

Université de Montréal

**Analyse des agents de chimiothérapie
par extraction sur phase solide automatisée couplée à
la chromatographie liquide et la spectrométrie de
masse en tandem (SPE-LC-ESI-MS/MS)**

Par

Farida Rabii

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès sciences (M. Sc.)
en chimie

Décembre 2012

© Farida Rabii, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Analyse des agents de chimiothérapie
par extraction sur phase solide automatisée couplée à
la chromatographie liquide et la spectrométrie de
masse en tandem (SPE-LC-ESI-MS/MS)**

Présenté par :
Farida Rabii

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Pierre Chaurand, président-rapporteur
Dr. Sébastien Sauvé, directeur de recherche
Dr. Pierre Thibault, membre du jury

Résumé

Les dernières décennies ont été marquées par une augmentation du nombre des cas de cancers, ce qui a subséquemment conduit à une augmentation dans la consommation des agents de chimiothérapie. La toxicité et le caractère cancérigène de ces molécules justifient l'intérêt crucial porté à leur égard. Quelques études ont fait l'objet de détection et de quantification des agents de chimiothérapie dans des matrices environnementales.

Dans ce projet, une méthode utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) précédée d'une extraction sur phase solide (SPE) automatisée ou en ligne a été développée pour la détection et la quantification d'un groupe de six agents de chimiothérapie. Parmi ceux-ci figurent les plus utilisés au Québec (gemcitabine, méthotrexate, cyclophosphamide, ifosfamide, irinotécan, épirubicine) et présentant des propriétés physico-chimiques et des structures chimiques différentes. La méthode développée a été validée dans une matrice réelle représentant l'affluent d'une station d'épuration dans la région de Montréal. Deux des six composés cytotoxiques étudiés en l'occurrence (cyclophosphamide et méthotrexate) ont été détectés dans huit échantillons sur les neuf qui ont été recensés, essentiellement au niveau de l'affluent et l'effluent de quelques stations d'épuration de la région de Montréal. Les résultats des analyses effectuées sur les échantillons réels ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans la concentration entre l'affluent et l'effluent, et donc que les systèmes d'épuration semblent inefficaces pour la dégradation de ces molécules.

Mots-clés: Agents de chimiothérapie, contaminants émergents, eaux usées, LC-MS/MS, SPE en ligne.

Abstract

The last few decades have been marked by an increase in the number of cancer cases, which subsequently led to an increase in the consumption of chemotherapeutic agents. The toxicity and the carcinogenicity of these molecules justify the increased interest. Few studies have been conducted to detect and quantify chemotherapeutic agents in environmental matrices.

In this project, a method using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) preceded by an online solid-phase extraction (SPE) has been developed for the detection and quantification of a group of six chemotherapeutic agents, which are among the most commonly used in Quebec (gemcitabine, methotrexate, cyclophosphamide, ifosfamide, irinotecan, epirubicin) and having different physico-chemical properties and different chemical structures. The developed method was validated in a real water matrix representing the influent of a sewage treatment plant in the Montreal area. Two of the six studied cytotoxic agents (cyclophosphamide and methotrexate) were detected in eight samples of the nine taken mainly at the influent and effluent of some treatment plants in the Montreal area. The results of the analysis of real samples showed that there was no significant difference in concentration between the influent and effluent. This also demonstrates the inadequacy of the current wastewater treatment approaches to remove those compounds.

Keywords: Chemotherapeutic agents, emergent contaminants, wastewater, LC-MS/MS, online SPE.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Tables des matières	vii
Liste des tableaux	x
Liste des figures.....	xi
Liste des sigles et abréviations	xii
Dédicace	xvi
Remerciements	xvii
Chapitre 1. Introduction	1
1.1. Agents de chimiothérapie (cytotoxiques).....	1
1.1.1. Problématique.....	1
1.1.2. Molécules pharmaceutiques, métabolites et produits de transformation	2
1.1.3. Source, devenir, effet et risque pour l’homme et l’environnement.....	3
1.1.4. Les antinéoplasiques (cytotoxiques)	4
1.1.4.1. Les classes d’antineoplasiques étudiés.....	5
1.1.4.2. Les critères de choix des antinéoplasiques.....	6
1.1.5. Aperçu sur les agents antinéoplasiques choisis dans l’étude	9
1.1.5.1. Les agents alkylants.....	9
1.1.5.2. Les anti-métabolites	10
1.1.5.3. Les agents intercalants.....	11
1.1.5.4. Les inhibiteurs enzymatiques	12
1.1.6. Études analytiques précédentes	12
1.1.6.1. Les agents alkylants.....	12
1.1.6.2. Les anti-métabolites	13
1.1.6.3. Les agents intercalants.....	15
1.1.6.4. Les inhibiteurs enzymatiques	16
1.1.7. Les objectifs du projet	16
1.2. Principe de l’extraction sur phase solide (SPE)	19
1.2.1. Historique	19

1.2.2. Développement de la SPE.....	19
1.2.3. Concept de la SPE.....	21
1.2.3.1. Les objectifs.....	21
1.2.3.1.1. La concentration.....	21
1.2.3.1.2. La purification.....	21
1.2.3.1.3. L'échange de solvants.....	21
1.2.3.2. Le processus de la SPE.....	22
1.2.3.3. Facteur de pré-concentration.....	26
1.2.4. SPE « <i>Off-line</i> » versus « <i>Online</i> ».....	27
1.3. Principes de la LC-MS/MS.....	33
1.3.1. Aperçu général.....	33
1.3.2. Principes de fonctionnement de la LC-MS/MS.....	33
1.3.3. Système LC-MS/MS utilisé dans le projet.....	34
1.3.3.1. Le système chromatographique en phase liquide.....	34
1.3.3.2. Le système MS/MS.....	37
Chapitre 2. Nouvelle méthode pour la détection des agents de chimiothérapie dans les eaux usées utilisant la SPE en ligne couplée à la spectrométrie de masse en tandem.....	41
Abstract.....	42
2.1. Introduction.....	43
2.2. Materials and methods.....	47
2.2.1. Materials and chemicals.....	47
2.2.2. Instrumentation.....	47
2.2.3. Samples collection and preparation.....	48
2.2.4. On-line SPE and LC parameters.....	48
2.2.5. Mass spectrometry parameters.....	49
2.2.6. Method validation.....	50
2.2.7. Breakthrough volume estimation.....	51
2.3. Results and discussion.....	52
2.3.1. LC optimization.....	52
2.3.2. Online SPE optimization.....	55

2.3.2.1. Breakthrough volume estimation	55
2.3.2.2. Load flow rate	56
2.3.3. Method validation.....	57
2.3.4. Analysis of wastewater influent and effluent.....	59
2.4. Conclusion.....	62
Acknowledgements	63
Supplementary material.....	64
Chapitre 3. Conclusion.....	67
Bibliographie.....	71

Liste des tableaux

Tableau 1.1.1 Structures et propriétés physico-chimiques des composés cibles.

Tableau 1.1.2 Quantité utilisée des composés cibles en % massique et consommation en Kg / M habitants.

Tableau 2.1 Physico-chemical properties and molecular structures of cytotoxic agents.

Tableau 2.2 Estimated breakthrough volumes for the two SPE columns tested.

Tableau 2.3 Analytical performances of the SPE-LC-ESI-MS/MS method.

Tableau 2.4 Cytotoxic agent concentrations measured in different influents and effluents.

Tableau S1 Load and analytical pumps program.

Tableau S2 LC-MS/MS acquisition parameters for the six cytotoxic agents and the internal standard (IS).

Liste des figures

- Figure 1.2.1 Les étapes de la SPE manuelle
- Figure 1.3.1 Montage de la SPE en ligne couplée à la LC-MS/MS
- Figure 1.3.2 Source électro-nébulisation-ESI
- Figure 1.3.3 Triple quadripôle (TSQ-Quantum)
- Figure 1.3.4 Exemple de scan d'ions fragments (IF)
- Figure 2.1 LC-MS/MS chromatogram in SRM mode of the selected compounds spiked at 75 ng L^{-1} in influent wastewater.
- Figure 2.2 Experimental determination of the effect of variation of the flow rate on analysis response area achieved with 0.5 ng of the cytotoxic agents ($n=3$) in $\text{d-H}_2\text{O}$.
- Figure 2.3 LC-MS/MS chromatogram in SRM mode of the detected compounds (not spiked) in a real effluent wastewater (WWTP-A).
- Figure S1 Example of curves for determination of breakthrough volumes with the PFP column.

Liste des sigles et abréviations

%RSD	Écart type relatif (<i>Relative standard deviation</i>)
%Massique	Pourcentage massique
0.1% F.A	0.1% Acide formique (<i>0.1% Formic acid</i>)
[A] _f	Concentration finale
[A] _i	Concentration initiale
ACN	Acétonitrile (<i>acetonitrile</i>)
APIs	Ingrédients pharmaceutiques actifs (<i>active pharmaceutical ingredients</i>)
ATZ	Atrazine
C ₁₈	Alcane linéaire à dix-huit carbones
CBP	Carboplatine
CP	Cyclophosphamide
CPT-11	Irinotécan
d-H ₂ O	Eau deionisée (<i>Deionized water</i>)
EPI	Épirubicine
ESI	Électro-nébulisation (<i>Electrospray</i>)
F.A	Acide formique (<i>Formic acid</i>)
FP	Facteur de pré-concentration
5-FU	5-Fluorouracil
GCA	Gemcitabine

GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (<i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
IARC	Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
IF	Ifosfamide
IS	Standard interne (<i>Internal standard</i>)
K _D	Coefficient de partage
Kg/ M habts	Kg par million d'habitants
LC	Chromatographie liquide (<i>Liquid chromatography</i>)
LC-ESI-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem en ionisation par électro-nébulisation (<i>Liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry</i>)
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (<i>Liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (<i>Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>)
L-L	Liquide-Liquide
LOD	Limite de détection (<i>Limit of detection</i>)
LogK _{o-w}	Logarithme de la constante de partition octanol-eau
LOQ	Limite de quantification (<i>Limit of quantification</i>)
LLOQ	Borne inférieure de la limite de quantification (<i>Lower limit of quantification</i>)

