168          | 100           |
| Timolol     | 11                                                 | 4              | 26             | 88            |

Tous les  $\beta$ -bloquants étudiés ont été détectés dans les influents de STEP. Certaines molécules sont systématiquement rencontrées alors que d'autres ne le sont que rarement. C'est en particulier le cas de l'alprénolol et du bupranolol qui n'ont été détectés que dans un seul échantillon, à des teneurs de l'ordre de 10 ng/L. Ces deux  $\beta$ -bloquants sont à la fois peu consommés et très métabolisés, ce qui explique les faibles teneurs et la rare occurrence de ces composés en amont des STEP.

Les molécules détectées aux plus fortes teneurs (de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$ ), sont systématiquement observées dans les influents de STEP. Il s'agit de l'acébutolol, de l'aténolol et du sotalol. L'acébutolol est le  $\beta$ -bloquant le plus consommé en France. Ceci explique qu'il soit détecté aux plus fortes teneurs dans les influents de STEP (de l'ordre de 2  $\mu\text{g/L}$  en moyenne). Ni l'aténolol, ni le sotalol ne faisaient partie des molécules les plus prescrites en 1999. Toutefois, nous ne disposons pas de données de consommation plus récentes. Les fortes teneurs rencontrées suggèreraient une forte augmentation de la consommation de ces molécules ces dernières années. Par ailleurs, l'aténolol étant très peu métabolisé, on peut considérer que la quasi-totalité des quantités ingérées atteignent les STEP.

D'autres composés ont été systématiquement détectés mais à des teneurs moindres. C'est notamment le cas du propranolol (400 ng/L en moyenne), du métoprolol (270 ng/L en moyenne) ou du bisoprolol (200 ng/L en moyenne) qui font également partie des molécules pharmaceutiques les plus prescrites.

### 2.1.1.2 Corticostéroïdes

Les concentrations moyennes, minimales et maximales en corticostéroïdes mesurées sur l'ensemble des échantillons d'influents analysés sont présentées Tableau 50.

**Tableau 50: Concentrations moyennes, minimales et maximales mesurées pour les corticostéroïdes dans l'ensemble des influents de STEP et fréquence de détection (n = 8)**

|                         | Présence de corticostéroïdes dans les influents |                |                |               |
|-------------------------|-------------------------------------------------|----------------|----------------|---------------|
|                         | Moyenne (ng/L)                                  | Minimum (ng/L) | Maximum (ng/L) | Fréquence (%) |
| Bétaméthasone           | nd                                              | /              | /              | 0             |
| Triamcinolone           | nd                                              | /              | /              | 0             |
| Prednisone              | 29                                              | 24             | 35             | 38            |
| Cortisol                | 135                                             | 21,4           | 260            | 88            |
| Prednisolone            | 319                                             | 40,9           | 362            | 38            |
| Budésonide              | nd                                              | /              | /              | 0             |
| Flunisolide             | nd                                              | /              | < LDQ          | 13            |
| Fluocinolone acétonide  | nd                                              | /              | /              | 0             |
| Triamcinolone acétonide | 3                                               | 3              | 3              | 25            |
| Cortisone               | 448                                             | 54,2           | 922,6          | 100           |
| Désonide                | nd                                              | /              | /              | 0             |
| Méthylprednisolone      | nd                                              | /              | /              | 0             |
| Dexaméthasone           | nd                                              | /              | /              | 0             |

Parmi les 13 corticostéroïdes étudiés, seuls 6 composés ont été détectés en amont des STEP.

La cortisone est systématiquement détectée, à une teneur moyenne de 500 ng/L. Ce composé étant une molécule endogène, ce résultat n'est pas surprenant. Le cortisol est également une molécule endogène, il n'a toutefois pas été détecté dans l'un des échantillons analysés. Comme le cortisol est en équilibre chimique avec la cortisone, la détection de l'un des composés implique *a fortiori* la présence de l'autre. Par ailleurs, tout composé endogène est nécessairement déversé dans les STEP. Vraisemblablement, le cortisol n'est pas détecté dans l'un des échantillons en raison d'une limite de détection trop élevée pour cette molécule.

Les composés exogènes détectés aux plus fortes teneurs sont la prednisone et la prednisolone avec des teneurs moyennes de l'ordre de 30 et 300 ng/L respectivement. Ces molécules sont effectivement les plus prescrites, d'où leur plus fréquente détection. De plus la prednisolone est le métabolite actif de nombreuses autres formes pharmaceutiques telles que la dexaméthasone ou la triamcinolone et son acétonide, ce qui explique les plus fortes teneurs retrouvées.

La bétaméthasone, la triamcinolone, la budésonide, la fluocinolone acétonide, la désonide, la méthylprednisolone et la dexaméthasone n'ont jamais été détectés dans les influents de STEP au cours de ces mesures. Ces résultats tiennent probablement aux forts taux de métabolisation de ces molécules ainsi qu'à leur faible consommation. Certaines de ces molécules avaient préalablement été détectées lors des premiers essais présentés Chapitre 2 page 103. On peut alors penser qu'il existe des variations

temporelles dans le rejet de corticostéroïdes dans l'environnement. Une étude spécifique serait alors nécessaire pour conclure.

### 2.1.1.3 Estrogènes

Les concentrations moyennes, minimales et maximales en estrogènes mesurées sur l'ensemble des échantillons d'influents analysés sont présentées Tableau 51.

**Tableau 51: Concentrations moyennes, minimales et maximales mesurées pour les estrogènes dans l'ensemble des influents de STEP et fréquence de détection (n = 8)**

|                  | Présence des estrogènes dans les influents |                |                |               |
|------------------|--------------------------------------------|----------------|----------------|---------------|
|                  | Moyenne (ng/L)                             | Minimum (ng/L) | Maximum (ng/L) | Fréquence (%) |
| Estrone          | 49                                         | 26,5           | 74,5           | 88            |
| Estradiol        | 20                                         | 9,7            | 33,2           | 88            |
| Éthinylestradiol | 3                                          | 0,3            | 4,7            | 50            |

L'estrone et l'estradiol, qui sont des molécules endogènes ont été détectés dans 88% des échantillons d'influent à des teneurs de l'ordre de la dizaine de ng/L. Ces résultats coïncident avec ceux précédemment rapportés dans la littérature, puisque Servos *et al.* [29] ont détecté l'estrone à des teneurs variant entre 19 et 78 ng/L (26 à 75 ng/L dans notre étude) et Heberer *et al.* [18] ont détecté l'estradiol à des teneurs allant de 2 à 26 ng/L (9 à 33 ng/L dans notre étude) dans les influents de STEP.

La littérature ne propose pas de données sur les teneurs en éthinylestradiol des influents de STEP. Cette étude a montré que les eaux de l'agglomération lyonnaise contiennent des teneurs de 3 ng/L en moyenne pour cette molécule.

## 2.1.2 Effluents

### 2.1.2.1 $\beta$ -bloquants

Les concentrations moyennes, minimales et maximales en corticostéroïdes mesurées sur l'ensemble des échantillons d'effluents analysés sont présentées Tableau 52.

Les teneurs en  $\beta$ -bloquants détectées dans les effluents lors de cette étude sont comparables à celles rapportées dans la littérature (voir Tableau 2, page 15).

En effet, Castiglioni *et al.* [30] ont détecté l'aténolol à une concentration de 1,2  $\mu\text{g/L}$  dans les effluents de la STEP de Cueno (Italie). Dans les effluents de STEP de l'agglomération lyonnaise une teneur moyenne de 975 ng/L est mesurée.

Par ailleurs, lors d'études réalisées aux Etats-Unis [33], en Allemagne [31] ou en Angleterre [35], le métoprolol et le propranolol ont été détectés à des teneurs pouvant dépasser le seuil du  $\mu\text{g/L}$ . Toutefois, les concentrations usuellement rencontrées dans les effluents de STEP pour ces deux  $\beta$ -

bloquants sont de l'ordre de la centaine de ng/L, ce qui est également le cas dans les effluents de STEP de l'agglomération lyonnaise (130 à 423 ng/L pour le propranolol et 162 à 233 ng/L pour le métoprolol).

**Tableau 52: Concentrations moyennes, minimales et maximales mesurées pour les  $\beta$ -bloquants dans l'ensemble des effluents de STEP et fréquence de détection (n = 8)**

|             | Présence de $\beta$ -bloquants dans les effluents |                |                |               |
|-------------|---------------------------------------------------|----------------|----------------|---------------|
|             | Moyenne (ng/L)                                    | Minimum (ng/L) | Maximum (ng/L) | Fréquence (%) |
| Acébutolol  | 975                                               | 571            | 1 404          | 100           |
| Alprénolol  | 10                                                | 10             | 10             | 13            |
| Aténolol    | 1 171                                             | 425            | 1 528          | 100           |
| Bisoprolol  | 196                                               | 72             | 555            | 100           |
| Bétaxolol   | 13                                                | 1              | 31             | 75            |
| Bupranolol  | 8                                                 | 8              | 8              | 13            |
| Cartéolol   | 6                                                 | 2              | 17             | 100           |
| Labétalol   | 71                                                | 24             | 113            | 100           |
| Métoprolol  | 162                                               | 105            | 233            | 100           |
| Nadolol     | 39                                                | 4              | 116            | 100           |
| Oxprénolol  | 27                                                | 5              | 62,2           | 75            |
| Pindolol    | 21                                                | 19             | 21,2           | 25            |
| Propranolol | 228                                               | 131            | 423            | 100           |
| Sotalol     | 1 724                                             | 345            | 7 928          | 88            |
| Timolol     | 8                                                 | 2,9            | 19             | 88            |

En 2001, Ternes *et al.* [31] ont détecté le bisoprolol et le bétaxolol à des teneurs de l'ordre de 60 ng/L. Ici, le bisoprolol est détecté à des teneurs supérieures, de l'ordre de la centaine de ng/L. Cette molécule est très consommée en France, avec un tonnage annuel de 1,6 t (données AFSSAPS 1999), ce qui n'est peut-être pas le cas en Allemagne. Pour le bétaxolol, des teneurs moindres sont observées, n'excédant pas 30 ng/L.

Aux Etats-Unis, Huggett *et al.* [33] ont détecté le nadolol dans 24 échantillons de STEP (sur 34 analysés) avec une teneur moyenne de 50 ng/L et une concentration maximale de 360 ng/L pour l'un des échantillons. Les résultats obtenus sur les effluents de STEP de l'agglomération lyonnaise sont en accord avec les mesures réalisées par Huggett *et al.*, puisque le nadolol est détecté en moyenne à 40 ng/L avec une teneur maximale de 116 ng/L. Toutefois, le nadolol est ici détecté dans 100 % des échantillons ce qui n'était pas le cas lors de l'étude menée par Huggett *et al.* La plus grande fréquence observée dans l'agglomération lyonnaise provient certainement d'une meilleure sensibilité de la méthode d'analyse puisque la méthode appliquée aux Etats-Unis n'atteignait qu'une limite de détection de 10 ng/L, n'autorisant ainsi la quantification qu'à partir de 30 ng/L. Les études réalisées dans l'agglomération lyonnaise montrent que 63 % des échantillons contiennent des teneurs inférieures à 30 ng/L, qui ne pourraient donc pas être quantifiées par la méthode proposée par Huggett *et al.*

### 2.1.2.2 Stéroïdes

Les concentrations moyennes, minimales et maximales en corticostéroïdes et estrogènes mesurées sur l'ensemble des échantillons d'effluents analysés sont présentées Tableau 53.

**Tableau 53: Concentrations moyennes, minimales et maximales mesurées pour les stéroïdes dans l'ensemble des effluents de STEP et fréquence de détection (n = 8)**

|                         | Présence des stéroïdes dans les effluents |                |                |               |
|-------------------------|-------------------------------------------|----------------|----------------|---------------|
|                         | Moyenne (ng/L)                            | Minimum (ng/L) | Maximum (ng/L) | Fréquence (%) |
| <b>Corticostéroïdes</b> |                                           |                |                |               |
| Bétaméthasone           | nd                                        | /              | /              | 0             |
| Triamcinolone           | nd                                        | /              | /              | 0             |
| Prednisone              | 26                                        | 25,6           | 25,6           | 13            |
| Cortisol                | 14                                        | 7,9            | 20             | 25            |
| Prednisolone            | nd                                        | /              | <LDQ           | 13            |
| Budésonide              | nd                                        | /              | /              | 0             |
| Flunisolide             | nd                                        | /              | <LDQ           | 38            |
| Fluocinolone acétonide  | nd                                        | /              | <LDQ           | 25            |
| Triamcinolone acétonide | nd                                        | /              | <LDQ           | 50            |
| Cortisone               | 174                                       | 1,25           | 459,5          | 75            |
| Désonide                | nd                                        | /              | /              | 0             |
| Méthylprednisolone      | nd                                        | /              | /              | 0             |
| Dexaméthasone           | nd                                        | /              | /              | 0             |
| <b>Estrogènes</b>       |                                           |                |                |               |
| Estrone                 | 22                                        | 2,1            | 46,1           | 100           |
| Estradiol               | 6                                         | 0,5            | 15,4           | 100           |
| Éthinylestradiol        | 3                                         | 1,5            | 5,7            | 50            |

Les molécules détectées dans les influents le sont également dans les effluents. De plus on constate pour certains composés une plus grande fréquence de détection dans les effluents que dans les influents. Ceci pourrait s'expliquer par des phénomènes de déconjugaison dans les STEP. Les molécules conjuguées ne sont pas analysées. Toutefois, l'hydrolyse de ces molécules lors des traitements épuratoires peut permettre de relarguer la molécule libre.

Les corticostéroïdes n'ayant jamais été recherchés dans les eaux environnementales, il n'existe pas de point de comparaison pour les données acquises dans cette étude.

Par contre le suivi des estrogènes est très fréquent au niveau international. L'estradiol a été détecté à des teneurs comprises entre 0,1 et 15 ng/L ce qui est en parfait accord avec les mesures réalisées sur les effluents de l'agglomération lyonnaise (0,5 à 15,4 ng/L). L'éthinylestradiol a été détecté par Pawlowski *et al.* [41] ainsi que par Kuch *et al.* [43] à des teneurs comprises entre 0,1 et 8 ng/L. Cette molécule n'est détectée ici que dans 50% des échantillons à des teneurs similaires : 1,5 à 5,7 ng/L.

De nombreux auteurs se sont intéressés au dosage de l'estrone dans les effluents de STEP. Des teneurs de l'ordre de la dizaine de ng/L ont généralement été rencontrées [24, 29-31, 41-43]. C'est également le cas dans cette étude (2 à 46 ng/L).

### 2.1.3 Conclusions

Ces analyses démontrent l'apport massif de résidus de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes et estrogènes dans les stations d'épuration de l'agglomération lyonnaise. Ces molécules sont également détectées dans les effluents de STEP. Ceci révèle d'ores et déjà que l'efficacité d'épuration des STEP ne permet pas d'éliminer totalement ces contaminants.

Etant données les fortes concentrations mesurées dans les effluents, des effets écotoxiques sur la faune et la flore du Rhône, en aval de Lyon sont certainement à déplorer. Il serait alors intéressant de doser ces molécules en différents points du fleuve, répartis entre Lyon et le delta du Rhône, afin d'évaluer le transport de ces contaminants dans le fleuve et d'estimer l'écotoxicité de ces résidus, sur une période donnée, aux concentrations mesurées dans le Rhône.

## 2.2 Flux environnementaux pour chaque analyte

Afin d'obtenir une meilleure estimation des quantités de composés pharmaceutiques rejetés par les STEP de la région lyonnaise, les flux de matière ont été déterminés pour chaque STEP en multipliant les concentrations déterminées, par les débits correspondant aux prélèvements. Pour avoir une vision globale des quantités déversées par les STEP du Grand Lyon les résultats ont été sommés pour chaque STEP. Dans le cas où 2 échantillons ont été analysés pour une même STEP, la moyenne des concentrations a été prise en compte.

Ces calculs montrent tout d'abord que de très importantes quantités de résidus pharmaceutiques atteignent les STEP, puisque nous avons globalement mesuré des flux massiques de 3 kg/j pour les  $\beta$ -bloquants, et de 325 et 23 g/j pour les corticostéroïdes et les estrogènes respectivement. Ces calculs montrent également que d'importantes quantités sont déversées dans l'environnement par les STEP : 14 g/j pour les estrogènes, 120 g/j pour les corticostéroïdes, 1,5 kg/j pour les  $\beta$ -bloquants.

Pour les  $\beta$ -bloquants, ces données sont confortées par une étude récente réalisée par le Cemagref de Lyon, laboratoire partenaire de ce projet, qui a calculé un rejet quotidien de 1,1 kg de  $\beta$ -bloquants par les STEP de l'agglomération lyonnaise [139].

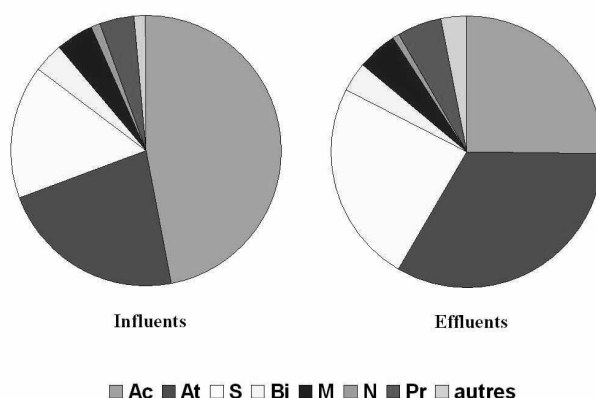
**Tableau 54: Flux massiques exprimés en g/j apportés au STEP ou déversés par celles-ci pour chacune des molécules étudiées.**



|                         | <b>influents</b> | <b>effluents</b> |
|-------------------------|------------------|------------------|
| <b>β-bloquants</b>      |                  |                  |
| Acébutolol              | 1 406            | 371              |
| Alprénolol              | 0,04             | 0,03             |
| Aténolol                | 669              | 486              |
| Bisoprolol              | 108              | 52               |
| Bétaxolol               | 3                | 2                |
| Bupranolol              | 0,016            | 0,02             |
| Cartéolol               | 2                | 3                |
| Labétalol               | 27               | 26               |
| Métoprolol              | 127              | 71               |
| Nadolol                 | 35               | 13               |
| Oxprénolol              | 2                | 10               |
| Pindolol                | 3                | 0,08             |
| Propranolol             | 129              | 77               |
| Sotalol                 | 485              | 352              |
| Timolol                 | 3                | 2                |
| <i>Flux total</i>       | <i>2 999</i>     | <i>1465</i>      |
| <b>Corticostéroïdes</b> |                  |                  |
| Prednisone              | 0,1              | 0,06             |
| Cortisol                | 17               | 0,08             |
| Prednisolone            | 10               | 0                |
| Triamcinolone acétonide | 0,01             | 0                |
| Cortisone               | 298              | 120              |
| <i>Flux total</i>       | <i>325</i>       | <i>120</i>       |
| <b>Estrogènes</b>       |                  |                  |
| Estrone                 | 18               | 12               |
| Estradiol               | 5                | 2                |
| Éthinylestradiol        | 0,03             | 0,04             |
| <i>Flux total</i>       | <i>23</i>        | <i>14</i>        |

### 2.2.1 β-bloquants

Afin de mieux visualiser la contribution de chaque β-bloquant à la contamination des influents et effluents de STEP, les flux de chaque analyte sont représentés sous forme de diagramme en secteur (Figure 57).



**Figure 57: Contributions relatives en chaque  $\beta$ -bloquant analysé dans l'ensemble des eaux de STEP**

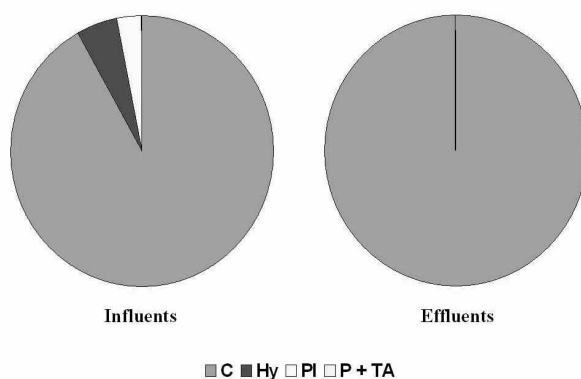
Il apparaît alors que 85 % de l'apport de  $\beta$ -bloquants est expliqué par la présence d'acébutolol (47%), d'aténolol et de sotalol. La contribution du propranolol et du métoprolol n'est pas négligeable puisque de l'ordre de 9%. Les 10 autres  $\beta$ -bloquants étudiés ne contribuent qu'à 6% de l'apport total en  $\beta$ -bloquants.

Une même tendance globale est observée dans les effluents avec toutefois une participation moindre de l'acébutolol (25%). L'acébutolol, le sotalol et l'aténolol représentent 83% des  $\beta$ -bloquants déchargés par les STEP. Le métoprolol et le propranolol contribuent à 5% et les 10 autres composés ne représentent que 7% des  $\beta$ -bloquants déchargés dans les effluents de STEP.

## 2.2.2 Corticostéroïdes

Afin de mieux visualiser la contribution de chaque corticostéroïde à la contamination des influents et effluents de STEP, les flux de chaque analyte sont représentés sous forme de diagramme en secteur (Figure 58).

La cortisone représente 92% de l'apport total en corticostéroïdes dans les STEP. Les 8 % restant sont essentiellement expliqués par le cortisol et la prednisolone. En effet, parmi les 10 autres corticostéroïdes étudiés, seules la triamcinolone acétonide et la prednisone ont été détectées, et leur contribution représente moins de 0,1% de l'apport global.

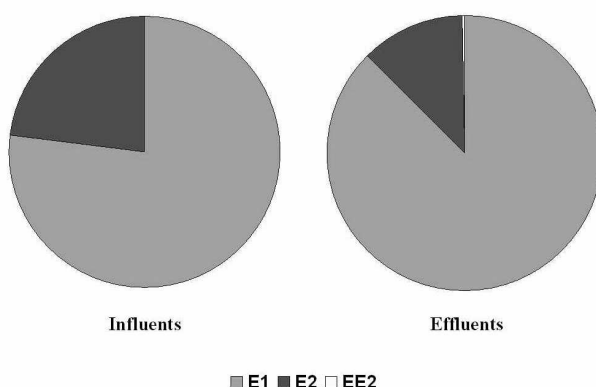


**Figure 58: Contributions relatives en chaque corticostéroïde analysé dans l'ensemble des eaux de STEP**

Dans les eaux de rejet des STEP on ne retrouve quasiment que la cortisone (99,9% de l'apport en corticostéroïdes).

### 2.2.3 Estrogènes

Afin de mieux visualiser la contribution de chaque estrogène à la contamination des influents et effluents de STEP, les flux de chaque analyte sont représentés sous forme de diagramme en secteur (Figure 59).



**Figure 59: Contributions relatives en chaque estrogène analysé dans l'ensemble des eaux de STEP**

Les deux molécules endogènes (E1, E2) sont principalement responsables de l'apport des estrogènes dans les STEP puisque l'estrone y contribue à 77% et l'estradiol à 23%. La molécule de synthèse (éthinyloestradiol) représente moins de 1 % de l'apport en estrogène.

Cet ordre de contribution est conservé pour les effluents où l'estrone est responsable de 87%, l'estradiol de 12% et l'éthinylestradiol de 0,3% du rejet d'estrogènes dans l'environnement.

### 2.2.4 Conclusions

Nous avons ainsi montré que l'acébutolol, le sotalol et l'aténolol pour les  $\beta$ -bloquants, la cortisone pour les corticostéroïdes, l'estrone et l'estradiol pour les estrogènes, sont les principales molécules à la fois apportées aux STEP et déchargées par celles-ci. Il semble alors important d'évaluer l'impact écologique de ces composés en terme d'écotoxicité, de bioaccumulation et de persistance. Il faut de plus souligner que si les quantités relatives de certaines molécules sont faibles voire négligeables, cela n'exclut pas la possibilité de risques environnementaux liés à la présence de ces molécules. La plupart de ces molécules peu abondantes sont en effet présentes à des teneurs de l'ordre de la dizaine de ng/L, concentrations auxquelles des effets écotoxiques ont été observés pour d'autres résidus pharmaceutiques (voir chapitre 1 page 19).

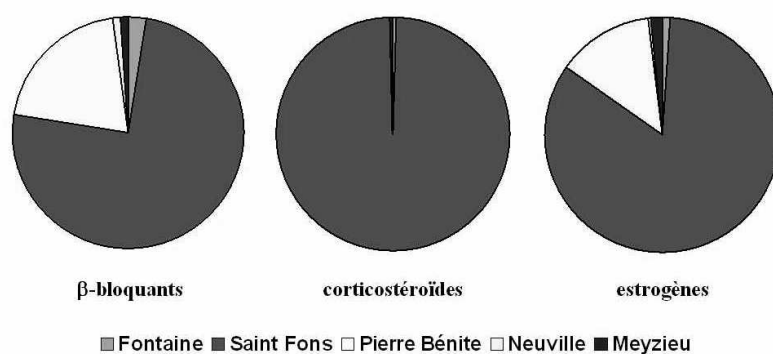
### 2.3 Flux par STEP

Afin d'identifier les STEP déchargeant les plus importantes quantités de résidus pharmaceutiques dans l'environnement, les flux environnementaux de chaque analyte appartenant à une même famille ont été additionnés pour une STEP donnée. Pour les STEP de Fontaines, Neuville et Saint Fons, pour lesquelles 2 échantillons ont été analysés, les valeurs moyennes sont considérées. Les flux de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes et estrogènes pour chacune des 5 STEP étudiées sont présentés Tableau 55.

**Tableau 55: Masses exprimées en g de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes et estrogènes rejetées quotidiennement dans chaque STEP**

|                    | Fontaines | Saint Fons | Pierre Bénite | Neuville | Meyzieu |
|--------------------|-----------|------------|---------------|----------|---------|
| $\beta$ -bloquants | 36        | 1 099      | 297           | 18       | 17      |
| corticostéroïdes   | 0,6       | 119        | 0             | 0,004    | 0,3     |
| estrogènes         | 0,1       | 11         | 2             | 0,7      | 0,2     |

Afin d'avoir une vision plus explicite des quantités relatives de résidus pharmaceutiques déversées par chaque STEP, une représentation en secteurs est présentée Figure 60.



**Figure 60: Contribution relative de chaque STEP au rejet de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes, et estrogènes dans l'environnement**

On constate que sur la durée de l'étude, la STEP de Saint Fons constituait le principal point de décharge en résidus pharmaceutiques du Grand Lyon puisque 75 % des  $\beta$ -bloquants, 99% des corticostéroïdes et 84% des estrogènes rejetés en provenaient. La STEP de Pierre Bénite constituait également un important point de décharge de résidus pharmaceutiques car elle rejetait 20% des  $\beta$ -bloquants et 13 % des estrogènes. Ces résultats ne sont pas surprenants car ces deux STEP sont les plus importantes du Grand Lyon. De plus, sachant que par temps sec, un habitant produit quotidiennement 150 L d'eaux usées et 110 g de DCO, il est possible de calculer un nombre théorique d'habitants raccordés à une STEP donnée en utilisant la relation suivante :

$$Eq. Hab. = \frac{DCO \times D}{110}$$

où, DCO représente la demande chimique en oxygène mesurée dans l'échantillon d'influent, exprimée en mg/L, D est le débit mesuré en entrée de station exprimé en m<sup>3</sup>/j et Eq.Hab. représente le nombre théorique d'habitants raccordés à la station (nombre d'équivalent habitants).

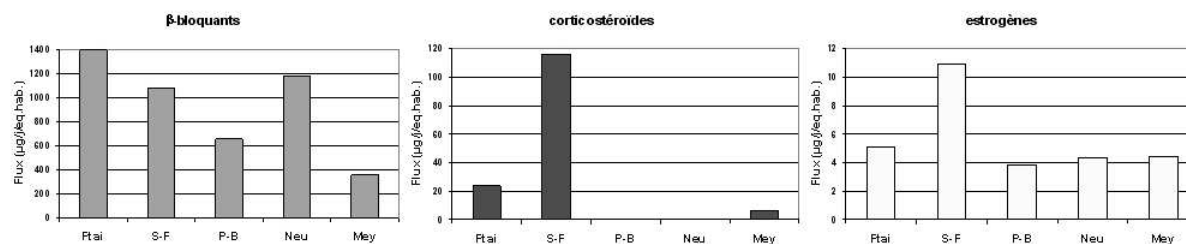
A partir des données de DCO et de débit fournies en annexe 8, on calcule un nombre d'équivalent habitants de 1 016 000 pour Saint Fons, de 450 000 pour Pierre Bénite, de 47 000 pour Meyzieu, de 25 000 pour Fontaines et de 15 000 pour Neuville. Il apparaît alors que les flux de résidus pharmaceutiques rejetés par chaque STEP sont essentiellement expliqués par le nombre d'habitants raccordés.

Afin de mieux comparer ces différentes stations, les flux de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes et estrogènes ont été ramenés à un équivalent habitant, en divisant les flux présentés Tableau 55 par le nombre théorique d'habitants raccordés. Les données de flux par classes pharmaceutiques, exprimées en  $\mu\text{g}/\text{j}/\text{eq. hab.}$  sont présentées Tableau 56.

**Tableau 56: Flux de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes et estrogènes exprimés en  $\mu\text{g}/\text{j}/\text{eq. hab.}$  déversés par chaque STEP**

|                    | Fontaines | Saint Fons | Pierre Bénite | Neuville | Meyzieu |
|--------------------|-----------|------------|---------------|----------|---------|
| $\beta$ -bloquants | 1394      | 1081       | 657           | 1178     | 357     |
| corticostéroïdes   | 24        | 116        | 0             | 0        | 6       |
| estrogènes         | 5         | 11         | 4             | 4        | 4       |

Afin d'avoir une vision plus explicite des quantités relatives de résidus pharmaceutiques déversées par chaque STEP, une représentation en histogramme est donnée Figure 61.



