

Extraction et analyse de produits pharmaceutiques dans les eaux environnementales

René FAURE

Laboratoire des Sciences Analytiques

Université Claude Bernard Lyon 1



Origine des produits pharmaceutiques recherchés :

- usage humain
- usage vétérinaire (élevage, pisciculture)

Conséquence de la dissémination des produits pharmaceutiques

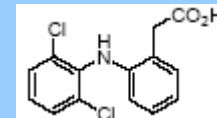
Ex.1:

Taux de mortalité anormalement élevé de vautours en Inde et au Pakistan en 2004.

(K. Fent *et al.*, Aquatic Toxicology, 2005)

Détection de teneurs élevées de diclofénac (analgésique) au niveau des reins de ces animaux.

(Oaks *et al.*, Nature, 2004, 630-633)



Ex.2:

Féminisation des poissons (composés oestrogéniques).

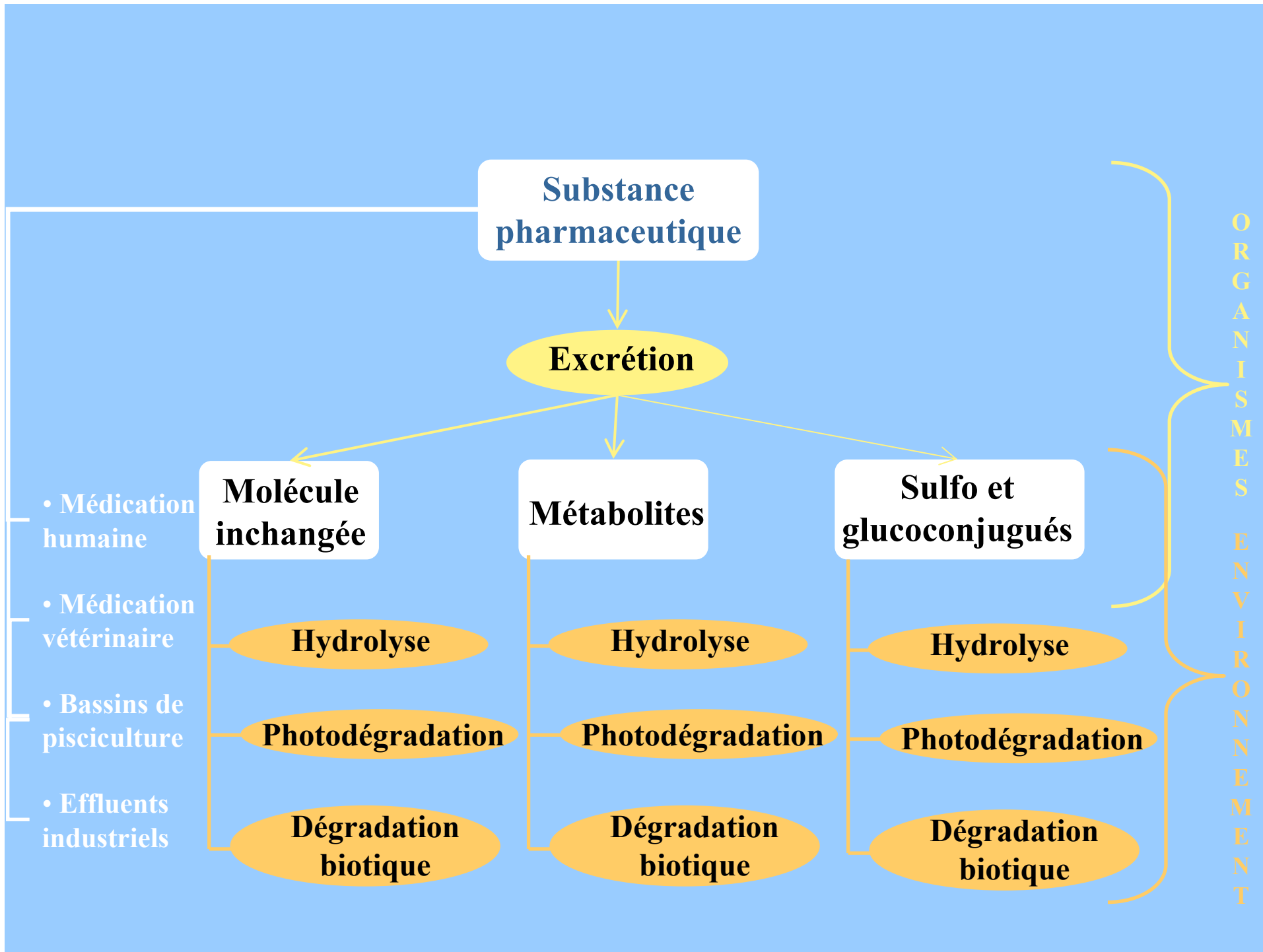
Substances pharmaceutiques dans l'environnement

⇒ **Danger**

car **composés développés pour avoir un effet biologique.**

Quels produits rechercher dans l'environnement ?