MDL	Limite de détection de la méthode (<i>Method detection limit</i>)
MeOH	Méthanol
M.E	Effet de matrices (<i>Matrix effects</i>)
MM/g.mol ⁻¹	Masse molaire en gramme par mole
mg L ⁻¹	Milligramme par litre (ppm)
mg mL ⁻¹	Milligramme par millilitre
µg L ⁻¹	Microgramme par litre (ppb)
µg dm ⁻²	Microgramme par décimètre carré
MTX	Méthotrxate
ng L ⁻¹	Nanogramme par litre (ppt)
pKa	Logarithme négatif de la constante d'acidité
PFP	pentafluoro-phényle (<i>pentafluoro-phenyl</i>)
R	Recouvrement (<i>Recovery</i>)
SPE	Extraction sur phase solide (<i>Solid phase extraction</i>)
SRM	Balayage d'ions fragments sélectionnés (<i>Selected reaction monitoring</i>)
Strata-X	divinylbenzène (<i>styrene divinylbenzene copolymer</i>)
UPLC-ESI-MS/MS	Chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec ionisation par électro-nébulisation (<i>Ultra performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry</i>)
UV	Ultra violet

V'_b	Volume de fuite (<i>breakthrough volume</i>)
V_i	Volume initial
V_f	Volume final
V_m	Volume mort (<i>Void volume</i>)
WWTP	Station d'épuration des eaux usées (<i>Wastewater treatment plant</i>)

*À ma grande sœur Fadila, pour son
grand combat quotidien contre le
cancer.*

Remerciements

Je tiens à remercier vivement le professeur Sébastien Sauvé qui m'a donné l'opportunité de reprendre mes études et de faire ma maîtrise au sein de son équipe dynamique. Je le remercie également pour son accompagnement, sa disponibilité, ses conseils et toutes les facilités accordées, tout au long de mon cheminement et qui m'ont aidé à réaliser ce travail et avoir mon diplôme d'études graduées. Un grand merci au professeur en retraite en l'occurrence M. Marius d'Amboise de l'université de Montréal pour son exceptionnel cours avancé de chromatographie que j'ai beaucoup apprécié et également pour ses conseils et son aide. Un grand merci à mon professeur de chimie analytique M. Rami Abdel Haq de l'université l'UQÀM pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son aide. Un grand merci à mes deux amis, collègues et co-auteurs, en l'occurrence M. Pedro Segura de l'université McGill et M. Paul Fayad du laboratoire Sébastien Sauvé, université de Montréal, pour les grandes discussions scientifiques, leur aide et disponibilité. Merci aussi à tous mes collègues de laboratoire pour les agréables moments passés ensemble, un merci spécial à Khadija Aboulfadl et Sung Vo Duy.

Un merci particulier à mes parents pour leur amour et leur soutien, à toute ma famille en Algérie et en France et plus particulièrement à mon grand frère Khaled pour son soutien, son aide et ses encouragements et aussi un grand merci à ma grande s ur Fadila pour sa présence malgré l'éloignement. Je remercie tous mes nouveaux amis connus au Québec et au Canada pour leurs encouragements et leurs présences réconfortantes dans les moments les plus difficiles.

Chapitre 1. Introduction

1.1. Les agents de chimiothérapie (cytotoxiques)

1.1.1. Problématique

Les produits pharmaceutiques ont été utilisés et rejetés dans l'environnement depuis très longtemps, mais leur présence et leurs effets néfastes sur l'environnement et sur la santé de l'homme n'ont été répertoriés que depuis les dernières décennies. Les problèmes causés par leur présence dans l'environnement ont été posés de façon cruciale et ces composés ont été identifiés comme contaminants émergents [1]. Les composés pharmaceutiques à usage humain ou vétérinaire regroupent plus de 4000 molécules ayant des propriétés physico-chimiques et biologiques différentes [2]. Ces médicaments avec leurs métabolites et leurs produits de transformation peuvent atteindre l'environnement via les rejets des stations d'épuration dont la conception au départ n'envisageait pas de traiter ce genre de molécules. Un apport significatif peut provenir également du ruissellement des eaux provenant des zones agricoles utilisant des composés pharmaceutiques vétérinaires [1, 3-5]. Il est important de signaler que ces préoccupations récentes et croissantes par rapport à ces contaminants et à leurs effets potentiels délétères sur la santé humaine et écologique sont dues d'une part, à la publication de nouvelles méthodes analytiques capables de détecter et de quantifier ces produits qui apparaissent à l'état de traces dans l'environnement [6]. D'autre part au fait que les effets environnementaux néfastes de ces produits sont maintenant reconnus [7].

1.1.2. Molécules pharmaceutiques, métabolites et produits de transformation

Les composés pharmaceutiques actifs sont de petites molécules ayant généralement un poids entre 200 et 1000 Dalton, elles sont également appelées: ingrédients pharmaceutiques actifs (APIs). Ces molécules ont généralement des fonctionnalités acides ou basiques, ainsi que des propriétés physicochimiques et des activités biologiques différentes [8]. Elles sont souvent classées en fonction de leurs propriétés chimiques, leurs modes d'actions ou leurs effets toxiques. Ce sont des molécules qui sont souvent relativement résistantes aux processus de biodégradation. Leur présence dans l'environnement aquatique a été démontrée depuis quelques décennies [5, 9-11]. Après excrétion, ces molécules se retrouvent soit inchangées dans l'environnement, soit sous forme de métabolites ou de produits de transformation.

Les métabolites sont des molécules qui résultent d'un changement de structure chimique qui s'effectue dans le corps humain ou celui des animaux. Il a été démontré que ces métabolites peuvent être aussi toxiques que les molécules parentes [12]. Ils présentent des propriétés pharmacologiques et toxicologiques différentes. La métabolisation d'une molécule est généralement incomplète et peut générer des métabolites avec une activité moindre ou supérieure ainsi qu'une solubilité dans l'eau fréquemment plus élevée. Il a été assumé également que les métabolites peuvent présenter dans certains cas une toxicité moindre que celle des molécules parentes [8] mais l'inverse est aussi possible.

Les produits de transformation peuvent résulter des processus d'hydrolyse et de photo-oxydation ou encore des traitements des effluents. Par ailleurs ces produits formés que ce soit par le biais de processus de transformation biologiques ou autres peuvent également afficher une activité inférieure ou une solubilité dans l'eau plus élevée que celles des molécules mères [8].

1.1.3. Sources, devenir, effets et risques pour l'homme et l'environnement

Plusieurs sources peuvent conduire à la présence des divers produits pharmaceutiques dans l'environnement. Parmi elles, il est à citer les rejets des effluents des manufactures de médicaments, les usines d'épuration des eaux usées, l'élimination inappropriée de médicaments inutilisés ou périmés et les déversements accidentels pendant la production [13]. Une autre source de contamination indirecte peut provenir de l'utilisation des boues d'épuration comme fertilisants sur les sols agricoles [14]. Par conséquent, les composés pharmaceutiques peuvent atteindre les eaux des nappes phréatiques [5, 14]. Les eaux de drainage provenant des terres ayant été irriguées par les eaux usées peuvent constituer un autre apport significatif [15]. Mais il reste que les eaux provenant des usines d'épuration des eaux usées, représentent le plus grand apport qui atteint l'environnement aquatique. En plus il est à souligner que cet apport est continu tout le long de l'année.

Plus de 160 composés pharmaceutiques ont été retrouvés dans les effluents des stations d'épuration, dans les eaux de surface, les eaux souterraines et même dans les eaux potables [8]. Vu le caractère polaire et non volatil de la majorité des composés pharmaceutiques, et vue leur solubilité dans l'eau, ces derniers vont nécessairement atteindre l'environnement aquatique s'ils ne sont pas dégradés ou s'ils n'ont pas été éliminés durant le processus d'épuration des eaux usées. Ceci va se faire via l'eau et via les chaînes alimentaires. Une large gamme de composés pharmaceutiques dont des hormones, des antibiotiques, des antinéoplasiques et des antidépresseurs ont été détectés dans les eaux usées, les eaux de surface et les eaux souterraines [5, 11].

Lors des dernières décennies, plusieurs recherches ont tenté d'étudier les effets toxiques aigus et chroniques et également d'évaluer les risques des médicaments qui se retrouvent dans l'environnement. Bien que les ingrédients actifs de ces derniers aient été choisis au départ pour avoir une action contre les

organismes, la probabilité que la majorité des médicaments à usage humain puissent produire des effets aigus sur les organismes aquatiques reste minime, sauf en cas de déversement accidentel [8]. Par ailleurs, il a été démontré l'apparition d'effets aigus sur des organismes environnementaux à des concentrations élevées de l'ordre de gramme par litre. D'autre part, d'autres études parlent d'effets chroniques suite à l'utilisation de petites concentrations à long terme sur des bactéries [16, 17]. L'ingestion de ces composés par l'homme en consommant de l'eau reste aussi souvent négligeable car les doses sont très faibles en comparaison aux doses thérapeutiques usuelles [8].

Par ailleurs, ces dernières années, les informations et données compilées portant sur les effets de la présence de médicaments dans l'environnement sont de plus en plus disponibles [18]. Leur présence constitue un risque à des concentrations élevées, car ceci peut produire des effets aigus sur les organismes aquatiques et possiblement sur la santé des humains. Il est à citer les effets toxiques, cancérigènes et mutagènes produits par certains de ces composés pharmaceutiques tels que les antinéoplasiques [19]. Étant donné que ces produits pharmaceutiques continuent à être rejetés dans l'environnement, les organismes vivants au point de rejet seront exposés de façon continue et pendant toute leur existence. Par conséquent ces composés peuvent causer un risque même à des doses très faibles [1]. Il est également important de signaler que le caractère de persistance de certains composés augmente le risque et fait varier les effets surtout si l'exposition est à long terme [8].