**Figure 61: Flux par équivalent habitant de β-bloquants (bleu), corticostéroïdes (pourpre), et estrogènes (jaune) rejetés dans les effluents des STEP de Fontaines (Ftai), Saint Fons (S-F), Pierre Bénite (P-B), Neuville (Neu) et Meyzieu (Mey).**

Les β-bloquants sont exclusivement consommés à but curatif, si l'on ne tient pas compte de l'usage illégal qui peut en être fait. On pourrait donc logiquement s'attendre à ce que les STEP recevant les eaux de rejet d'un grand nombre d'hôpitaux (Pierre Bénite et Saint Fons) présentent des flux par équivalent habitant supérieurs à ceux des autres STEP. Or les analyses réalisées montrent que les flux les plus importants sont observés pour les STEP de Fontaines et Neuville qui reçoivent peu voire pas d'effluents hospitaliers. En revanche, la STEP de Pierre Bénite, qui est raccordée à 13 établissements hospitaliers présente des flux de β-bloquants par habitant parmi les plus faibles observés. Il semble alors que les eaux reçues par les STEP n'influent pas sur le rejet de résidus de β-bloquants dans l'environnement et que les traitements réalisés prévalent. Il semble alors intéressant d'estimer les rendements d'épuration pour chaque STEP. Les travaux réalisés par Miège *et al.* [139] confortent ces résultats, puisqu'ils observent également un flux de β-bloquants par équivalent habitant relativement important pour la STEP de Fontaines, et relativement faible pour celle de Pierre Bénite.

Par ailleurs, nous avons précédemment montré que les rejets de stéroïdes dans l'environnement étaient principalement dus aux molécules endogènes. Les flux par équivalent habitant devraient donc théoriquement être constants, quelle que soit la STEP considérée. Pour les estrogènes, à l'exception des données de Saint Fons, ceci est vérifié. La STEP de Saint Fons présente toutefois un flux d'estrogènes 2,5 fois supérieur aux autres STEP sur la période de l'étude, ce qui suggère une éventuelle influence des traitements appliqués. Pour les corticostéroïdes, l'influence de ces traitements est certaine du fait de la grande variabilité des flux par équivalent habitant observés dans les effluents des différentes STEP. En effet, pour Pierre Bénite et Neuville, les flux mesurés à partir des échantillons analysés dans cette étude sont nuls alors qu'ils sont supérieurs à 100 µg/j/eq. Hab. à Saint Fons.

Il semblerait ainsi que pour chaque classe pharmaceutique, les traitements d'épuration auraient une influence sur les quantités déchargées. Il est donc intéressant d'évaluer l'efficacité d'épuration des STEP étudiées.

## 2.4 Efficacité d'épuration

### 2.4.1 Principe

Pour évaluer l'efficacité d'épuration d'une STEP vis-à-vis d'une molécule pharmaceutique donnée, des bilans de matière doivent être effectués entre l'entrée et la sortie de STEP. Les ratios entre les quantités entrant dans les STEP et les quantités sortantes, pour un analyte donné, permettent alors la détermination du rendement d'épuration. Pour réaliser un bilan de matière exhaustif, il est nécessaire de prendre en compte les quantités de composés suivants :

- molécule libre,
- molécules conjuguées (métabolites de phase II),
- métabolites de phase I,
- molécules adsorbées sur les MES,
- produits de dégradation.

Toutefois, étant donnée la difficulté d'acquérir certaines données (telles que les produits de dégradation), les abattements sont généralement calculés en ne s'intéressant qu'aux molécules libres, conjuguées ou adsorbées. Un dosage global des molécules libres et conjuguées est généralement réalisé en effectuant des réactions de déconjugaison par hydrolyse chimique ou enzymatique. Les quantités adsorbées sur les MES sont généralement extraites par solvant (Soxhlet ou ASE (extraction assistée par solvant) par exemple) et additionnées à la phase liquide.

Dans cette étude, seules les molécules libres sont prises en compte. Les taux d'abattement ( $\tau_{ab}$ ) sont calculés de la façon suivante :

$$\tau_{ab} = \frac{F_{infl} - F_{eff}}{F_{infl}} \times 100$$

où  $F_{eff}$  représente le flux massique d'un analyte donné en sortie de STEP et  $F_{infl}$  son flux massique en entrée de STEP.

## 2.4.2 Résultats

Les résultats obtenus pour chaque analyte et pour chaque STEP sont présentés Tableau 57.

**Tableau 57: Taux d'abattement pour chaque analyte et pour chaque STEP**

|                                     | Fontaines | Saint Fons | Neuville | Pierre Bénite | Meyzieu |
|-------------------------------------|-----------|------------|----------|---------------|---------|
| <b><math>\beta</math>-bloquants</b> |           |            |          |               |         |
| Acébutolol                          | 25        | 60         | 30       | 86            | 66      |
| Alprénolol                          | 31        | /          | /        | /             | /       |
| Aténolol                            | 9         | 26         | 21       | 37            | 28      |
| Bisoprolol                          | 40        | 41         | 75       | 72            | 59      |
| Bétaxolol                           | -20       | 22         | 86       | /             | 33      |
| Bupranolol                          | -28       | /          | /        | /             | /       |
| Cartéolol                           | -39       | -58        | 12       | 5             | -1      |
| Labétalol                           | -4        | 6          | -35      | 9             | -18     |
| Métoprolol                          | 30        | 36         | 41       | 60            | 28      |
| Nadolol                             | -19       | -9         | 38       | 94            | 56      |
| Oxprénolol                          | -20       | -556       | -224     | /             | -127    |
| Pindolol                            | 71        | /          | /        | 100           | /       |
| Propranolol                         | 50        | 47         | 44       | 23            | 12      |
| Sotalol                             | -175      | 21         | 41       | 51            | 43      |
| Timolol                             | 18        | 26         | 42       | 52            | 27      |
| <b>Corticostéroïdes</b>             |           |            |          |               |         |
| Prednisone                          | 38        | /          | /        | /             | /       |
| Cortisol                            | 98        | 100        | 100      | 100           | 94      |
| Prednisolone                        | 100       | 100        | /        | /             | 100     |
| Triamcinolone acétonide             | /         | /          | 100      | /             | /       |
| Cortisone                           | 32        | 37         | 100      | 100           | 38      |
| <b>Estrogènes</b>                   |           |            |          |               |         |
| Estrone                             | 55        | -32        | 87       | 84            | 40      |
| Estradiol                           | 75        | 35         | 56       | 98            | 53      |
| Ethinylestradiol                    | -49       | /          | -31      | /             | /       |
| <b>Moyennes</b>                     |           |            |          |               |         |
| $\beta$ -bloquants                  | -26       | 39         | 33       | 74            | 45      |
| Corticostéroïdes                    | 75        | 42         | 100      | 100           | 93      |
| Estrogènes                          | 58        | -17        | 71       | 87            | 44      |

Par cette approche extrêmement simplifiée, il n'est pas possible d'estimer de façon précise les taux d'abattement. Toutefois, sachant d'une part qu'une molécule conjuguée peut s'hydrolyser pour libérer la molécule libre mais que la réaction inverse est très peu probable (dilution importante, nécessité d'enzymes spécifiques, *etc.*), et que d'autre part la quantité de MES est beaucoup plus faible dans les effluents que dans les influents, c'est-à-dire qu'il y a *a priori* moins de molécules adsorbées dans les effluents, les valeurs de  $\tau_{ab}$  peuvent être traitées de la façon suivante.

- Si  $\tau_{ab} \leq 0$  %, il n'est pas possible de conclure sur l'efficacité de la STEP puisque les quantités adsorbées et/ou conjuguées jouent un rôle important.



- Si  $\tau_{ab} > 0 \%$ , il est possible de conclure que les traitements épuratifs appliqués permettent de retenir dans les boues ou de dégrader l'analyte considéré.

### 2.4.2.1 $\beta$ -bloquants

Le bupranolol, le cartéolol, le labétalol et l'oxprénolol présentent systématiquement des taux d'abattement nuls ou négatifs, leur épuration dans les STEP ne peut donc pas être discutée.

L'alprénolol, le bétaxolol, et le pindolol n'ont pas été détectés dans tous les influents, dès lors, il n'est pas possible de calculer de taux d'abattement pour certaines STEP et la comparaison des efficacités d'épuration ne peut pas être réalisée pour ces composés.

Pour le nadolol et le sotalol, les taux d'abattement sont négatifs pour une partie des STEP, ces molécules ne permettent donc pas de comparaison sur l'ensemble des stations d'épuration.

Finalement, seuls l'acébutolol, l'aténolol, le bisoprolol, le métoprolol, le propranolol et le timolol conduisent à des valeurs de  $\tau_{ab}$  positives pour toutes les STEP étudiées. Une représentation graphique est proposée Figure 62 pour ces 6 composés.

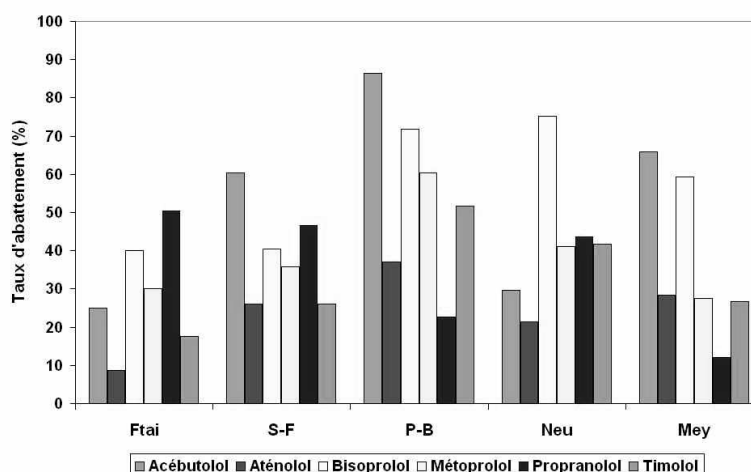


Figure 62: Taux d'abattement pour 6  $\beta$ -bloquants, pour chaque STEP

Au vu de ces données, il semble hasardeux de faire ressortir une STEP plus efficace que les autres, puisque selon l'analyte considéré, les meilleurs rendements d'épuration ne sont pas obtenus sur les mêmes sites. La STEP de Pierre Bénite semble conduire à des rendements d'épuration supérieurs aux autres STEP pour une majorité de  $\beta$ -bloquants, au vu des échantillons analysés.

Cependant, outre le fait que de nombreuses variables n'ont pas été prises en compte, il n'est pas possible de généraliser ces résultats, en raison du faible nombre d'échantillons analysés pour chaque STEP (1 ou 2).

Par ailleurs, ces essais ne permettent pas de déterminer si l'un des traitements appliqués dans les STEP étudiées permettrait de favoriser l'épuration de ces résidus dans l'environnement. En effet, de

nombreux paramètres entrent en jeu dans l'efficacité des traitements d'épuration, certains ne pouvant pas être contrôlés (température, présence d'inhibiteurs tels que des métaux, concentration de l'analyte), d'autres pouvant être modifiés (pH du réacteur biologique, concentration en oxygène, temps de rétention dans les boues ou la phase liquide). La nature de la molécule et le type de procédé appliqué ont également une influence, mais sont les seules variables connues pour cette étude.

#### 2.4.2.2 Stéroïdes

Parmi les corticostéroïdes étudiés, seule la cortisone a systématiquement été détectée dans les influents. L'efficacité d'épuration ne pourra dès lors être évaluée que pour cette molécule.

Pour les estrogènes, l'éthinylestradiol n'a été détecté que pour 2 STEP et l'estrone présente une valeur de taux d'abattement supérieure à 100%. De ce fait seul le comportement de l'estradiol sera discuté.

Les données présentées Tableau 57 tendent à montrer que la STEP de Pierre Bénite serait la plus efficace pour l'épuration des stéroïdes, puisque des taux d'abattement 10 à 60 fois moindres sont observés sur cette STEP pour l'estradiol et la cortisone sur les échantillons analysés.

### 2.5 Estimation des risques

Afin d'avoir un premier aperçu de l'impact possible des résidus de stéroïdes et de  $\beta$ -bloquants, en aval des STEP étudiées, il est possible de calculer un quotient de risque (QR) selon l'équation suivante :

$$QR = PEC / PNEC$$

où PEC représente la concentration environnementale prédite, et PNEC est la concentration environnementale prédite ne générant pas d'effets néfastes pour l'écosystème.

Si QR présente une valeur supérieure à 1 pour un analyte donné, il est possible de conclure qu'un risque écotoxicologique est probable.

Les valeurs de PEC peuvent être extrapolées des mesures précédemment présentées dans ce chapitre. En effet, connaissant les quantités rejetées par les STEP ( $F_{STEP}$ ) et les débits des rivières ( $D_{rivière}$ ) à proximité de la station d'épuration, il est possible d'estimer une concentration environnementale selon la relation :

$$PEC = F_{STEP} / D_{rivière}$$

Afin de se placer dans le pire des *scenarii*, les débits minimaux de ces rivières sont pris en compte. Pour les STEP de Neuville et Fontaines qui rejettent leurs effluents dans la Saône, les valeurs de débit de la Saône à Couzon au Mont d'Or sont considérées. La plus faible valeur, calculée par la DIREN Rhône Alpes sur 16 ans, est de 42 m<sup>3</sup>/s. Pour la STEP de Meyzieu qui rejette ses effluents dans le

Rhône en amont du confluent, les débits du Rhône mesurés à Lyon (Perrache) sont utilisés. La plus faible valeur, calculée par la CNR sur 86 ans, est de 190 m<sup>3</sup>/s. Les STEP de Saint Fons et Pierre Bénite rejetant également leurs effluents dans le Rhône, mais en aval du confluent, les données de débit mesurées à Ternay sont prises en compte. La CNR calcule sur 86 ans, un débit minimal de 280 m<sup>3</sup>/s. Les données hydrologiques de synthèse sur ces trois points (Couzon au Mont d'Or, Ternay et Lyon Perrache) sont fournies en annexe 4, et la situation géographique de ces villes est présentée Figure 56, page 138.

De plus, afin de se placer dans des conditions plus réalistes, les quantités rejetées par Neuville et Fontaines sont additionnées afin d'estimer l'impact conjoint de ces deux STEP sur la Saône. Pour des raisons similaires, les données de flux mesurés à Saint Fons et Pierre Bénite sont également additionnées.

Pour l'estimation des risques environnementaux, les valeurs de PNEC proposées dans la littérature sont utilisées. Toutefois, du fait du peu d'information disponible, seul un nombre restreint de molécules sera pris en compte. Ferrari *et al.* [189] estiment en particulier une PNEC de 10 ng/L pour le propranolol. Huscheck *et al.* [190] calculent une PNEC de 0,1 ng/L pour l'éthinylestradiol. Toutefois, cette molécule étant très rarement détectée, nous avons préféré prendre en compte l'estimation plus grossière proposée par Stuer-Lauridsen *et al.* [191] qui estiment une PNEC de 5 ng/L pour l'ensemble des estrogènes. Pour les corticostéroïdes, aucune donnée de PNEC n'est proposée dans la littérature.

Finalement, les résultats obtenus pour le propranolol et les estrogènes sont présentés Tableau 58.

**Tableau 58: Estimation des risques pour le propranolol et les estrogènes à proximité de Lyon**

| Propranolol |                       |         |            |       |
|-------------|-----------------------|---------|------------|-------|
| lieu        | D (m <sup>3</sup> /s) | F (g/j) | PEC (ng/L) | QR    |
| Couzon      | 42                    | 2,3     | 0,63       | 0,063 |
| Ternay      | 280                   | 73,9    | 3,06       | 0,306 |
| Lyon        | 190                   | 1,3     | 0,08       | 0,008 |

| Estrogènes |                       |         |            |       |
|------------|-----------------------|---------|------------|-------|
| lieu       | D (m <sup>3</sup> /s) | F (g/j) | PEC (ng/L) | QR    |
| Couzon     | 42                    | 0,2     | 0,05       | 0,011 |
| Ternay     | 280                   | 12,9    | 0,53       | 0,106 |
| Lyon       | 190                   | 0,2     | 0,01       | 0,003 |

Les résultats obtenus au cours de ces deux mois de suivi environnemental tendent à montrer que le risque généré par l'introduction de propranolol et d'estrogènes dans l'environnement est négligeable à proximité de Lyon. Toutefois, les mélanges de résidus pharmaceutiques et d'autres polluants organiques peuvent avoir un effet synergique dans l'environnement. De ce fait, si ces composés considérés séparément ne présentent *a priori* pas de risque pour l'écosystème de l'agglomération

lyonnaise, ils pourraient toutefois contribuer au risque global généré par l'ensemble des matières polluantes.

Par ailleurs, ces estimations sont réalisées à partir d'un nombre très restreint d'échantillons (1 ou 2). De ce fait, rien ne prouve que les mesures réalisées soient représentatives des quantités déversées quotidiennement par chaque STEP. En effet, si Miège *et al.* [139] concluent également que le propranolol ne présente pas de risque environnemental lorsqu'il est considéré individuellement, les valeurs de QR qu'ils calculent sont supérieures à celles obtenues dans cette étude. Ils évaluent effectivement des QR de 0,107 à Couzon au Mont d'Or et de 0,750 à Ternay, soient des quotients de risque environ deux fois plus élevés que dans cette étude. Il serait alors nécessaire de disposer d'un plus grand nombre de données pour déterminer de façon plus précise et plus réaliste les PEC.

### **3 Conclusions et perspectives**

Cette étude a démontré que de fortes concentrations de résidus pharmaceutiques sont présentes dans les effluents de STEP de l'agglomération lyonnaise. Ces teneurs sont parfois très supérieures aux concentrations écotoxiques mesurées pour d'autres résidus pharmaceutiques, puisqu'elles peuvent atteindre des valeurs de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$  (pour l'acébutolol en particulier) et sont pour de nombreux composés de l'ordre de la centaine de  $\text{ng/L}$  (propranolol et cortisone entre autres). A partir d'une étude réalisée durant les mois de mars et avril 2007, nous avons pu constater que 1,5 kg de  $\beta$ -bloquants, 120 g de corticostéroïdes et 13 g d'estrogènes étaient déversés quotidiennement dans les eaux de l'agglomération lyonnaise. Toutefois, toutes les STEP ne contribuent pas de façon équivalente à ces rejets du fait de leurs capacités très différentes. Nous avons par ailleurs constaté que les traitements appliqués dans ces STEP semblent avoir une influence sur l'épuration des résidus de  $\beta$ -bloquants, corticostéroïdes et d'estrogènes. Les données acquises dans ces travaux ne visaient pas à estimer les rendements d'épuration. Toutefois, une influence certaine des traitements a été constatée.

Nous avons également observé que les stéroïdes endogènes (cortisone, estrone, estradiol), l'acébutolol et l'aténolol pour les  $\beta$ -bloquants étaient les molécules détectées aux plus fortes concentrations et également les plus fréquemment rencontrées dans les échantillons. Il devient alors intéressant d'étudier leur écotoxicité afin d'évaluer le risque environnemental qu'elles génèrent. Le transport de ces résidus dans le Rhône, en aval de Lyon est également un point important à étudier dans l'estimation des risques environnementaux.

Pour de prochains travaux, il pourrait être intéressant d'étudier les fluctuations saisonnières de ces micropolluants. Il faudrait de plus estimer de façon précise l'efficacité d'épuration de chaque STEP à partir d'un plus large panel d'échantillons, et en prenant en compte les molécules conjuguées et adsorbées sur les matières en suspension. Il serait également intéressant de prendre en compte les

produits de dégradation de ces composés, mais ceci requiert alors une étude de la dégradation biotique et abiotique (hydrolyse, photolyse) de ces molécules. La stabilité photochimique des résidus pharmaceutiques dans l'environnement fait d'ailleurs l'objet du Chapitre 5.



# Chapitre □

□hotodégradation des  
corticostéroïdes et des  
 $\beta$ -bloquants





## Chapitre 5 Photodégradation des corticostéroïdes et des $\beta$ -bloquants

L'étude de la photodégradation des molécules pharmaceutiques permet d'une part l'estimation de la stabilité de ces résidus dans l'environnement et d'autre part d'évaluer l'efficacité d'un éventuel traitement UV pour leur élimination dans les STEP. L'instabilité des estrogènes en photolyse directe ou indirecte a été démontrée par plusieurs études [158, 167, 168] et certains photoproduits ont été caractérisés [170] (voir Chapitre 1, page 50). Le comportement photolytique des estrogènes n'a donc pas été repris dans ces travaux. En revanche, les études concernant le devenir photochimique des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants dans l'environnement sont beaucoup plus restreintes. Néanmoins, la caractérisation de quelques photoproduits a été proposée pour certains corticostéroïdes [20, 172-174]. Toutefois, la stabilité photochimique de ces composés en photolyse directe ou dans des matrices environnementales mérite d'être précisée. Un nombre restreint de publications est dédié à l'étude du comportement photolytique des  $\beta$ -bloquants [164, 175, 177, 178]. Ces travaux sont réalisés dans l'eau pure et l'influence des matrices environnementales sur leur photodégradation reste encore à déterminer. Il semble alors nécessaire d'évaluer la photolabilité des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants dans les matrices environnementales, ainsi que d'identifier les produits issus de la photodégradation de ces substances. Des travaux ont été entrepris dans ce sens et sont présentés dans ce chapitre.

## 1 Matériels et méthodes

### 1.1 Réactifs et solvants

Les réactifs et solvants utilisés pour les études de photodégradation des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants, ainsi que les solutions mère ou de travail préparées sont présentés Chapitre 2 page 64.

L'adrénostérone (99%) provenait de Sigma-Aldrich. Une solution mère à 1 g/L a été préparée dans l'acétonitrile.

Le nitrate d'uranyle hexahydrate (99%), l'acide oxalique dihydrate (99%) et le permanganate de potassium (99%) provenaient de Prolabo. Une solution d'oxalate d'uranyle est préparée dans l'eau à une concentration de 20 mM en  $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$  et 100 mM en  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$  pour les mesures actinométriques.

### 1.2 Conditions de photodégradation

#### 1.2.1 Photoréacteur

Les réactions de photodégradation ont été réalisées dans un photoréacteur à immersion à double paroi en pyrex, d'un volume interne de 2 L (Figure 63). Un puits central à double paroi en pyrex est réservé à une lampe plongeante à vapeur de mercure haute pression (HPK 125W, Philips). Une circulation continue d'eau dans les doubles parois permettait de prévenir tout échauffement de la solution et du pyrex. L'irradiation a été réalisée sous agitation magnétique afin de maintenir l'homogénéité de la solution. Le photoréacteur était recouvert d'une feuille de papier d'aluminium afin d'éviter les pertes de photons ainsi que de s'affranchir de toute pollution par une source lumineuse extérieure. Le réacteur restait ouvert afin de permettre le contact avec l'air tout au long de la dégradation. Par précaution, un réfrigérant était installé sur le photoréacteur afin d'éviter une éventuelle évaporation.

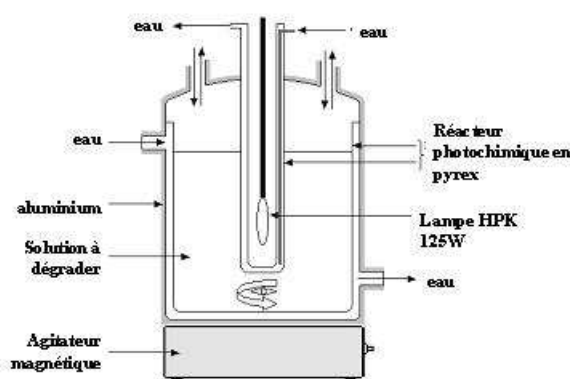


Figure 63 : Dispositif expérimental utilisé lors des études de photodégradation

### 1.2.2 Source d'irradiation

La source d'irradiation utilisée était une lampe à vapeur de mercure haute pression HPK 125W Philips à enveloppe de quartz. Son spectre est composé d'un fond continu auquel se superpose un spectre de raies (Figure 64).

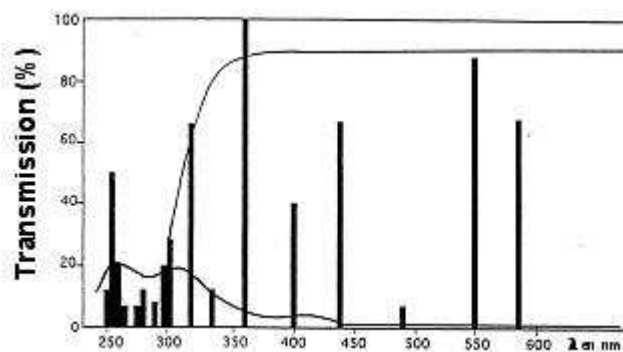


Figure 64 : Spectre d'émission de la lampe HPK 125W, courbe de transmission du pyrex

La couche d'ozone présente dans la haute atmosphère, du fait de la photolyse de l'oxygène, absorbe les rayons UV-C ( $\lambda < 280$  nm). Ainsi, l'énergie solaire est très faible en dessous de 280 nm. Le pyrex filtre les UV-C, ce qui permet de se rapprocher des conditions naturelles. De plus, l'eau utilisée pour le refroidissement du système filtre le rayonnement IR ( $\lambda > 780$  nm).

La stabilité de la lampe au cours du temps a été contrôlée par actinométrie chimique à l'oxalate d'uranyle [192].

### 1.3 Photodégradation des résidus pharmaceutiques

La directive OCDE/GD(97)21 stipule que, pour être environnementalement significatives, les expériences de photodégradation en laboratoire doivent être réalisées à des concentrations inférieures à  $10^{-4}$  mol/L (c'est-à-dire de l'ordre de la dizaine de mg/L pour les corticostéroïdes et les  $\beta$ -bloquants). Toutefois, pour se rapprocher des conditions environnementales, il est intéressant de diminuer cette concentration à des teneurs de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$ . Ces conditions de concentration permettent d'évaluer les cinétiques de dégradations de molécules dans les conditions environnementales mais ne permettent pas de s'intéresser aux photoproduits pour des questions de sensibilité de l'analyse. Il apparaît alors nécessaire d'évaluer la photolabilité des substances non seulement en milieu dilué (de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$ ) mais également en milieu concentré (de l'ordre de la dizaine de mg/L). Après s'être assuré de l'accord des cinétiques de dégradation entre les deux conditions de concentration, les mélanges réactionnels issus des photodégradations en milieu concentré peuvent être utilisés pour la caractérisation des photoproduits. Par ailleurs, le comportement photolytique des molécules est susceptible de dépendre

de la matrice. La caractérisation des photoproduits ne pouvant être réalisée que pour des solutions dans l'eau ultra pure, il a également été nécessaire de vérifier que les photoproduits formés dans ces conditions l'étaient également lors de dégradations dans des matrices environnementales.

### 1.3.1 Photodégradations en milieu dilué

Des dégradations à 10 µg/L ont été réalisées pour des mélanges d'une part de  $\beta$ -bloquants et d'autre part de corticostéroïdes. Pour cela 1 L d'eau a été dopé par 200 µL de la solution mélange à 50 mg/L contenant l'ensemble des  $\beta$ -bloquants ou des corticostéroïdes. Pour les expériences de photolyse directe, l'eau ultra pure était utilisée. Les expériences de photolyse indirecte étaient réalisées en utilisant pour matrice des échantillons d'effluents provenant de la station d'épuration de Pierre-Bénite, préalablement filtrés à 0,45 µm.

Le mélange réactionnel était alors versé dans le photoréacteur et irradié. La cinétique de dégradation était suivie en prélevant des volumes négligeables d'échantillon (1 mL) à intervalles de temps régulier.

### 1.3.2 Photodégradations en milieu concentré

Afin de caractériser les photoproduits, des expériences ont été réalisées sur des solutions à 10 mg/L. Pour cela, 10 mg d'analyte ont été pesés et dissous dans 1L d'eau. L'eau milli-Q était utilisée pour les expériences de photolyse directe. Les expériences de photolyse indirecte ont été réalisées en utilisant pour matrice des échantillons d'effluents provenant de la station d'épuration de Pierre-Bénite, préalablement filtrés à 0,45 µm.

Les cinétiques de disparition de l'analyte et d'apparition/disparition des photoproduits étaient suivies en prélevant des volumes négligeables d'échantillon (1 mL) à intervalles de temps régulier.

## 1.4 Analyse

Les échantillons prélevés ont été analysés par LC/DAD ou LC/DAD/MS/MS.

### 1.4.1 Appareillage

Une chaîne chromatographique Agilent 1100 series constituée d'un dégazeur, d'une pompe quaternaire, d'un passeur d'échantillons et d'un détecteur à barrette de diodes était couplée à un triple quadripôle Sciex API 300 par l'intermédiaire d'une source TIS (TurboIon Spray). Le contrôle de l'appareil et le traitement des données étaient réalisés par le biais du logiciel Analyst 1.4.1.

Le spectromètre de masse a préalablement été calibré en utilisant une solution standard de polypropylène glycol, en réglant la résolution, telle que la largeur à mi-hauteur d'un pic soit dans le domaine  $0,7 \pm 0,1$  uma.

Le gaz de nébulisation (air) et le gaz rideau (azote) étaient fixés à 10 unités arbitraires. La source était chauffée à 400°C pour les analyses des mélanges issus de la dégradation des corticostéroïdes et à 500°C pour les analyses des mélanges issus de la dégradation des  $\beta$ -bloquants. Un gaz desséchant (air) était introduit à un débit de 8 L/min.

## **1.4.2 Conditions d'analyse**

### **1.4.2.1 Photodégradation en milieu dilué**

Les échantillons prélevés lors des expériences en milieu dilué ont été analysés dans les conditions précédemment développées dans le Chapitre 2.

Les échantillons issus de la dégradation de mélanges de corticostéroïdes ont été analysés par LC/MS/MS, en appliquant le gradient eau/AcN présenté Tableau 29 page 95, sur une colonne X-Bridge C18 150 x 2,1 mm, 5 $\mu$ m provenant de Waters. Le chromatogramme résultant de cette analyse est présenté Figure 33, c) page 90. Les paramètres de masse permettant l'analyse des corticostéroïdes en mode MRM positif sont présentés Chapitre 2 en partie 1.3 page 65.

Les échantillons issus de la dégradation de mélanges de  $\beta$ -bloquants ont quant à eux été analysés sur une colonne Hibar Purospher Star RP18e 250 x 4,6, 5 $\mu$ m provenant de Merck, selon le gradient eau 0,1% FOA/AcN présenté Tableau 26 page 89. Le chromatogramme résultant de cette analyse est présenté Figure 31, c) page 85. Les paramètres de masse permettant l'analyse des  $\beta$ -bloquants en mode MRM positif sont présentés Chapitre 2 en partie 1.3 page 65.

### **1.4.2.2 Photodégradation en milieu concentré**

Des conditions d'analyse spécifiques à chaque mélange de dégradation ont été développées. Ces méthodes sont présentées en Annexe 5.

## **2 Photodégradation des corticostéroïdes**

### **2.1 Caractéristiques spectrales**

La Figure 65 présente les spectres UV des corticostéroïdes. Ces spectres montrent que le domaine d'absorbance des corticostéroïdes s'étend au-dessus de 280 nm. Bien que leur absorbance soit faible dans le domaine 280-400 nm, les corticostéroïdes sont susceptibles d'absorber le rayonnement solaire et de se dégrader.