- **Connaître les quantités vendues**
- **Tenir compte de la toxicité**
 - **LC₅₀ (50% de décès pour une durée donnée)**
 - **EC₅₀ (50% de population manifestant un effet)**
- **Devenir des produits, en particulier lorsqu'ils sont soumis au traitement des Stations d'Épuration (STEP)**
 - **biodégradation**
 - **hydrolyse**
 - **photodégradation**
 - **connaissance des temps de ½ vie**
 - **identification des métabolites :**
 - **analyse molécules mères (ex. clofibrate)**
 - **analyse de produit dégradé (ex. acide clofibrique)**
 - **analyse des métabolites (glucuronides conjugués)**



Estimation du risque environnemental d'un produit (Environmental Risk Assesment, ERA)

Agence Européenne de l'Evaluation des Médicaments

Predicted Environmental Concentration (PEC)

- objectif : estimer la concentration prévisible d'un produit en milieu aqueux (rivière)
- connaître :
 - les quantités consommées,
 - les populations,
 - le taux de dégradation
 - le taux de dilution des eaux usées

Predicted No-Effect Concentration (PNEC)

- tests d'écotoxicologie (EC₅₀, LC₅₀)

Si $PEC / PNEC < 1$: pas de problème

Les différents types de matrices aqueuses

- **Eaux usées (entrée de STEP)**
- **Eaux épurées (sortie de STEP)**
- **Eaux de rivières (dilution sortie de STEP + produits vétérinaires)**
- **Eaux souterraines**
- **Eaux potables**

⇒ **Problématiques différentes ⇒ LOD différentes**

T.A. Ternes *et al.*, Fresenius J. Anal. Chem., 1998, 329-340

Ex. : (ng/L)	Eau potable	Eau usée
Propranolol	5	25
Clofibrate	20	100

Historique

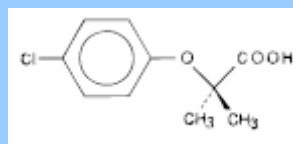
Premières recherches de produits pharmaceutiques

USA : effluents de STEP

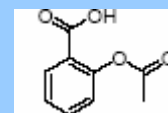
A.W. Garrison *et al.*, Ann Arbor Science, 1976;

C. Hignite, D.L. Azarnoff, Life Science, 1977, 337-342

Acide clofibrigue (hypolipémiant : clofibrate, étofibrate,...)



Acide salicylique (analgésique : acide acétylsalicylique)



Procédure : => résines échangeuses d'ions
=> extraction liquide-liquide (CH_2Cl_2)
=> dérivation (méthylation diazométhane)
=> GC/MS

Résultats : Acide clofibrigue : 2 – 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Acide salicylique : 2 – 96 $\mu\text{g.L}^{-1}$

Acide clofibrique

Grande Bretagne, eau de rivière

A. Waggott, Ann. Arbor. Sci., 1981, M1

10 ng.L⁻¹

Allemagne, eau de rivière

Heberer *et al.*, Vom. Wasser, 1996, 19-31

270 ng.L⁻¹

T.A. Ternes, Wat. Res., 1998, 3245-3260

550 ng.L⁻¹

Suisse, eau de lac

Buser *et al.*, 1998

9 ng.L⁻¹

Des milliers de molécules sont utilisées.

De nouvelles molécules apparaissent chaque année.

Quelles sont les familles de molécules recherchées ?

Antibiotiques (usage vétérinaire ou humain) :

Triméthoprim, Erytromycine, Lincomycine, Sulfaméthaxazole...

Analgésiques et anti-inflammatoires :

Ibuprofène, Acide acétylsalicylique, Diclofénac, Fénoprofène, Naxoprofène, ...

Antiépileptiques :

Diazépam, Carbamazépine, ...

Régulateurs hypolipémiantes

Acide clofibrigue, Gémofibrozil, Fénofibrate, Bezafibrate,...

Béta-bloquants :

Métoprolol, propranolol, timolol, acébutolol, oxprénolol...

Stéroïdes :

Estradiol, estrone, estriol, ...

M.J. Lopez de Alda et al., J. Chromatogr. A, 2003, 503-526

J. Garric, B. Ferrari, Rev. Sci. Eau, 2005, 307-330

Procédure analytique

- Préparation de l'échantillon

Purification et pré-concentration
Solid Phase Extraction (SPE)

- Analyse par LC plutôt que par GC

(souvent, pas de dérivation nécessaire en LC)

- Couplage avec la Spectrométrie de Masse (MS), bien souvent MS-MS

Préparation de l'échantillon

- **Filtration sur fibres de verre (0,1 – 0,45 μm)**
- **Fixation du pH en fonction :**
 - **du caractère acido-basique des molécules ciblées**
 - **de la nature de la phase SPE utilisée**
- **Ajout d'un agent complexant fort (edta) pour les molécules complexantes**
 - ex. : tétracyclines qui nécessitent en plus l'utilisation de matériels sans groupe silanol .**

Choix de la cartouche SPE

**Recherche de la meilleure sorption :
extraire sélectivement la famille de composés ciblés**

**Résultats publiés parfois contradictoires
(M. Petrovic et al., J. Chromatogr. A, 2005, 1-14)**

Ex. : analyse des anti-inflammatoires acides

Silice C18 (W. Ahner et al., J. Chromatogr., 2001, 69)