1.1.4. Les antinéoplasiques (cytotoxiques)

Les agents antinéoplasiques nommés aussi agents cytotoxiques sont des composés pharmaceutiques toxiques. Selon « *International Agency for Research on Cancer-IARC* »[19]. 9 composés antinéoplasiques sont classés comme cancérigènes pour l'homme (Groupe-1). Plusieurs d'entre eux sont classés comme probablement et possiblement cancérigènes pour l'homme respectivement (Groupe-2A et Groupe-2B). Quant aux autres, ils ne sont pas classés pour leur cancérigénicité pour l'homme

(Groupe-3). Il reste par ailleurs que la majorité d'entre eux, ont des propriétés mutagènes et tératogènes. La plupart des médicaments utilisés ne sont pas des médicaments récents. Ils sont utilisés en chimiothérapie dans le traitement des différentes formes de cancer chez l'humain. Ils sont utilisés principalement dans les hôpitaux, et sont administrés aux patients généralement par voie intraveineuse, mais aussi ces dernières années par voie orale. Dans la plupart des cas, les protocoles de chimiothérapie font appel à l'utilisation de ces médicaments seuls ou en combinaison avec d'autres agents antinéoplasiques. Par ailleurs l'utilisation d'un seul agent cytotoxique dans la thérapie ne semble pas très conseillée. Car le même agent va attaquer la majorité des cellules cancéreuses. Mais il reste une fraction qui va développer une résistance à cet agent qui est souvent réadministré. À cet effet, l'association de plusieurs agents ayant des impacts différents paraît souhaitable. Car chacun utilisé en combinaison avec les autres, va avoir un effet toxique différent des autres. Par conséquent le traitement sera plus efficace [20].

Les agents cytotoxiques agissent pour inhiber la multiplication des cellules cancéreuses mais ils n'ont pas de mécanisme d'action spécifique ou sélectif sur les cellules néoplasiques. Autrement dit, le mécanisme d'action n'est pas centré exclusivement sur les cellules tumorales. Par conséquent, ces médicaments s'attaquent aussi aux cellules saines d'où les multiples effets indésirables causés aux patients.

1.1.4.1. Les classes d'antineoplasiques étudiés

Les agents antinéoplasiques sont classés selon leurs modes d'actions, mais les composés d'un même sous-groupe peuvent avoir des structures chimiques très différentes, les agents faisant l'objet de cette étude sont cités ci-dessous en fonction des classes auxquelles ils appartiennent :

1-Agents alkylants: cyclophosphamide, ifosfamide, carboplatine.

2-Les anti-métabolites: gemcitabine, méthotrexate, 5-Fluorouracil.

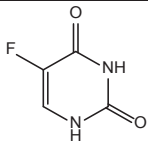
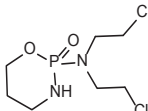
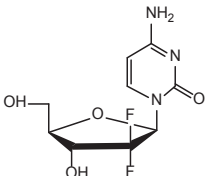
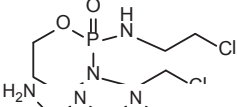
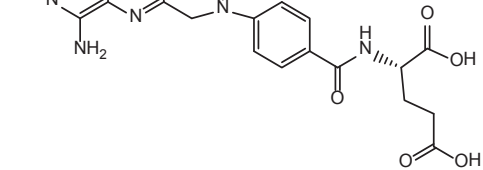
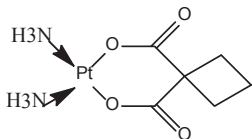
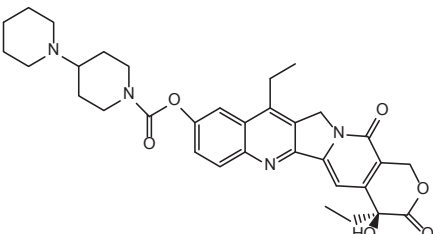
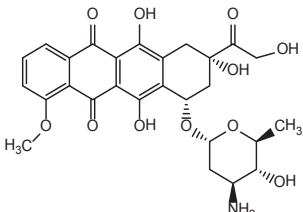
3-Les agents intercalants: épirubicine.

4-Les inhibiteurs enzymatiques: irinotécan.

1.1.4. 2. Les critères de choix des antinéoplasiques

Le choix des agents antinéoplasiques ciblés dans cette étude a été fait en considérant plusieurs sous-groupes. Le **Tableau 1.1** résume les données relatives aux propriétés physico-chimiques et structures moléculaires des composés choisis.

Tableau 1.1.1 Structures et propriétés physico-chimiques des composés cibles

Composés	Structures	MM/g.mol ⁻¹	pKa	LogK _{o-w}
5-Fluorouracil C ₄ H ₃ FN ₂ O ₂ (5-FU)		130.018	8.02[21]	-0.89[21]
Cylophosphamide C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P (CP)		261.086	2.84[22] 4.5-6.5[23]	0.63[21]
Gemcitabine C ₉ H ₁₁ F ₂ N ₃ O ₄ (GCA)		263.198	3.6[24]	-1.24[25]
Ifosfamide C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P (IF)		261.086	1.54[22]	0.86 [21]
Méthotrexate C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅ (MTX)		454.439	4.7[21] 4.8-5.4[26]	-1.85 [21]
Carboplatine C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ Pt (CBP)		371.254	-	-0.46 [21]
Irinotécan C ₃₃ H ₃₈ N ₄ O ₆ (CPT-11)		586.678	-	4.37[27]
Épirubicine C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁ (EPI)		543.519	8.08[28] 7.7[22]	1.85 [21]

MM: Masse molaire

Plusieurs paramètres ont été pris en considération pour le choix des composés étudiés. D'abord, le premier paramètre est le caractère cancérigène, mutagène et tératogène de ces composés [19]. Le deuxième paramètre est l'utilisation de ces composés dans les protocoles de chimiothérapie dans les hôpitaux au Québec et spécifiquement dans la région de Montréal¹. Le degré de métabolisation de ces molécules a été également considéré et par conséquent, le pourcentage susceptible de se retrouver inchangé après excrétion et rejet dans l'environnement. Des données de consommation ont été recueillies auprès des services de la santé de Montréal-Laval. Ces données montrent que les composés choisis représentent ceux les plus utilisés. Le **Tableau 1.2** regroupe les pourcentages massiques ainsi que les quantités consommées en Kg par million d'habitants pour les composés utilisés. Le troisième paramètre important à mentionner est la présence de ces composés dans l'environnement. Plusieurs études précédentes ont détecté et quantifié certains de ces composés dans les eaux usées et les eaux de surface, en Europe, en Amérique, en Asie et en Australie [26, 29-31]. Le quatrième paramètre est l'idée d'avoir ces composés dont les propriétés physico-chimiques et structures chimiques différentes dans une seule méthode ce qui constituait en soi un défi analytique important. Le 5-Fluorouracil (5-FU) et le carboplatine (CBP) qui sont des composés les plus utilisés ont été choisis au départ, mais comme l'ensemble des composés ont été extraits par une seule méthode, ces derniers n'ont pas été retenus par la procédure de pré-concentration. De plus, comme le 5-Fu s'ionise en mode négatif, sa séparation chromatographique des autres molécules était une condition absolue pour assurer le changement de mode du détecteur MS, ceci était impossible vu que le 5-Fu et la gemcitabine ont presque la même polarité et il était difficile de les séparer sur la colonne analytique choisie. Par conséquent, ces deux composés n'ont pas été retenus pour la suite des travaux.

¹ *President, advisory committee of pharmacists - Sigmasanté hospital group purchasing-2010*

Tableau 1.1.2 Quantité utilisée des composés cibles en % massique et consommation en Kg / M habitants

Composés	% Massique	Kg / M habitants
5-Fluorouracil	45.85	21.10
Cyclophosphamide	12.45	5.72
Gemcitabine	11.12	5.11
Ifosfamide	5.00	2.30
Méthotrexate	3.44	1.58
Carboplatine	2.95	1.36
Irinotécan	1.09	0.50
Épirubicine	0.26	0.12

Le pourcentage massique de chaque composé a été calculé en comparant la masse de chaque agent cytotoxique par rapport à l'ensemble de la masse de tous les agents de chimiothérapie utilisés.

1.1.5. Aperçu sur les agents antinéoplasiques choisis dans l'étude

Comme il a été vu précédemment, les agents de chimiothérapie sont regroupés en plusieurs classes thérapeutiques. Les agents de chaque groupe possèdent des propriétés différentes.

1.1.5.1. Les agents alkylants

La cyclophosphamide (CP) est un antinéoplasique très largement utilisé. Son utilisation remonte aux années 1950 [20]. La CP possède des propriétés immunosuppressives. Elle est rapidement absorbée, métabolisée et excrétée. La CP n'est pas cytotoxique en soi et est inactive jusqu'à sa métabolisation par le foie. Elle se métabolise en métabolite alkylant actif [19]. Il n'y a que 13% de la CP qui est excrétée inchangée et la fraction excrétée via les selles est insignifiante [32]. D'autres auteurs parlent d'une fraction de plus de 20% excrétée inchangée via les urines [33].

Elle est largement utilisée seule et souvent en combinaison avec d'autres agents dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique, les cancers des seins et de l'ovaire. Elle est administrée par voie orale ou intraveineuse. En plus d'avoir des propriétés mutagéniques et tératogéniques [33], la CP est classée comme cancérigène reconnu pour l'humain (Groupe-1) [19].

L'ifosfamide (IF) est l'isomère structurel de la CP et peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres agents. Il est utilisé depuis les années 1970 [19]. Il présente un large spectre d'activité antitumorale similaire à celui de la CP. Il nécessite une biotransformation pour être cytotoxique [34], tout comme la CP. Mais les deux agents antinéoplasiques présentent une différence dans la toxicité car ils ont des métabolismes différents [35]. L'IF est mutagène et peut avoir des effets tératogéniques même à des doses non toxiques pour les mères porteuses [19]. Il n'est administré que par voie intraveineuse [20]. La fraction excrétée inchangée de l'ifosfamide via les urines représente 18% de la dose administrée [36].

Le carboplatine (CBP) est largement utilisé pour les cancers avancés de l'ovaire et du foie. Il est administré par voie intraveineuse et comme il n'est que très peu absorbé, il n'est donc pas administré par voie orale [37]. Les patients recevant le carboplatine comme traitement séjournent habituellement en dehors de l'hôpital [20]. Environ 67% du CBP est excrété par voie rénale [38].