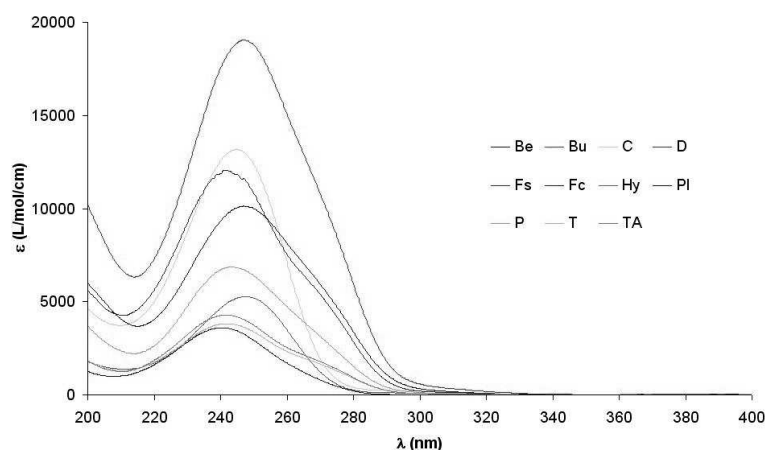


Figure 65 : Spectres UV des corticostéroïdes

## 2.2 Stabilité photochimique

Afin de s'assurer que les réactions observées proviennent effectivement de processus photochimiques, la stabilité des corticostéroïdes en solution aqueuse a préalablement été vérifiée durant 3 mois.

### 2.2.1 Photodégradations en milieu dilué

La photodégradation des corticostéroïdes, étudiée à 10 µg/L, montre une cinétique apparente du premier ordre. La linéarité des courbes  $\ln(c/c_0)$  en fonction du temps a effectivement été observée avec des facteurs de corrélation supérieurs à 0,99 ( $c$  représentant la concentration de la molécule dégradée à l'instant  $t$  et  $c_0$  sa concentration initiale). A titre d'exemple, les droites obtenues pour la fluocinolone acétonide et la budésonide sont présentées Figure 66 pour chaque matrice.

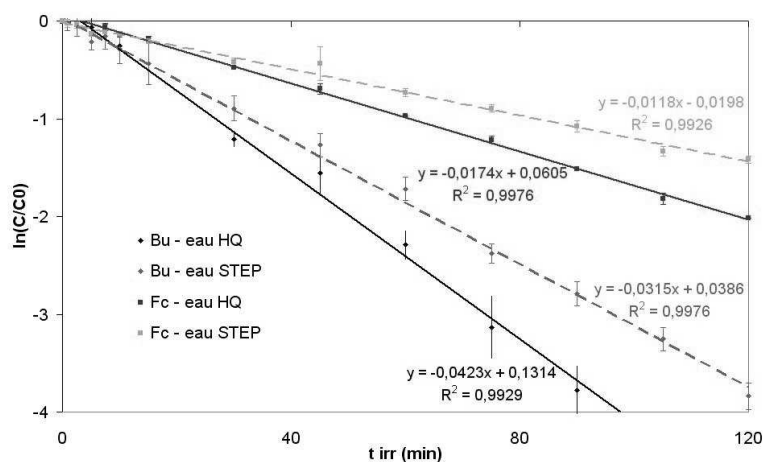


Figure 66: Cinétiques de photodégradation de la budésonide (Bu) et de la fluocinolone acétonide (Fc) à 10 µg/L dans l'eau milli-Q (eau HQ) et dans les matrices environnementales (eau STEP)

Pour chaque matrice, les expériences de photodégradation ont été répétées 4 fois. Une bonne répétabilité des essais est observée avec des coefficients de variations inférieurs à 10% sur les temps de demi-vie. A partir des droites  $\ln(c/c_0) = -kt + \varepsilon$ , les constantes de vitesse pour la photodégradation de chaque molécule ont été évaluées. Les temps de demi-vie des molécules sont calculés selon la relation :

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

Ces grandeurs sont présentées Tableau 59.

**Tableau 59: Temps de demi-vie exprimés en min pour la photodégradation des corticostéroïdes dans l'eau milli-Q ou dans les effluents de STEP, à 10 µg/L**

| molécule | eau HQ <sup>a</sup>                | eau STEP <sup>a</sup>              | eau HQ <sup>b</sup>                |
|----------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
|          | $t_{1/2}$ (DS <sup>c</sup> ) (min) | $t_{1/2}$ (DS <sup>c</sup> ) (min) | $t_{1/2}$ (DS <sup>c</sup> ) (min) |
| Be       | 30,5 (1,1)                         | 31,2 (0,3)                         | 80                                 |
| Bu       | 14,1 (0,5)                         | 22,4 (0,9)                         | 62                                 |
| D        | 32,7 (1,5)                         | 41,9 (2,2)                         | 99                                 |
| Fs       | 19,9 (0,5)                         | 28,2 (0,5)                         | 64                                 |
| Fc       | 40,6 (1,7)                         | 57,8 (2,1)                         | 105                                |
| Pl       | 15,9 (1,0)                         | 15,6 (4,3)                         | 47                                 |
| P        | 16,3 (0,9)                         | 22,4 (2,5)                         | 43                                 |
| T        | 31,8 (3,3)                         | 37,3 (3,1)                         | 116                                |
| TA       | 25,9 (0,9)                         | 36,5 (1,2)                         | 74                                 |

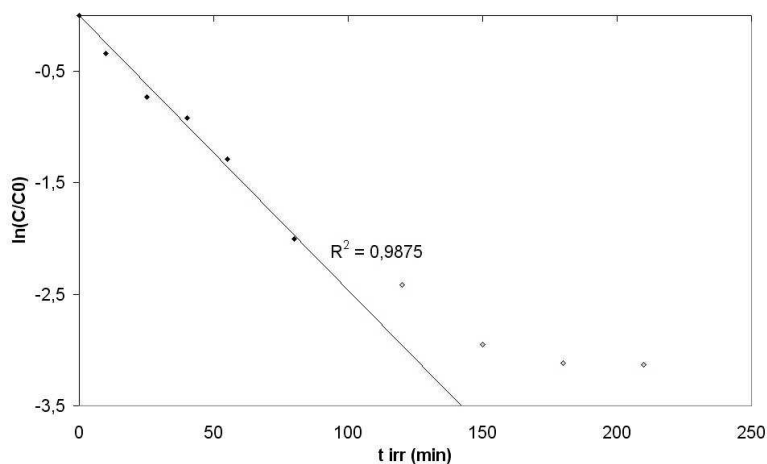
a : irradiation par une lampe HPK 125W

b : irradiation par la lumière solaire

c : Déviation Standard

Pour la plupart des corticostéroïdes il apparaît que les temps de demi-vie mesurés dans les matrices environnementales sont significativement plus grands que ceux mesurés dans l'eau milli-Q. Cela pourrait être dû à une compétition de l'absorption de photons, d'une part par les analytes ciblés, et d'autre part, par d'autres constituants présents dans les eaux de STEP. Il semble donc que la dégradation des corticostéroïdes dans l'environnement puisse s'expliquer par des processus de photolyse directe. Le comportement photolytique de ces molécules, estimé dans l'eau milli-Q est donc relativement proche de celui observé dans les milieux naturels. Les temps de demi-vie observés lors des irradiations par une lampe HPK sont inférieurs à 1 h pour la majorité des composés étudiés. La photodégradation de la cortisone et du cortisol s'est avérée insuffisante sur la durée des expériences (2 h) pour une détermination correcte des cinétiques de dégradation. Il est donc uniquement possible de conclure, à partir de ces données, que le cortisol et la cortisone ont des temps de demi-vie significativement plus importants que les 8 autres corticostéroïdes étudiés. Ces deux molécules sont les seules parmi les 11 étudiées à ne présenter qu'une insaturation sur le cycle A (voir Figure 2 page 22), donc un groupement chromophore de moins que les autres molécules. Il apparaît effectivement que les coefficients d'extinction molaire de ces deux composés sont les plus faibles de la famille sur le domaine 280-400 nm.

Etant données les très faibles stabilités de ces molécules dans les conditions d'irradiation de laboratoire, des essais ont été réalisés en exposant le mélange réactionnel directement à la lumière solaire. Cette étude n'inclut pas la cortisone et le cortisol, car étant donnée leur plus lente dégradation une journée d'ensoleillement n'aurait pas permis de les dégrader suffisamment pour estimer leur temps de demi-vie. Il faut de plus souligner que ces expériences ont été réalisées mi-septembre, soit dans des conditions d'ensoleillement relativement élevées. Les temps de demi-vie observés ne sont que 2 à 3 fois supérieurs à ceux observés lors de l'irradiation par une lampe HPK. Ceci souligne la grande instabilité des corticostéroïdes sous rayonnement solaire. D'autre part, du fait de la variation de l'intensité lumineuse au cours de la journée de moins bons facteurs de corrélation ont été observés. A titre d'exemple la cinétique de dégradation de la prednisone exposée au rayonnement solaire est présentée Figure 67.



**Figure 67 : Cinétique de dégradation de la prednisone à 10 µg/L exposée au rayonnement solaire.**

Une cinétique apparente du premier ordre est là encore observée. Les derniers prélèvements n'ont pas été pris en compte dans la détermination de la constante de vitesse du fait de la perte de linéarité sur ces points. Cet écart à la linéarité pourrait être dû à la diminution du flux photonique du fait de la plus faible intensité du rayonnement solaire en fin de journée.

Les déviations standard sur les temps de demi-vie n'ont pas pu être évaluées du fait de la variabilité de l'intensité du rayonnement solaire sur plusieurs jours. Toutefois, elles sont probablement très supérieures à celles mesurées dans les conditions de dégradation de laboratoire du fait de la moins précise détermination de la pente de la droite  $\ln(c/c_0) = -kt + \epsilon$ .

D'autre part, ces conditions ne reflètent pas ce qui se passe réellement dans l'environnement. Des paramètres tels que la turbidité ou la température sont susceptibles de modifier les temps de demi-vie et doivent effectivement être pris en compte.



### 2.2.2 Photodégradations en milieu concentré

Les comportements photolytiques des corticostéroïdes dans l'eau milli-Q et dans l'eau de STEP étant semblables, les photodégradations en milieu concentré ont été évaluées uniquement dans l'eau milli-Q.

A titre d'exemple, la Figure 68 montre les cinétiques de dégradation observées pour la cortisone et la triamcinolone.

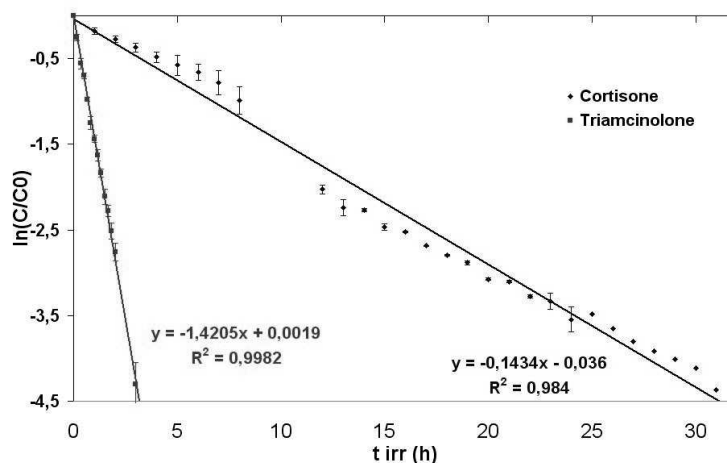


Figure 68 : Cinétiques de photodégradation de la Cortisone et de la Triamcinolone à 10 mg/L, n=5

Le Tableau 60 synthétise les temps de demi-vie mesurés pour les corticostéroïdes à 10 mg/L.

Tableau 60: Temps de demi-vie des corticostéroïdes sous irradiation UV dans l'eau milliQ, à 10 mg/L

| molécule                     | $t_{1/2}$ |
|------------------------------|-----------|
| Cortisone (C)                | 4h45min   |
| Triamcinolone T)             | 26 min    |
| Triamcinolone acétonide (TA) | 26 min    |
| Dexaméthasone (D)            | 35 min    |
| Prednisolone (Pl)            | 28 min    |

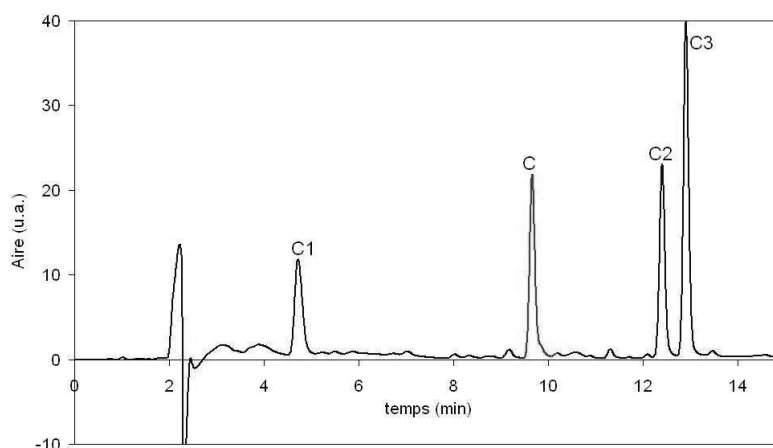
Les temps de demi-vie observés à cette concentration sont similaires à ceux mesurés en solution diluée. Cela est particulièrement vérifié pour la triamcinolone, la triamcinolone acétonide et la dexaméthasone, alors qu'il y a une certaine influence de la concentration pour la cortisone et la prednisolone. Ces résultats sont en accord avec la cinétique postulée, puisque la vitesse de dégradation de ces molécules est indépendante de la concentration.

Nous avons ainsi montré que la photodégradation des corticostéroïdes est peu sensible à la matrice considérée, et à la concentration à laquelle sont réalisées les expériences. De ce fait l'étude des photoproduits réalisée dans l'eau milli-Q, à de fortes concentrations, est représentative de ce qui se produit dans l'environnement.

## 2.3 Etude des photoproduits

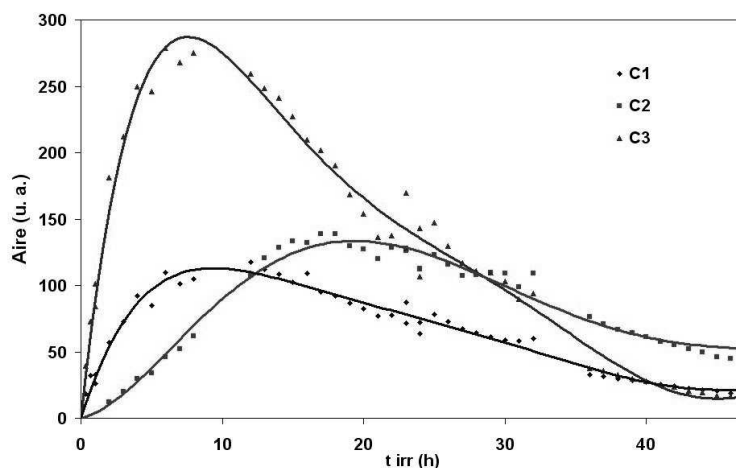
### 2.3.1 Cortisone

La photodégradation de la cortisone conduit à la formation de 3 principaux photoproduits. Le chromatogramme obtenu après 14 h d'irradiation d'une solution de cortisone à 10 mg/L est présenté Figure 69.



**Figure 69 :** Chromatogramme d'une solution de cortisone à 10 mg/L irradiée 14h par une lampe HPK (C : cortisone et C1, C2, C3 : principaux photoproduits) ; paramètres chromatographiques présentés en Annexe 5

Les cinétiques d'apparition/disparition de ces photoproduits sont présentées Figure 70

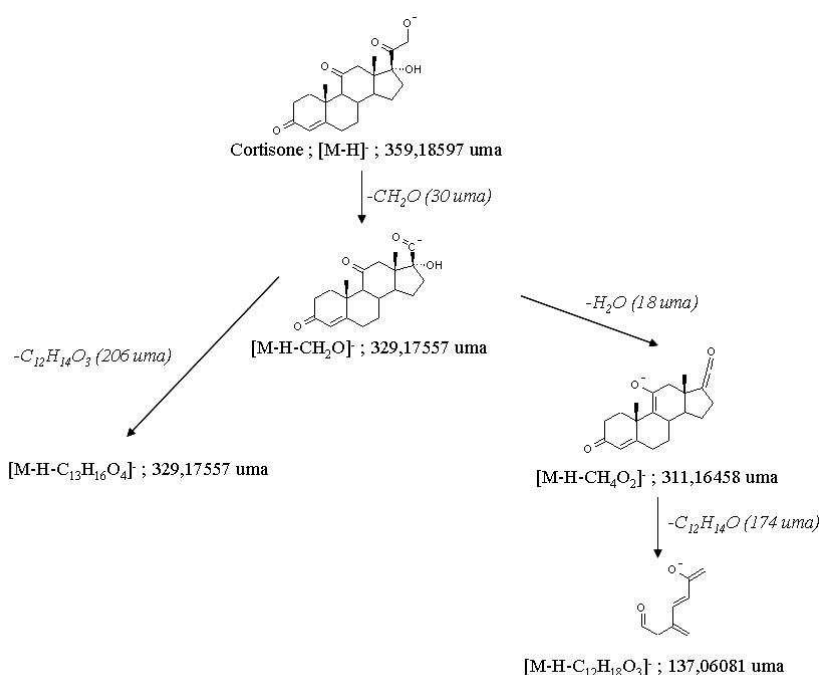


**Figure 70 :** Cinétiques d'apparition/disparition des principaux photoproduits de la cortisone (C1, C2, C3)

Après 40 h d'irradiation, la minéralisation de la cortisone n'est pas complète et les 3 principaux photoproduits décrits précédemment sont toujours présents. Des analyses par spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) ont donc été effectuées pour les caractériser. Ces analyses ont été réalisées par l'Institut für Siedlungs-Wasserwirtschaft (Aix-la-Chapelle, Allemagne) sur un spectromètre de

masse de type Orbitrap équipé d'une source ESI, en mode négatif. Ces analyses ont permis de déterminer les formules brutes des composés C1, C2 et C3, ainsi que celles de leurs principaux fragments.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la fragmentation de la cortisone, afin de mieux comprendre la fragmentation de ses photoproduits en spectrométrie de masse. La fragmentation de la cortisone est schématisée Figure 71.



**Figure 71: Schéma de fragmentation de la cortisone en ESI (-)/MS<sup>n</sup>**

Il apparaît alors que la perte d'une masse 30 uma (CH<sub>2</sub>CO) en MS<sup>2</sup> est caractéristique de la chaîne latérale. La perte consécutive en MS<sup>3</sup> d'une molécule d'eau (18 uma) indique la présence d'une fonction alcool en position C17. Lorsque la cortisone est davantage fragmentée, on observe la rupture en chaîne du noyau cyclopentanophénanthrène, associée à de complexes mécanismes de réarrangement.

Le composé (C1) a été isolé du mélange réactionnel par SPE (protocole présenté en Annexe 5). La fragmentation de (C1) est schématisée Figure 72.

(C1) est détecté à une masse de 377 uma, ce qui correspond à la formule brute C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>O<sub>6</sub>. Sa fragmentation en MS<sup>2</sup> conduit à 3 fragments intenses de masse 359 uma (perte d'eau), 347 uma (perte de formaldéhyde) et 329 uma (perte de CH<sub>4</sub>O<sub>2</sub>). Comme cela a été indiqué précédemment, la perte de CH<sub>2</sub>O indique que la chaîne latérale n'a pas été modifiée. (C1) peut perdre une molécule d'eau en MS<sup>2</sup>, ce qui n'était pas le cas de la cortisone. Ceci pourrait suggérer la présence d'autres fonctions hydroxyle. Enfin la perte de CH<sub>4</sub>O<sub>2</sub> peut être attribuée à ces 2 structures :

- Peroxyde : H<sub>3</sub>C-O-O-H
- Alcools géminaux : HO-CH<sub>2</sub>-OH

Si la première hypothèse était vérifiée, le photoproduit (C1) présenterait également une fonction peroxyde. Ceci se traduirait, en spectrométrie de masse, par une déprotonation au niveau de cette fonction, qui entraînerait une perte d'O<sub>2</sub> (32 uma). Or la perte d'une masse 32 uma n'a pas été observée lors de la fragmentation du composé (C1). Cette hypothèse semble alors peu plausible.

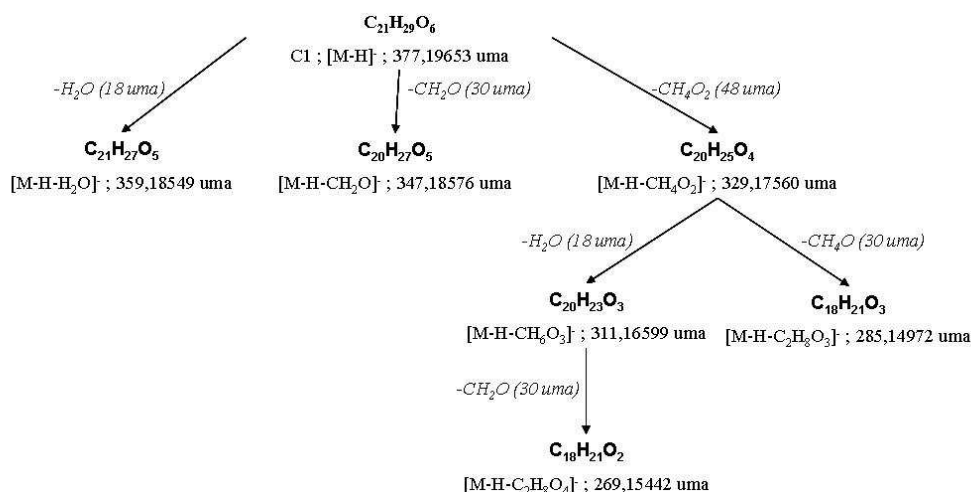


Figure 72: Schéma de fragmentation du photoproduit C1 en ESI (-)/MS<sup>n</sup>

Comme nous l'avons vu précédemment, la modification chimique n'a pas eu lieu sur la chaîne latérale, dès lors, la présence d'alcools géminaux ne peut provenir que d'une ouverture de cycle. Dans ce cas, la fragmentation en MS<sup>n</sup> de l'ion fragment 329 uma suivrait un mécanisme différent de la fragmentation de la cortisone. Effectivement les fragments de (C1) ne peuvent pas être corrélés aux fragments de la cortisone. La structure finalement proposée pour (C1) est présentée Figure 73.

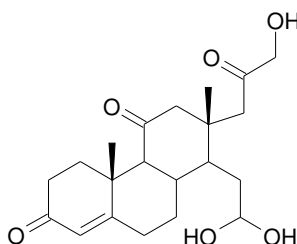
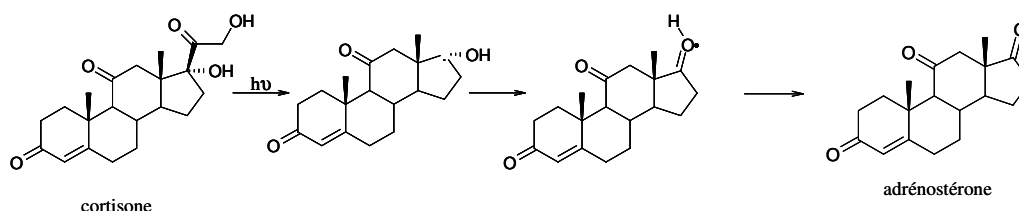


Figure 73: Structure proposée pour le photoproduit (C1)

Afin de conforter cette hypothèse, des analyses RMN ont été entreprises. Les stéroïdes répondent peu en RMN, ce qui requiert d'importantes quantités de produit dont nous ne pouvions pas disposer. Malgré des temps d'accumulation très long, la sensibilité s'est avérée être insuffisante pour pouvoir exploiter les spectres RMN<sup>13</sup>C. Les spectres acquis en RMN du proton pour la cortisone et le composé (C1) sont présentés en Annexe 6. Le signal, de l'hydrogène en C4, ainsi que des hydrogènes en C21 (chaîne latérale) sont présents sur les 2 spectres, indiquant une similarité structurale des 2 composés en ces positions. Le signal de la fonction alcool en C17 n'est plus présent sur le spectre de (C1), ce qui

confirme l'absence de la fonction alcool en cette position. Par ailleurs, 2 doublets apparaissent à 3,5 et 3,7 ppm sur le spectre de (C1), pouvant être attribués aux fonctions alcool geminales. Ainsi, les éléments d'information qui ont pu être obtenus suite à l'analyse RMN<sup>1</sup>H du photoproduit (C1) semblent confirmer la proposition de structure réalisée Figure 73. Par ailleurs, le chromatogramme obtenu Figure 69 montre que le photoproduit (C1) est plus hydrophile que la cortisone car il est élué à un plus faible pourcentage d'AcN. La présence d'un plus grand nombre de fonctions alcool sur la structure proposée est effectivement révélatrice d'une plus grande polarité.

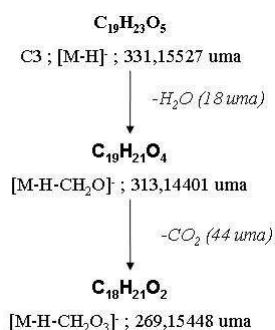
Les composés (C2) et (C3) n'ayant pas pu être extraits séparément du mélange réactionnel, leur analyse a été réalisée en couplage LC/HRMS. L'analyse du composé (C2) montre que ce composé a pour formule brute C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>. On constate par ailleurs qu'une rupture de type Norrish I (voir Chapitre 1, partie 4.3.2.1.2, page 52) au niveau de la fonction carbonyle en C20 peut conduire à la formation d'adrénostérone selon le mécanisme réactionnel présenté Figure 74.



**Figure 74: Mécanisme de formation de l'adrénostérone par irradiation photonique de la cortisone**

L'adrénostérone étant une molécule commerciale, la bonne adéquation des temps de rétention en chromatographie et de la fragmentation en spectrométrie de masse de l'adrénostérone commerciale et du composé (C2) a pu être vérifiée.

Pour le composé (C3) qui ne semble pas être commercialisé et qui n'a pas pu être extrait du mélange en raison de son hydrophobicité proche de (C2), peu d'informations ont pu être obtenues. La fragmentation de (C3) en MS<sup>2</sup> est schématisée Figure 75.



**Figure 75: Schéma de fragmentation du photoproduit (C3) en ESI (-)/MS<sup>2</sup>**

La perte d'une masse 30 uma n'est pas observée ce qui suggère une modification de la chaîne latérale. La fragmentation du composé (C3), de formule brute C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>O<sub>5</sub>, conduit à la perte d'une molécule d'eau, la fragmentation consécutive de l'ion de masse 269 uma génère une perte de CO<sub>2</sub>. De façon

générale, la perte d'une molécule de  $\text{CO}_2$  en spectrométrie de masse provient de fonctions acide carboxylique. Il semble alors que la perte d'une molécule d'eau lors de la fragmentation de (C3) conduise à la formation d'une fonction acide carboxylique. Cette fonction ne semble pas présente pour le composé (C3) puisque la perte de 44 uma n'est pas observée en  $\text{MS}^2$ . La molécule proposée Figure 76 est alors une hypothèse possible de structure du photoproduit (C3).

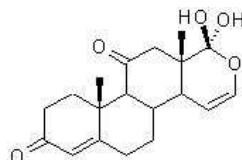


Figure 76: Hypothèse de structure pour le photoproduit (C3)

### 2.3.2 Triamcinolone

La triamcinolone se dégrade selon un schéma beaucoup plus complexe puisque 9 photoproduits apparaissent. Les cinétiques d'apparition/disparition de ces photoproduits sont présentées Figure 77.

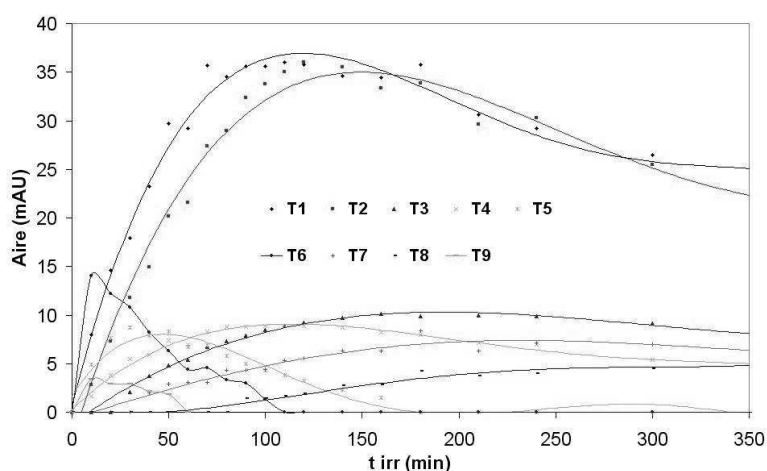


Figure 77 : Cinétiques d'apparition/disparition des photoproduits de la triamcinolone

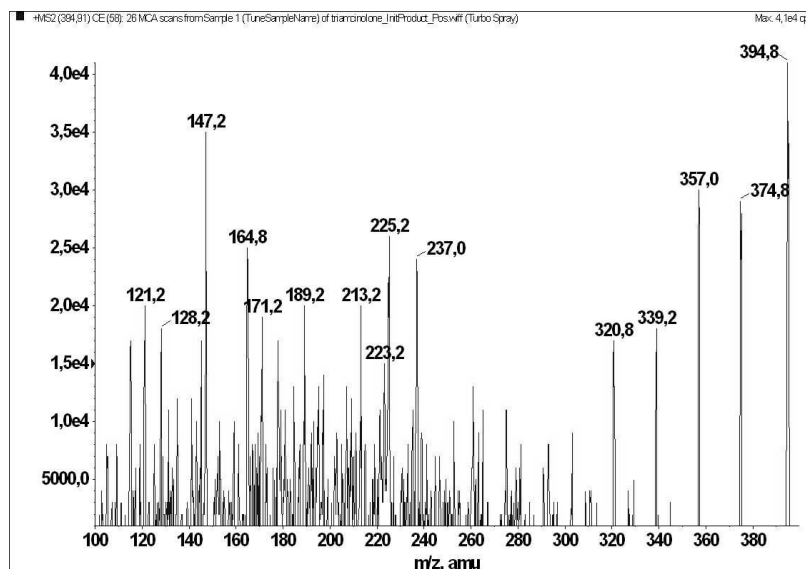
Cette étude cinétique montre que les composés T1, T2, T5 T6 et T9 apparaissent de façon quasi instantanée lorsque la solution de triamcinolone est soumise au rayonnement UV. Les produits T3, T7 et T8 n'apparaissent qu'après un certain avancement de la réaction. Il est donc probable que ces composés soient issus de la dégradation consécutive des photoproduits précédemment cités.