**Oasis HLB (Hypophilic Lipophilic Balanced)
(S. Marchese et al., Chromatographia, 2003, 263)**

Pour les **composés ayant une fonction carboxylique** ($4 < pK_a < 5$) :

passer en milieu acide (pH 2-3)

⇒ 100% du composé sous la forme acide non chargée

⇒ favorisant la sorption par interactions lipophiliques

Pour les **composés ayant un caractère basique** (fonction amine)

⇒ passage en milieu acide

⇒ forme protonée cationique de la fonction amine

⇒ rétention par une cartouche type Oasis MCX

(rétention mixte : phase cationique, phase inverse)

ou

⇒ passage en milieu basique

⇒ fonction amine non chargée

⇒ rétention par une cartouche type silice greffée C18.

Mise en œuvre de la SPE

- **Ecoulement des fluides sur la cartouche :**
 - par aspiration
 - par pressurisation (bonne répétabilité, automatisation aisée)
- **Conditionnement de la cartouche**
- **Chargement de l'échantillon**
Généralement 1 L => final 1 mL
- **Elution ex. : MeOH**
- **Evaporation sous N₂**
- **Reprise par un petit volume d'eau (ex. 100 µL)**
- **Echantillon prêt pour passage en LC (conservation à 4°C)**

LC

**Théoriquement,
la MS en détection n'exige pas une excellente séparation**

**Pratiquement,
la pureté du pic chromatographique assure
un rendement d'ionisation stable dans la source
(réduction de l'effet de matrice)**

Colonne : C18

Phase mobile :

- Eau acidifiée (Acide formique 10 mM) / MeOH**
- Eau neutre (Acétate d'ammonium 10 mM) / ACN**
- Eau acidifiée (Acide formique 10 mM) / ACN**
- Eau neutre (Acétate d'ammonium 10 mM) / MeOH**

Détection MS

- Procédé d'ionisation

- Electrospray (ESI) bien adapté aux composés polaires**
- Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), pour les composés peu polaires**

- Mode de détection des ions

- LC-MS ne permet que le mode SIM (Selected Ion Monitoring)**
- LC-MS-MS offre le mode SRM (Selected Reaction Monitoring)**

Le mode SIM travaille avec l'ion précurseur

- ions négatifs : ex. : fonction carboxylique déprotonée**
- ions positifs : ex. : fonction amine protonée**

Le mode SRM, après sélection de l'ion précurseur, travaille sur les ions formés au niveau du deuxième quadripôle.

- ions négatifs : ex. : perte d'un CO_2**
- ions positifs : ex. : perte H_2O
perte NH_3**

SRM améliore la sélectivité

Néanmoins, tous les problèmes ne sont pas réglés pour des matrices très complexes telles que les eaux usées

=> effets négatifs dus à la diminution du rendement d'ionisation

=> effets positifs, plus rares

Effets de matrice

Au niveau de la SPE

Cas idéal :

rendement d'extraction élevé insensible aux effets de matrice

Cas réel :

rendement d'extraction souvent inférieur à 100%

Il faut trouver des conditions pour lesquelles ce rendement est stable, quelle que soit la matrice.

Etalon interne permettant de s'affranchir de la variabilité du rendement d'extraction.

- composé représentatif de la famille de composés analysés**
- problème de l'effet de matrice au niveau de la mesure (ionisation en MS)**

Effet de matrice au niveau de la mesure

Introduction d'un étalon interne dans l'échantillon issu de la SPE

- **Composé représentatif de la famille**
- **Composé marqué ^2H ou ^{13}C**

Cas idéal (coût?) molécule analysée marquée d4

Décalage en masse suffisant pour éviter les interférences d'autant plus nécessaire que la concentration analysée est forte par rapport à la concentration de l'étalon interne.

Les deux structures (marquées et non marquées) subissent les mêmes effets de matrice (idéal).

- **Introduction possible avant la SPE**
- **Utilisation d'un même composé marqué pour plusieurs analytes**
Ce n'est pas parfait car les effets de matrice dépendent du temps de rétention!

=> plusieurs étalons internes!

**Autre option pour minimiser les effets de matrices :
la laborieuse méthode des ajouts d'un standard**

Au niveau de la mesure (LC-MS-MS)

- **Nécessité de partager l'extrait en plusieurs fractions**
 - **une fraction ne recevant pas d'ajout**
 - **des fractions recevant des teneurs croissantes d'ajouts connus**
- **Nécessité d'avoir une bonne idée de la concentration recherchée (analyse préliminaire?)**

An niveau global (SPE + LC-MS-MS)

- **Nécessité de pratiquer un grand nombre d'extractions (coût très élevé en temps et en matériel!)**

Résultats

Antibiotiques

Triméthoprim

Sortie STEP (USA, Las Vegas) 25 ng/L

B.J. Vanderford, Anal. Chem., 2003, 6265-6274

Estuaire (Angleterre) max 569 ng/L

K.V. Thomas, M.J. Hilton, Marine Pollution Bulletin, 2004, 436-444

Sortie STEP (Angleterre) moy 128 ng/L

D. Ashton *et al.*, Sci. Total Environ., 2004, 167-184

Entrée STEP (Suède) 80 ng/L

Sortie STEP (Suède) 40 ng/L

D. Bendz *et al.*, Journal of Hazardous Materials, 2005, 195

Erythromycine

Sortie STEP (USA, Las Vegas)