1.1.5.2. Les anti-métabolites

Le méthotrexate (MTX) est un antagoniste folique et un des anti-métabolites les plus utilisés dans le traitement du cancer des seins, la leucémie aigüe et le sarcome ostéogénique [35]. Il est également utilisé à plus faibles doses pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde [39]. Il est souvent utilisé en combinaison avec d'autres antinéoplasiques et donne des résultats efficaces pour le traitement du cancer des seins. Le MTX peut être administré de façon orale ou intraveineuse. Il est excrété essentiellement par voie rénale. Jusqu'à 90% de la dose administrée est excrétée sous

forme non métabolisée [38]. Le MTX n'est pas classé pour sa cancérogénicité pour l'humain (Groupe-3). Par ailleurs il est mutagène et a des effets tératogéniques pour l'humain [19].

La gemcitabine (GCA) est principalement utilisée dans le traitement du cancer des poumons, le cancer pancréatique et le cancer cervical [38]. Après administration, jusqu'à 92% est excrété via les urines, dont 10% représente la fraction inchangée et donc 90% est rejeté sous forme de métabolites actifs. En plus de ses effets toxiques, la GCA est reconnue comme étant mutagénique chez les mammifères [38].

Le 5-Fluorouracil (5-FU) est l'un des agents cytotoxiques les plus largement utilisés au Québec¹. Synthétisé il y a plus de 50 ans, il est utilisé seul ou en combinaison avec d'autres agents [19]. Il a été utilisé dans le traitement de plusieurs tumeurs solides [40]. Il est essentiellement utilisé pour le traitement du cancer des seins, le cancer colorectal et le cancer de la vessie [41]. Il est administré par voie intraveineuse et aussi orale. Le 5-FU est éliminé à 90% sous forme métabolisée. Seulement 10% représente la fraction inchangée du 5-FU excrété via les urines [42]. D'autres auteurs parlent d'une fraction de 10 à 50% [43, 44]. Le 5-FU a des effets toxiques reconnus spécialement pour les personnes âgées [42]. Par ailleurs il est considéré tératogène et est classé dans le Groupe-3 selon l'IARC [19]. Donc il n'est pas classé selon sa cancérogénicité. En se métabolisant, le 5-FU conduit à la formation de métabolites cytotoxiques comme la fluorouridine triphosphate et déoxyfluorouridine triphosphate [43, 44].

1.1.5.3. Les agents intercalants

L'épirubicine (EPI) est utilisée pour les cancers des seins, des poumons et de la vessie. Elle est administrée par voie intraveineuse [20]. La métabolisation de l'EPI génère le 13-OH-épirubicine dont l'activité cytotoxique est reconnue moindre que celle de la molécule mère [38]. Des essais chez l'homme ont démontré le risque de l'apparition d'une leucémie secondaire associée à l'utilisation de l'épirubicine [38].

Par ailleurs, sa mutagénicité est reconnue chez les animaux. Jusqu'à 20% de l'EPI est excrétée dans les urines [38].

1.1.5.4. Les inhibiteurs enzymatiques

L'irinotécan (CPT-11) est un composé semi-synthétique utilisé pour le cancer du colon métastatique. Il est administré par infusion intraveineuse, seul ou en combinaison avec d'autres antinéoplasiques [20]. Le CPT-11 est rejeté dans les urines avec une proportion qui peut aller jusqu'à 20% inchangée et 1% sous forme de son métabolite actif, le SN-38. Le CPT-11 est également rejeté via les selles dans une proportion allant jusqu'à 64%. Certains auteurs associent l'apparition de la leucémie aigüe à l'utilisation du CPT-11 [38].

1.1.6. Études analytiques précédentes

Plusieurs études ont été effectuées à travers différents pays européens, américains et asiatiques pour la détection et la quantification des agents de chimiothérapie dans des matrices environnementales et biologiques (urine, sang, plasma et tissus). Un aperçu sur ces études incluant les techniques et quelques résultats est présenté pour chaque classe de cytotoxiques.

1.1.6.1. Les agents alkylants

La CP et l'IF sont parmi les agents cytotoxiques les plus largement utilisés et ont fait l'objet de plusieurs études dans différentes matrices. Ils ont été analysés en utilisant la GC-MS avec une dérivation préalable précédée d'une extraction sur phase solide (SPE). Ils ont été quantifiés à des concentrations de 24 ng L⁻¹ pour l'IF et 146 ng L⁻¹ pour la CP dans les eaux usées d'un hôpital en Allemagne [45]. Les deux agents cytotoxiques ont été aussi détectés et quantifiés en utilisant l'UPLC-ESI-MS/MS précédée d'un enrichissement par SPE « *Off-line* » [30]. En effet les eaux usées de plusieurs stations d'épuration à Pékin en Chine ont été analysées avec des limites de détection (LOD) de 0.8 ng L⁻¹ et 2.5 ng L⁻¹ pour la CP et l'IF respectivement dans les eaux d'égouts. D'autre part, les limites de détection pour les

deux composés dans les eaux usées épurées, étaient de 0.5 ng L^{-1} pour la CP et 1.6 ng L^{-1} pour l'IF. L'une des techniques les plus utilisées est la LC-ESI-MS/MS précédée toujours d'une extraction sur phase solide. Ces deux composés ont été analysés dans trois types d'eau en Espagne en utilisant cette technique [29]. Les limites de détection de la méthode (MDL) pour la CP étaient de 1.7 ng L^{-1} , 2.3 ng L^{-1} et 2.1 ng L^{-1} respectivement pour l'eau de rivière, les eaux usées épurées et non épurées. Pour l'IF, les MDL étaient respectivement de 1.3 ng L^{-1} , 1.1 ng/L et 1.7 ng L^{-1} pour l'eau de rivière, les eaux usées épurées et non épurées.

Par ailleurs d'autres méthodes ont été développées en utilisant toujours la LC-MS/MS mais dans des matrices biologiques. Une étude sur les urines du personnel travaillant dans la préparation et l'administration de ces cytotoxiques aux malades dans un hôpital en Italie a rapporté des limites de détection (LOD) de 50 ng L^{-1} pour la CP et l'IF [46]. Par ailleurs la CP a été retrouvée chez plusieurs personnes à une concentration variant de 50 à 1031 ng L^{-1} alors que son isomère l'IF a été retrouvé uniquement chez un individu à une concentration de 153 ng L^{-1} [46]. Par ailleurs une autre méthode a permis d'avoir une valeur de la plus petite limite de quantification (LLOQ) de l'ordre de 200 ng L^{-1} pour les deux agents cytotoxiques [22].

Au meilleur de mes connaissances, le carboplatine (CBP) n'a fait l'objet que de rares études. Une méthode utilisant la LC-MS précédée d'une extraction sur phase solide manuelle a été publiée aux USA. La méthode a été développée dans le but de déterminer le carboplatine intact dans le plasma et les tissus des tumeurs. Les limites de quantification (LOQ) étaient de $0.07 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans le plasma ultra-filtré et de $0.034 \mu\text{g mL}^{-1}$ dans la tumeur homogénéisée [47].

1.1.6.2. Les anti-métabolites

Vue l'importance du MTX dans le traitement du cancer et l'historique de son utilisation. Plusieurs études ont été publiées pour sa détermination. La revue de littérature publiée en 2001 a décrit plus de 70 études chromatographiques entre 1975

et 2000 [48]. Ces études ont décrit plusieurs conditions expérimentales pour la préparation des échantillons, la méthode d'analyse et le type de détecteur utilisé.

Une méthode utilisant l'UPLC-ESI-MS/MS a été publiée en 2010 [30]. Cette méthode a permis d'obtenir une limite de détection de 0.6 ng L^{-1} dans les eaux usées. Le taux de recouvrement était de 67% dans la même matrice. Une autre méthode a été également proposée par d'autres auteurs au Canada [26]. Cette méthode utilise la LC-MS/MS précédée d'une SPE automatisée. Elle a été validée dans plusieurs matrices. Les limites de détection étaient de 11 ng L^{-1} , 16 ng L^{-1} et 3.7 ng L^{-1} respectivement dans les eaux usées non épurées, les eaux usées épurées et l'eau de robinet. Au meilleur de mes connaissances, cette méthode représente la seule qui a utilisé l'extraction sur phase solide en ligne couplée à la LC-ESI-MS/MS pour les agents de chimiothérapie.

Le MTX a été également quantifié dans des matrices biologiques telles que les urines. La limite de détection était de $1.1 \mu\text{g L}^{-1}$ [49]. Une autre méthode a été également publiée pour la même matrice, l'auteur rapporte une LOD de 200 ng L^{-1} [46].

La GCA est un agent de chimiothérapie récemment utilisé [50]. Une méthode utilisant la LC-MS/MS a permis de quantifier la GCA se retrouvant sur les surfaces de travail dans les hôpitaux [51]. Les résultats publiés indiquent un recouvrement supérieur à 75%. La précision exprimée en termes de %RSD (relative standard deviation, écart type relatif) a toujours été inférieure à 9.4%. La LOQ était de 25 ng L^{-1} . La GCA a été également quantifiée dans les eaux usées et les eaux de surface. Une autre méthode basée sur la LC-MS/MS combinée à une extraction sur phase solide manuelle, a permis la quantification de la GCA à une concentration de 9.3 ng L^{-1} dans les eaux usées et de 2.4 ng L^{-1} dans les eaux de surface. Les MDL étaient de 1.7 ng L^{-1} pour les eaux usées et de 1.3 ng L^{-1} pour les eaux de surface [29].

Étant donné la grande utilisation du 5-FU plusieurs études ont été réalisées pour sa détermination et sa quantification dans différentes matrices biologiques et environnementales. L'exposition du personnel responsable de la préparation et l'administration de cet agent cytotoxique aux patients dans un hôpital en Italie a été évaluée [52]. La HPLC combinée à une détection par ultra-violet (UV) précédée d'une SPE manuelle a été utilisée pour l'analyse. Plusieurs échantillons ont été pris au niveau des surfaces de travail. Le 5-FU a été détecté dans un intervalle allant de 0.2 à 470 $\mu\text{g dm}^{-2}$. Le 5-FU a été également détecté au niveau de la face interne des gants utilisés par le personnel de l'hôpital. La valeur étant de 0.07 à 3.77 $\mu\text{g/}$ paire de gants.