Afin d'identifier ces photoproduits, différentes analyses LC/ MS/MS ont été réalisées sur le mélange réactionnel préconcentré 50 fois par SPE (protocole présenté en Annexe 5).

La fragmentation de la triamcinolone a au préalable été étudiée. L'ion moléculaire ( $[M+H]^+ = 395$  uma) se fragmente en ions correspondant à la perte de HF (20 uma) et H<sub>2</sub>O (18 uma) en série (Figure 78). On obtient les ions suivants :

- $[M+H-HF]^+ = 375$  uma
- $[M+H-H_2O-HF]^+ = 357$  uma
- $[M+H-2H_2O-HF]^+ = 339$  uma
- $[M+H-3H_2O-HF]^+ = 321$  uma
- $[M+H-4H_2O-HF]^+ = 303$  uma

Les autres principaux fragments observables (121 uma, 147 uma, 225 uma) sur le spectre de la triamcinolone sont typiques des fragmentations des stéroïdes et ont été déjà relevés par Cavina *et al.* [193]. Le mécanisme des fragmentations est cependant incertain, et les ions cités précédemment n'ont pas été identifiés. Ils correspondent aux fragmentations du squelette cyclopentanophénantrène.



**Figure 78 : Spectre de fragmentation de la triamcinolone en mode positif avec une source TIS**

L'analyse LC/MS/MS du mélange de photodégradation de la triamcinolone a permis de déterminer les masses des photoproduits et de leurs principaux fragments.

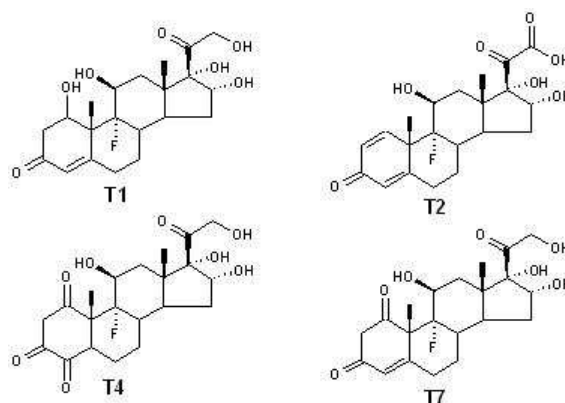
On constate que les photoproduits T4, T5 et T8 présentent des fragments correspondant à la perte de HF (-20 uma). L'atome de fluor reste donc présent sur ces photoproduits.

**Tableau 61: Analyse de la triamcinolone (T) et de ses photoproduits par LC/TIS/MS/MS**

| Composé                 |                            | T1    | T2    | T3    | T4    | T5    | T6    | T7    | T8    | T9    | T     |
|-------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Pics observés en MS (-) | masse (uma)                | 411,5 | 407,0 | 457,0 | 425,0 | 393,4 | 423,0 | 409,0 | 393,4 | -     | 393,4 |
|                         | principaux fragments (uma) | 375   | 377   | 441   | 395   | 363   | 375   | 379,5 | 363   | -     | 363   |
|                         |                            | 363   | 359   | 393   | 377   | 345   | 343   | 361   | 345   | -     | 345   |
| Pics observés en MS (+) | masse (uma)                | 413,4 | 409,0 | 459,0 | 427,0 | 395,4 | 425,0 | 411,0 | 395,5 | 395,5 | 395,5 |
|                         | principaux fragments (uma) | 395   | 361   | 441   | 411   | 377   | 375   | 393   | 375   | 347   | 375   |
|                         |                            | 377   | 349   | 395   | 393   | 359   | 365   | 375   | 357   | 315   | 357   |

De plus, il est intéressant de noter que tous les photoproduits ont des masses supérieures à la triamcinolone. Dans les conditions opératoires appliquées seuls peuvent être envisagées des clivages ou réarrangements de la molécule ainsi que des réactions d'oxydation et d'hydrolyse.

En s'appuyant sur les résultats de l'analyse LC/MS/MS et sur les cinétiques d'apparition des photoproduits, plusieurs structures peuvent être proposées (Figure 79). Les composés T5, T8 et T9 sont de même masse que la triamcinolone (T). Ils sont donc probablement issus de réarrangements de la molécule.

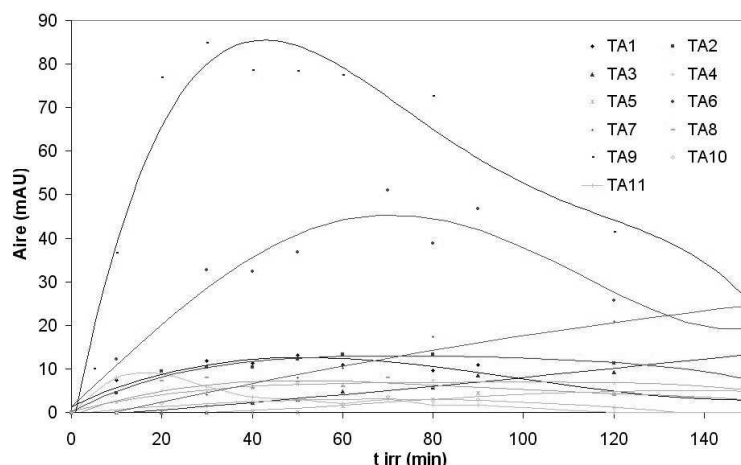
**Figure 79: Propositions de structures pour les photoproduits de la triamcinolone**

Le composé T1 pourrait provenir de l'hydrolyse de la double liaison C2-C3, l'oxydation du produit T1 conduirait alors à la formation de T7. Le composé T2 pourrait provenir de l'oxydation de la chaîne latérale en position C21. T4 serait formé suite à l'oxydation des 2 doubles liaisons du cycle A.



### 2.3.3 Triamcinolone acétonide

La photodégradation de la triamcinolone acétonide conduit à la formation de 11 principaux photoproduits (Figure 80).



**Figure 80 : Cinétiques d'apparition/disparition des photoproduits de la triamcinolone acétonide**

Les composés TA1, TA2, TA4, TA6, TA9, TA10 et TA11 sont formés instantanément lorsque la solution de triamcinolone acétonide est soumise au rayonnement UV. Les produits TA3, TA5, TA7 et TA8, n'apparaissent qu'après un certain délai (10, 50, 10 et 5 min respectivement) et sont donc probablement issus de la dégradation consécutive des photoproduits. Bien que la triamcinolone acétonide se dégrade avec une cinétique très rapide, il est intéressant de noter que les composés TA3, TA5 et TA7 restent détectables après 18 h d'irradiation UV.

Afin de caractériser ces photoproduits, le mélange réactionnel a été analysé par LC/MS/MS. La fragmentation de la triamcinolone acétonide en spectrométrie de masse a été étudiée au préalable.

Tout comme la Triamcinolone, la Triamcinolone acétonide ( $[M+H]^+ = 435.4$  uma) se fragmente en ions correspondant à la perte de HF, H<sub>2</sub>O et (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO. Les ions suivants sont observés (Figure 81) :

- $[M+H-HF]^+ = 415$  uma
- $[M+H-H_2O-HF]^+ = 397$  uma
- $[M+H-H_2O-HF-(CH_3)_2CO]^+ = 339$  uma
- $[M+H-2H_2O-HF-(CH_3)_2CO]^+ = 321$  uma
- $[M+H-3H_2O-HF-(CH_3)_2CO]^+ = 303$  uma

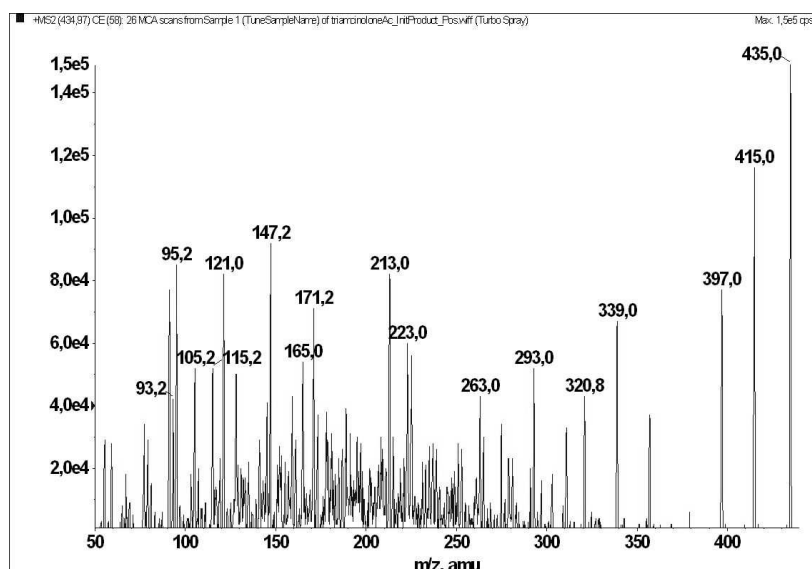


Figure 81: Spectre de fragmentation de la triamcinolone acétonide en mode positif avec une source d'ionisation APCI

Les autres principaux fragments observables sur le spectre de la triamcinolone acétonide sont typiques des fragmentations des stéroïdes, comme cela a précédemment été observé pour la triamcinolone.

L'analyse LC/MS/MS du mélange de dégradation préconcentré 50 fois par SPE (voir Annexe 5) a permis de déterminer les masses molaires de ces photoproduits et l'identification de leurs fragments majoritaires en spectrométrie de masse (Tableau 62)

Tableau 62: Analyse de la triamcinolone acétonide (TA) et de ses photoproduits par LC/TIS/MS/MS

| Composé                 |                            | TA1   | TA2   | TA3   | TA4   | TA5   | TA6   | TA7   | TA    | TA8   | TA9   | TA10  | TA11 |
|-------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| Pics observés en MS (-) | [M+H] <sup>+</sup> (uma)   | 333,4 | 451,0 | 425,6 | 449,4 | 423,6 | 447,3 | 421,6 | 433,3 | 465,5 | 407,4 | 449,4 | -    |
|                         | principaux fragments (uma) | 313,5 | 431   | 375,4 | 429,6 |       | 433,2 |       |       |       |       |       |      |
|                         |                            | 263,3 | 413   | 349,5 | 371,5 | 470,6 | 415,2 |       | 480,4 | 451,6 | 454,5 | 496,5 | -    |
|                         |                            | 212,3 | 375   | 329,4 | 353,2 | 394,5 | 359,4 | -     | 357,4 | 439,5 | 378,6 | 433,3 | -    |
| Pics observés en MS (+) | [M+H] <sup>+</sup> (uma)   | 335,1 | 453,5 | 427,7 | 451,4 | 425,4 | 449,3 | 423,3 | 435,4 | 467,4 | 467,4 | 451,4 | -    |
|                         | principaux fragments (uma) | 315   | 435   |       |       |       |       |       | 415,2 |       |       |       |      |
|                         |                            | 297   | 415   |       | 433,3 |       |       | 389,5 | 397,4 |       |       |       |      |
|                         |                            | 279   | 396   | 351,5 | 375,4 | 407,5 |       | 331,4 | 357,4 | 441,5 | 409,4 | 435,5 | -    |
|                         |                            | 251   | 377   | 281,4 | 309,4 | 315,4 | -     | 271,1 | 339,4 | 415,3 | 389,5 | 357,5 | -    |
|                         |                            | 225   | 357   |       | 279,1 |       |       | 239,1 | 293,3 |       | 314,5 |       |      |
|                         |                            |       | 339   |       |       |       |       |       | 263,1 |       |       |       |      |
|                         |                            |       |       |       |       |       |       |       | 213,1 |       |       |       |      |

Ces analyses ont permis de proposer des structures pour certains photoproduits (Figure 82).

La formation du produit TA1 pourrait être issue d'une rupture de type Norrish I au niveau de la fonction carbonyle en C20. Ce clivage conduit à la perte de la fonction acétale. La molécule TA2 pourrait provenir de l'hydratation de la double liaison C1-C2. L'oxydation consécutive de TA2 permettrait alors la formation de TA4 et TA10. Le composé TA6 pourrait être formé suite à

l'oxydation de la chaîne latérale en C21. La molécule TA9 proviendrait de l'oxydation des doubles liaisons du cycle A et de leur hydrolyse consécutive. Le mécanisme de formation de TA9 passerait alors probablement par un intermédiaire réactionnel constitué d'un pontage interne au cycle A par  $O_2$  (Figure 83).

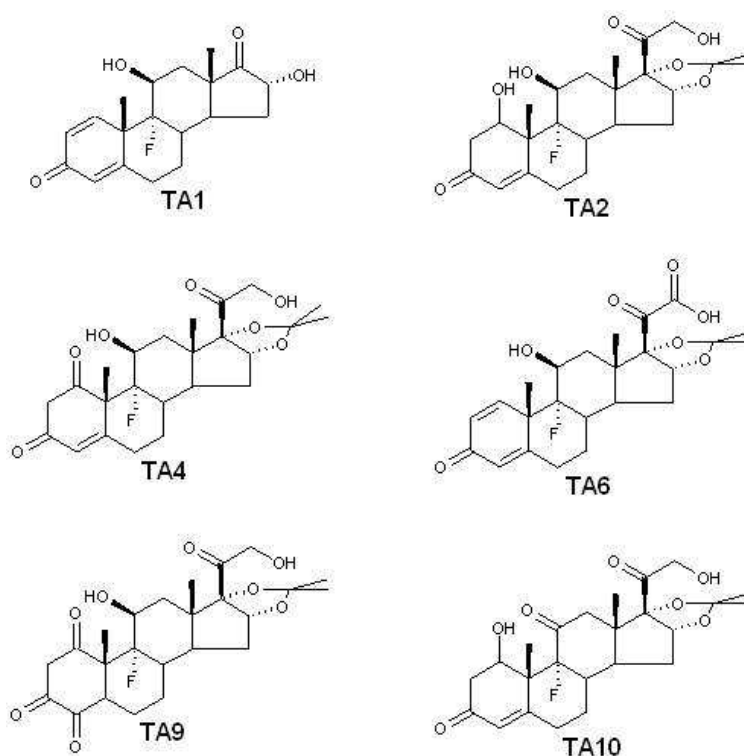


Figure 82: Propositions de structures pour les photoproduits de la triamcinolone acétonide

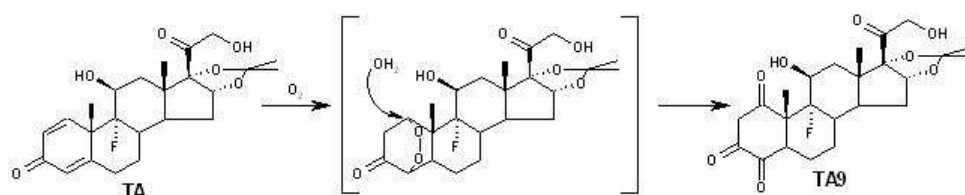


Figure 83 : Proposition de mécanisme pour la formation de TA9

Les structures caractérisées par Ricci *et al.* n'ont pas été observées dans cette étude du fait des conditions expérimentales très différentes. Ricci *et al.* étudiaient effectivement la photodégradation de la triamcinolone acétonide en solvant organique et sous atmosphère inerte, alors que cette étude est réalisée dans l'eau et en présence d'oxygène. Les principaux produits identifiés dans cette étude résultent effectivement de réactions d'hydratation ou d'oxydation.

### 2.3.4 Conclusions

L'instabilité des corticostéroïdes sous irradiation UV a été observée. Dans les matrices environnementales comme dans l'eau milli-Q, ces molécules ont des temps de demi-vie inférieurs à 1 h dans les conditions de laboratoire, à l'exception de la cortisone et du cortisol pour lesquels des temps de demi-vie de l'ordre de 5 h ont été observés.

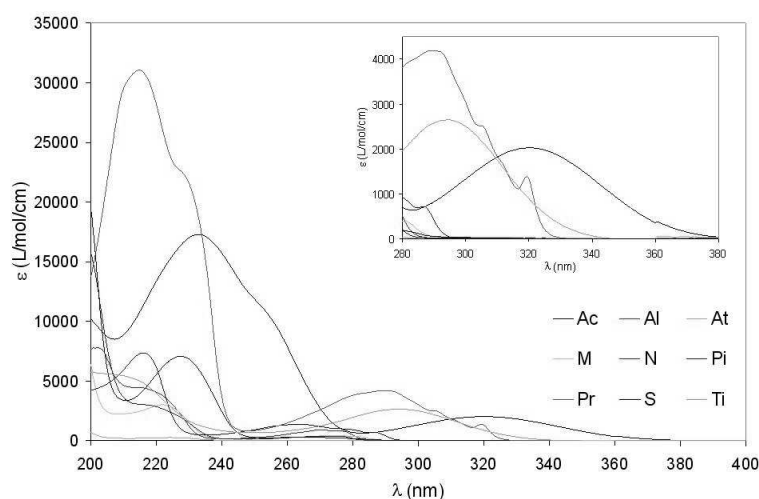
L'analyse LC/MS/MS a permis d'émettre des hypothèses quant aux structures des photoproduits de la triamcinolone et de la triamcinolone acétonide. Une analyse RMN pourrait permettre de confirmer ces structures. Toutefois du fait des polarités relativement proches des photoproduits il n'est pas aisé de les isoler. De plus, la RMN des stéroïdes requiert des quantités très importantes de produit (plusieurs mg) afin d'atteindre une sensibilité suffisante et donc des temps d'acquisition raisonnables. Les conditions expérimentales ne permettent pas d'obtenir de telles quantités de photoproduits. Ces molécules n'étant pas commerciales, il faudrait envisager leur synthèse pour confirmer ces résultats.

Une autre stratégie consisterait à analyser ces photoproduits au moyen de spectromètres de masse de très haute résolution (de type Orbitrap), comme cela a été réalisé pour la cortisone. A partir de la masse exacte de la molécule, ainsi que celle des principaux fragments, il serait alors possible de déterminer les structures des photoproduits.

## 3 Photodégradation des $\beta$ -bloquants

### 3.1 Caractéristiques spectrales

Les spectres UV des  $\beta$ -bloquants (Figure 84) montrent que la plupart des molécules n'absorbent que dans le domaine des UV-C et ne peuvent *a priori* pas être photodégradées dans l'environnement. Seuls l'acébutolol, le pindolol, le propranolol et le timolol ont un domaine d'absorbance qui s'étend au-delà de 280 nm. Un intérêt particulier sera donc porté à ces molécules.



### 3.2 Stabilité photochimique

Afin de s'assurer que les réactions observées proviennent effectivement de processus photochimiques, la stabilité des  $\beta$ -bloquants en solution aqueuse a préalablement été vérifiée durant 3 mois.

#### 3.2.1 Photodégradations en milieu dilué

La photodégradation des  $\beta$ -bloquants, étudiée à 10  $\mu\text{g/L}$  montre une cinétique apparente du premier ordre. La linéarité des courbes  $\ln(c/c_0)$  en fonction du temps est effectivement vérifiée ( $c$  représentant la concentration de la molécule dégradée à l'instant  $t$  et  $c_0$  sa concentration initiale). A titre d'exemple, les droites obtenues pour le nadolol et le propranolol dans chaque matrice sont présentées Figure 85.

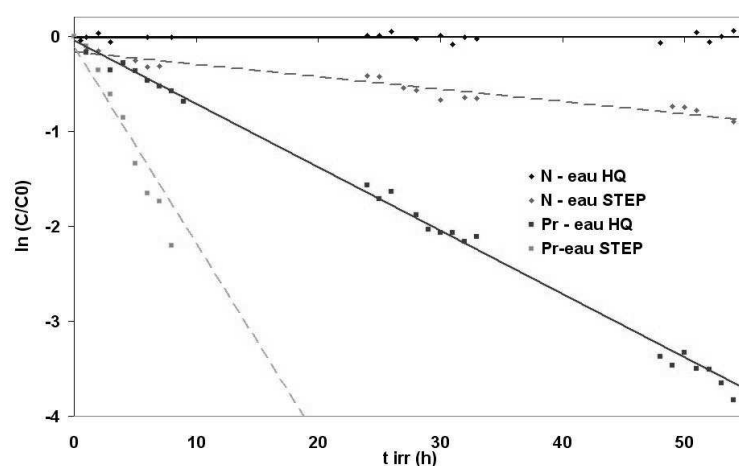


Figure 85: Cinétiques de photodégradation du Nadolol (N) et du Propranolol (Pr) à 10 $\mu\text{g/L}$  dans l'eau milli-Q (eau HQ) et dans une eau environnementale (eau STEP)

Les dégradations dans les eaux environnementales ont été répétées 3 fois. Il est à noter que pour déterminer de façon correcte les constantes de vitesse, les durées d'irradiation doivent être supérieures à 48 h. La répétition des essais ne peut donc être réalisée que sur des échantillons différents, du fait de la possible instabilité de la matrice sur plusieurs jours. Les temps de demi-vie (Tableau 63) sont estimés à partir de la constante de vitesse, selon l'équation :

$$t_{1/2} = \ln 2/k$$

**Tableau 63: Temps de demi-vie des  $\beta$ -bloquants sous irradiation UV dans l'eau milli-Q ou dans les effluents de STEP**

| molécule | eau HQ        | eau STEP      |               |               |
|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|          |               | échantillon 1 | échantillon 2 | échantillon 3 |
|          | $t_{1/2}$ (h) | $t_{1/2}$ (h) | $t_{1/2}$ (h) | $t_{1/2}$ (h) |
| Ac       | 144*          | 28            | 20            | 10            |
| Al       | stable        | 50            | 20            | 10            |
| At       | stable        | stable        | stable        | stable        |
| Bx       | stable        | 48            | /             | 18            |
| Bi       | stable        | 70            | 40            | 15            |
| Bp       | stable        | 36            | /             | 37            |
| Ct       | stable        | 55            | /             | 24            |
| M        | stable        | 48            | 20            | 20            |
| N        | stable        | 54            | 29            | 20            |
| Ox       | 267*          | 9             | /             | 6             |
| Pi       | 16 (2)        | 2             | 4             | 1             |
| Pr       | 8 (0,4)       | 3             | 4             | 3             |
| S        | stable        | 8             | 6             | 4             |
| Ti       | 33 (4)        | 5             | 5             | 3             |

\* : valeurs extrapolées

Conformément à ce qui était attendu au vu des caractéristiques spectrales des  $\beta$ -bloquants (Figure 84), les molécules n'absorbant pas dans le domaine des UV-A et UV-B sont stables dans des conditions de photolyse directe. La dégradation de ces molécules peut toutefois être initiée par des photosensibilisateurs présents dans les eaux environnementales, à l'exception de l'aténolol qui reste stable dans des conditions de photolyse indirecte.

Il est toutefois à remarquer que l'acébutolol se dégrade peu lorsqu'il est soumis à une irradiation UV alors que cette molécule présente un important domaine d'absorbance dans le domaine des UV-B. Il est possible que les principaux phénomènes de désexcitation pour ce composé soient la phosphorescence ou la fluorescence, qui ne conduisent pas à la destruction de la molécule. La littérature montre effectivement que l'acébutolol est une molécule fluorescente [194].

Par ailleurs, on constate une grande variabilité des temps de demi-vie dans les échantillons environnementaux. En effet, afin d'estimer correctement ces temps de demi-vie, il est nécessaire de réaliser un suivi de la cinétique de dégradation sur une durée de 50 h au minimum.

Expérimentalement, cela requiert 3 semaines de manipulation (temps de préparation + temps de dégradation). Dès lors 2 stratégies peuvent être envisagées pour étudier les cinétiques de dégradation dans les eaux environnementales :

- Utiliser un même échantillon de STEP pour les différentes expériences. Toutefois, cette stratégie implique de conserver la matrice sur une période de 3 semaines. Etant donnée l'instabilité des échantillons, cette stratégie ne permet pas de disposer de matrices équivalentes.
- Utiliser des échantillons de STEP prélevés à des dates différentes. Toutefois cette stratégie ne permet pas non plus de disposer de matrices équivalentes.

Pour répéter la dégradation dans des matrices semblables, il faudrait alors réaliser ces expériences en parallèle. Dans ce cas plusieurs photoréacteurs ainsi que plusieurs lampes différentes doivent être utilisés. La modification de la géométrie du système, ainsi que de la source d'irradiation sont susceptibles de modifier l'absorption des photons par le mélange réactionnel, ne permettant alors pas la comparaison des résultats.

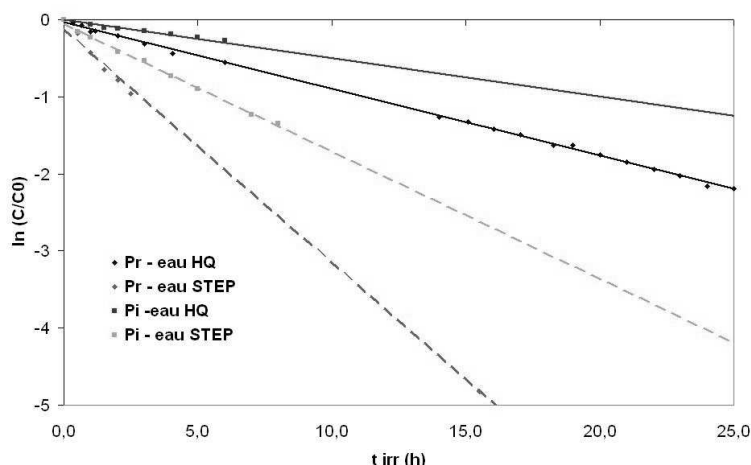
Il est donc impossible de répéter les expériences de photodégradation des  $\beta$ -bloquants dans des conditions parfaitement similaires. L'estimation des déviations standard sur les temps de demi-vie de ces molécules dans les eaux environnementales ne peut donc pas être réalisée.

Il apparaît toutefois que les photostabilités des  $\beta$ -bloquants sont fortement dépendantes de la matrice, dès lors la détermination des déviations standard pour une unique matrice a peu de sens d'un point de vu environnemental.

### 3.2.2 Photodégradations en milieu concentré

Les  $\beta$ -bloquants étant sujets à la photolyse indirecte, leurs comportements photolytiques ont été évalués dans l'eau milli-Q et dans l'eau de STEP.

A titre d'exemple, la Figure 86 montre les cinétiques de dégradation observées pour le pindolol et le propranolol.



**Figure 86 : Cinétiques de photodégradation du pindolol et du propranolol à 10 mg/L dans l'eau milli-Q et dans les eaux environnementales (effluents de STEP)**

Le Tableau 64 rassemble les temps de demi-vie mesurés pour les  $\beta$ -bloquants à 10 mg/L.

**Tableau 64: Temps de demi-vie des  $\beta$ -bloquants sous irradiation UV dans l'eau milli-Q ou dans les effluents de STEP**

| molécule         | eau HQ | eau STEP |
|------------------|--------|----------|
| Acébutolol (Ac)  | 115*   | 13       |
| Pindolol (Pi)    | 16     | 4        |
| Propranolol (Pr) | 8      | 2        |
| Timolol (Ti)     | 29     | 15       |

\* : valeur extrapolée

Les temps de demi-vie observés à cette concentration sont similaires à ceux mesurés en solution diluée, dans les conditions de photolyse directe. Ces résultats sont en accord avec la cinétique postulée, puisque la vitesse de dégradation de ces molécules est indépendante de la concentration. Toutefois, pour l'acébutolol, les temps de demi-vie paraissent relativement différents. Cependant, il faut remarquer que les temps de demi-vie de cette molécule sont extrapolés au-delà de la durée effective de l'expérience, leurs déterminations sont donc approximatives, et la différence observée dans les deux conditions de concentration n'est alors pas significative.

Nous avons ainsi montré que la photodégradation des  $\beta$ -bloquants ne dépend pas de la concentration à laquelle sont réalisées les expériences. L'étude des photoproduits peut donc être réalisée en milieu concentré. Par ailleurs, ces composés sont sujets à la photodégradation indirecte, il est donc nécessaire d'analyser les photoproduits formés dans chaque matrice, afin de s'assurer que les molécules observées suite à la photolyse directe des  $\beta$ -bloquants sont également formées dans les eaux environnementales.



### ***3.3 Etude des photoproduits***

#### **3.3.1 Etude comparative eau milli-Q vs eau de STEP**

Une étude préliminaire a été réalisée afin de vérifier que les photoproduits formés dans les eaux environnementales l'étaient également dans des conditions de photolyse directe. Pour cela, la photodégradation des  $\beta$ -bloquants a été réalisée à 10 mg/L dans les deux matrices. Les cinétiques d'apparition/disparition des photoproduits issus de réactions d'hydroxylation sont déterminées par l'analyse LC/MS/MS des prélèvements en mode SIM. Pour chaque molécule, des isomères de position correspondant à des isomères mono-, di-, ou tri-hydroxylés sont observés. A titre d'exemple, les résultats obtenus pour l'acébutolol et le pindolol sont présentés Figure 87.

Cette étude montre d'une part que les cinétiques d'apparition/disparition des photoproduits sont accélérées dans les eaux environnementales, ce qui est en accord avec les constatations réalisées suite au suivi de dégradation des molécules mères.

D'autre part, on constate que les photoproduits formés dans l'eau milli-Q sont également formés dans les eaux environnementales. La caractérisation des photoproduits peut donc être réalisée suite à des dégradations dans l'eau ultra pure.

Ces essais ont toutefois montré que la caractérisation des photoproduits ne peut pas être réalisée de façon exhaustive dans des conditions de photolyse directe. En effet, en ne s'intéressant qu'aux produits hydroxylés, un nombre accru d'isomères de position a été observé dans les eaux environnementales.