98 ng/L

B.J. Vanderford, Anal. Chem., 2003, 6265-6274

Rivière (Italie, Po)

max 1-16 ng/L

D. Calamari *et al.*, Environ. Sci. Technol, 2003, 1241

Sortie STEP (Angleterre)

moy 109 ng/L

D. Ashton *et al.*, Sci. Total Environ., 2004, 167-184

Sortie STEP (Italie)

9-353 ng/L

S. Castiglioni *et al.*, J. Chromatogr. A, 2005, 206

Entrée STEP (Italie)

max 1 ng/L

Sortie STEP (Italie)

max 161 ng/L

S. Castiglioni *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2006, 357

Sulfaméthoxazole

Sortie STEP (Allemagne, Berlin)

T. Heberer, J. Hydrology, 2002, 175-189

900 ng/L

Sortie STEP (USA, Las Vegas)

B.J. Vanderford, Anal. Chem., 2003, 6265-6274

20 ng/L

Sortie STEP (Angleterre)

D. Ashton *et al.*, Sci. Total Environ., 2004, 167-184

max 152 ng/L

Entrée STEP (Suède)

Sortie STEP (Suède)

D. Bendz *et al.*, J. of Hazardous Materials, 2005, 195

20 ng/L

70 ng/L

Entrée STEP (Italie)

Sortie STEP (Italie)

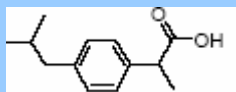
S. Castiglioni *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2006, 357

max 209 ng/L

max 304 ng/L

Analgésiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens

Ibuprofène



Sortie STEP (Allemagne)

max 3400 ng/L

Rivière (Allemagne)

max 530 ng/L

T.A. Ternes, *Wat. Res.*, 1998, 3245-3260

Entrée STEP (Suède)

3 ng/L

H.R. Buser *et al.*, *Environ. Sci. Sci. Technol.*, 1999, 2529-2535

Sortie STEP (Allemagne, Berlin)

100 ng/L

T. Heberer, *J. Hydrology*, 2002, 175-189

Sortie STEP (Suisse, Lac de Genève)

10-300 ng/L

B. Soulet, A. Tauxe, J. Tarradellas, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2002, 659-667

Rivière (Italie, Po)

max 1-16 ng/L

D. Calamari *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, 1241

Ibuprofène (suite)

Sortie STEP (USA, Las Vegas)

5 ng/L

B.J. Vanderford, Anal. Chem., 2003, 6265-6274

Rivière (Italie, Po)

max 79 ng/L

D. Calamari *et al.*, Environ. Sci. Technol, 2003, 1241

Sortie STEP (France, Seine)

5-180 ng/L

Rivière (France, Seine)

2-400 ng/L

H. Budzinski *et al.*, Spectra Analyse, 2004, 1

Sortie STEP (Angleterre)

moy 4201 ng/L

D. Ashton *et al.*, Sci. Total Environ., 2004, 167-184

Estuaire (Angleterre)

max 928 ng/L

K.V. Thomas, M.J. Hilton, Marine Pollution Bulletin, 2004, 436-444

Ibuprofène (suite)

Entrée STEP (Suède) 3600 ng/L

Sortie STEP (Suède) 150 ng/L

D. Bendz *et al.*, Journal of Hazardous Materials, 2005, 195-204

Sortie STEP (Italie) 9-353 ng/L

S. Castiglioni *et al.*, J. Chromatogr. A, 2005, 206

Entrée STEP (Italie) max 324 ng/L

Sortie STEP (Italie) max 162 ng/L

S. Castiglioni *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2006, 357

Naproxène

Sortie STEP (Allemagne) max 520 ng/L

Rivière (Allemagne) max 390 ng/L

T.A. Ternes, Wat. Res., 1998, 3245-3260

Entrée STEP (Allemagne, Berlin) 440 ng/L

Sortie STEP (Allemagne, Berlin) 80 ng/L

T. Heberer, J. Hydrology, 2002, 175-189

Entrée STEP (Suède) 3700 ng/L

Sortie STEP (Suède) 250 ng/L

D. Bendz *et al.*, Journal of Hazardous Materials, 2005, 195

Psycholeptiques

Carbamazépine

Sortie STEP (Allemagne) max 6300 ng/L
Rivière (Allemagne) max 1100 ng/L
T.A. Ternes, *Wat. Res.*, 1998, 3245-3260

Entrée STEP (Allemagne, Berlin) 1780 ng/L
Sortie STEP (Allemagne, Berlin) 1630 ng/L
T. Heberer, *J. Hydrology*, 2002, 175-189

Sortie STEP (USA, Las Vegas) 92 ng/L
B.J. Vanderford, *Anal. Chem.*, 2003, 6265-6274