Par ailleurs la GC-MS/MS après une SPE manuelle, était la technique utilisée par d'autres auteurs qui ont réussi à quantifier le 5-FU dans les eaux usées d'un hôpital à Paris en 2008 [53]. Les résultats publiés ont indiqué la présence du 5-FU dans 12 échantillons sur un total de 14 prélevés. La fourchette de concentration mesurée était entre 0.09 et 4.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. La LOQ était de 40 ng L^{-1} .

Le 5-FU a aussi été quantifié dans le plasma des patients atteints du cancer. Les auteurs proposent une méthode basée sur la LC-MS/MS [54] et rapportent une LOQ de 2.5 ng mL^{-1} . La précision calculée dans la même journée exprimée en %RSD variait entre 0.7 et 3.4%.

1.1.6.3. Les agents intercalants

Quelques études ont été publiées pour la détermination de l'EPI. Les techniques utilisées généralement étaient la LC-UV, LC-MS et LC-MS/MS. La méthode publiée pour la détermination de l'EPI dans les urines utilisant la SPE-LC-MS/MS a donné une LOD de 0.04 $\mu\text{g L}^{-1}$. Le recouvrement était de 98.1%. Par ailleurs la précision exprimée en termes de %RSD était inférieure à 10.6% [55].

L'EPI a également été détectée et quantifiée à une concentration de 0.1 à 1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ dans les eaux usées de l'hôpital universitaire de Vienne. La HPLC combinée à une détection par fluorescence était la technique utilisée dans ce cas et qui s'est révélée être reproductible et exacte dans un intervalle allant de 0.1 à 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ [31]. D'autres auteurs rapportent des MDL de 3.8 ng L^{-1} dans les eaux usées et de 3.5 ng L^{-1} dans les eaux de surface [29].

1.1.6.4. Les inhibiteurs enzymatiques

La technique la plus couramment utilisée pour la détermination du CPT-11 dans les matrices biologiques est la LC combinée à la détection par fluorescence [56]. Par exemple, une méthode a été publiée en 2003 utilisant cette technique pour la détermination du (CPT-11) dans le sang des malades. La plus petite limite de quantification était de 5 ng mL^{-1} [57].

Par ailleurs le CPT-11 a également été déterminé dans l'eau, comme le montre l'étude faite en 2011 [29]. La MDL était de 1.1 ng L^{-1} pour les eaux usées et de 0.9 ng L^{-1} pour les eaux de surface.

1.1.7. Les objectifs du projet

La revue bibliographique effectuée sur la détermination des agents de chimiothérapie dans les différentes matrices a révélé l'utilisation de plusieurs techniques. Par ailleurs la LC-MS/MS précédée de l'extraction sur phase solide manuelle « *Off-line* » était la technique de choix pour l'analyse de ces composés.

La plupart des études publiées se sont limitées à l'étude de 2 ou 3 agents cytotoxiques [58], d'autres méthodes comprenant plusieurs agents cytotoxiques ont été développées [29], mais l'extraction sur phase solide manuelle « *Off-line* » a toujours été la technique utilisée pour la pré-concentration des échantillons qu'ils soient biologiques ou environnementaux. Les deux études publiées par Garcia et al [26, 59] présentent à ma connaissance les seules méthodes analytiques ayant utilisé la

SPE automatisée « *Online* » combinée à la LC-MS/MS pour la quantification de deux agents cytotoxiques i.e. la CP et le MTX.

L'objectif de mon projet consiste à développer une méthode permettant la détermination d'un groupe de six agents cytotoxiques dans une matrice environnementale. Ces derniers appartenant à différentes familles et ayant des propriétés physico-chimiques différentes. La LC-ESI-MS/MS combinée à une extraction sur phase solide automatisée sera la technique utilisée pour le développement de la méthode analytique. À ma connaissance l'extraction sur phase solide automatisée serait utilisée pour la première fois dans cette méthode, pour la pré-concentration d'un ensemble comprenant plus de 2 agents cytotoxiques. D'autant plus que ces agents combinent des hydrophobicités très différentes et comprennent des composés très hydrophiles telle que la gemcitabine qui serait pénible à extraire, le défi est encore plus grand quand il s'agit d'une extraction automatisée et ce qu'elle peut engendrer comme difficultés surtout quant au problème du volume de fuite (*breakthrough volume*).

Plusieurs paramètres seront optimisés pour la SPE « *Online* » dont le volume et le débit de charge. Les performances de deux colonnes de charge seront testées. La méthode développée sera validée dans une matrice d'eaux usées (affluent) à travers l'évaluation des paramètres suivants : La gamme dynamique linéaire, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), le taux de recouvrement, les effets de matrices et la précision (dans une même journée ainsi que durant trois journées consécutives) exprimée en termes de %RSD.

1.2. Principe de l'extraction sur phase solide (SPE)

1.2.1. Historique

L'extraction sur phase solide a été utilisée depuis le moyen âge par des fabricants de parfums à Grasse en France. Les fragrances volatiles ont été extraites des pétales de roses en utilisant la paraffine [60]. Les premières applications scientifiques modernes ont été réalisées vers les années 1951 par une équipe du « *Public Health Service* » aux États-Unis, qui a utilisé le charbon activé pour concentrer des composés organiques dans les eaux de surface [61].

Dans le but d'utiliser certains composés ayant des propriétés inhibitrices d'enzymes (protéases) comme agents actifs contre les infections virales telles que le sida (*HIV-AIDS*); les laboratoires de recherche « Pfizer » au Royaume Uni ont commencé à faire des investigations vers la fin des années 1980. En effet la détermination de l'efficacité de ces inhibiteurs d'enzymes a été évaluée à travers l'incubation de peptides avec les protéases en question, tout en ajoutant différentes concentrations de l'inhibiteur. Après incubation, la concentration de l'un des peptides libéré par clivage a été déterminée. Donc afin de pouvoir analyser ces produits de clivage obtenus à partir de peptides, l'extraction sur phase solide fût proposée comme outil pour la pré-concentration. À cette époque elle était déjà largement utilisée pour l'étude des métabolismes des médicaments dans le but de découvrir de nouvelles entités chimiques [62].

1.2.2. Développement de la SPE:

Malgré les grands progrès accomplis en matière d'instrumentation analytique, les matrices environnementales dans lesquelles sont recherchés les contaminants organiques restent complexes et présentent des défis substantiels. Souvent, ces contaminants se retrouvent à l'état de traces (0.1 à 200 ng L⁻¹) avec plusieurs autres composés interférents. Le besoin d'éliminer ces interférents et de pré-concentrer s'impose donc, afin de détecter et quantifier ces contaminants. Il est estimé que le prétraitement des échantillons constitue les deux tiers du temps total du processus

analytique et est souvent considéré comme la première source d'erreurs dans les résultats.

Plusieurs raisons ont contribué au développement de la SPE et à son utilisation courante. L'idée était de trouver une méthode alternative à l'extraction liquide-liquide (L-L) et qui utiliserait le moins de solvant possible vue que cette dernière en consommait beaucoup [63, 64]. Par ailleurs l'émergence de contaminants à caractère polaire a augmenté ce besoin. Étant donné que la majorité des composés polaires sont partiellement solubles dans l'eau. Par conséquent quel que soit le solvant organique choisis pour l'extraction, les taux de recouvrement ne seraient pas satisfaisants. En outre la diversité existante quant aux sorbants, a beaucoup aidé au développement et à l'évolution de la SPE, plus particulièrement concernant les composés polaires qui montrent une meilleure rétention [65]. Le couplage de la SPE en ligne avec la LC a fait de cette méthode d'analyse une des techniques les plus robustes. Elle a même remplacé la GC qui a été pour plusieurs années l'une des méthodes favorites des chimistes analytiques.

Une autre technique de pré-concentration qui mérite d'être soulignée consiste en la micro-extraction sur phase solide (SPME) qui est totalement différente de la SPE, puisque son principe est basé sur un équilibre de partage des analytes entre la fibre de silice enrobé de polymère et la matrice, la quantité des analytes extraits est proportionnelle à la quantité disponible ou libre dans la matrice.

La GC précédée de la micro-extraction sur phase solide (SPME) permet l'analyse des composés volatils et semi-volatils à partir d'échantillons liquides, solides ou gazeux. Cette dernière bien qu'elle ne nécessite pas l'emploi de solvants, n'a pas pu remplacer la SPE, puisque un sévère problème de contamination « *Carry-over* » surgit souvent entre les échantillons à cause de l'absence de lavage entre les injections successives. Aussi le temps d'équilibration nécessaire pour l'adsorption des analytes est long et peut souvent dépasser une heure. Une limitation importante de cette technique se traduit par le fait que les volumes de la phase d'extraction sont

petits pour permettre une extraction totale des analytes, ce qui peut affecter les limites de détection surtout pour l'analyse de traces. Par ailleurs l'utilisation de fibres avec des volumes plus grands se traduit par l'utilisation de couches plus épaisses, ce qui va entraîner des temps d'extraction plus longs [66].

1.2.3. Concept de la SPE

1.2.3.1. Les objectifs

Le but de l'utilisation de la SPE peut se résumer en trois choses:

1.2.3.1.1. La concentration

Pour des fins de quantification d'un ou de plusieurs analytes d'intérêt existant à l'état de traces, il est nécessaire de les concentrer le plus possible. Ceci assurera une bonne réponse de l'appareil utilisé pour l'analyse et permettra donc de minimiser les erreurs de précision engendrées par le bruit de fond, d'où la nécessité d'utiliser la SPE.

1.2.3.1.2. La purification

La mesure de certains composés est très difficile. Ces derniers sont contenus dans des matrices très complexes contenant des interférents masquant les analytes d'intérêt durant l'analyse. L'élimination de ces interférents devient primordiale. La purification est réalisée donc soit par la rétention des analytes sur la phase solide et rinçage des interférents ou l'inverse.

1.2.3.1.3. L'échange de solvants

Pour être analysés, certains composés nécessitent un environnement spécifique. Quel que soit la matrice dans laquelle se trouvent ces analytes, il est nécessaire de les extraire de cette dernière et de les mettre dans une matrice qui est plus compatible avec l'instrument à utiliser. Par exemple en GC l'utilisation des solutions aqueuses n'est pas possible.