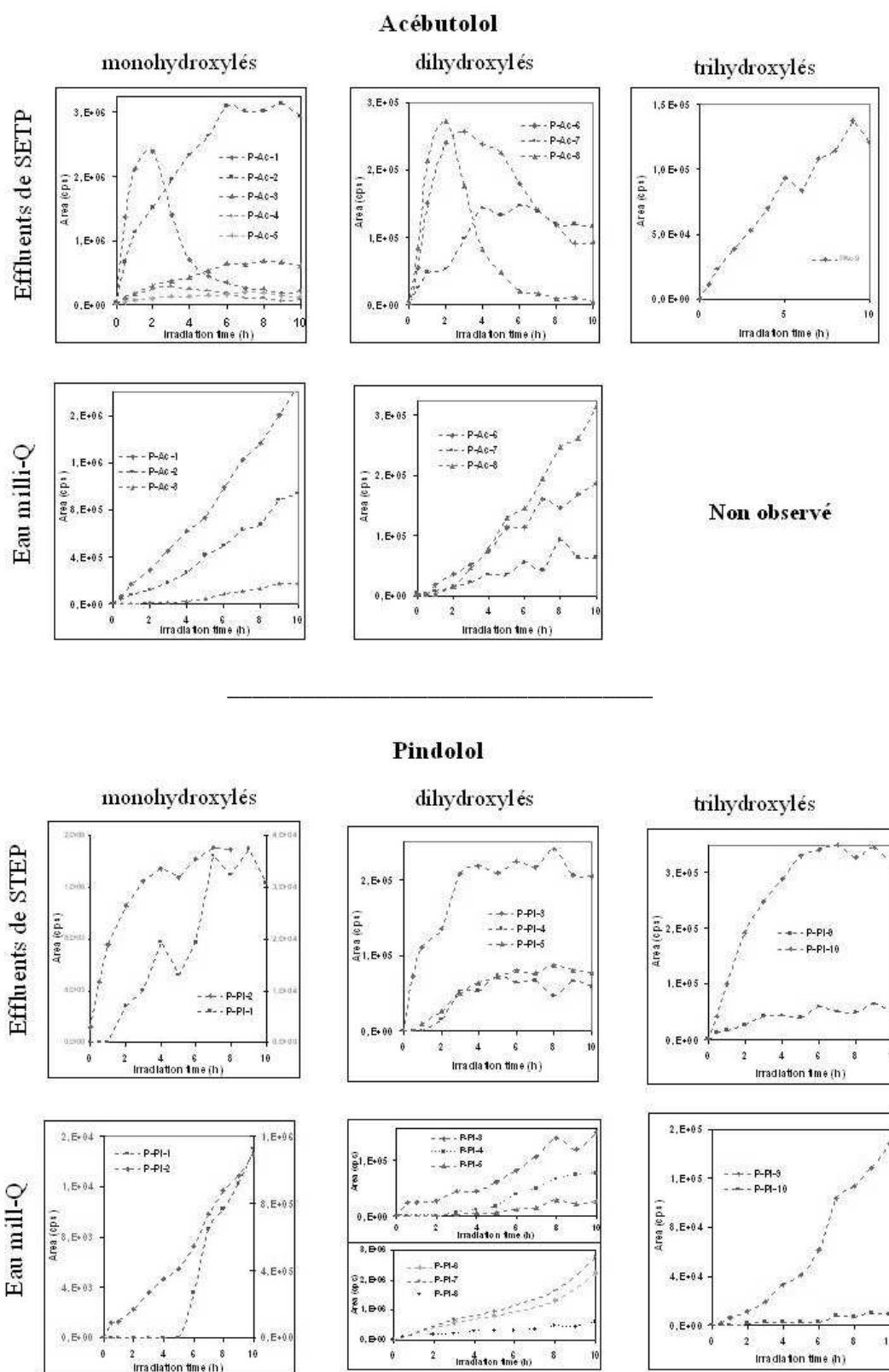


Figure 87: Cinétiques d'apparition/disparition des photoproduits hydroxylés du pindolol et de l'acébutolol dans l'eau milli-Q et l'eau de STEP

### 3.3.2 Propranolol

La photodégradation du propranolol conduit à un mélange complexe de photoproduits, conformément à ce qui avait préalablement été observé par Liu *et al.* [175]. Le chromatogramme obtenu après 21 h d'irradiation d'une solution de propranolol à 10 mg/L (échantillon préconcentré 100 fois par lyophilisation) est présenté Figure 88.

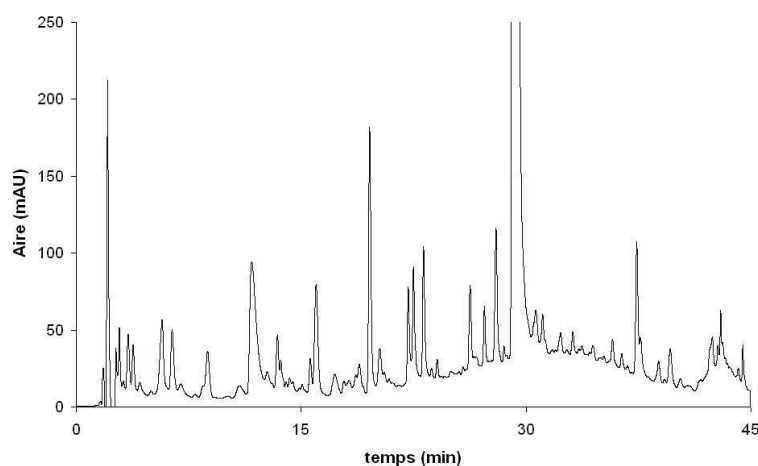


Figure 88: Chromatogramme d'une solution de propranolol à 10mg/L irradiée 21 h par une lampe HPK, échantillon concentré 100 fois par lyophilisation

L'analyse LC/MS/MS du mélange réactionnel a permis d'identifier certains photoproduits. Le spectre de fragmentation du propranolol ainsi que les principaux fragments de la molécule sont présentés Figure 89.

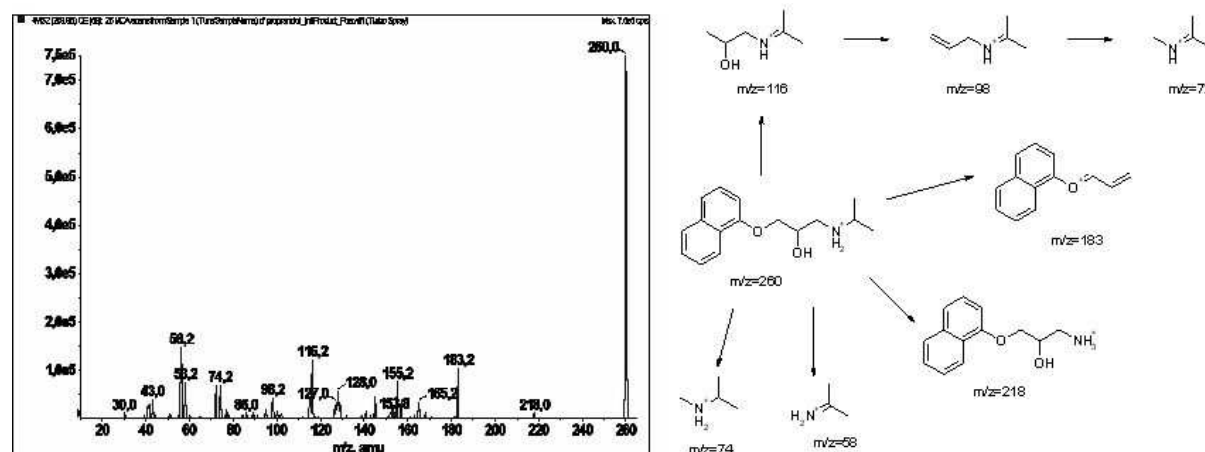


Figure 89 : Fragmentation du propranolol en spectrométrie de masse en mode positif

La fragmentation du propranolol conduit à la formation d'ions caractéristiques de différentes parties de la structure. Par exemple, l'ion de  $m/z=116$  uma est caractéristique de la chaîne latérale alors que les ions de masse 218 ou 183 uma sont représentatifs de la partie aromatique. Ainsi, l'analyse de la fragmentation des photoproduits permet de conclure sur les sites de modification chimique du propranolol sous irradiation UV. Les masses des principaux photoproduits du propranolol, ainsi que

celles de leurs fragments sont présentées Tableau 65. Il convient de souligner qu'en raison d'un bruit de fond trop important en mode full scan, les composés de masse inférieure à 100 uma ne peuvent pas être étudiés.

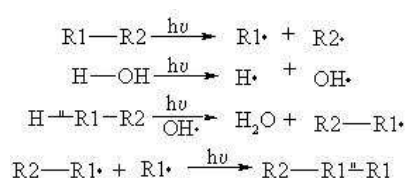
**Tableau 65: Analyse du propranolol et de ses photoproduits par LC/TIS/MS/MS**

| composé                          | Pr1 | Pr2 | Pr3 | Pr4 | Pr5 | Pr6 | Pr7 | Pr8        | Pr9 | Pr10 | Pr11 | Pr12 |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|-----|------|------|------|
| masse (uma)                      | 328 | 282 | 310 | 308 | 326 | 308 | 324 | 310        | 308 | 276  | 276  | 310  |
| principaux<br>fragments<br>(uma) | 292 |     |     | 292 | 308 | 290 | 292 | 292        | 175 |      |      |      |
|                                  | 274 | 266 | 280 | 264 | 292 | 175 | 131 | 177        | 131 | 250  | 199  | 280  |
|                                  | 116 | 116 | 116 | 116 | 116 | 116 | 116 | 131<br>116 | 116 | 116  | 116  | 116  |

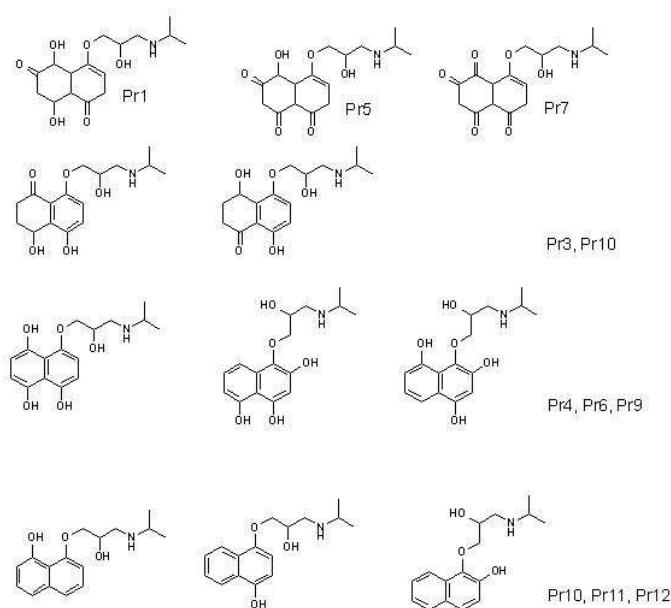
  

| composé                          | Pr  | Pr13 | Pr14 | Pr15 | Pr16 | Pr17 | Pr18 | Pr19 | Pr20 | Pr21 | Pr22 | Pr23 |
|----------------------------------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| masse (uma)                      | 260 | 438  | 466  | 406  | 436  | 436  | 436  | 332  | 465  | 408  | 347  | 479  |
| principaux<br>fragments<br>(uma) | 218 |      | 454  |      | 275  | 416  | 416  | 290  |      |      | 319  |      |
|                                  | 183 | 260  | 359  | 260  | 260  | 318  | 275  | 244  | 375  | 260  | 291  | 461  |
|                                  | 157 | 183  | 333  | 133  | 260  | 272  | 275  | 244  | 260  | 183  | 260  | 121  |
|                                  | 116 | 116  | 260  | 116  | 133  | 260  | 260  | 183  | 116  | 116  | 121  | 105  |
|                                  |     |      | 116  |      | 116  | 134  | 116  | 116  |      |      | 105  |      |
|                                  |     |      |      |      |      | 116  |      |      |      |      |      |      |

En première analyse, il est intéressant de noter que tous les photoproduits ont des masses supérieures au propranolol. Ceci indique que les produits de dégradation sont principalement issus de réactions d'addition radicalaire et non de clivage. On constate d'une part que les composés Pr22 et Pr23 sont issus d'une modification de la chaîne latérale car ils ne présentent pas de fragment de masse 116. D'autre part, Pr22 et Pr23 sont les seuls photoproduits de masse impaire. Ils présentent donc un nombre pair d'atomes d'azote. La fragmentation des composés Pr13 à Pr21, à l'exception de Pr19 conduit à un ion de masse 260 uma, soit la masse de l'ion moléculaire du propranolol. Il est donc envisageable que ces produits, bien qu'ils présentent un fragment de masse 116, soient issus d'une dérivation de la chaîne latérale. Leur fragment de masse 116 serait alors issu de la fragmentation consécutive de l'ion de masse 260. Il est probable que ces composés soient issus de réarrangements de la molécule selon le schéma suivant :



Les composés Pr1 à Pr12 sont plus polaires que le propranolol car moins retenus en chromatographie à polarité des phases inverses. Leur formation pourrait s'expliquer par des réactions d'oxydation (addition de radicaux hydroxyle ou hydrolyse). Les structures proposées pour ces composés sont présentées Figure 90.



**Figure 90: Propositions de structures pour les photoproduits du propranolol**

Les composés Pr10, Pr11 et Pr12 sont des isomères de positions issus de la monohydroxylation du propranolol. La présence d'un substituant oxygéné sur le noyau naphthalène oriente préférentiellement l'addition en ortho ou para. La substitution en  $\gamma$  de la chaîne carbonée (Pr10) est moins favorable, toutefois la stabilisation du photoproduit alors formé par une liaison hydrogène rend cette hypothèse plausible. De plus ce composé particulier est également un métabolite du propranolol.

Les composés Pr4, Pr6 et Pr9 sont des isomères de positions correspondant à des trihydroxylations du noyau naphthalène. La régiosélectivité de l'addition a été prise en compte pour la proposition de ces structures.

Les composés Pr3 et Pr10 sont formés suite à l'addition de 2 groupements hydroxyle et à l'hydrolyse d'une double liaison. Du fait de la perte de l'aromaticité, les fonctions énol sont représentées sous la forme cétone Figure 90.

Pr1 est formé suite à l'hydrolyse de deux doubles liaisons et à l'addition de deux radicaux hydroxyle. L'oxydation consécutive des fonctions hydroxyle de Pr1 conduit à la formation de Pr5 et Pr7.

Les photoproduits du propranolol présentés dans la littérature n'ont pas été observés au cours de cette étude. L'étude menée par Uwai *et al.* [180] étaient réalisée dans des conditions très différentes puisqu'ils s'intéressaient à la photodégradation du propranolol dans différentes formulations pharmaceutiques, donc à l'état solide. Il est donc possible que le comportement photochimique du propranolol diffère à l'état solide ou en solution. Les travaux réalisés par Liu *et al.* [175] étaient en revanche exécutés pour des solutions aqueuses de propranolol. Toutefois, l'utilisation d'une source d'irradiation différente (lampe à arc de Xénon) pourrait expliquer que des photoproduits différents soient formés.

## **4 Conclusions**

Les expériences réalisées ont montré que la photodégradation des composés pharmaceutiques pouvait être correctement modélisée par des expériences en laboratoire dans l'eau milli-Q et à des concentrations très supérieures à celles réellement rencontrées dans l'environnement.

La plupart des corticostéroïdes sont extrêmement instables sous irradiation UV quelle que soit la matrice dans laquelle ils sont dégradés. Leur durée de vie dans l'environnement est donc vraisemblablement très courte et il serait donc nécessaire de s'intéresser aux produits de dégradation de ces composés, tant en terme de suivi environnemental que d'écotoxicité.

L'instabilité photochimique des  $\beta$ -bloquants a également été démontrée dans cette étude. Parmi les 14  $\beta$ -bloquants étudiés seul l'aténolol s'est avéré photochimiquement stable dans les conditions environnementales. La photolabilité des 13 autres composés a été observée dans des conditions de photolyse indirecte. L'analyse LC/MS/MS du propranolol a permis d'émettre des hypothèses quant aux structures de ses photoproduits.

Les données massiques des photoproduits déterminées dans cette étude pourraient permettre dans de futurs travaux de réaliser l'analyse qualitative de la contamination des eaux environnementales par ces composés.

# Conclusions & Perspectives





## Conclusions □ Perspectives

Les travaux présentés dans ce mémoire visaient à estimer la contamination des eaux de l'agglomération lyonnaise par des résidus de  $\beta$ -bloquants, de corticostéroïdes et d'estrogènes, en s'intéressant tout particulièrement à leurs principaux points de décharge, à savoir, les stations d'épuration.

Pour cela, deux méthodologies d'analyse ont été développées. La première permet d'extraire séquentiellement, à partir d'une unique charge, les corticostéroïdes et les  $\beta$ -bloquants. L'analyse consécutive des extraits a permis de quantifier ces résidus dans l'environnement [195]. La seconde méthode développée, permet d'analyser les estrogènes dans des échantillons de STEP, à partir de très faibles prises d'essai (1 mL). Pour cela une méthode totalement automatisée permettant l'extraction, la dérivation sur support et l'analyse LC/MS/MS en ligne a été développée [196]. Cette méthode a permis d'obtenir de bonnes purifications puisqu'il n'a pas été observé d'effet matrice.

Ces méthodes ont montré de bonnes performances en terme de linéarité et de répétabilité. Toutefois, étant donné l'impossibilité de disposer de matrices environnementales blanches, il n'a pas été possible de valider complètement ces méthodes. Les objectifs ont également été atteints en terme de sensibilité, avec des limites de détections de l'ordre du ng/L pour l'ensemble des analytes.

L'application de ces procédures d'analyse lors de mesures de terrain a montré que les molécules détectées aux plus fortes teneurs étaient les stéroïdes endogènes (cortisone, estrone, estradiol) ainsi que l'acébutolol, l'aténolol et le sotalol pour les  $\beta$ -bloquants.

Par ailleurs, les analyses réalisées sur une période de 2 mois semblent révéler des disparités dans l'efficacité d'épuration des STEP de l'agglomération lyonnaise vis-à-vis de ces micropolluants.

Dans les STEP, ainsi que dans les eaux environnementales, les résidus pharmaceutiques peuvent subir différentes dégradations. Nous nous sommes notamment intéressés à la photodégradation des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants. La plupart des corticostéroïdes ont montré une grande instabilité sous irradiation UV avec des temps de demi-vie inférieurs à une heure dans les conditions de laboratoire. Cependant la minéralisation de ces composés n'a pas été observée après 6 h d'irradiation.

Les photoproduits formés pouvant parfois s'avérer plus toxiques que la molécule mère, aucune conclusion ne peut être tirée quant à l'élimination des risques liés à la présence de corticostéroïdes dans l'environnement. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution a en particulier permis de caractériser les photoproduits majoritaires de la cortisone.

Pour les  $\beta$ -bloquants, dont certains peuvent être stables dans des conditions de photolyse directe, un effet catalytique de la matrice a été observé. Toutefois, la minéralisation de ces molécules n'a pas été observée après 50 h d'irradiation.

La photodégradation des corticostéroïdes et des  $\beta$ -bloquants semble majoritairement résulter de réactions d'oxydation, addition de radicaux hydroxyle ou hydrolyse de doubles liaisons en particulier.

Ainsi le rejet de corticostéroïdes et de  $\beta$ -bloquants dans l'environnement conduit à une multitude de photoproduits dont la caractérisation est particulièrement complexe et la toxicité inconnue. D'autre part, étant données les fortes teneurs déversées par les STEP, il semble important de développer des procédés d'épuration efficaces pour la minéralisation de ces molécules lors des traitements de STEP.

Dans de futurs travaux, il pourrait être intéressant de rechercher des moyens d'obtention de matrices vierges de résidus pharmaceutiques, afin de permettre une validation complète des procédures d'analyse. Ceci pourrait être réalisé en synthétisant des matrices blanches en laboratoire, ou en traitant des eaux environnementales de sorte à éliminer les résidus pharmaceutiques présents. Par exemple, l'irradiation UV d'eaux environnementales pourrait permettre l'élimination de nombreux corticostéroïdes, ou un traitement sur charbons actifs pourrait permettre l'adsorption des composés pharmaceutiques.

Un suivi environnemental approfondi s'avère important afin d'estimer les variations temporelles et spatiales des résidus pharmaceutiques dans l'environnement. Par ailleurs, les différentes STEP de l'agglomération lyonnaise semblent avoir un impact sur l'épuration des résidus de stéroïdes et de  $\beta$ -bloquants. Il serait intéressant de conduire une étude permettant la détermination des procédés les plus efficaces. D'un point de vue écotoxicologique, l'acquisition de données concernant la cortisone et ses photoproduits, l'acébutolol, l'aténolol et le sotalol semble nécessaire. Il est également important d'étoffer les connaissances sur l'écotoxicité des estrogènes. L'instabilité photochimique des stéroïdes et des  $\beta$ -bloquants ayant été démontrée, des efforts doivent être poursuivis pour la caractérisation des produits de dégradation. Il serait également intéressant d'évaluer la dégradation biotique de ces molécules.

Par ailleurs, la contamination des eaux environnementales par les résidus de  $\beta$ -bloquants et de stéroïdes ayant été démontrée, les métabolites issus de ces classes pharmaceutiques contaminent vraisemblablement les eaux environnementales. Il serait donc nécessaire de quantifier ces métabolites dans l'environnement et d'évaluer leur écotoxicité. Ceci pourrait être particulièrement intéressant pour

les composés hautement métabolisés tels que l'acébutolol qui, bien qu'il soit métabolisé à 86 %, a été mesuré à des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{g/L}$ .

De plus, les méthodes développées dans ces travaux pourraient être adaptées à la quantification de résidus pharmaceutiques dans les eaux potables, où de plus faibles limites de détection, de l'ordre du  $\text{pg/L}$ , sont nécessaires. Pour les corticostéroïdes et les  $\beta$ -bloquants, un gain de sensibilité est susceptible d'être généré par une diminution des effets matrices. La sensibilité pourrait de plus être améliorée en augmentant le facteur d'enrichissement *via* une augmentation de la prise d'essai et/ou une diminution du volume de solvant de reprise. Pour les estrogènes, des limites de détection de l'ordre du  $\text{ng/L}$  sont atteintes à partir d'échantillons d'1 mL. L'augmentation de la prise d'essai à 1 L pourrait donc potentiellement permettre d'atteindre des limites de quantification de l'ordre du  $\text{pg/L}$ .



# Bibliographie



## Bibliographie

1. [www.norman-network.net](http://www.norman-network.net).
2. C Hignite, DL Azarnoff: **Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent.** *Life Sciences* 1977, **20**:337-341.
3. J Debska, A Kot-Wasik, J Namiesnik: **Fate and analysis of pharmaceutical residues in the aquatic environment.** *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2004, **34**:51-67.
4. B Halling-Sorensen, S Nors Nielsen, PF Lanzky, F Ingerslev, HC Holten Luthoft, SE Jorgensen: **Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review.** *Chemosphere* 1998, **36**:357-393.
5. T Heberer: **Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment : a review of recent research data.** *Toxicology Letters* 2002, **131**:5-17.
6. MJ López de Alda, S Díaz-Cruz, M Petrovic, D Barceló: **Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroids sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment.** *Journal of Chromatography A* 2003, **1000**:503-526.
7. S Thiele-Bruhn: **Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review.** *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 2003, **166**:145-167.
8. C Zwiener, FH Frimmel: **LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment a critical review. Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, **378**:862-874.

9. CG Daughton, TA Ternes: **Pharmaceuticals and personal care products in the environment : Agents of subtle change?** *Environmental Health Perspectives Supplements* 1999, **107**:907-938.
10. CG Daughton: **Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry : Pharmaceuticals in the environment.** *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2001, **12**:1067-1076.
11. F Monier: **Comme des poissons dans l'eau. Les dérivés de pesticides de détergents et de médicaments menacent la faune et la flore.** *L'Express* 20/03/2003.
12. F Gruhier: **La menace des bactéries mutantes.** *Le Nouvel Observateur* 10/07/2003.
13. N Brisson: **Ces résidus de médicaments qui coulent dans nos rivières.** *Le Figaro* 23/07/2005.
14. G D'Ascenzo, A Di Corcia, A Gentili, R Mancini, R Mastropasqua, M Nazzari, R Samperi: **Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities.** *The Science of the Total Environment* 2003, **302**:199-209.
15. S Zühlke, U Dünnebier, T Heberer: **Detection of phenazone-type drugs and their microbial metabolites in ground and drinking water applying solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1050**:201-209.
16. R Loos, J Wollgast, T Huber, G Hanke: **Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, **387**:1469-1478
17. J Tolls: **Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils : a review.** *Environmental Science and Technology* 2001, **35**:3397-3406.
18. T Heberer: **Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water.** *Journal of Hydrology* 2002, **266**:175-189.
19. HL Rogers: **Overview of in vivo metabolism of drugs by aquatic species.** *Veterinary and Human Toxicology* 1986, **28 (suppl.1)**:38-44.



20. M DellaGreca, A Fiorentino, M Isidori, M Lavorgna, L Previtera, M Rubino, F Temussi: **Toxicity of prednisolone, dexamethasone and their photochemical derivatives on aquatic organisms.** *Chemosphere* 2004, **54**:629-637.
21. M Yasojima, N Nakada, K Komori, Y Suzuki, H Tanaka: **Occurrence of levofloxacin, clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan.** *Water Science and Technology* 2006, **53**:227-233.
22. JB Quintana, R Rodil, T Reemtsma: **Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1061**:19-26.
23. V Koutsouba, T Heberer, B Fuhrmann, K Schmidt-Baulmer, D Tsipi, A Hiskia: **Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry.** *Chemosphere* 2003, **51**:69-75.
24. M Carballa, F Omil, JM Lema, M Llompарт, C Garcí-Jarez, I Rodríguez, M Gómez, T Ternes: **Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in sewage treatment plant.** *Water Research* 2004, **38**:2918-2926.
25. JB Quintana, T Reemstma: **Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion pair reverse-phase chromatography/ tandem mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004, **18**:765-774.
26. I Rodríguez, JB Quintana, J Carpinteiro, AM Carro, RA Lorenzo, R Cela: **Determination of acidic drugs in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry as tert.-butyldimethylsilyl derivatives.** *Journal of Chromatography A* 2003, **985**:265-274.
27. EM Golet, A Streler, AC Alder, W Giger: **Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction.** *Analytical Chemistry* 2002, **74**:5455-5462.
28. B Ferrari, N Paxeus, RL Giudice, A Pollio, J Garric: **Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2003, **55**:359-370.

29. MR Servos, DT Bennie, BK Burnison, A Jurkovic, R McInnis, T Neheli, A Scnell, P Seto, SA Smyth, T Ternes: **Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants.** *The Science of the Total Environment* 2005, **336**:155-170.
30. S Castiglioni, R Bagnati, D Calamari, R Fanelli, E Zuccato: **A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters.** *Journal of Chromatography A* 2005, **1092**:206-215.
31. T Ternes: **Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.** *Trends in Analytical Chemistry* 2001, **20**:419-434.
32. GL Brun, M Bernier, R Losier, K Doe, P Jackman, H-B Lee: **Pharmaceutically active compounds in atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for environmental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity.** *Environmental Toxicology and Chemistry* 2006, **25**:2163-2176.
33. DB Huggett, IA Khan, CM Foran, D Schlenk: **Determination of beta-adrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent.** *Environmental Pollution* 2003, **121**:199-205.
34. E Zuccato, S Castiglioni, R Fanelli: **Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment.** *Journal of Hazardous Materials* 2005, **122**:205-209.
35. D Ashton, M Hilton, KV Thomas: **Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom.** *The Science of The Total Environment* 2004, **333**:167-184.
36. MJ Hilton, KV Thomas: **Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2003, **1015**:129-141.
37. EM Golet, AC Alder, A Hartmann, TA Ternes, W Giger: **Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid phase**

- extraction and liquid chromatography with fluorescence detection.** *Analytical Chemistry* 2001, **73**:3632-3638.
38. E Botisti, C Frosyni, D Tsipi: **Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, **387**: 1317-1327.
39. N Lindqvist, T Tuhkanen, L Kronberg: **Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters.** *Water Research* 2005, **39**:2219-2228.
40. S Öllers, H Singer, P., P Fässler, SR Müller: **Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water.** *Journal of Chromatography A* 2001, **911**:225-234.
41. S Pawlowski, T Ternes, M Bonerz, AC Rastall, L Erdinger, T Braunbeck: **Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen.** *Toxicology in vitro* 2004, **18**:129-138.
42. X-Y Xiao, DV McCalley, J McEvoy: **Analysis of estrogens in river water and effluents using solid phase extraction and gas chromatography-negative chemical ionisation mass spectrometry of the pentafluorobenzoyl derivatives.** *Journal of Chromatography A* 2001, **923**:195-204.
43. HL Kuch, K Ballschmiter: **Determination of endocrine disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range.** *Environmental Science and Technology* 2001, **35**:3201-3206.
44. T Ternes: **Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers.** *Water Research* 1998, **32**:3245-3260.
45. BJ Vanderford, RA Pearson, DJ Rexing, SA Snyder: **Analysis of endocrine disruptors, pharmaceutical and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *Analytical Chemistry* 2003, **75**:6265-6274.

46. DW Kolpin, ET Furlong, MT Meyer, SD Zaugg, LB Barber, HT Buxton: **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000 : A national reconnaissance.** *Environmental Science and Technology* 2002, **36**:1202-1211.
47. DW Kolpin, M Skopec, MT Meyer, ET Furlong, SD Zaugg: **Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions.** *The Science of the Total Environment* 2004, **328**:119-130.
48. I-C Beck, R Bruhn, J Gandrass, W Ruck: **Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea.** *Journal of Chromatography A* 2005, **1090**:98-106.
49. D Calamari, E Zuccato, S Castiglioni, R Bagnati, R Fanelli: **Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy.** *Environmental Science and Technology* 2003, **37**:1241-1248.
50. KV Thomas, MJ Hilton: **The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries.** *Marine Pollution Bulletin* 2004, **49**:436-444.
51. C Hao, L Lissemore, B Nguyen, S Kleywegt, P Yang, K Solomon: **Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometry.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006, **384**:505-513.
52. W Ahrer, E Scherwenk, W Buchberger: **Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2001, **910**:69-78.
53. J Debska, A Kot-Wasik, J Namiesnik: **Determination of nonsteroidal antiinflammatory drugs in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass spectrometry.** *Journal of Separation Science* 2005, **28**:2419-2426.
54. S Weigel, R Kallenbohn, H Hühnerfuss: **Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1023**:183-195.