Effluent STEP (France, Seine) 300-2500 ng/L
Rivière (France, Seine) 6-100 ng/L
H. Budzinski *et al.*, *Spectra Analyse*, 2004, 1

Carbamazépine (suite)

Entrée STEP (Suède) 1680 ng/L

Sortie STEP (Suède) 1180 ng/L

D. Bendz *et al.*, Journal of Hazardous Materials, 2005, 195

Sortie STEP (Italie) max 1318 ng/L

S. Castiglioni *et al.*, J. Chromatogr. A, 2005, 206

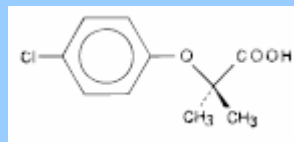
Entrée STEP (Italie) max 386 ng/L

Sortie STEP (Italie) max 422 ng/L

S. Castiglioni *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2006, 357

Régulateurs hypolipémiants

Acide clofibrrique



Sortie STEP (Allemagne)

max 1600 ng/L

Rivière (Allemagne)

max 550 ng/L

T.A. Ternes, Wat. Res., 1998, 3245-3260

Entrée STEP (Allemagne, Berlin)

460 ng/L

Sortie STEP (Allemagne, Berlin)

480 ng/L

T. Heberer, J. Hydrology, 2002, 175-189

Rivière (Italie, Po)

max 6 ng/L

D. Calamari *et al.*, Environ. Sci. Technol, 2003, 1241

Estuaire (Angleterre)

max 111 ng/L

K.V. Thomas, M.J. Hilton, Marine Pollution Bulletin, 2004, 436-444

Acide clofibrrique (suite)

Sortie STEP (Italie)

S. Castiglioni *et al.*, J. Chromatogr. A, 2005, 206

max 111 ng/L

Entrée STEP (Italie)

Sortie STEP (Italie)

S. Castiglioni *et al.*, Environ. Sci. Technol., 2006, 357

max 25 ng/L

max 18 ng/L

Béta-bloquants

Propranolol

Sortie STEP	(Allemagne)	max 290 ng/L
Rivière	(Allemagne)	max 590 ng/L
T.A. Ternes, Wat. Res., 1998, 3245-3260		
Sortie STEP	(Angleterre)	moy 93 ng/L
D. Ashton <i>et al.</i>, Sci. Total Environ., 2004, 167-184		
Estuaire	(Angleterre)	max 56 ng/L
K.V. Thomas, M.J. Hilton, Marine Pollution Bulletin, 2004, 436-444		
Influent STEP	(Suède)	50 ng/L
Effluent STEP	(Suède)	30 ng/L
D. Bendz <i>et al.</i>, Journal of Hazardous Materials, 2005, 195		