1.2.3.2. Le processus de la SPE

L'extraction sur phase solide est l'une des multiples techniques de traitement d'échantillons existantes telles que la filtration, la précipitation, la solubilisation etc...qui constituent toutes des étapes entre l'échantillonnage et l'analyse. Le but de cette étape est de rendre l'échantillon plus compatible avec la technique d'analyse utilisée. La SPE est mise en œuvre directement sans aucune préparation préalable, à part un simple ajustement de pH. Le principe de cette technique est semblable à l'extraction liquide-liquide (L-L) où l'analyte est partagé entre deux solvants immiscibles. L'extraction est efficace si une grande partie de l'analyte d'intérêt est récupéré dans le solvant d'extraction. Seulement en SPE, le solvant d'extraction est remplacé par une phase solide [60].

La SPE consiste donc, dans un premier temps à retenir les analytes sur la phase solide (sorbant) et à éliminer par rinçage les autres composantes de la matrice jugées indésirables (les interférents). Puis dans un deuxième temps à récupérer par élution les analytes dans un faible volume de solvant. Par conséquent, ces derniers vont se retrouver dans une solution plus propre avec des concentrations plus élevées et susceptibles d'être quantifiés [67].

Avant de procéder à l'extraction proprement dite, il est important de faire un choix judicieux du sorbant à utiliser. Ensuite, il faut procéder à son conditionnement pour le préparer à recevoir l'échantillon en question. Ce conditionnement assure une meilleure reproductibilité de la rétention des composés d'intérêt.

Le choix du support solide (sorbant) qui sera utilisé dans l'extraction dépend de la nature de l'échantillon à extraire (si par exemple la matrice est aqueuse comme c'est le cas des échantillons environnementaux et biologiques, des supports hydrophobes sont utilisés puisque dans ce cas l'eau constitue la phase mobile qui a la force éluante la moins forte) et des propriétés physico-chimiques des composés à analyser et notamment de leur polarité, de la quantité disponible de l'échantillon, du

facteur de pré-concentration recherché et aussi de la sensibilité de la méthode d'analyse et le besoin d'éliminer ou non les autres composés contenus dans l'échantillon et qui peuvent interférer dans l'analyse. Ces informations vont permettre de choisir le support solide qui va conduire à une meilleure rétention des analytes d'intérêts.

Dans l'environnement, des volumes de plusieurs centaines de millilitres peuvent être nécessaires pour une bonne pré-concentration (polluants organiques). En revanche, dans l'industrie pharmaceutique, le volume des échantillons à purifier n'est que de quelques millilitres. Le sorbant choisi doit donc avoir une excellente affinité pour les composés cibles. Il doit également présenter un minimum d'affinité avec les interférents de la matrice.

Pour la mise en œuvre de la SPE, un volume de l'échantillon est percolé à travers une petite surface solide. Le partage des composés entre la phase liquide et la phase stationnaire s'effectue de telle sorte que les molécules d'intérêts sont retenues par simple adsorption à la surface ou par pénétration dans les couches externes. Le partage est défini par le coefficient K_D qui indique le rapport entre la fraction d'analytes retenus sur la surface solide et celle qui est restée dans la matrice. Ce coefficient est d'autant plus grand, que les analytes ont été bien adsorbés sur la phase solide. Ce phénomène d'adsorption des analytes est appelé rétention. Par contre il n'y a pas que les analytes d'intérêt qui sont retenus. D'autres composés de la matrice peuvent avoir une affinité avec la phase solide et peuvent ainsi être retenus. Ces composés vont constituer des interférents pour les analytes d'intérêt et il devient primordial de les éliminer. Pour ce faire, il est nécessaire d'effectuer un lavage ou rinçage avec un solvant qui est susceptible de les éluer sans pour autant désorber les analytes d'intérêt. Cet ensemble d'opérations constitue la première étape de l'extraction. La deuxième étape qui consiste à désorber les analytes et les collecter, nécessite l'utilisation d'un solvant d'extraction pour lesquels ces derniers ont une affinité et ce phénomène est donc appelé l'élution. Il est caractérisé par le facteur de capacité k' , qui est le rapport entre la concentration des analytes dans la phase solide

et le solvant. Par ailleurs, l'extraction L-L, contrairement à la SPE, requiert l'utilisation d'un solvant d'extraction non miscible avec la matrice. Alors qu'en SPE ceci n'est pas nécessaire. Les deux phases liquides peuvent être miscibles car elles ne seront jamais en contact et c'est la phase solide qui servira d'intermédiaire entre les deux [60]. Si le but de la SPE est de purifier, le processus se déroulera en trois étapes seulement. L'étape une et deux sont identiques, mais l'étape trois consistera à retenir les impuretés sur la phase solide et à éluer les analytes d'intérêts dans un petit volume de solvant. La figure qui suit illustre bien les étapes décrites plus haut :

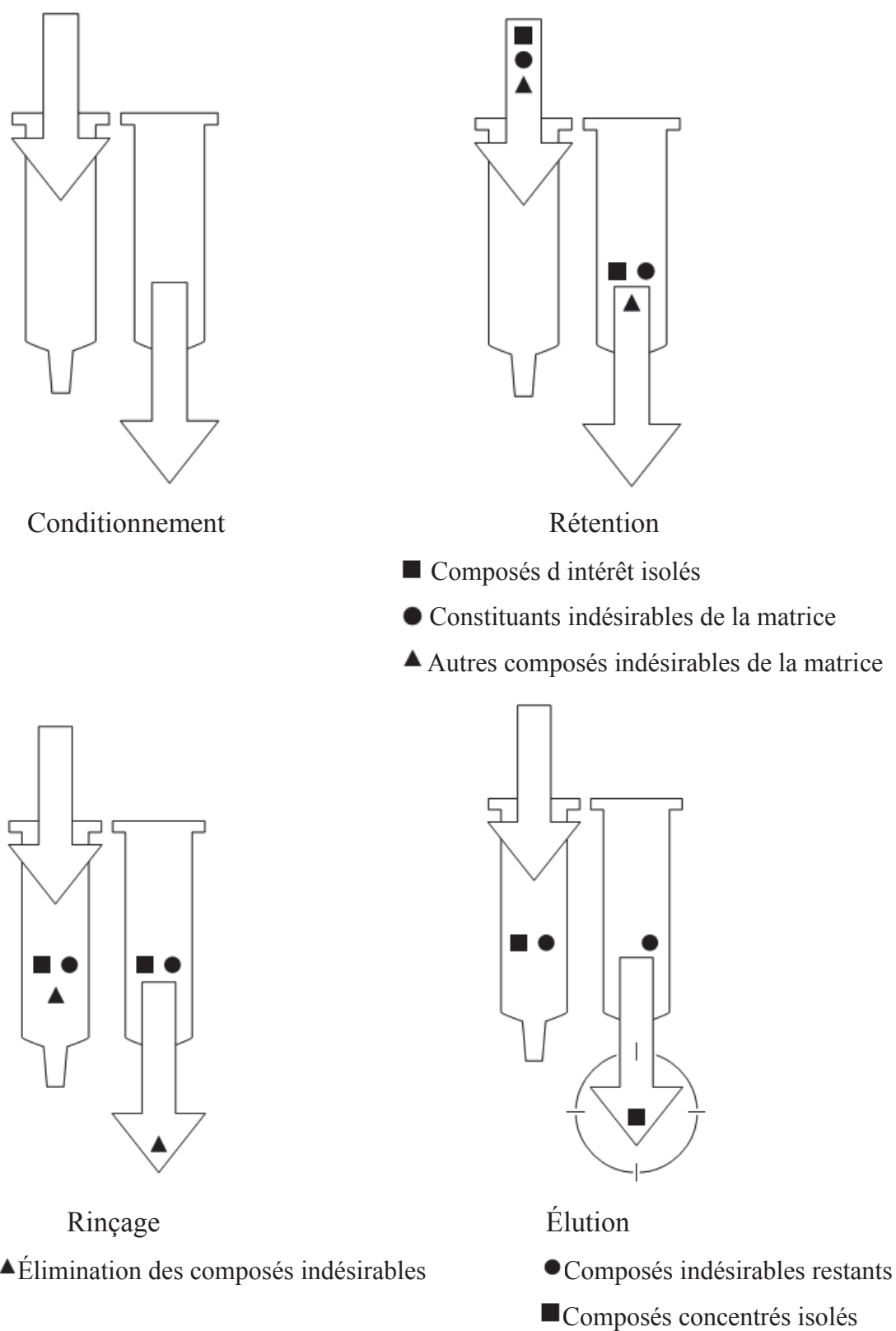


Figure.1.2.1: Les étapes de la SPE manuelle [68]

Les étapes décrites précédemment constituent les étapes de l'extraction proprement dite. Il y a une autre étape avant l'injection de l'analyte dans le système chromatographique. Cette étape est la concentration de l'éluât recueilli, ceci consiste à l'évaporer partiellement ou totalement en faisant passer un jet d'azote. Le résidu est ensuite reconstitué dans la phase mobile utilisée en chromatographie.

La SPE a souvent été utilisée comme outil dans le but de pré-concentrer ou de purifier, dans l'analyse de produits pharmaceutiques, de pesticides, d'hormones etc...dans des matrices environnementales et biologiques. L'étude réalisée pour l'analyse d'un ensemble de produits pharmaceutiques (triméthoprime, carbamazépine, naproxène, gémfibrozile) et de pesticides (atrazine, simazine, cyanazine) dans les eaux [69], a fait usage de la SPE automatisée dans le but de pré-concentrer ces composés et par la suite les analyser par LC-MS/MS. La gémcitabine et ses métabolites ont été extraits du plasma humain en utilisant la SPE manuelle [24]. Des anti-infectieux tels que, la sulfaméthoxazole, ciprofloxacine, clarithromycine ont été extraits d'une matrice d'eaux usées en utilisant la SPE automatisée [70] puis analysés par LC-MS/MS. Un ensemble d'agents de chimiothérapie de la famille des antracyclines ont été extraits des urines par SPE manuelle [55].