55. S Weigel, J Kuhlmann, H Hühnerfuss: **Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants : occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea.** *The Science of the Total Environment* 2002, **295**:131-141.
56. BW Schwab, EP Hayes, JM Fiori, FJ Mastrocco, NM Roden, D Cragin, RD Meyerhoff, VJ D'Aco, PD Anderson: **Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2005, **42**:296-312.
57. S Webb, T Ternes, M Gibert, K Olejniczak: **Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water.** *Toxicology Letters* 2003, **142**:157-167.
58. LJ Schulman, EV Sargent, BD Naumann, EC Faria, DG Dolan, JP Wargo: **A human health risk assessment of pharmaceuticals in the aquatic environment.** *Human and Ecological Risk Assessment* 2002, **8**:657-680.
59. K Fent, AA Weston, D Caminada: **Ecotoxicology of human pharmaceuticals.** *Aquatic Toxicology* 2006, **76**:122-159.
60. [www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuitedl.htm](http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuitedl.htm).
61. HJ De Lange, W Noordoven, AJ Murk, M Lüring, EHTM Peeters: **Behavioural response of *Gammarus Pulex* (crustacea, amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals.** *Aquatic Toxicology* 2006, **78**:209-216.
62. S Pawlowski, R van Aerle, CR Tyler, T Braunbeck: **Effects of 17[alpha]-ethinyloestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004, **57**:330-345.
63. JL Flippin, D Huggett, CM Foran: **Changes in timing reproduction following chronic exposure to ibuprofen in Japanese medaka, *Oryzias latipes*.** *Aquatic Toxicology* 2007, **81**:73-78.
64. F Ramade: **Dictionnaire encyclopédique des pollutions - les polluants : de l'environnement à l'homme.** Paris: Ediscience international; 2000.
65. R Wang, T-Z Liu, T Wang: **The fate of antibiotics in environment and its ecotoxicology.** *Shengtai Xuebao* 2006, **26**:265-270.

66. U Tansuphasiri, D Kaminthakul, W Pandii: **Antibiotic resistance of enterococci isolated from frozen foods and environmental waters.** *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 2006, **37**:162-170.
67. JP Sumpter: **Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview.** *Acta Hydrochimica Hydrobiologica* 2005, **33**:9-16.
68. BG McAllister, DE Kime: **Early life exposure to environmental levels of aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*).** *Aquatic Toxicology* 2003, **65**:309-316.
69. BJ Richardson, PKS Lam, M Martin: **Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to southern China.** *Marine Pollution Bulletin* 2005, **50**:913-920.
70. DGJ Larsson, M Adolfsson-Erici, J Parkkonen, M Petterson, AH Berg, PE Olsson, L Förlin: **Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive?** *Aquatic Toxicology* 1999, **45**:91-97.
71. T Ternes, J Stüber, N Herrmann, D McDowell, A Ried, M Kampmann, B Teiser: **Ozonation : a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater?** *Water Research* 2003, **37**:1976-1982.
72. J Radjenovic, M Petrovic, D Barceló: **Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, **387**:1365-1377.
73. T Kosjek, E Heath, B Kompare: **Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, **387**:1379-1387.
74. PE Stackelberg, J Gibs, ET Furlong, MT Meyer, SD Zaugg, RL Lippincott: **Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal pharmaceuticals and other organic compounds.** *The Science of the Total Environment* 2007, **377**:255-272.
75. K Shimada, K Mitamura, T Higashi: **Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids.** *Journal of Chromatography A* 2001, **935**:141-172.

76. SJ Szeffler: **Pharmacodynamics and pharmacokinetics of budesonide: A new nebulized corticosteroid.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1999, **104**:S175-S183.
77. [www.biam2.org](http://www.biam2.org).
78. H Sanderson, DJ Johnson, T Reitsma, RA Brain, CJ Wilson, KR Solomon: **Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2004, **39**:158-183.
79. H Fang, W Tong, WS Branham, C Moland, SL Dial, H Hong, Q Xie, R Perkins, W Owens, D Sheehan: **Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor.** *Chemical Research in Toxicology* 2003, **16**:1338-1358.
80. T Mes, G Zeeman, G Lettinga: **Occurrence and fate of estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethynilestradiol for domestic wastewater.** *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2005, **4**:275-311.
81. S Jobling, D Casey, T Rodgers-Gray, J Oehlmann, U Schulte-Oehlmann, S Pawlowski, T Baunbeck, AP Turner, CR Tyler: **Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and estrogenic effluent.** *Aquatic Toxicology* 2003, **65**:205-220.
82. RE Gutjahr-Gobell, GE Zaroogian, DJ Borsay Horowitz, TR Gleason, LJ Mills: **Individual effects of estrogens on a marine fish, Cunner (*Tautoglabrus adspersus*), extrapolated to the population level.** *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2006, **63**:244-252.
83. AA Adeoya-Osiguwa, S Markoulaki, SR Pocock, SR Milligan, LR Fraser: **17 $\beta$ -estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function.** *Human Reproduction* 2003, **18**:100-107.
84. M Seki, H Yokota, M Maeda, K Kobayashi: **Fish full life-cycle testing for 17 $\beta$ -estradiol on medaka (*Oryzias Latipes*).** *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005, **24**:1259-1266.
85. MJ Ruiz-Angel, S Carda-Broch, MC Garcia-Alvarez-Coque, A Berthod: **Effect of ionization and the nature of the mobile phase in quantitative structure-retention relationship studies.** *Journal of Chromatography A* 2005, **1063**:25-34.

86. M Cleuvers: **Initial risk assessment for three  $\beta$ -blockers found in the aquatic environment.** *Chemosphere* 2005, **59**:199-205.
87. EM Dzialowski, PK Turner, BW Brooks: **Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia Magna*.** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2006, **50**:503-510.
88. DB Huggett, BW Brooks, B Peterson, CM Foran, D Schlenk: **Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals ( $\beta$ -blockers) on aquatic organisms.** *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2002, **43**:229-235.
89. X Wen, C Tu, HK Lee: **Two-step liquid-liquid microextraction of nonsteroidal antiinflammatory drugs in wastewater.** *Analytical Chemistry* 2004, **76**:228-232.
90. R Suedee, T Srichana, T Chuchome, U Kongmark: **Use of molecularly imprinted polymers from a mixture of tetracycline and its degradation products to produce affinity membranes for the removal of tetracycline from water.** *Journal of Chromatography B* 2004, **811**:191-200.
91. GA Grant, SL Frison, P Sporns: **A sensitive method for detection of sulfamethazine and N-acetylsulfamethazine residues in environmental samples using solid phase immunoextraction coupled with MALDI-TOF MS.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003, **51**:5367-5375.
92. J Bones, P Nesterenko, KV Thomas, B Paull: **Environmental samples using a monolithic silica reversed phase column.** *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 2006, **86**:487-504.
93. T Storm, T Reemstma, M Jekel: **Use of volatile amines as ion-pairing agents for the high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of aromatic sulfonates in industrial wastewater.** *Journal of Chromatography A* 1999, **854**:175-185.
94. JA Ballantine: **The Enhancement of Polyphosphonate Salt Electrospray Mass Spectrometry and the High-performance Liquid Chromatographic Separation of Triphosphate Esters by Diethylamine Treatment.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1997, **11**:624-629.
95. K Van der Ven, W Van Dongen, BUW Maes, EL Esmans, R Blust, WM De Coen: **Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid**



- chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.** *Chemosphere* 2004, **57**:967-973.
96. A Macià, F Borrull, M Calull, C Aguilar: **Determination of some acidic drugs in surface and sewage treatment plant waters by electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry.** *Electrophoresis* 2004, **25**:3441-3449.
  97. MD Prat, B Compañó, R., JA Hernández-Arteseros, M Granados: **Determination of quinolones in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography with fluorimetric detection.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1041**:27-33.
  98. E Sangiorgi, M Curatolo, W Assini, E Bozzoni: **Application of neutral loss mode in liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of corticosteroids in bovine urine.** *Analytica Chimica Acta* 2003, **483**:259-267.
  99. M Fiori, E Pierdominici, F Longo, G Brambilla: **Identification of main corticosteroids as illegal feed additives in milk replacers by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation.** *Journal of Chromatography A* 1998, **807**:219-227.
  100. P Delahaut, P Jacquemin, Y Colemonts, M Dubois, J De Graeve, H Deluyker: **Quantitative determination of several synthetic corticosteroids by gas chromatography-mass spectrometry after purification by immunoaffinity chromatography.** *Journal of Chromatography B* 1997, **696**:203-215.
  101. H Hirata, T Kasama, Y Sawai, RR Fike: **Simultaneous determination of deflazacort metabolites II and III, cortisol, cortisone, prednisolone and prednisone in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1994, **658**:55-61.
  102. L Gagliardi, D De Orsi, MR Del Giudice, F Gatta, R Porrà, P Chimenti, D Tonelli: **Development of a tandem thin-layer chromatography-high-performance liquid chromatography method for the identification and determination of corticosteroids in cosmetic products.** *Analytica Chimica Acta* 2002, **457**:187-198.
  103. E Pujos, MM Flament-Waton, P Goetinck, MF Grenier-Loustalot: **Optimizing the extraction and analysis of DHEA sulfate, corticosteroids and androgens in urine:**

- application to a study of the influence of corticosteroid intake on urinary steroid profiles.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, **380**:524-536.
104. MJ O'Keeffe, S Martin, L Regan: **Validation of a multiresidue liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantitation and confirmation of corticosteroid residues in urine, according to the proposed SANCO 1085 criteria for banned substances.** *Analytica Chimica Acta* 2003, **483**:341-350.
  105. D Courtheyn, J Vercammen, H De Brabander, I Vandenreyt, P Batjoens, K Vanoosthuyze, C Van Peteghem: **Determination of dexamethasone in urine and faeces of treated cattle with negative chemical ionization-mass spectrometry.** *Analyst* 1994, **119**:2557-2564.
  106. Y Gaillard, F Vayssette, G Pepin: **Compared interest between hair analysis and urine analysis in doping controls. Results for amphetamines, corticosteroids and anabolic steroids in racing cyclists.** *Forensic Science International* 2000, **107**:361-379.
  107. M-E Capella-Peiró, M Gil-Augustí, L Monferrer-Pons, J Esteve-Romero: **Direct injection micellar liquid chromatographic method for the analysis of corticosteroids in creams, ointments and other pharmaceuticals.** *Analytica Chimica Acta* 2002, **454**:125-135.
  108. V Cirimele, P Kintz, V Dumestre, JP Goullé, B Ludes: **Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry.** *Forensic Science International* 2000, **107**:381-388.
  109. PW Tang, WC Law, TSM Wan: **Analysis of corticosteroids in equine urine by liquid chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B* 2001, **754**:229-244.
  110. Y Rönquist-Nii, PO Edlund: **Determination of corticosteroids in tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, **37**:341-350.
  111. O Van den Hauwe, J Castro Perez, J Claereboudt, C Van Peteghem: **Simultaneous determination of betamethasone and dexamethasone residues in bovine liver by**

- liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2001, **15**:857-861.
112. ME Touber, MC Van Engelen, C Georgakopos, JA Van Rhijn, MWF Nielen: **Multi-detection in sports doping and veterinary control using high resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry.** *Analytica Chimica Acta* 2007, **586**: 137-146.
113. S Hou, M Hindle, PR Byron: **Chromatographic and mass spectral characterization of budesonide and a series of structurally related corticosteroids using LC-MS.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2005, **39**:196-205.
114. GNW Leung, EW Chung, ENM Ho, WH Kwok, DKK Leung, FPW Tang, TSM Wan, NH Yu: **High-throughput screening of corticosteroids and basic drugs in horse urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography B* 2005, **825**:47-56.
115. Y Luo, CE Uboh, LR Soma, F Guan, JA Rudy, D Tsang, S.: **Resolution, quantification and confirmation of betamethasone and dexamethasone in equine plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005, **18**:825-832.
116. MJ Greig, B Bolanos, T Quenzer, JMR Bylund: **Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization for high-resolution analyses of corticosteroids.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003, **17**:2763-2768.
117. H Noppe, K Verheyden, W Gillis, D Courtheyn, P Vanthemsche, HF De Bradander: **Multi-analyte approach for the determination of ng.L<sup>-1</sup> levels of steroid hormones in unidentified aqueous samples.** *Analytica Chimica Acta* 2007, **586**:22-29.
118. H Noppe, K De Wash, S Roelmans, N Van Hoof, T Verslyche, C Janssen, R., HF De Brabander: **Development and validation of an analytical method for detection of estrogens in water.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005, **392**:91-98.
119. P Lee Ferguson, CR Iden, AE McElroy, BJ Brownawell: **Determination of steroid estrogen in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC-electrospray-MS.** *Analytical Chemistry* 2001, **73**:3890-3895.

120. T Benjits, W Günther, WE Lambert, A de Leenheer: **Sonic spray ionisation applied to liquid chromatography / tandem mass spectrometry analysis of endocrine disrupting chemicals in environmental water samples.** *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2003, **17**:1866-1872.
121. V Ingrand, G Herry, J Beausse, M-R de Roubin: **Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2003, **1020**:99-104.
122. J Hu, H Zhang, H Chang: **Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2005, **1070**:221-224.
123. Z Li, S Wang, N Alice Lee, RD Allan, IR Kennedy: **Development of a solid-phase extraction-enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water.** *Analytica Chimica Acta* 2004, **503**:171-177.
124. MJ López de Alda, D Barceló: **Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2000, **892**:391-406.
125. G Pojana, A Bonfà, F Busetti, A Collarin, A Marcomoni: **Determination of natural and synthetic estrogenic compounds in coastal lagoon waters by HPLC-electrospray-mass spectrometry.** *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry* 2004, **84**:717-727.
126. R Liu, JL Zhou, A Wilding: **Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1022**:179-189.
127. AC Belfroid, A Van der Host, AD Vethaak, AJ Schäfer, GBJ Rijs, J Wegener, WP Cofino: **Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands.** *The Science of the Total Environment* 1999, **225**:101-108.

128. SA Snyder, TL Keith, DA Verbrugge, EM Snyder, TS Gros, K Kannan, JP Giesy: **Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures.** *Environmental Science and Technology* 1999, **33**:2814-2820.
129. I Heisterkamp, J Gandrass, W Ruck: **Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples?** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, **378**:709-715.
130. K Komori, H Tanaka, Y Okagasu, M Yusojima, C Sato: **Analysis and occurrence of estrogen in wastewater in Japan.** *Water Science and Technology* 2004, **50**:93-100.
131. K Mitani, M Fujioka, H Kataoka: **Fully automated analysis of estrogens in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A* 2005, **1081**:218-224.
132. A Peñalver, E Pocurull, F Borrull, RM Marcé: **Method based on solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples.** *Journal of Chromatography A* 2002, **964**:153-160.
133. Y Wen, B-S Zhou, Y Xu, S-W Jin, Y-Q Feng: **Analysis of estrogens in environmental waters using polymer monolith in polyether ether ketone tube solid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography.** *Journal of chromatography A* 2006, **1133**:21-28.
134. MJ López de Alda, D Barceló: **Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-diode array detection.** *Journal of Chromatography A* 2001, **911**:203-210.
135. S Rodríguez-Mozaz, MJ López de Alda, D Barceló: **Picogram per liter level determination of estrogens in natural waters and waterworks by a fully automated on-line solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry.** *Analytical Chemistry* 2004, **76**:6998-7006.
136. MR Anari, R Bakhtiar, B Zhu, S Huskey, RB Franklin, C Evans: **Derivatization of ethinylestradiol with dansyl chloride to enhance electrospray ionization :**

- application in trace analysis of ethinylestradiol in rhesus monkey plasma.** *Analytical Chemistry* 2002, **74**:4136-4144.
137. MD Hernando, M Petrovic, Fernández-Alba, D Barceló: **Analysis by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for  $\beta$ -blockers and lipid regulating agents in wastewater samples.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1046**:133-140.
  138. TA Ternes, R Hirsch, J Mueller, K Haberer: **Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and  $\beta_2$ -sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS.** *Fresenius' Journal of analytical chemistry* 1998, **362**:329-340.
  139. C Miège, M Favier, C Brosse, JP Canler, M Coquery: **Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from Lyon area (France) and risk assessment for the downstream river.** *Talanta* 2007, **70**:739-744.
  140. MJ Gómez, M Petrovic, AR Fernández-Alba, D Barceló: **Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters.** *Journal of Chromatography A* 2006, **1114**:224-233.
  141. M Petrovic, M Gros, D Barceló: **Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry.** *Journal of chromatography A* 2006, **1124**:68-81.
  142. M Gros, M Petrovic, D Barceló: **Development of a multiresidue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters.** *Talanta* 2006, **70**:678-690.
  143. AAM Stolker, W Niesing, EA Hogendoorn, J Versteegh, F. M., R Fuchs, UAT Brinkman: **Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004, **378**:955.
  144. HH Maurer, O Tenberken, C Kratzsch, AA Weber, FT Peters: **Screening for library-assisted identification and fully validated quantification of 22 beta-blockers in**

- blood plasma by liquid chromatography–mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization.** *Journal of Chromatography A* 2004, **1058**:169-181.
145. RD Johnson, RJ Lewis: **Quantitation of atenolol, metoprolol and propranolol in post-mortem human fluid and tissue specimens via LC/APCI-MS.** *Forensic Science International* 2006, **156**:103-117.
  146. TA Ternes: **Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples.** *Trends in Analytical Chemistry* 2001, **20**:419-434.
  147. AC Coragem, B Sueli Bonato, P Sueli Bonato: **Quantitative Analysis of  $\beta$ -Blockers in Pharmaceutical Preparations by Capillary Electrophoresis.** *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2005, **31**:209-214.
  148. J Zheng, SA Shamsi: **Simultaneous enantioseparation and sensitive detection of eight  $\beta$ -blockers using capillary electrochromatography-electrospray-ionization-mass spectrometry.** *Electrophoresis* 2006, **27**:2139-2151.
  149. C Akbay, SAA Rizvi, SA Shamsi: **Simultaneous enantioseparation and tandem UV-MS detection of eight  $\beta$ -blockers in micellar electrokinetic chromatography using a chiral molecular micelle.** *Analytical Chemistry* 2005, **77**:1672-1683.
  150. SAA Rizvi: **Polymeric sulfated amino acid surfactants: A class of versatile chiral selectors for micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and MEKC-MS.** *Analytical Chemistry* 2007, **79**:879-898.
  151. JG Calvert, JN Pitts: **Photochemistry**, 2<sup>nd</sup> edn. New-York London Sydney: John Wiley & Sons, Inc.; 1967.
  152. J Mack, JR Bolton: **Photochemistry of nitrite and nitrate in aqueous solution: a review.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1999, **128**:1-13.
  153. M Daniels, RV Meyers, EV Belardo: **Photochemistry of aqueous nitrate system. I. Excitation in the 300-m $\mu$  band.** *Journal of Physical Chemistry* 1968, **72**:389-399.
  154. GV Buxton, Greenstock, Clive L., WP Helman, Ross, Alberta B.: **Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}/\text{O}^\cdot$ ) in aqueous solutions.** *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 1988, **17**:513-886.

155. MC Gonzales, AM Braun: **VUV photolysis of aqueous solutions of nitrate and nitrite.** *Research on Chemical Intermediates* 1995, **21**:837-859.
156. MC Gonzales, AM Braun: **Vacuum-UV photolysis of aqueous solutions of nitrate: effect of organic matter. I. Phenol.** *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1996, **93**:7-19.
157. P Bilski, CF Chignell, J Szyclinski, A Borkowski, E Olesky, K Reszka: **Photooxidation of organic and inorganic substrates during UV photolysis of nitrite anion in aqueous solution.** *Journal of the American Chemical Society* 1992, **114**:549-556.
158. A-C Lin, M Reinhard: **Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water.** *Environmental Chemistry* 2005, **24**:1303-1309.
159. JL Packer, JJ Werner, DE Latch, K McNeill, WA Arnold: **Photochemical fate of pharmaceuticals in the environments: naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen.** *Aquatic Science* 2003, **65**:342-351.
160. AL Boreen, WA Arnold, K McNeill: **Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five membered heterocyclic groups.** *Environmental Science and Technology* 2004, **38**:3933-3940.
161. JJ Werner, K McNeill, WA Arnold: **Environmental photodegradation of mefenamic acid.** *Chemosphere* 2005, **58**:1339-1346.
162. DE Latch, BL Stender, JL Packer, WA Arnold, K McNeill: **Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: cimetidine and ranitidine.** *Environmental Science and Technology* 2003, **37**:3342-3350.
163. TE Doll, FH Frimmel: **Fate of pharmaceuticals-photodegradation by simulated solar UV-light.** *Chemosphere* 2003, **52**:1757-1769.
164. R Andreozzi, M Raffaele, P Nicklas: **Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment.** *Chemosphere* 2003, **50**:1319-1330.
165. AL Boreen, WA Arnold, K McNeill: **Triplet-state sensitized photodegradation of sulfa drugs containing six-membered heterocyclic groups: identification of an SO<sub>2</sub> extrusion photoproduct.** *Environmental Science and Technology* 2005, **59**:3630-3638.



166. H-R Buser, T Poiger, MD Müller: **Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in lake.** *Environmental Science and Technology* 1998, **32**:3449-3456.
167. B Liu, X Liu: **Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions.** *The Science of the Total Environment* 2004, **320**:269-274.
168. B Liu, F Wu, N-S Deng: **UV-light induced photodegradation of 17  $\alpha$ -ethynilestradiol in aqueous solutions.** *Journal of Hazardous Materials* 2003, **B98**:311-316.
169. Y Zhang, JL Zhou, B Ning: **Photodegradation of estrone and 17 $\beta$ -estradiol in water.** *Water Research* 2007, **41**:19-26.
170. BE Segmuller, BL Armstrong, R Dunphy, AR Oyler: **Identification of autooxidation and photodegradation products of ethynilestradiol by on-line HPLC-NMR and HPLC-MS.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000, **23**:927-937.
171. DI Schuster, R Hallam Brown, BM Resnick: **Photochemistry of ketones in solution. 53. Stereospecific triplet state rearrangements of chiral 2-cyclohexenones : Type A lumiketone rearrangement and phenyl migration.** *Journal of the American Chemical Society* 1978, **100**:4504-4512.
172. A Ricci, E Fasani, M Mella, A Albini: **General patterns in the photochemistry of pregna-1,4-dien-3,20-diones.** *Journal of Organic Chemistry* 2003, **68**:4361-4366.
173. A Ricci, E Fasani, M Mella, A Albini: **Noncommunicating Photoreaction Paths in Some Pregna-1,4-diene-3,20-diones.** *Journal of Organic Chemistry* 2001, **66**:8086-8093.
174. M DellaGreca, A Fiorentino, MR Iesce, M Isidori, A Nardelli, L Previtera, F Temussi: **Identification of phototransformation products of prednisone by sunlight : Toxicity of the drugs and its derivatives on aquatic organisms.** *Environmental Toxicology and Chemistry* 2003, **22**:534-539.
175. Q-T Liu, HE Williams: **Kinetics and degradation products for direct photolysis of  $\beta$ -blockers in water.** *Environmental Science and Technology* 2007, **41**:803-810.
176. PF Robinson, Q-T Liu, AM Riddle, R Murray-Smith: **Modelling the impact of direct phototransformation on predicted environmental concentrations (PECs) of propranolol hydrochloride in UK and US rivers.** *Chemosphere* 2007, **66**:757-766.

177. V Andrisano, R Ballardini, P Hrelia, C Norma, A Tosti, R Gotti, V Cavrini: **Studies on the photostability and in vitro phototoxicity of labetalol.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2001, **12**:495-504.
178. V Andrisano, R Gotti, A Leoni, V Cavrini: **Photodegradation studies on atenolol by liquid chromatography.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999, **21**:851-857.
179. S Sortino, S Petralia, F Boscà, MA Miranda: **Irreversible photo-oxydation of propranolol triggered by self-photogenerated singlet molecular oxygen.** *Photochemical and Photobiological Science* 2002, **1**:136-140.
180. K Uwai, M Tani, Y Ohtake, S Abe, A Maruko, T Chiba, Y Hamaya, Y Ohkubo, M Takeshita: **Photodegradation products of propranolol: The structures and pharmacological studies.** *Life Sciences* 2005, **78**:357-365.
181. DH Marchand, K Croes, JW Dolan, LR Snyder, RA Henry, KMR Kallury, S Waite, PW Carr: **Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VIII. Phenylalkyl and fluoro-substituted columns.** *Journal of Chromatography A* 2005, **1062**:65-78.
182. T Toyo'oka: **Modern Derivatization Methods for Separation Sciences.** Chichster New-York Weinheim Brisbane Singapore Toronto: John Wiley & Sons, Inc.; 1999.
183. KH DeSilva, FB Vest, HT Karnes: **Pyrene Sulphonyl Chloride as a reagent for quantification of Oestrogens in Human Serum Using HPLC with Conventional and Laser-Induced Fluorescence detection.** *Biomedical Chromatography* 1996, **10**:318-324.
184. JJ Halvax, G Wiese, WP Van Bennekom, A Bult: **On-line phase transfer catalysed dansylation of phenolic compounds followed by normal-phase liquid chromatography with fluorescence detection.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1992, **10**:335-341.
185. A Salvador, L Millerioux, A Renou: **Simultaneous LC-MS-MS Analysis of Capecitabine and its Metabolites (5'-deoxy-5-fluorocytidine, 5'-deoxy-5-fluorouridine, 5-fluorouracil) After Off-Line SPE from Human Plasma.** *Chromatographia* 2006, **63**:609-615.

186. MR Servos, DT Bennie, BK Burnison, A Jurkovic, R McInnis, T Neheli, A Scnell, P Seto, SA Smyth, T Ternes: **Distribution of estrogens, 17 $\beta$ -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants.** *The Science of the Total Environment* 2004.
187. <http://sierm.eaurmc.fr/rejets-collectivites/stations-epuration.php?dept=69>.
188. P Servais, J Garnier, N Demarteau, N Brion, G Billen: **Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents.** *Water Research* 1999, **33**:3521-3531.
189. B Ferrari, R Mons, B Vollat, B Frayssé, N Paxéus, R Lo Giudice, A Pollio, J Garric: **Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?** *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004, **23**:1344-1354.
190. G Huschek, PD Hansen, HH Maurer, D Krenzel, A Kayser: **Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use According to European Commission Recommendations.** *Environmental Toxicology* 2004, **19**:226-240.
191. F Stuer-Lauridsen, M Birkved, LP Hansen, HC Holten Lützhøft, B Halling-Sørensen: **Environmental risk assesment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use.** *Chemosphere* 2000, **40**:783-793.
192. E Quivet: **Analyse du comportement environnemental de pesticides.** 2004:Thèse, Chimie, Lyon, 278-2004.
193. G Cavina, R Alimenti, B Gallinella, L Valvo: **The identification of related substances in Triamcinolone acetonide by means of high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry.** *The Analyst* 1992, **129**:719-723.
194. HE Adbdellatef, MM El-Henawee, HM El-Sayed, MM Ayad: **Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for analysis of tramadol, acebutolol and dothiepin in pharmaceutical preparations.** *Spectrochimica Acta Part A* 2006, **65**:1087-1092.
195. A Piram, A Salvador, J-Y Gauvrit, P Lantéri, R Faure: **Development and optimisation of a single extraction procedure for the LC/MS/MS analysis of two pharmaceutical classes residues in Sewage Treatment Plant.** soumise.

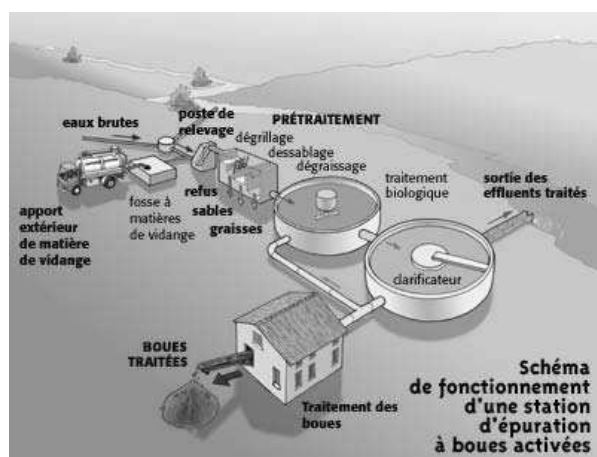
196. A Salvador, C Moretton, A Piram, R Faure: **On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants.** *Journal of Chromatography A* 2007, **1145**:102-109.

Anne es



# Annexe 1

## Fonctionnement d'une station d'épuration



Une station d'épuration est installée généralement à l'extrémité d'un réseau de collecte, juste en amont de la sortie des eaux vers le milieu naturel. Elle rassemble une succession de dispositifs, empruntés tour à tour par les eaux usées. Chaque dispositif est conçu pour extraire au fur et à mesure les différents polluants contenus dans les eaux.

### Les prétraitements :

Les dispositifs de prétraitement sont présents dans toutes les stations d'épuration, quels que soient les procédés mis en œuvre à l'aval. Ils ont pour but d'éliminer les éléments solides ou particuliers les plus grossiers, susceptibles de gêner les traitements ultérieurs ou d'endommager les équipements : déchets volumineux (dégrillage), sables (dessablage) et corps gras (dégraissage – déshuilage).

Le **dégrillage** consiste à faire passer les eaux usées au travers d'une grille dont les barreaux, plus ou moins espacés, retiennent les éléments les plus grossiers. Après nettoyage des grilles par des moyens mécaniques, manuels ou automatiques, les déchets sont évacués avec les ordures ménagères. Le tamisage, qui utilise des grilles de plus faible espacement, peut parfois compléter cette phase du prétraitement.

Le **dessablage** et le **déshuilage-dégraissage** consistent ensuite à faire passer l'eau dans des bassins où la réduction de vitesse d'écoulement fait se déposer les sables et flotter les graisses. L'injection des microbulles d'air permet d'accélérer la flottation des graisses. Les sables sont récupérés par pompage alors que les graisses sont raclées en surface. On enlève ainsi de l'eau les éléments grossiers et les sables de dimension supérieure à 200 microns ainsi que 80 à 90 % des graisses et matières flottantes (soit 30 à 40 % des graisses totales).