Aténolol

Entrée STEP (Italie) 134-1029 ng/L

Sortie STEP (Italie) 155-966 ng/L

S. Castiglioni et al., Environ. Sci. Technol., 2006, 357

Sortie STEP (Italie) 27-1168 ng/L

S. Castiglioni et al., J. Chromatogr. A, 2005, 206

Rivière (Italie, Po) 3-241 ng/L

D. Calamari et al., Environ. Sci. Technol., 2003, 1241

Stéroïdes

17 α -éthynylestradiol

Sortie STEP (Pays-Bas)
A.C. Belfroid *et al.* Sci. Total Environ., 1999, 101

max 7,5 ng/L

Quelques articles de synthèses

C.G. Daughton et al., Environ. Health Perspect., 1999, 907-938

**Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment
Formules, utilisation, détection dans l'environnement...**

T. Heberer, Toxicology Letters, 2002, 5-17

**Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in
the aquatic environment**

M.J. Lopez de Alda et al., J. Chromatogr. A, 2003, 503-506

**Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected
emerging pollutants in the aquatic environment**

J. Garric et B. Ferrari, Rev. Sci. Eau, 2005, 307-330

Les substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques

M. Petrovic et al., J. Chromatogr. A, 2005, 1-14

**Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of
pharmaceutical residues in environmental samples : a review**

K. Fent et al., Aquatic Toxicology, 2005

Ecotoxicology of human pharmaceuticals

**Volumes consommés dans certains pays : Allemagne, Autriche,
Danemark, Australie, Angleterre, Italie, Suisse**

Comparaisons des concentrations en entrée et en sortie de STEP

Commentaires par familles de composés

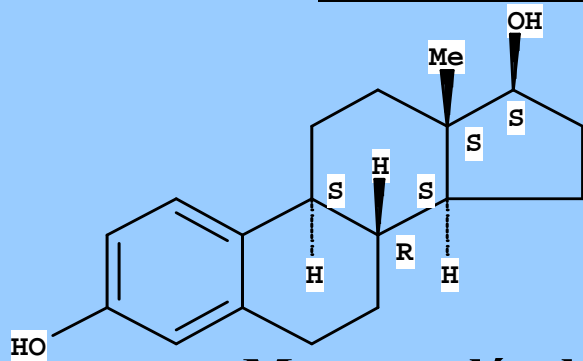
Toxicité

M.D. Hernando et al., Talanta, 2006, 334-342

**Environmental risk assessment of pharmaceuticals residues in
wastewater effluents, surface waters and sediments**

Analyse d'estrogènes

Estradiol

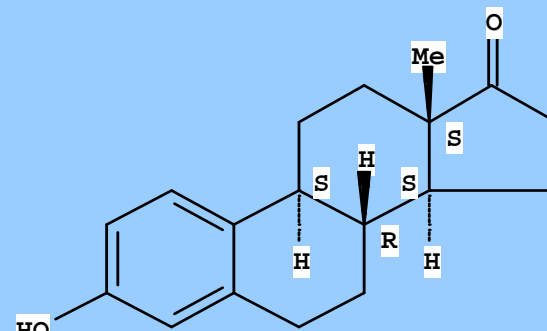


$pK_a = 10,2$

$\log P = 4,1$

Masse moléculaire : 272

Estrone

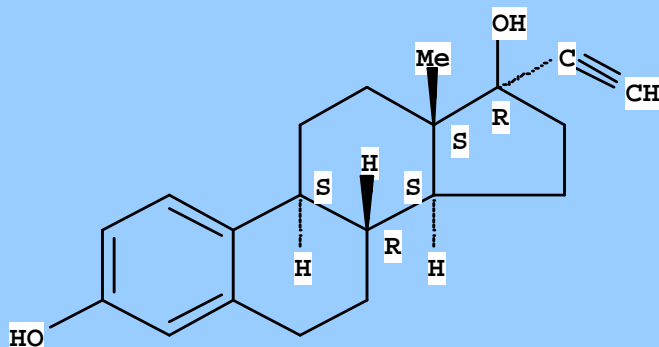


$pK_a = 10,2$

$\log P = 3,7$

Masse moléculaire : 270

Ethinylestradiol

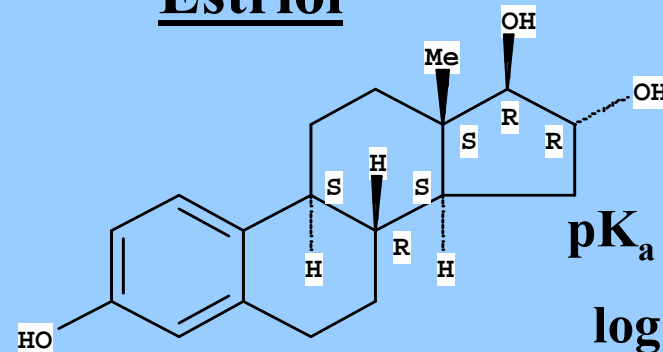


$pK_a = 10,2$

$\log P = 4,5$

Masse moléculaire : 288

Estriol



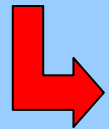
$pK_a = 10,2$

$\log P = 2,9$

Masse moléculaire : 296

Objectifs

- Volume de prise d'essai important (entre 200 mL et 5 L)



Diminution de la prise d'essai à 1 mL

- LOD faibles obtenues avec des appareils de dernière génération (API 4000) :