1.2.3.3. Facteur de pré-concentration

Le facteur de pré-concentration ou d'enrichissement en SPE indique l'augmentation de la concentration d'un analyte donné A, dans la solution finale par rapport à sa concentration dans la solution initiale (matrice), il est défini selon l'équation suivante:

$$FP = \frac{[A]_f}{[A]_i} = \frac{V_i}{V_f} \quad \text{Eq. (1)}$$

1.2.4. SPE « *Off-line* » versus « *Online* »

La SPE peut être réalisée selon deux procédés, le premier manuel « *Off-line* » et le deuxième automatisé « *Online* ». Les deux procédés suivent les mêmes étapes et sont régis par la même théorie. Seulement le procédé manuel consiste en une étape complètement indépendante de l'analyse. Ceci s'effectue sur un montage fonctionnant sous vide et utilisant des cartouches cylindriques en polymères. Ces cartouches sont de volumes variables et de natures et d'épaisseurs de sorbants variables. Alors que, le procédé automatisé consiste en une étape complètement intégrée à l'analyse. Une colonne de charge qui contient la phase stationnaire solide est intégrée au système chromatographique. L'échantillon est chargé sur la colonne par le biais d'un solvant à partir d'une première pompe. Dans un premier temps, l'échantillon est extrait et les analytes sont piégés. Dans un deuxième temps, les analytes sont ensuite élués par la phase mobile amenée par la deuxième pompe et sont transférés jusqu'à la colonne analytique. Par conséquent, la totalité des analytes piégés sont transférés vers la colonne analytique. Dans un tel cas il n'y a aucune perte dans le facteur de pré-concentration car la totalité des composés retenus sur le sorbant sont transférés. Ceci permettra donc l'utilisation de plus petits volumes, ce qui n'est pas le cas dans la SPE manuelle pour laquelle une petite fraction de l'extrait seulement est utilisée pour l'analyse [69]

Une comparaison entre les deux procédés manuel et automatisé permet de mentionner que la SPE manuelle demeure la méthode la plus utilisée. Ceci est lié à son faible coût comparé à celle automatisée, à la disponibilité d'une grande variété de sorbants (phase stationnaire) et au volume d'échantillon analysable qui varie de millilitre (mL) au litre (L). La procédure SPE manuelle permet aussi l'utilisation d'une plus grande variété de solvants, étant donné que le procédé est complètement indépendant de l'analyse. Par ailleurs malgré sa popularité et sa simplicité, la SPE manuelle reste une procédure longue, laborieuse à réaliser et qui comporte beaucoup d'étapes. Ce qui peut induire à une éventuelle contamination et à des erreurs dans les résultats. Le débit est difficile à contrôler ce qui affecte la reproductibilité. Le nombre

d'échantillons est limité. L'utilisateur de la méthode est beaucoup plus exposé aux solvants. Seule une petite fraction de l'extrait est utilisée dans l'analyse. Une éventuelle perte des analytes peut également se produire lors de l'étape d'évaporation. L'utilisation de la méthode d'étalonnage par ajouts dosés pour quantifier reste difficile vu le temps et le travail laborieux qu'elle nécessite.

Les raisons précédemment évoquées ont poussé à l'automatisation de la SPE pour justement contrer ces désavantages. Par ailleurs la SPE automatisée présente aussi des limitations. Les solvants utilisés restent limités car il faut considérer la compatibilité de ces derniers avec la HPLC et également avec les sources d'ionisation. Les limites de détection sont habituellement plus grandes que celles de la SPE manuelle. Une sérieuse limitation posée par les volumes de fuite (*breakthrough volumes*) qui empêchent d'utiliser de grands volumes pour pré-concentrer. En effet, les colonnes de charge sont de petites colonnes dont la masse de la phase stationnaire est vraiment petite à comparer avec les masses des phases stationnaires utilisées dans la SPE manuelle. Cette dernière offre la possibilité d'augmenter ce volume de fuite en augmentant la masse du sorbant de 1 à 2 grammes sans pour autant affecter le volume du solvant de désorption. Alors que la SPE automatisée ne permet pas cette alternative, vu que l'éventail de masse du sorbant dans les colonnes de charge varie de 20 à 100 mg. Ce qui explique le fait que les composés sont peu retenus sur la colonne [65]. En effet, pour la détection de contaminants organiques tels que des composés pharmaceutiques dans les eaux, il est nécessaire de déterminer au préalable le volume minimal à percoler pour avoir une concentration détectable par le système analytique. Cependant, la percolation d'un grand volume pour permettre la pré-concentration maximale de ces composés conduit à la perte de certains d'entre eux. Effectivement lors du processus de percolation, le solvant (l'eau) qui constitue en fait l'échantillon se comporte comme un éluant pour ces composés. Donc à partir d'un certain volume percolé appelé volume de fuite, les composés ne sont plus retenus. L'obtention de bons rendements d'extraction est étroitement liée à la percolation d'un volume inférieur au volume de fuite. Par conséquent, la seule façon de contrer ce problème est de vraiment choisir une phase

stationnaire très sélective. Le défi est encore plus grand quand il s'agit de composés polaires qui sont peu retenus sur une colonne en mode de phase inversée. Plusieurs paramètres sont à considérer quant au choix de la phase d'extraction (sorbant). Parmi ces derniers, il est à citer la nature de la matrice à analyser et également les propriétés physico-chimiques des composés à étudier. Les supports hydrophobes conviennent parfaitement aux matrices biologiques et environnementales qui sont en majorité aqueuses, étant donné que l'eau dans ce cas constitue la phase mobile la moins éluante. L'utilisation des supports à base de silice modifiée a été très fréquente dans le mode automatisé pour l'extraction des composés organiques. Les propriétés de ces supports sont bien connues et elles ont beaucoup servies dans la séparation chromatographique [70]. La polarité des composés est un facteur décisif dans le choix du support d'extraction. La polarité d'un composé est en général liée à la notion d'hydrophobicité qui est définie par le coefficient de partage entre l'octanol et l'eau ($K_{\text{oct-eau}}$). Par conséquent, les composés dont le logarithme de ($P_{\text{oct-eau}}$) est supérieur à 3 sont considérés non polaires, ceux dont le $\log K_{\text{oct-eau}}$ est situé entre 2 et 3 sont généralement considérés comme moyennement polaires, et ceux dont le $\log P_{\text{oct-eau}}$ est inférieur à 2 sont polaires [70]. D'autres auteurs indiquent que les composés polaires sont ceux dont le logarithme ($K_{\text{oct-eau}}$) est en bas de 1 [69].

La nécessité d'avoir une compatibilité entre la colonne de charge et la colonne analytique, représente également une autre limitation. Effectivement si les deux colonnes ont la même nature de sorbant, le système présentera une meilleure efficacité. La différence dans la nature de la phase stationnaire des colonnes couplées s'interprète par un élargissement des pics chromatographiques. Une façon de contrer ce problème est d'assurer la désorption en mode retour « *back-flush* » seulement avec un solvant organique puis par le biais d'une troisième pompe, ajouter l'eau, les deux solvants vont alors être mélangés avant d'arriver à la colonne analytique [65].

Même si la nature du sorbant choisi est un paramètre important dans le processus de la SPE automatisée, d'autres points importants doivent être considérés pour une meilleure efficacité, notamment, la nature et la proportion des solvants

organiques avec lesquels les composés sont désorbés. En effet une fois extraits, ces derniers doivent être désorbés de façon quantitative, sélective et rapide. La fraction de composés désorbés et transférés à la colonne analytique doit être la plus grande possible pour une meilleure sensibilité. Dans ce cas, le pourcentage de solvant organique utilisé pour la désorption doit être bien optimisé. Dans le cas contraire, ceci induirait non seulement une baisse dans la sensibilité du signal mais aussi il serait difficile d'avoir des résultats reproductibles [70]. Le pourcentage de solvant organique pourrait également avoir un effet sur la forme des pics. Un élargissement des pics est toujours observé après une pré-concentration automatisée par rapport à l'injection directe de petits volumes. Si le pourcentage de solvant organique n'est pas suffisant pour permettre une désorption quantitative des composés, ces derniers sortiraient larges de la colonne de charge. C'est généralement le cas quand le mélange des composés étudiés contient des molécules très polaires comme certains agents cytotoxiques, qui nécessiteraient de débiter à des pourcentages d'eau plus grands pour permettre la séparation [65] et également une meilleure rétention de ces derniers sur la colonne analytique car les faibles pourcentages en solvant organique retarderaient leurs éluions. Donc il est vraiment nécessaire de trouver un compromis pour avoir une désorption quantitative et alors assurer une meilleure sensibilité, une bonne forme des pics et une séparation acceptable. Par ailleurs l'élargissement des pics chromatographiques après une pré-concentration automatisée est un phénomène très observé en comparaison avec l'injection directe de petits volumes. Il n'est pas dû seulement au pourcentage de solvant organique, mais d'autres facteurs peuvent aussi expliquer cet élargissement. Entre autres, en chromatographie directe, le volume d'échantillon injecté est beaucoup plus faible que celui qui est introduit en utilisant la chromatographie couplée à la SPE automatisée. La désorption à des températures élevées permettrait une diminution de l'élargissement de 15%. La dissolution des composés est favorisée par le chauffage de la colonne ce qui induit par conséquent une désorption quantitative et rapide [70].

La sélectivité permettrait la désorption et le transfert des composés d'intérêt. Cette désorption sélective contribuerait de beaucoup à la diminution de l'effet de

matrice. L'élimination des composés non désirés par un lavage de la colonne de charge après extraction serait une bonne technique pour améliorer la sélectivité [70].

La SPE couplée à la LC en ligne reste une technique très prometteuse et robuste. Malgré les difficultés qu'elle peut présenter quant à son optimisation, la sélectivité des phases stationnaires surtout vis-à-vis des composés polaires, le choix et la compatibilité des solvants organiques. Il reste qu'il y a beaucoup de développements qui se font en matière de synthèse des sorbants, pour permettre un choix plus diversifié et une plus grande affinité surtout vis-à-vis des composés polaires et qui sont les plus difficiles à retenir.