### Les traitements primaires et physico-chimiques

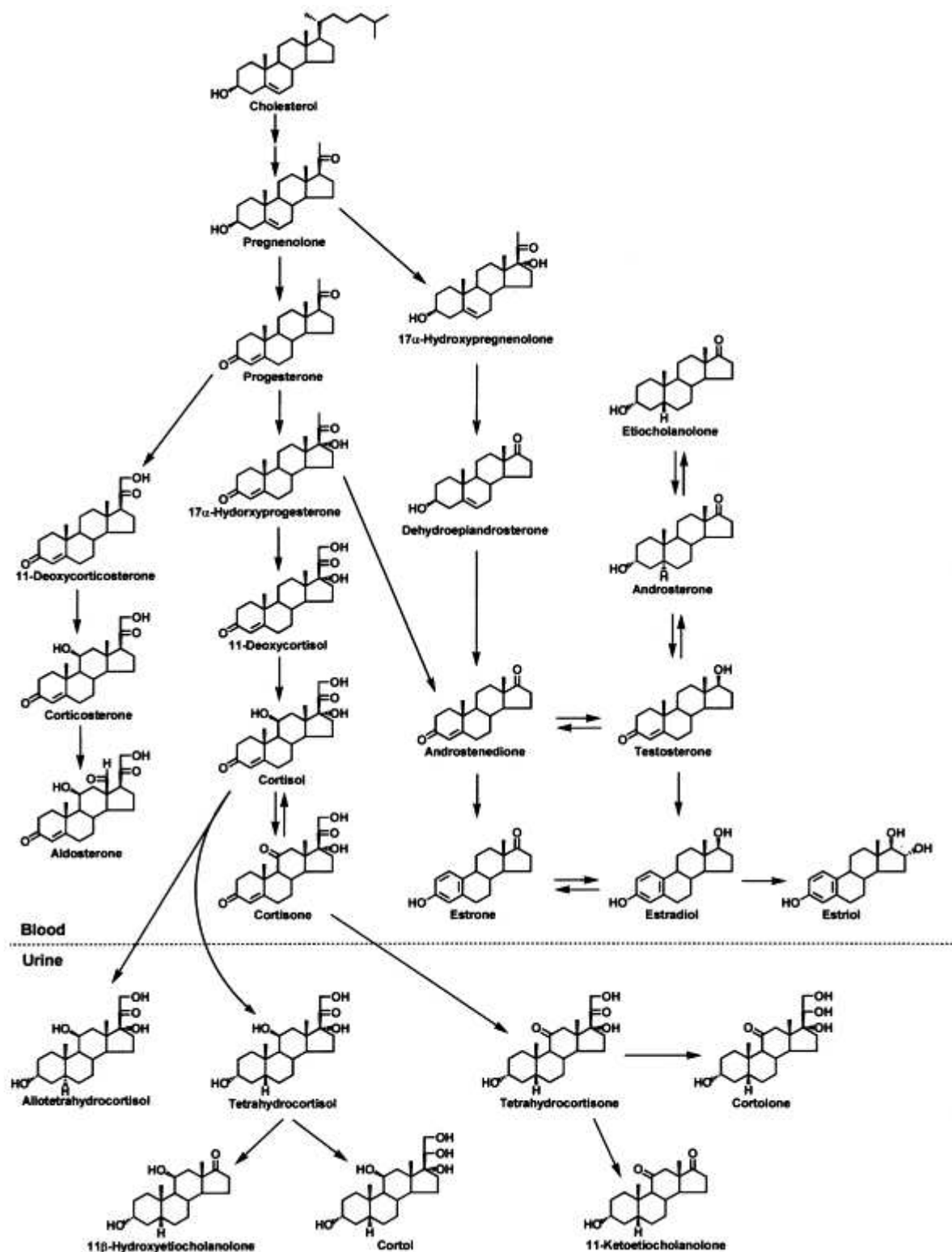
Après les prétraitements, il reste dans l'eau une charge polluante dissoute et des matières en suspension. Les traitements primaires ne portent que sur les matières particulaires décantables. Les traitements physico-chimiques permettent d'agglomérer ces particules par adjonction d'agents coagulants et floculants. Les amas de particules ainsi formés, ou "flocs", peuvent être séparés de l'eau par décantation ou par flottation.

### Les traitements biologiques

Ces traitements sont indispensables pour extraire des eaux usées les polluants dissous, essentiellement les matières organiques. Ils utilisent l'action de micro-organismes capables d'absorber ces matières. La sélection naturelle des espèces et leur concentration dans un bassin permettent d'accélérer et de contrôler un phénomène qui se produit communément en milieu naturel. Dans le cas des eaux usées urbaines, on favorise le développement de bactéries aérobies, c'est-à-dire, qui utilisent l'oxygène pour se développer.

## Annexe 1

### Métabolisme du cholestérol 11



1. K Shimada, K Mitamura, T Higashi: **Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids.** *Journal of Chromatography A* 2001, 935:141-172.



## Annexe 1

### *Analyses d'échantillons environnementaux*

Cette annexe présente l'ensemble des mesures réalisées sur les eaux de STEP.

Pour chaque échantillon une fiche indique les mesures physico-chimiques réalisées par le laboratoire de la Direction de l'eau du Grand-Lyon, ainsi que les mesures de résidus pharmaceutiques réalisées pour cette étude.

Les extraits SPE de  $\beta$ -bloquants et de corticostéroïdes sont en première approche dosés par rapport à une gamme étalon. Une concentration  $c_{gam}$  exprimée en  $\mu g/L$  est alors calculée. Cette concentration ne tient compte ni de l'effet matrice (EM), ni du rendement d'extraction (Rdt), ni du facteur d'enrichissement (FE). Une correction de cette valeur est apportée par la relation suivante :

$$c_{env} = \frac{c_{gam}}{(1 + EM) \times Rdt \times FE}$$

La valeur  $c_{env}$  ainsi calculée (exprimée en  $ng/L$  dans cette annexe) représente la concentration réelle de l'analyte considéré dans l'échantillon. Cette annexe présente de plus les effets matrices mesurés pour chaque analyte et chaque échantillon.

Pour les estrogènes, la concentration environnementale  $c_{env}$  est égale à la concentration calculée par rapport à la gamme ( $c_{gam}$ ) et les éventuels effets matrices sont compensés par l'addition des standards internes deutérés correspondant à chaque analyte. De ce fait les champs  $c_{gam}$  et EM ne sont pas renseignés pour les estrogènes.

Les coefficients de variation sur les mesures de  $c_{env}$  sont également indiqués dans cette annexe.

## Fontaine s /Saône échantillon du 18/04/07

|                                                   | influent                |        |        |                         | effluent                |        |        |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 0                       |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 4529                    |        |        |                         | 4982                    |        |        |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 430                     |        |        |                         | 65                      |        |        |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 180                     |        |        |                         | 18                      |        |        |                         |
| MES (mg/L)                                        | 190                     |        |        |                         | 16                      |        |        |                         |
| pH                                                | 7,7                     |        |        |                         | 7,7                     |        |        |                         |
| cond (µS/cm)                                      | 1359                    |        |        |                         | 1256                    |        |        |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
|                                                   | C <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | C <sub>gam</sub> (µg/L) | C <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | C <sub>gam</sub> (µg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Acébutolol                                        | 2080                    | 2      | /      | 141,5*                  | 1404                    | 6,6    | /      | 153,6*                  |
| Alprénolol                                        | 16                      | 4,9    | -32,0  | 6,6                     | 10                      | 8,9    | -25,8  | 6,7                     |
| Aténolol                                          | 2063                    | 5,4    | /      | 140,3*                  | 1847                    | 8,1    | /      | 203,2*                  |
| Bisoprolol                                        | 1056                    | 2,2    | -63,6  | 230,8                   | 555                     | 5,5    | -49,3  | 264,2                   |
| Bétaxolol                                         | 32                      | 3,8    | -28,6  | 20,3                    | 31                      | 8      | -18,0  | 22,7                    |
| Bupranolol                                        | 7                       | 5,8    | -25,5  | 4,6                     | 8                       | 9,6    | -26,9  | 5,2                     |
| Cartéolol                                         | 14                      | 2,9    | -58,9  | 5,4                     | 17                      | 10,5   | -61,8  | 6,2                     |
| Labétalol                                         | 118                     | 1,5    | -47,3  | 57,9                    | 113                     | 5,8    | -39,4  | 63,8                    |
| Métoprolol                                        | 322                     | 9,8    | -21,5  | 156,5                   | 233                     | 9,8    | -25,6  | 159,2                   |
| Nadolol                                           | 96                      | 10,2   | -58,6  | 23,9                    | 116                     | 10,2   | -64,2  | 32,9                    |
| Oxprénolol                                        | 38                      | 5,7    | -28,2  | 23,9                    | 41                      | 8,8    | -26,2  | 26,9                    |
| Pindolol                                          | 106                     | 16,1   | -26,8  | 7,8                     | 19                      | 21,2   | -24,8  | 1,0                     |
| Propranolol                                       | 892                     | 5,2    | -70,7  | 172,3                   | 423                     | 5      | -38,3  | 226,8                   |
| Sotalol                                           | 3168                    | 7,6    | -78,2  | 470,0                   | 7928                    | 3,8    | -91,0  | 67,0*                   |
| Timolol                                           | 26                      | 4,1    | -38,6  | 9,8                     | 19                      | 10,5   | -37,5  | 9,9                     |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisone                                        | 24                      | 12     | -80,67 | 3                       | 25,6                    | 80     | -91,76 | 1,54                    |
| Cortisol                                          | 214,7                   | 17     | -89,04 | 16,47                   | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisolone                                      | 362,0                   | 26     | -95,1  | 10,1                    | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Flunisolide                                       | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    |
| Triamcinolone acétonide                           | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cortisone                                         | 54,2                    | 8,12   | -78,9  | 8,12                    | 208,5                   | 13     | -84,56 | 24,15                   |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Méthylprednisolone                                | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Estrone                                           | 53,4                    | 3,3    | /      | /                       | 11,8                    | 2,4    | /      | /                       |
| Estradiol                                         | 23,6                    | 21     | /      | /                       | 6,91                    | 7,2    | /      | /                       |
| Ethinylestradiol                                  | 4,71                    | 1,2    | /      | /                       | 5,68                    | 9,7    | /      | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième

## Fontaine s /Saône échantillon du 13/03/07

|                                                   | influentes              |        |        |                         | effluents               |        |        |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 0                       |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 2867                    |        |        |                         | 3143                    |        |        |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 1280                    |        |        |                         | 94                      |        |        |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 500                     |        |        |                         | 34                      |        |        |                         |
| MES (mg/L)                                        | 1202                    |        |        |                         | 26                      |        |        |                         |
| pH                                                | 7,6                     |        |        |                         | 7,7                     |        |        |                         |
| cond (μS/cm)                                      | 1245                    |        |        |                         | 1641                    |        |        |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | 72,2                    |        |        |                         | 38,3                    |        |        |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | 33,1                    |        |        |                         | 33,6                    |        |        |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | 0,52                    |        |        |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | 7,3                     |        |        |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | 12,3                    |        |        |                         | 2,3                     |        |        |                         |
|                                                   | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Acébutolol                                        | 1134                    | 5,6    | /      | 77,1*                   | 796                     | 6,6    | /      | 87,6*                   |
| Alprénolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | 8,9    | -25,8  | nd                      |
| Aténolol                                          | 1144                    | 8,18   | /      | 77,8*                   | 742                     | 8,1    | /      | 81,7*                   |
| Bisoprolol                                        | 528                     | 5,7    | -56,9  | 136,5                   | 321                     | 5,5    | -49,3  | 196,0                   |
| Bétaxolol                                         | 8                       | 17,26  | -37,5  | 4,3                     | 14                      | 8      | -18,0  | 8,8                     |
| Bupranolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | 9,6    | -26,9  | nd                      |
| Cartéolol                                         | 3                       | 7,91   | 158,2  | 6,4                     | 4                       | 10,5   | -61,8  | 10,8                    |
| Labétalol                                         | 27                      | 11,5   | -50,8  | 12,3                    | 24                      | 5,8    | -39,4  | 11,6                    |
| Métoprolol                                        | 312                     | 11,69  | -62,5  | 72,6                    | 154                     | 9,8    | -25,6  | 101,0                   |
| Nadolol                                           | 96                      | 3,58   | 173,6  | 158,0                   | 85                      | 10,2   | -64,2  | 198,0                   |
| Oxprénolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | 8,8    | -26,2  | nd                      |
| Pindolol                                          | 33                      | 6,91   | -75,2  | 0,8                     | 23                      | 21,2   | -24,8  | 0,7                     |
| Propranolol                                       | 633                     | 3,09   | -85,2  | 61,9                    | 255                     | 5      | -38,3  | 114,3                   |
| Sotalol                                           | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | 3,8    | -91,0  | nd                      |
| Timolol                                           | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | 10,5   | -37,5  | nd                      |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisone                                        | 35                      | 1,7    | -73,43 | 5                       | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cortisol                                          | 196,9                   | 10,7   | -87,23 | 16,8                    | 7,9                     | 10,7   | -17,4  | 5,8                     |
| Prednisolone                                      | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Flunisolide                                       | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | nd                      |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone acétonide                           | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    |
| Cortisone                                         | 462,0                   | 13,3   | -54,58 | 149                     | 8,1                     | 11,4   | -84,56 | 169,67                  |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| méthylprednisolone                                | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /      |                         | nd                      | /      | /      | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Estrone                                           | 52,9                    | 2      | /      | /                       | 38                      | 9,1    | /      | /                       |
| Estradiol                                         | 33,2                    | 6,1    | /      | /                       | 5                       | 15,4   | /      | /                       |
| Ethinylestradiol                                  | 0,3                     | 27,8   | /      | /                       | 1,5                     | 26     | /      | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième

## Saint Fons échantillon du 19/03/07

|                                                   | influent                |        |        |                         | effluent                |        |        |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 2,2                     |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 317400                  |        |        |                         | 317400                  |        |        |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 362                     |        |        |                         | 112                     |        |        |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 140                     |        |        |                         | 36                      |        |        |                         |
| MES (mg/L)                                        | 191                     |        |        |                         | 50                      |        |        |                         |
| pH                                                | 7,9                     |        |        |                         | 7,8                     |        |        |                         |
| cond (μS/cm)                                      | 952                     |        |        |                         | 883                     |        |        |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | 37,3                    |        |        |                         | 24,7                    |        |        |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | 24,2                    |        |        |                         | 17,9                    |        |        |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | 0                       |        |        |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | 5,8                     |        |        |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | 4,8                     |        |        |                         | 2,8                     |        |        |                         |
|                                                   | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Acébutolol                                        | 2684                    | 3,7    | /      | 182,5*                  | 1073                    | 6,7    | 13     | 118,0*                  |
| Alprénolol                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Aténolol                                          | 1993                    | 5,9    | /      | 137,5*                  | 1373                    | 3,3    | -102,7 | 151,0*                  |
| Bisoprolol                                        | 236                     | 3,4    | -4,5   | 135,5                   | 120                     | 5,7    | 22,9   | 138,5                   |
| Bétaxolol                                         | 9                       | 7,2    | 43,6   | 11,6                    | 7                       | 7,6    | 67,3   | 10,8                    |
| Bupranolol                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cartéolol                                         | 5                       | 13,9   | -61,5  | 1,7                     | 7                       | 8,7    | -71,0  | 2,0                     |
| Labétalol                                         | 49                      | 2,4    | -4,6   | 43,3                    | 43                      | 1,4    | 19,5   | 47,8                    |
| Métoprolol                                        | 267                     | 3,9    | -17,1  | 137,0                   | 135                     | 5,3    | 15,0   | 143,0                   |
| Nadolol                                           | 54                      | 4,8    | -61,0  | 12,6                    | 61                      | 10,5   | -71,4  | 13,8                    |
| Oxprénolol                                        | 4                       | 13,9   | 21,2   | 4,4                     | 5                       | 10,8   | 35,7   | 6,5                     |
| Pindolol                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Propranolol                                       | 295                     | 3      | -25,0  | 146,0                   | 173                     | 4,7    | 2,2    | 153,5                   |
| Sotalol                                           | 1506                    | 5,7    | -58,0  | 430,0                   | 650                     | 5,9    | -19,0  | 49,5*                   |
| Timolol                                           | 7                       | 11,9   | 3,9    | 4,8                     | 5                       | 8      | 12,3   | 4,9                     |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisone                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cortisol                                          | 73,4                    | 6,1    | -35,38 | 33,2                    | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisolone                                      | 40,9                    | 7,6    | -77,19 | 5,79                    | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Flunisolide                                       | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone acétonide                           | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cortisone                                         | 922,6                   | 6,9    | -45,35 | 358                     | 459,5                   | 11,2   | -47,59 | 180,6                   |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| méthylprednisolone                                | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Estrone                                           | nd                      | /      | /      | /                       | 33,8                    | 6,8    | /      | /                       |
| Estradiol                                         | nd                      | /      | /      | /                       | 4,3                     | 4,1    | /      | /                       |
| Ethinylestradiol                                  | nd                      | /      | /      | /                       | nd                      |        | /      | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième

## Saint Fons échantillon du 26/03/07

|                                                   | influent                |        |          |                         | effluent                |        |          |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|----------|-------------------------|-------------------------|--------|----------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 0,2                     |        |          |                         |                         |        |          |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 299800                  |        |          |                         | 299800                  |        |          |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 362                     |        |          |                         | 119                     |        |          |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 140                     |        |          |                         | 36                      |        |          |                         |
| MES (mg/L)                                        | 158                     |        |          |                         | 45                      |        |          |                         |
| pH                                                | 7,8                     |        |          |                         | 7,9                     |        |          |                         |
| cond (μS/cm)                                      | 1022                    |        |          |                         | 1004                    |        |          |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | 39,2                    |        |          |                         | 27                      |        |          |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | 28,6                    |        |          |                         | 21,1                    |        |          |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |          |                         | 0                       |        |          |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |          |                         | 6,4                     |        |          |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | 5                       |        |          |                         | 4,7                     |        |          |                         |
|                                                   | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%)   | c <sub>gam</sub> (μg/L) | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%)   | c <sub>gam</sub> (μg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |          |                         |                         |        |          |                         |
| Acébutolol                                        | 1467                    | 6,14   | -34,0278 | 101,8*                  | 571                     | 5,81   | -3,93519 | 62,8*                   |
| Alprénolol                                        | nd                      | nd     | nd       | nd                      | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Aténolol                                          | 1566                    | 4,09   | 6,274008 | 106,5*                  | 1268                    | 3,9    | -37,58   | 14,0*                   |
| Bisoprolol                                        | 180                     | 11,92  | -7,4     | 100,2                   | 129                     | 6,06   | -7,8     | 112,0                   |
| Bétaxolol                                         | 9                       | 10,47  | -18,8    | 6,7                     | 7                       | 15,02  | -5,4     | 6,0                     |
| Bupranolol                                        | nd                      | nd     | nd       | nd                      | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Cartéolol                                         | 1                       | 6,01   | 169,4    | 3,1                     | 2                       | 4,77   | 228,3    | 6,2                     |
| Labétalol                                         | 53                      | 9,28   | -34,0    | 32,7                    | 53                      | 5,55   | -20,5    | 39,5                    |
| Métoprolol                                        | 246                     | 14,52  | -30,5    | 105,9                   | 196                     | 3,88   | -29,1    | 128,0                   |
| Nadolol                                           | 13                      | 1,15   | 286,2    | 30,9                    | 12                      | 14,53  | 299,4    | 37,7                    |
| Oxprénolol                                        | 6                       | 7,59   | -36,9    | 3,3                     | 62                      | 18,23  | -27,9    | 5,0                     |
| Pindolol                                          | nd                      | nd     | nd       | nd                      | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Propranolol                                       | 274                     | 4,74   | -40,2    | 108,3                   | 131                     | 5,2    | -13,3    | 98,5                    |
| Sotalol                                           | 583                     | 5,11   | -55,5    | 176,3                   | 1028                    | 13,39  | -81,7    | 177,0                   |
| Timolol                                           | 4                       | 15,25  | -42,8    | 1,3                     | 3                       | 13,32  | -29,8    | 1,7                     |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |          |                         |                         |        |          |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        |                         |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Prednisone                                        | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Cortisol                                          | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Prednisolone                                      | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Flunisolide                                       | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Triamcinolone acétonide                           | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Cortisone                                         | 275,0                   | 9,7    | 163      | 513                     | 306,1                   | 12     | -60,8    | 90                      |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| méthylprednisolone                                | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /        | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |          |                         |                         |        |          |                         |
| Estrone                                           | 48,6                    | 2,6    | /        | /                       | 28,6                    | 10,5   | /        | /                       |
| Estradiol                                         | 15                      | 7,6    | /        | /                       | 5,2                     | 16,2   | /        | /                       |
| Ethinylestradiol                                  | nd                      | /      | /        | /                       | nd                      | /      | /        | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième

## Pierre Bénite échantillon du 20/03/07

|                                                   | influentes              |        |        |                         | effluents               |        |          |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|--------|----------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 1,3                     |        |        |                         |                         |        |          |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 137160                  |        |        |                         | 142000                  |        |          |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 362                     |        |        |                         | 42                      |        |          |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 130                     |        |        |                         | 710                     |        |          |                         |
| MES (mg/L)                                        | 25100                   |        |        |                         | 8                       |        |          |                         |
| pH                                                | 7,8                     |        |        |                         | 7,5                     |        |          |                         |
| cond (μS/cm)                                      | 1034                    |        |        |                         | 783                     |        |          |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | 40                      |        |        |                         | 0                       |        |          |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | 26,6                    |        |        |                         | 0                       |        |          |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | 0,19                    |        |          |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | 7,6                     |        |          |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | 6,7                     |        |        |                         | 4,4                     |        |          |                         |
|                                                   | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%)   | c <sub>gam</sub> (μg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |        |                         |                         |        |          |                         |
| Acébutolol                                        | 5353                    | 6,05   | /      | 364,0*                  | 704                     | 3      | -105,523 | 77,5*                   |
| Alprénolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Aténolol                                          | 702                     | 6,88   | /      | 47,7*                   | 426                     | 7,35   | -92,7231 | 46,9*                   |
| Bisoprolol                                        | 265                     | 7,82   | -61,8  | 60,6                    | 72                      | 6,6    | -54,5    | 30,8                    |
| Bétaxolol                                         | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Bupranolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Cartéolol                                         | 10                      | 1,46   | -74,4  | 2,4                     | 9                       | 18,21  | -63,3    | 3,2                     |
| Labétalol                                         | 76                      | 6,29   | -71,7  | 20,1                    | 67                      | 6,77   | -60,0    | 24,9                    |
| Métoprolol                                        | 320                     | 10,96  | -70,9  | 57,7                    | 123                     | 5,23   | -62,5    | 42,3                    |
| Nadolol                                           | 172                     | 37,11  | -73,3  | 27,5                    | 10                      | 15,21  | -56,8    | 3,3                     |
| Oxprénolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Pindolol                                          | 18                      | 7,97   | -61,9  | 0,7                     | nd                      | nd     | nd       | nd                      |
| Propranolol                                       | 254                     | 10,98  | -74,8  | 42,3                    | 190                     | 6,56   | -67,9    | 53,0                    |
| Sotalol                                           | 1019                    | 5,71   | -65,8  | 236,8                   | 482                     | 4,01   | -45,9    | 245,0                   |
| Timolol                                           | 12                      | 5,35   | -71,0  | 2,1                     | 5                       | 6,55   | -60,9    | 1,7                     |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |        |                         |                         |        |          |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Prednisone                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Cortisol                                          | 21,4                    | 2,2    | -34,33 | 9,86                    | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Prednisolone                                      | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Flunisolide                                       | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Triamcinolone acétonide                           | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Cortisone                                         | 778,7                   | 18,2   | -48,81 | 283                     | nd                      | /      | /        | nd                      |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| méthylprednisolone                                | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /        | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |        |                         |                         |        |          |                         |
| Estrone                                           | 74,5                    | 0,9    | /      | /                       | 11,8                    | 5      | /        | /                       |
| Estradiol                                         | 21,4                    | 5,4    | /      | /                       | 0,5                     | 89     | /        | /                       |
| Ethinylestradiol                                  | nd                      | /      | /      | /                       | nd                      | /      | /        | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième

## Neuville s/ Saône échantillon du 02/04/07

|                                                   | influentes              |        |        |                         | effluents               |        |        |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 0                       |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 5660                    |        |        |                         | 5990                    |        |        |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 278                     |        |        |                         | 45                      |        |        |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 110                     |        |        |                         | 8                       |        |        |                         |
| MES (mg/L)                                        | 127                     |        |        |                         | 16                      |        |        |                         |
| pH                                                | 7,8                     |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| cond (μS/cm)                                      | 923                     |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
|                                                   | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Acébutolol                                        | 1264                    | 6,38   | /      | 85,9*                   | 779                     | 3,4    | /      | 85,7*                   |
| Alprénolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Aténolol                                          | 1594                    | 2,89   | /      | 108,4*                  | 1085                    | 6,7    | -79,12 | 119,4*                  |
| Bisoprolol                                        | 359                     | 7,33   | -25,9  | 159,8                   | 112                     | 4,7    | -41,9  | 101,6                   |
| Bétaxolol                                         | 2                       | 6,95   | -21,5  | 1,5                     | nd                      | /      | -39,8  | nd                      |
| Bupranolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cartéolol                                         | 2                       | 14,09  | -29,7  | 1,4                     | 2                       | /      | -69,6  | 1,4                     |
| Labétalol                                         | 55                      | 5,44   | -31,3  | 35,4                    | 67                      | /      | -57,5  | 53,6                    |
| Métoprolol                                        | 222                     | 9,68   | -33,6  | 91,2                    | 134                     | 6,4    | -38,2  | 85,8                    |
| Nadolol                                           | 15                      | 9,6    | 22,7   | 10,7                    | 6                       | 28,8   | -71,4  | 4,9                     |
| Oxprénolol                                        | 5                       | 15,25  | -20,3  | 3,8                     | 13                      | /      | -44,2  | 10,8                    |
| Pindolol                                          | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Propranolol                                       | 178                     | 3,91   | -30,7  | 81,6                    | 133                     | 3,8    | -39,2  | 98,3                    |
| Sotalol                                           | 291                     | 6,81   | -39,1  | 120,4                   | 363                     | 3,6    | -59,9  | 174,3                   |
| Timolol                                           | 11                      | 7,91   | -43,1  | 3,7                     | 3                       | 12,5   | -50,6  | 1,7                     |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisone                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cortisol                                          | 41,3                    | 9,9    | -94,23 | 1,67                    | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisolone                                      | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Flunisolide                                       | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | nd                      |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone acétonide                           | 2,776269                | 6,1    | -76,33 | 0,46                    | <LDQ                    | /      | /      | nd                      |
| Cortisone                                         | 860,5                   | 14     | -76,43 | 144                     | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| methylnprednisolone                               | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Estrone                                           | 29,5                    | 6      | /      | /                       | 2,1                     | 3      | /      | /                       |
| Estradiol                                         | 9,7                     | 6      | /      | /                       | 1                       | 85,8   | /      | /                       |
| Ethinylestradiol                                  | 2,6                     | 22,2   | /      | /                       | 3,9                     | 11,5   | /      | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième

## Neuville échantillon du 11/04/07

|                                                   | influent                |        |        |                         | effluent                |        |        |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 0                       |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 5440                    |        |        |                         | 5960                    |        |        |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 323                     |        |        |                         | 123                     |        |        |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 120                     |        |        |                         | 46                      |        |        |                         |
| MES (mg/L)                                        | 154                     |        |        |                         | 13                      |        |        |                         |
| pH                                                | 7,5                     |        |        |                         | 7,7                     |        |        |                         |
| cond (μS/cm)                                      | 942                     |        |        |                         | 855                     |        |        |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | 29,4                    |        |        |                         | 6,8                     |        |        |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | 18,2                    |        |        |                         | 5,2                     |        |        |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | 4,7                     |        |        |                         | 3                       |        |        |                         |
|                                                   | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Acébutolol                                        | 2081                    | 5,1    | /      | 141,5*                  | 1396                    | 3,4    | /      | 153,6*                  |
| Alprénolol                                        | nd                      |        |        | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Aténolol                                          | 1326                    | 16,9   | /      | 90,2*                   | 1051                    | 6,7    | /      | 115,6*                  |
| Bisoprolol                                        | 560                     | 7,1    | -60,9  | 131,2                   | 100                     | 4,7    | -41,9  | 54,3                    |
| Bétaxolol                                         | 4                       | 5,2    | -40,1  | 2,1                     | 1                       |        | -39,8  | 0,4                     |
| Bupranolol                                        | nd                      |        | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cartéolol                                         | 5                       | 2,2    | -64,4  | 1,6                     | 4                       |        | -69,6  | 1,1                     |
| Labétalol                                         | 88                      | 6,5    | -58,9  | 33,8                    | 113                     |        | -57,5  | 44,7                    |
| Métoprolol                                        | 215                     | 9,1    | -48,6  | 68,5                    | 105                     | 6,4    | -38,2  | 59,8                    |
| Nadolol                                           | 2                       | 23,6   | -63,0  | 0,5                     | 4                       | 28,8   | -71,4  | 0,9                     |
| Oxprénolol                                        | 5                       | 26,6   | -39,5  | 2,8                     | 19                      |        | -44,2  | 9,3                     |
| Pindolol                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Propranolol                                       | 356                     | 3,4    | -44,0  | 131,8                   | 145                     | 3,8    | -39,2  | 76,5                    |
| Sotalol                                           | 1027                    | 15     | -78,5  | 149,8                   | 345                     | 3,6    | -59,9  | 130,0                   |
| Timolol                                           | 6                       | 11,8   | -45,9  | 2,1                     | 6                       | 12,5   | -50,6  | 2,5                     |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisone                                        | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cortisol                                          | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisolone                                      | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Flunisolide                                       | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone acétonide                           | nd                      | /      | /      | nd                      | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    |
| Cortisone                                         | 152,6                   | 10,8   | -24,1  | 152,6                   | 1,3                     | 46,6   | -9,97  | 1,25                    |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| méthylprednisolone                                | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Estrone                                           | 26,5                    | 16,3   | /      | /                       | 4,9                     | 5,6    | /      | /                       |
| Estradiol                                         | 11,7                    | 25,1   | /      | /                       | 7,8                     | 1,8    | /      | /                       |
| Ethinylestradiol                                  | 3                       | x      | /      | /                       | 2,9                     | 1      | /      | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième



## Meyzieu échantillon du 27/03/07

|                                                   | influent                |        |        |                         | effluent                |        |        |                         |
|---------------------------------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|-------------------------|--------|--------|-------------------------|
| Précipitations (mm)                               | 0                       |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| D (m <sup>3</sup> /j)                             | 4448                    |        |        |                         | 3456                    |        |        |                         |
| DCO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 1158                    |        |        |                         | 328                     |        |        |                         |
| DBO (mg <sub>O2</sub> /L)                         | 480                     |        |        |                         | 140                     |        |        |                         |
| MES (mg/L)                                        | 308                     |        |        |                         | 115                     |        |        |                         |
| pH                                                | 7                       |        |        |                         | 7,7                     |        |        |                         |
| cond (μS/cm)                                      | 1646                    |        |        |                         | 1657                    |        |        |                         |
| NK (mg <sub>N</sub> /L)                           | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg <sub>N</sub> /L) | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
| PT (mg <sub>N</sub> /L)                           | nm                      |        |        |                         | nm                      |        |        |                         |
|                                                   | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) | c <sub>env</sub> (ng/L) | CV (%) | EM (%) | c <sub>gam</sub> (μg/L) |
| <b>β-bloquants</b>                                |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Acébutolol                                        | 2438                    | 10,9   | /      | 165,8*                  | 1073                    | 5,78   | /      | 188,0*                  |
| Alprénolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | nd     | nd     | nd                      |
| Aténolol                                          | 1706                    | 3,92   | /      | 116,0*                  | 1573                    | 4,86   | /      | 173,0*                  |
| Bisoprolol                                        | 302                     | 11,95  | -48,7  | 92,8                    | 158                     | 8,28   | -24,7  | 112,0                   |
| Bétaxolol                                         | 18                      | 6,88   | -41,8  | 9,6                     | 16                      | 12,54  | -30,9  | 9,8                     |
| Bupranolol                                        | nd                      | nd     | nd     | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cartéolol                                         | 3                       | 5,52   | 134,5  | 5,8                     | 3                       | 18,42  | 158,9  | 8,3                     |
| Labétalol                                         | 60                      | 11,89  | -41,9  | 32,3                    | 91                      | 5,61   | -35,6  | 54,7                    |
| Métoprolol                                        | 233                     | 14,62  | -30,2  | 100,6                   | 217                     | 11,12  | -31,1  | 137,5                   |
| Nadolol                                           | 38                      | 9,65   | 340,0  | 101,3                   | 22                      | 18,3   | 412,7  | 88,4                    |
| Oxprénolol                                        | 8                       | 15,52  | -43,8  | 4,0                     | 24                      | 15,57  | -28,9  | 14,8                    |
| Pindolol                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | nd     | nd     | nd                      |
| Propranolol                                       | 330                     | 1,09   | -35,5  | 140,7                   | 373                     | 8,4    | -32,3  | 219,8                   |
| Sotalol                                           | 1733                    | 9,8    | -81,6  | 217,3                   | 1274                    | 16,01  | -75,3  | 295,7                   |
| Timolol                                           | 11                      | 14,05  | -58,8  | 2,9                     | 11                      | 16,12  | -48,8  | 4,5                     |
| <b>Corticostéroïdes</b>                           |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Bétaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Prednisone                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Cortisol                                          | 260,0                   | 8,1    | -94,01 | 10,9                    | 20                      | 17,4   | -81,81 | 3,23                    |
| Prednisolone                                      | 553,4                   | 9      | -85,5  | 49,75                   | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Budésonide                                        | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Flunisolide                                       | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Fluocinolone acétonide                            | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| Triamcinolone acétonide                           | nd                      | /      | /      | <LDQ                    | <LDQ                    | /      | /      | <LDQ                    |
| Cortisone                                         | 77,2                    | 11,9   | -78,06 | 12,03                   | 61,2                    | 2      | -97,17 | 1,3                     |
| Désonide                                          | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| méthylprednisolone                                | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| dexaméthasone                                     | nd                      | /      | /      | nd                      | nd                      | /      | /      | nd                      |
| <b>Estrogènes</b>                                 |                         |        |        |                         |                         |        |        |                         |
| Estrone                                           | 60,1                    | 2,1    | /      | /                       | 46,1                    | 3      | /      | /                       |
| Estradiol                                         | 22,8                    | 9,4    | /      | /                       | 13,9                    | 6      | /      | /                       |
| Ethinylestradiol                                  |                         |        | /      | /                       | nd                      | /      | /      | /                       |

\*: calculé à partir des échantillons dilués au dixième

## Annexe 1

### *Données hydrologiques*

Les données présentées dans cette annexe sont issues de la banque nationale de données pour l'hydrométrie et l'hydrologie ([www.hydro.eaufrance.fr](http://www.hydro.eaufrance.fr)).