Coût de l'appareil : API 2000 : 160 k€

API 4000 : 360 k€

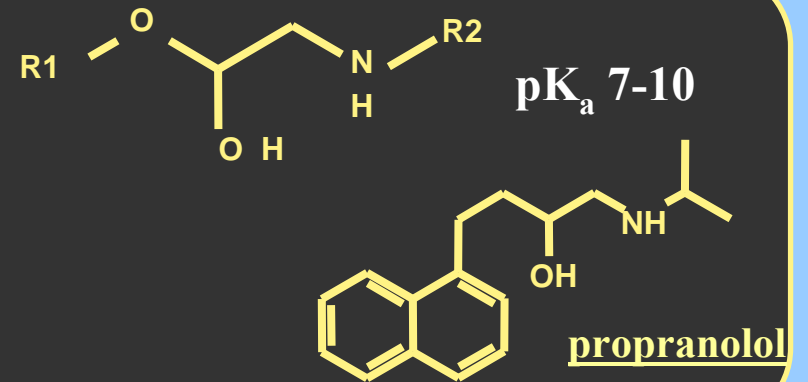
API 5000 : 450 k€



Automatisation de la méthode

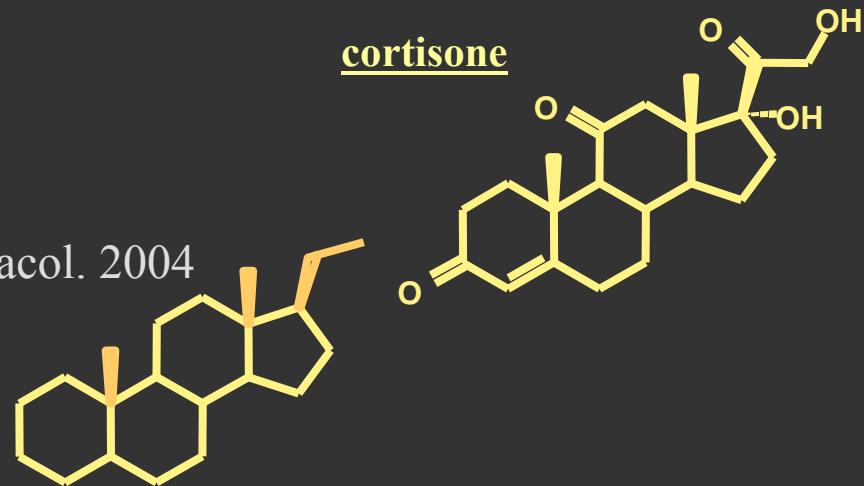
Dérivation des estrogènes

β -boquants



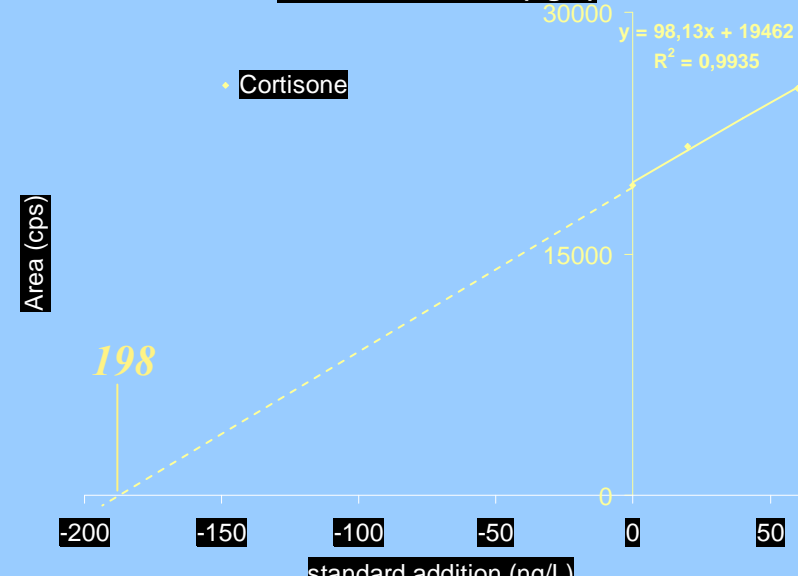
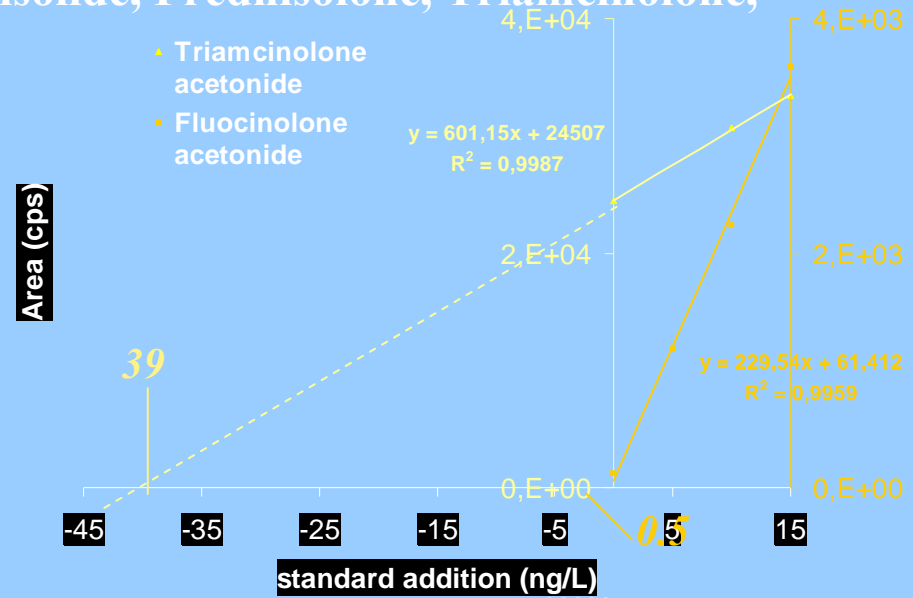
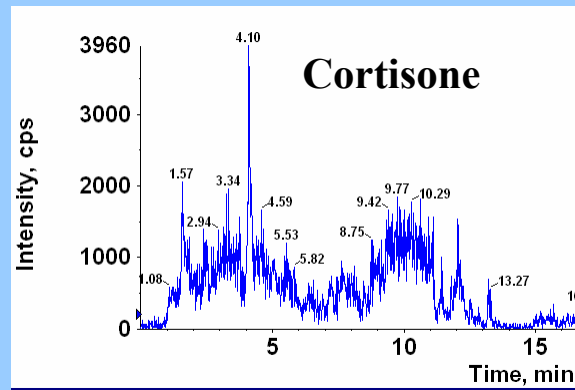
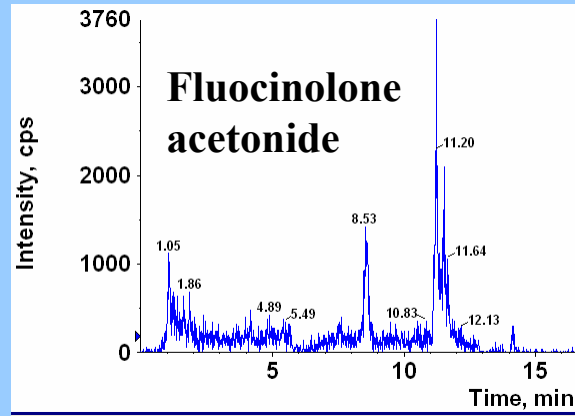
Corticosteroides