Ces fiches de synthèse sont composées de 6 parties.

#### 1) Écoulements mensuels

Les 12 écoulements mensuels moyens et l'écoulement annuel moyen (module interannuel) sont présentés sous 3 formes : Débit ( $\text{m}^3/\text{s}$ ) ; Débit spécifique ( $\text{L/s/km}^2$ ) ; Lane d'eau équivalente (mm)

#### 2) Modules interannuels

La colonne « module indique le module interannuel moyen. Cette valeur est obtenue en calculant la moyenne pondérée des 12 écoulements mensuels moyens, sur l'ensemble de la période connue. Il s'agit donc d'une moyenne expérimentale.

Les colonnes « médiane » et « quinquennale » indiquent des valeurs obtenues par ajustement à la loi statistique indiquée.

#### 3) Données basses eaux

La loi utilisée est la loi choisie par le gestionnaire pour les calculs en basses eaux pour la station concernée. La période (pour le calcul de VCN) est l'année d'étiage (du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre pour les cours d'eau à régime pluvial).

VCN3 est le débit minimal sur 3 jours consécutifs

VCN10 est le débit minimal sur 10 jours consécutifs

QMNA est le débit mensuel minimal annuel

Seule la médiane et la quinquennale sèche (valeur en dessous de laquelle les débits ne descendent que 20 fois par siècle) sont indiquées.

#### 4) Données de crue

Les valeurs indiquées résultent de l'utilisation systématique de la loi de Gumbel sur l'année hydrologique.

QJ correspond à un calcul de crue utilisant les débits journaliers en entrée.

QIX correspond à un calcul de crue utilisant les débits instantanés maximaux mensuels en entrée.

#### 5) Maximum connus

Hauteur maximale instantanée, débit maximal instantané et débit journalier maximaux. Il s'agit des plus fortes valeurs connues de la banque HYDRO.

#### 6) Débits classés

Les informations contenues dans ce tableau sont les débits journaliers classés pour les fréquences : 0,99 ; 0,98 ; 0,95 ; 0,90 ; 0,8 ; 0,7 ; 0,6 ; 0,5 ; 0,4 ; 0,3 ; 0,2 ; 0,1 ; 0,05 ; 0,02 ; 0,01.



## LA SAONE A COUZON-AU-MONT-D'OR [2]

Zone hydrographique : U4710010

Bassin versant : 29900 km<sup>2</sup>

Producteur : DIREN Rhone-Alpes / Bassin RMC

E-mail : jean-francois.brochot@rhone-alpes.ecologie.gouv.fr

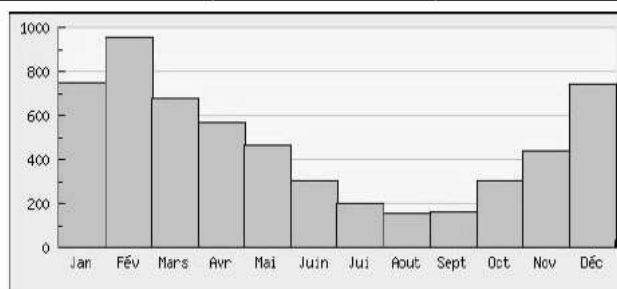
### SYNTHESE

donnees hydrologiques de synthese (1969 - 1984)  
Calculees le 16/06/2007; Intervalle de confiance : 95 %; utilisation des stations anterieures

écoulements mensuels (naturels)

donnees calculees sur 16 ans

|                 | janv.   | fév.    | mars    | avr.    | mai     | juin    | juil.   | août    | sept.   | oct.    | nov.    | déc.    | Année |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| Débits (m3/s)   | 747.0 # | 954.0 # | 679.0 # | 565.0 # | 462.0 # | 306.0 # | 197.0 # | 153.0 # | 159.0 # | 303.0 # | 439.0 # | 745.0 # | 473.0 |
| Qsp (l/s/km2)   | 25.0 #  | 31.9 #  | 22.7 #  | 18.9 #  | 15.4 #  | 10.2 #  | 6.6 #   | 5.1 #   | 5.3 #   | 10.1 #  | 14.7 #  | 24.9 #  | 15.8  |
| Lame d'eau (mm) | 66 #    | 79 #    | 60 #    | 48 #    | 41 #    | 26 #    | 17 #    | 13 #    | 13 #    | 27 #    | 38 #    | 66 #    | 501   |



modules interannuels ( loi de Gauss - septembre a aout )

donnees calculees sur 16 ans

| module (moyenne)      | fréquence     | quinquennale sèche    | médiane               | quinquennale humide   |
|-----------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 473.0 [ 424.0;522.0 ] | debits (m3/s) | 360.0 [ 280.0;420.0 ] | 480.0 [ 370.0;630.0 ] | 570.0 [ 510.0;650.0 ] |

basses eaux ( loi de Galton - janvier a decembre )

donnees calculees sur 16 ans

| fréquence          | VCN3 (m3/s)           | VCN10 (m3/s)          | QMNA (m3/s)           |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| biennale           | 61.00 [ 49.00;78.00 ] | 72.00 [ 53.00;97.00 ] | 96.00 [ 75.00;120.0 ] |
| quinquennale sèche | 42.00 [ 31.00;53.00 ] | 47.00 [ 31.00;63.00 ] | 63.00 [ 45.00;80.00 ] |

crues ( loi de Gumbel - septembre a aout )

donnees calculees sur 15 ans

| fréquence      | QJ (m3/s)             | QIX (m3/s)  |
|----------------|-----------------------|-------------|
| biennale       | 1700. [ 1500.;2000. ] |             |
| quinquennale   | 2200. [ 1900.;2700. ] |             |
| décennale      | 2500. [ 2200.;3200. ] |             |
| vicennale      | 2800. [ 2400.;3700. ] |             |
| cinquantennale | non calculé           |             |
| centennale     | non calculé           | non calculé |

maximums connus (par la banque HYDRO)

|                                   |       |                   |
|-----------------------------------|-------|-------------------|
| hauteur maximale instantanee (cm) | 711   | 2 mars 1999 03:49 |
| debit instantane maximal (m3/s)   |       |                   |
| debit journalier maximal (m3/s)   | 2600. | 23 decembre 1981  |

débits classés

donnees calculees sur 6064 jours

| fréquence    | 0.99  | 0.98  | 0.95  | 0.90  | 0.80  | 0.70  | 0.60  | 0.50  | 0.40  | 0.30  | 0.20  | 0.10  | 0.05  | 0.02  | 0.01  |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| debit (m3/s) | 1900. | 1810. | 1380. | 1060. | 711.0 | 506.0 | 379.0 | 287.0 | 214.0 | 164.0 | 119.0 | 77.20 | 58.70 | 47.30 | 42.10 |



## LE RHONE A TERNAY

Zone hydrographique : V3130020

Bassin versant : 50560 km²

Producteur : CNR

E-mail : cnr@calva.net

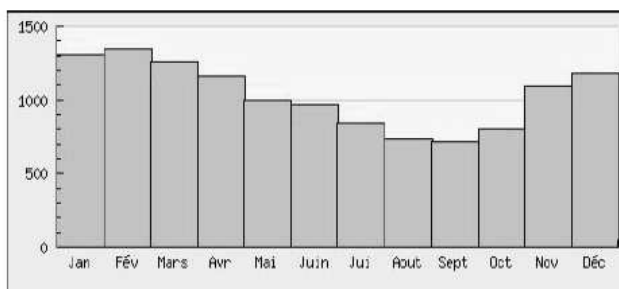
### SYNTHESE

donnees hydrologiques de synthese (1920 - 2006)  
Calculees le 16/06/2007; Intervalle de confiance : 95 %; utilisation des stations anterieures

écoulements mensuels (naturels)

donnees calculees sur 86 ans

|                 | janv.   | fév.    | mars    | avr.    | mai     | juin    | juil.   | août    | sept.   | oct.    | nov.    | déc.    | Année |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| Débits (m3/s)   | 1310. # | 1350. # | 1260. # | 1160. # | 1000. # | 964.0 # | 844.0 # | 731.0 # | 720.0 # | 799.0 # | 1090. # | 1180. # | 1030. |
| Qsp (l/s/km2)   | 25.9 #  | 26.6 #  | 24.8 #  | 22.8 #  | 19.8 #  | 19.1 #  | 16.7 #  | 14.5 #  | 14.2 #  | 15.8 #  | 21.5 #  | 23.3 #  | 20.4  |
| Lame d'eau (mm) | 69 #    | 66 #    | 66 #    | 59 #    | 53 #    | 49 #    | 44 #    | 38 #    | 36 #    | 42 #    | 55 #    | 62 #    | 644   |



modules interannuels ( loi de Galton - septembre a aout )

donnees calculees sur 86 ans

| module (moyenne)      | fréquence     | quinquennale sèche    | médiane               | quinquennale humide   |
|-----------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1030. [ 955.0;1110. ] | debits (m3/s) | 820.0 [ 770.0;860.0 ] | 1000. [ 950.0;1100. ] | 1200. [ 1200.;1300. ] |

basses eaux ( loi de Galton - janvier a decembre )

donnees calculees sur 86 ans

| fréquence          | VCN3 (m3/s)           | VCN10 (m3/s)          | QMNA (m3/s)           |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| biennale           | 330.0 [ 320.0;350.0 ] | 370.0 [ 350.0;380.0 ] | 470.0 [ 450.0;500.0 ] |
| quinquennale sèche | 280.0 [ 260.0;290.0 ] | 300.0 [ 280.0;310.0 ] | 370.0 [ 340.0;390.0 ] |

crues ( loi de Gumbel - septembre a aout )

donnees calculees sur 86 ans

| fréquence      | QJ (m3/s)             | QIX (m3/s)            |
|----------------|-----------------------|-----------------------|
| biennale       | 3100. [ 3000.;3300. ] | 3200. [ 3100.;3300. ] |
| quinquennale   | 3900. [ 3800.;4200. ] | 4000. [ 3800.;4200. ] |
| décennale      | 4500. [ 4200.;4800. ] | 4500. [ 4300.;4900. ] |
| vicennale      | 5000. [ 4700.;5400. ] | 5100. [ 4800.;5500. ] |
| cinquantennale | 5700. [ 5300.;6200. ] | 5700. [ 5400.;6300. ] |
| centennale     | non calculé           | non calculé           |

maximums connus (par la banque HYDRO)

| hauteur maximale instantanee (cm) |       |                    |
|-----------------------------------|-------|--------------------|
| debit instantane maximal (m3/s)   | 4780. | 23 mars 2001 17:02 |
| debit journalier maximal (m3/s)   | 5060. | 20 janvier 1955    |

débits classés

donnees calculees sur 41640 jours

| fréquence    | 0.99  | 0.98  | 0.95  | 0.90  | 0.80  | 0.70  | 0.60  | 0.50  | 0.40  | 0.30  | 0.20  | 0.10  | 0.05  | 0.02  | 0.01  |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| debit (m3/s) | 3270. | 2930. | 2420. | 1990. | 1490. | 1170. | 964.0 | 825.0 | 710.0 | 611.0 | 518.0 | 419.0 | 351.0 | 291.0 | 264.0 |



## LE RHONE A LYON [PERRACHE]

Zone hydrographique : V3000015

Bassin versant : 20300 km<sup>2</sup>

Producteur : CNR

E-mail : cnr@calva.net

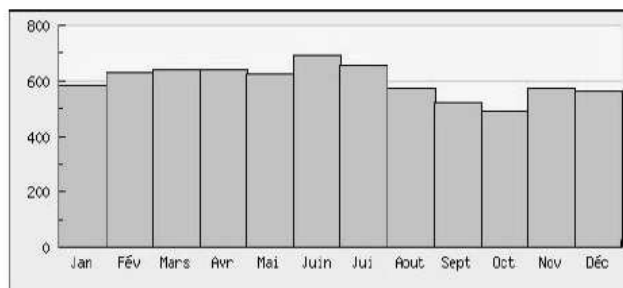
### SYNTHESE

donnees hydrologiques de synthese (1920 - 2005)  
Calculees le 16/06/2007; Intervalle de confiance : 95 %; utilisation des stations anterieures

écoulements mensuels (naturels)

donnees calculees sur 86 ans

|                 | janv.   | fév.    | mars    | avr.    | mai     | juin    | juil.   | août  | sept.   | oct.    | nov.    | déc.  | Année |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|-------|-------|
| Débits (m3/s)   | 585.0 # | 630.0 ! | 638.0 ! | 638.0 # | 625.0 ! | 691.0 # | 656.0 ! | 571.0 | 519.0 ! | 490.0 ! | 573.0 ! | 564.0 | 598.0 |
| Qsp (l/s/km2)   | 28.8 #  | 31.0 !  | 31.4 !  | 31.4 #  | 30.8 !  | 34.1 #  | 32.3 !  | 28.1  | 25.6 !  | 24.1 !  | 28.3 !  | 27.8  | 29.5  |
| Lame d'eau (mm) | 77 #    | 77 !    | 84 !    | 81 #    | 82 !    | 88 #    | 86 !    | 75    | 66 !    | 64 !    | 73 !    | 74    | 931   |



modules interannuels ( loi de Galton - septembre a aout )

donnees calculees sur 86 ans

| module (moyenne)      | fréquence     | quinquennale sèche    | médiane               | quinquennale humide   |
|-----------------------|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 598.0 [ 574.0;623.0 ] | debits (m3/s) | 490.0 [ 470.0;510.0 ] | 600.0 [ 560.0;640.0 ] | 700.0 [ 670.0;730.0 ] |

basses eaux ( loi de Galton - janvier a decembre )

donnees calculees sur 86 ans

| fréquence          | VCN3 (m3/s)           | VCN10 (m3/s)          | QMNA (m3/s)           |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| biennale           | 220.0 [ 220.0;230.0 ] | 250.0 [ 240.0;260.0 ] | 310.0 [ 300.0;330.0 ] |
| quinquennale sèche | 190.0 [ 180.0;200.0 ] | 210.0 [ 200.0;210.0 ] | 250.0 [ 240.0;260.0 ] |

crues ( loi de Gumbel - septembre a aout )

donnees calculees sur 85 ans

| fréquence      | QJ (m3/s)             | QIX (m3/s)            |
|----------------|-----------------------|-----------------------|
| biennale       | 2100. [ 2000.;2200. ] | 2100. [ 2100.;2200. ] |
| quinquennale   | 2600. [ 2500.;2800. ] | 2700. [ 2600.;2800. ] |
| décennale      | 3000. [ 2800.;3200. ] | 3000. [ 2900.;3200. ] |
| vicennale      | 3300. [ 3100.;3600. ] | 3400. [ 3200.;3600. ] |
| cinquantennale | 3800. [ 3500.;4100. ] | 3800. [ 3600.;4200. ] |
| centennale     | non calculé           | non calculé           |

maximums connus (par la banque HYDRO)

|                                   |       |                       |
|-----------------------------------|-------|-----------------------|
| hauteur maximale instantanee (cm) |       |                       |
| debit instantane maximal (m3/s)   | 4250. | 1 novembre 1944 00:00 |
| debit journalier maximal (m3/s)   | 7420. | 29 mars 1972          |

débits classés

donnees calculees sur 31778 jours

| fréquence    | 0.99  | 0.98  | 0.95  | 0.90  | 0.80  | 0.70  | 0.60  | 0.50  | 0.40  | 0.30  | 0.20  | 0.10  | 0.05  | 0.02  | 0.01  |
|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| debit (m3/s) | 1860. | 1590. | 1240. | 1010. | 804.0 | 683.0 | 595.0 | 519.0 | 453.0 | 388.0 | 330.0 | 270.0 | 236.0 | 209.0 | 193.0 |

## **Anne e  **

### ***Méthodes d' traction et d'anal ses appliqu es au  études de photod radation***

#### **Méthodes d' traction sur phase solide**

##### ** hotod radation de la cortisone   isolation du produit   **

Cartouche : Varian Bond Elut C18, 500 mg, 3cc

Conditionnement : 3 mL MeOH puis 3 mL eau

Charge : 50 mL de solution de cortisone   100 mg/L irradi e 14 h par une lampe HPK

Elution : 4,5 mL de mélange eau/AcN, 80/20, v/v

##### ** r concentration des m lan es réactionnels issus de la photod radation de la triamcinolone et de la triamcinolone acétonide**

Cartouche : Varian Bond Elut C18, 500 mg, 3cc

Conditionnement : 3 mL MeOH puis 6 mL eau

Charge : 250 mL de solution de triamcinolone irradi e 100 min (ou de triamcinolone acétonide irradi e 60 min) par une lampe HPK

Elution : 6mL AcN

Evaporation   sec et reprise par 5 mL d'eau

## Méthodes d'analyse des mélanges réactionnels issus de la photodégradation de corticostéroïdes

### cortisone, triamcinolone acétonide, de, améthasone et prednisolone

Colonne : Waters Symmetry C18 150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m

Débit : 0,2 mL/min

Elution : gradient eau/AcN

| Temps (min) | %eau | %AcN |
|-------------|------|------|
| 0           | 75   | 25   |
| 25          | 0    | 100  |
| 30          | 0    | 100  |

Détection : UV :  $\lambda$  = 246 nm

### Photodégradation de la triamcinolone

Colonne : Thermo, Aquasil C18 100 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m

Débit : 0,2 mL/min

Elution : gradient eau/AcN

| Temps (min) | %eau | %AcN |
|-------------|------|------|
| 0           | 80   | 20   |
| 18          | 45   | 55   |
| 22          | 0    | 100  |
| 32          | 0    | 100  |

Détection : UV :  $\lambda$  = 238 nm

## Méthodes d'analyse des mélanes réactionnels issus de la photodégradation de $\beta$ -bloquants

Le gaz rideau (azote) et le gaz de nébulisation (air) étaient fixés à un débit de 10 unités arbitraires. La source TIS était chauffée à 450°C. Un gaz desséchant (air) était introduit à un débit de 8 L/min. La tension d'orifice (DP) et le potentiel de focalisation (FP) dépendent des analytes.

### acébutolol

Colonne : Thermo, Aquasil C18, 100 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m

Débit : 0,2 mL/min

Elution : gradient tampon formiate/AcN (tampon formiate : formiate d'ammonium 10mM acidifié à pH3,8 par addition d'acide formique)

| Temps (min) | %eau | %AcN |
|-------------|------|------|
| 0           | 97   | 3    |
| 5           | 97   | 3    |
| 6           | 92   | 10   |
| 30          | 0    | 100  |
| 40          | 0    | 100  |

Détection :

UV :  $\lambda = 220$  nm,  $\lambda = 270$  nm

ESI(+)/MS, mode SIM

DP = 21

FP = 150

| Ion suivi | photoproduit correspondant |
|-----------|----------------------------|
| 337       | molécule mère              |
| 353       | produit mono-hydroxylé     |
| 369       | produit di-hydroxylé       |
| 385       | produit tri-hydroxylé      |
| 401       | produit tétra-hydroxylé    |



**métoprolol**

Colonne : Waters, X-Terra C18, 50 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m

Débit : 0,2 mL/min

Elution : gradient tampon formiate/AcN (tampon formiate : formiate d'ammonium 10mM  
acidifié à pH3,8 par addition d'acide formique)

| Temps (min) | %eau | %AcN |
|-------------|------|------|
| 0           | 95   | 5    |
| 40          | 0    | 100  |

UV :  $\lambda$  = 220 nm,  $\lambda$  = 270 nm

ESI(+)/MS, mode SIM      DP = 21      FP = 150

|           |                            |
|-----------|----------------------------|
| Ion suivi | photoproduit correspondant |
| 268       | molécule mère              |
| 284       | produit mono-hydroxylé     |
| 300       | produit di-hydroxylé       |
| 316       | produit tri-hydroxylé      |
| 332       | produit tétra-hydroxylé    |

**pindolol**

Colonne : Thermo, Aquasil C18, 100 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m

Débit : 0,2 mL/min

Elution : gradient tampon formiate/AcN (tampon formiate : formiate d'ammonium 10mM  
acidifié à pH3,8 par addition d'acide formique)

| Temps (min) | %eau | %AcN |
|-------------|------|------|
| 0           | 97   | 3    |
| 30          | 0    | 100  |

UV :  $\lambda$  = 220 nm,  $\lambda$  = 270 nm

ESI(+)/MS, mode full scan

ou

ESI(+)/MS, mode SIM      DP = 16      FP = 130

| Ion suivi | photoproduit correspondant |
|-----------|----------------------------|
| 249       | molécule mère              |
| 265       | produit mono-hydroxylé     |
| 281       | produit di-hydroxylé       |
| 297       | produit tri-hydroxylé      |
| 313       | produit tétra-hydroxylé    |

**propranolol**

Colonne : Waters, Symmetry C18, 150 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m

Débit : 0,2 mL/min

Elution : gradient tampon formiate/AcN (tampon formiate : formiate d'ammonium 10mM  
acidifié à pH3,8 par addition d'acide formique)

| Temps (min) | %eau | %AcN |
|-------------|------|------|
| 0           | 95   | 5    |
| 40          | 0    | 100  |

UV :  $\lambda$  = 220 nm,  $\lambda$  = 270 nm

ESI(+)/MS, mode full scan

ou

ESI(+)/MS, mode SIM      DP = 16      FP = 140

| Ion suivi | photoproduit correspondant |
|-----------|----------------------------|
| 260       | molécule mère              |
| 276       | produit mono-hydroxylé     |
| 292       | produit di-hydroxylé       |
| 308       | produit tri-hydroxylé      |

**timolol**

Colonne : Thermo, Aquasil C18, 100 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m

Débit : 0,2 mL/min

Elution : gradient tampon formiate/AcN (tampon formiate : formiate d'ammonium 10mM  
acidifié à pH3,8 par addition d'acide formique)

| Temps (min) | %eau | %AcN |
|-------------|------|------|
| 0           | 90   | 10   |
| 20          | 0    | 100  |

UV :  $\lambda$  = 220 nm,  $\lambda$  = 270 nm

ESI(+)/MS, mode SIM

DP = 16

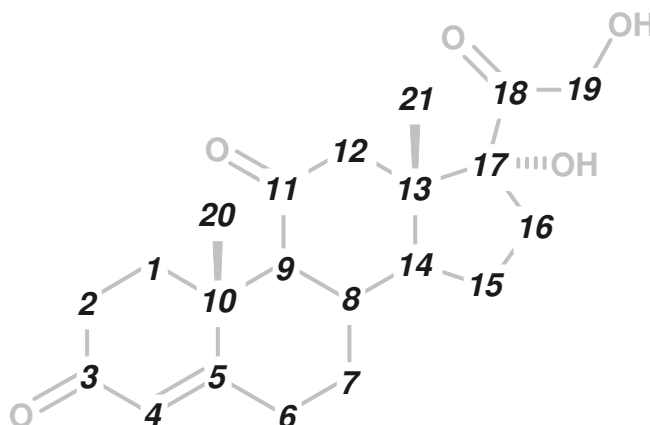
FP = 140

| Ion suivi | photoproduit correspondant |
|-----------|----------------------------|
| 317       | molécule mère              |
| 333       | produit mono-hydroxylé     |
| 349       | produit di-hydroxylé       |
| 365       | produit tri-hydroxylé      |
| 381       | produit tétra-hydroxylé    |

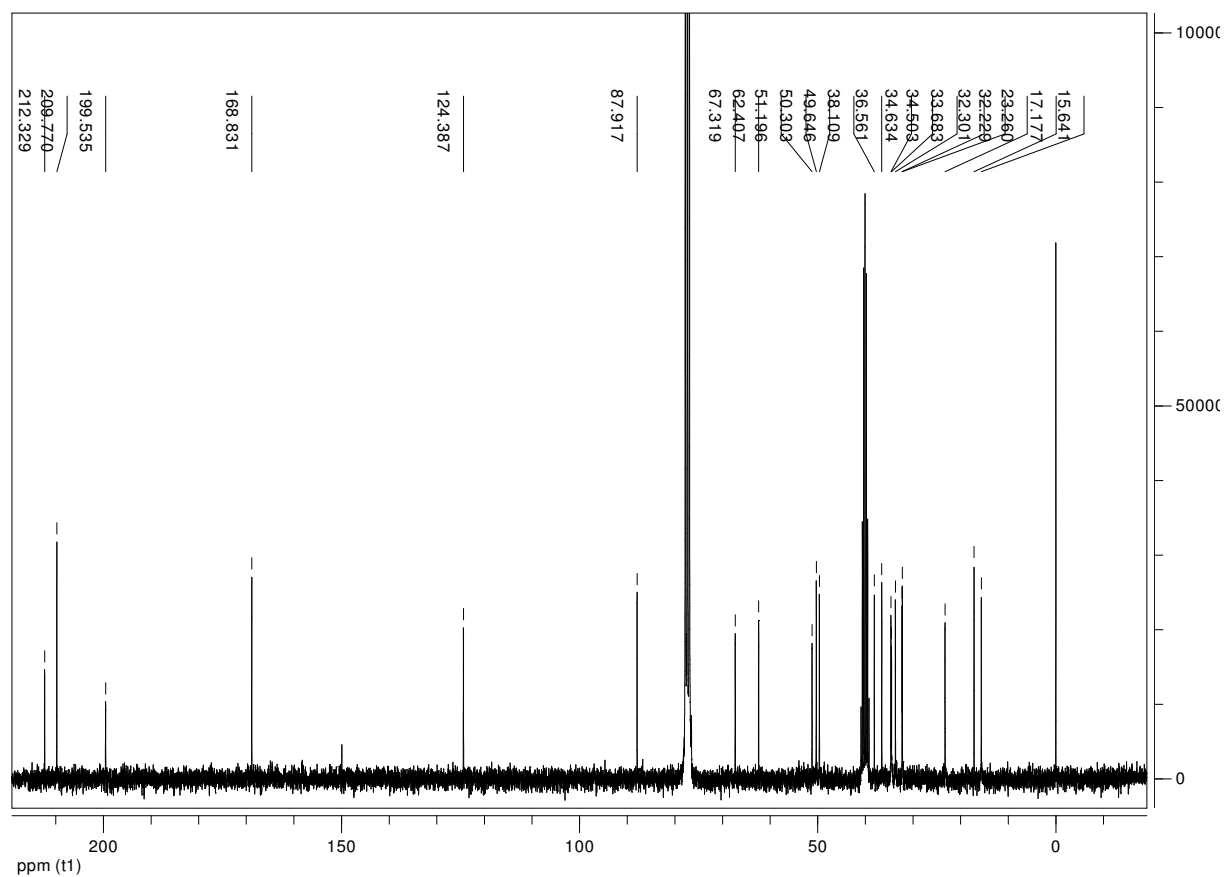
## Annexe 1

### Spectres RMN de la cortisone et de son photoproduit

#### Cortisone



#### Spectre RMN<sup>13</sup>C découplé



ERROR: rangecheck  
OFFENDING COMMAND: .buildcmap

STACK:

-dictionary-  
/WinCharSetFFFF-V2TT9BF4ACCA  
t/CMap  
-dictionary-  
/WinCharSetFFFF-V2TT9BF4ACCA  
t