Sanderson *et al.*, Regulat. Tox. Pharmacol. 2004



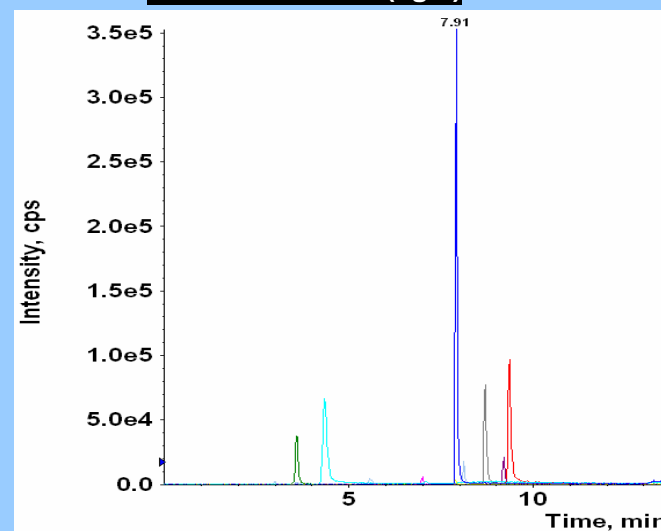
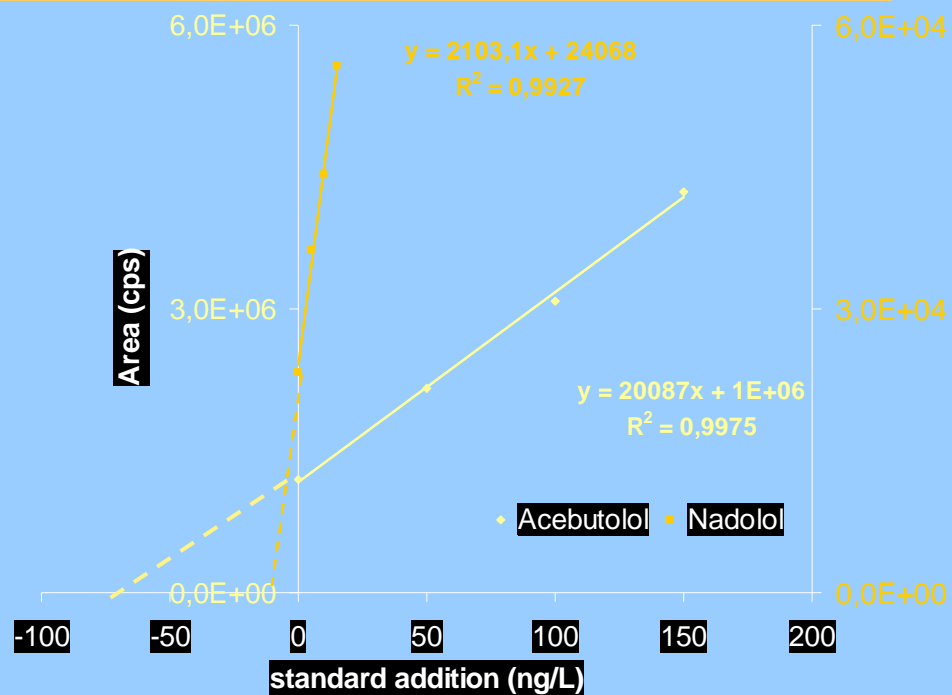
Corticostéroïdes

Cortisone, Flucinolone acetonide, Flunisolide, Prednisolone, Triamcinolone, Triamcinolone acetonide détectés à PB



β -bloquants

Environmental concentrations (ng/L)	
Acebutolol	70
Bisoprolol	73
Metoprolol	110
Nadolol	10
Pindolol	2
Propranolol	92
Sotalol	320
Timolol	32



Perspectives

Suivre l'évolution des consommations de substances médicamenteuses pour préparer les méthodologies analytiques utiles à l'analyse environnementale.

Réduire le volume d'échantillon analysé (1L => 1 mL)

- grâce à l'amélioration de l'instrumentation (LOD plus basses)
- grâce à la pratique de la SPE en ligne (maîtrise de l'effet mémoire!)

Améliorer la spécificité des signaux analysés LC-MS-TOF

L'analyse par temps de vol (TOF) permet d'avoir une masse exacte caractéristique d'une formule brute.

Remerciements

Centre de Compétences en Chimie et Toxicologie Analytiques

Christian Staub

Jean-Luc Veuthey

Collaborateurs travaillant sur ce sujet

Bernard Herbreteau

Arnaud Salvador

Pedro Marote

Anne Piram

Partenaires

Région Rhône-Alpes

Service Central d'Analyse du CNRS,

Marie-Florence Grenier-Loustalot

Cemagref Lyon

Jeanne Garric, Cécile Miege, Marina Cauquery