1.3. Principes de la LC-MS/MS

1.3.1. Aperçu général

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est une technique robuste, sensible, spécifique et rapide. Ce couplage basé sur les capacités de séparation chromatographique et celles de détection de l'analyseur de masse a permis un progrès spectaculaire quant à l'analyse des mélanges complexes de molécules organiques et biologiques. Son application dans le domaine de l'environnement a conduit à la détection et la quantification d'une large gamme de contaminants présents à l'état de traces.

1.3.2. Principe de fonctionnement de la LC-MS/MS

Le couplage LC-MS/MS consiste au jumelage d'un système chromatographique en phase liquide et d'un détecteur de masse en tandem (analyseurs placés en série). Le principe consiste à introduire l'échantillon à analyser via un injecteur qui est ensuite transporté par la phase mobile liquide sur la colonne analytique où les molécules en question seront retenues et séparées en fonction de leurs affinités vis-à-vis de la phase stationnaire qui constitue la colonne analytique et également de la phase mobile. Les molécules sont ensuite envoyées vers le spectromètre de masse où elles sont ionisées par le biais d'une source d'ionisation choisie en fonction des molécules à étudier et transformées sous forme gazeuse. Et finalement, elles sont entraînées dans le spectromètre de masse par l'effet du vide. Ce dernier constitué de deux analyseurs de masse et d'une chambre de collision. Le principe de la spectrométrie de masse en tandem consiste à sélectionner un ou des ions moléculaires appelés ions parents ou ions précurseurs selon la valeur de leurs rapports m/z dans un premier analyseur, puis à les fragmenter, les fragments ainsi générés, appelés ions fils sont à leur tour sélectionnés par le deuxième analyseur et envoyés vers le détecteur. La réalisation de cette opération peut être assurée par la combinaison de plusieurs types d'analyseurs dont des quadripôles, des temps de vol, des secteurs magnétiques et électriques, mais aussi au sein d'un seul analyseur dans le

cas d'une trappe ionique. Plusieurs types de balayage sont possibles dont, le balayage complet (*full scan*), dans ce cas une gamme de masse de précurseurs sont choisis, le balayage d'ions sélectionnés (*SIM-Selected Ion Monitoring*) qui s'effectue dans le premier analyseur où un précurseur est choisi et est non fragmenté, le spectre d'ions fragments (*product ion scan*), multiples fragmentations sélectives (*MRM-Multiple Reaction Monitoring*), où plusieurs précurseurs sont choisis et sont fragmentés, spectres de précurseurs (*precursor ion scan*) et enfin perte de neutre spécifique (*constant neutral loss*). Dans le cas de l'utilisation de la spectrométrie de masse comme moyen de détection, la séparation en amont sur la colonne analytique n'est plus nécessaire pour l'identification des différents analytes dans un mélange complexe. Ceci offre l'opportunité de développer des méthodes plus rapides et donc de réduire le coût de l'analyse.

1.3.3. Système LC-MS/MS utilisé dans le projet

Le système LC-MS/MS utilisé pour la réalisation de ce projet est composé d'un système chromatographique en phase liquide couplé à un spectromètre du type quadripôle placé en série (*tandem*) doté d'une source d'ionisation à électro-nébulisation (*electrospray*).

1.3.3.1. Le système chromatographique en phase liquide

Le système chromatographique en phase liquide comprend une seringue d'injection de 2.5 mL, une boucle de 1mL, deux valves et deux pompes. Une première pompe qui sert au chargement de l'échantillon sur la colonne d'extraction (SPE) et donc permet l'extraction des molécules contenues dans la matrice sur la colonne de charge et une deuxième pompe qui sert à l'élution et la séparation des analytes sur la colonne analytique (**Figure 1.3.1**).

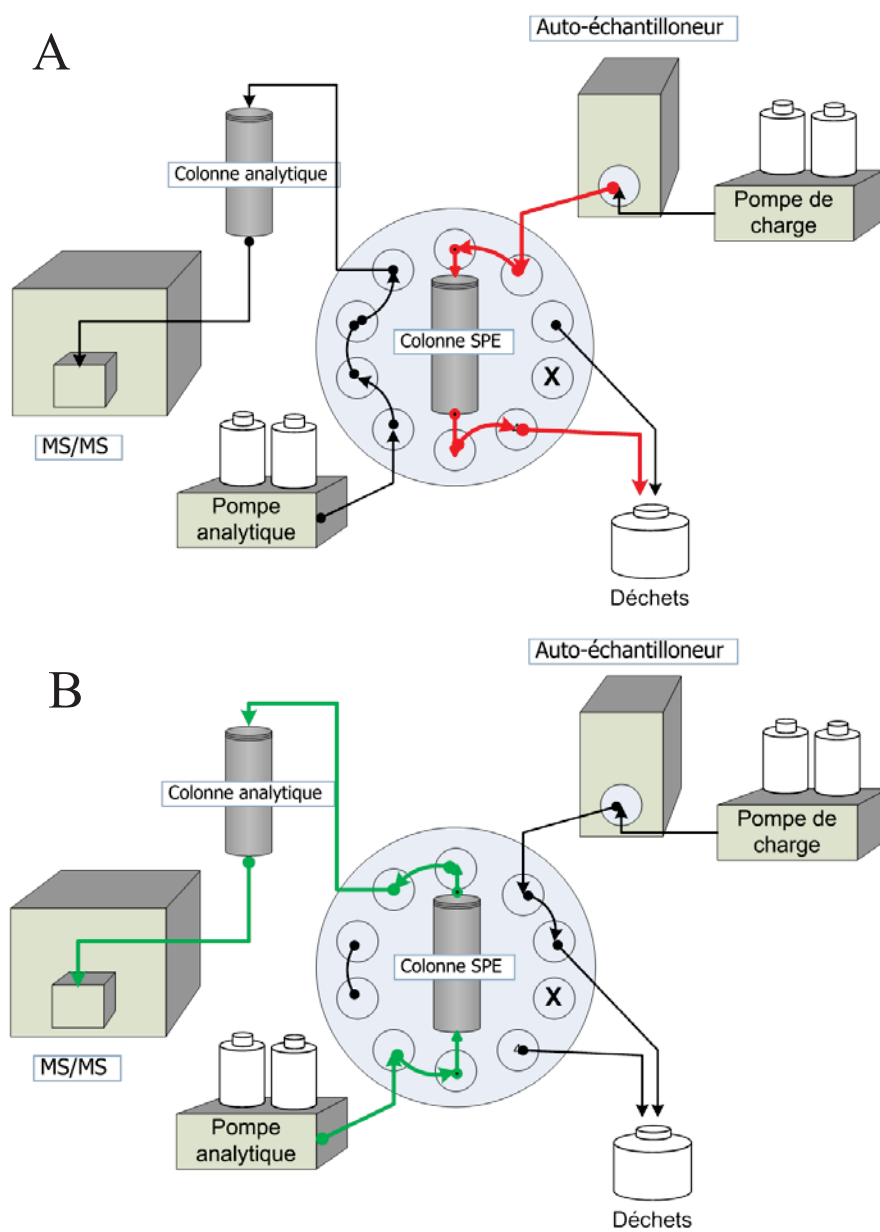


Figure 1.3.1: Montage de la SPE en ligne couplée à la LC-MS/MS [71]

A: Charge et extraction-**B:** Éluion et séparation

Le principe consiste à injecter via la seringue d'injection l'échantillon dans la boucle de 1 mL se trouvant sur la valve 1. L'échantillon est ensuite transféré par le biais de la première pompe sur la colonne de charge se trouvant sur la valve 2 et utilisant un solvant appelée solution de conditionnement qui est sous forme d'eau grade HPLC acidifiée à 0.1% avec l'acide formique dans ce cas. Ce transfert est en fait assuré par ce changement de valve (*switch valve*). Une fois transférés les analytes d'intérêt sont retenus sur la colonne, la rétention est fonction de l'affinité qu'ont les analytes vis-à-vis de la phase stationnaire constituant la colonne de charge, qui a été choisie au préalable en fonction des propriétés physico-chimiques et des structures des molécules qui ont fait l'objet de cette étude. Après que les analytes soient piégés sur la colonne de charge, la deuxième pompe se met à fonctionner pour éluer les analytes en mode retour (*back-flush*) et les envoyer sur la colonne analytique où a lieu la séparation utilisant une phase mobile constituée d'un solvant A qui est de l'eau grade HPLC acidifiée à 0.1% et d'un modificateur organique B sous forme d'un mélange à 50% de MeOH et ACN également acidifié à 0.1% avec l'acide formique. La séparation a été réalisée selon un gradient qui a été optimisé pour permettre la séparation et l'élution des analytes dans un temps optimal de 11min. Par ailleurs le lavage de la seringue d'injection, la boucle et la valve1 moyennant un mélange de solvants organiques dans un premier temps et puis de l'eau acidifiée a 0.1% avec l'acide formique dans un deuxième temps, s'effectue au même moment où se fait l'élution et le transfert des analytes vers la colonne analytique. Le lavage est réalisé dans le but d'éviter une éventuelle contamination que certains composés peuvent causer (*carry-over*).

1.3.3.2. Le système MS/MS

Le système MS/MS est sous forme d'un spectromètre de masse du type triple quadripôle placé en série (*tandem*), QqQ. Ce système est composé d'une source d'ionisation du type électro-nébulisation (*electro-spray*) et deux analyseurs de masses séparés par une cellule de collision.

Le mélange solvant-analytes provenant du système chromatographique en phase liquide (LC) est nébulisé dans une chambre à pression atmosphérique. Une différence de potentiel élevée de l'ordre de ± 2 kV à ± 5 kV [72] est appliquée à l'extrémité de l'émetteur, qui est un fin tube capillaire en acier inoxydable. Dans le cadre de ce projet, l'ionisation s'est faite en mode positif utilisant une valeur de voltage de l'ordre de 4.5 kV, le choix de cette valeur a été fait, suite à plusieurs tests d'optimisation qui ont été effectués pour chacun des composés et dont cette valeur a révélé le meilleur signal pour l'ensemble. L'effluent liquide est alors transformé en un nuage de fines gouttelettes chargées (*spray*) qui se forment à l'extrémité du capillaire (**Figure 1.3.2**). Ces gouttelettes chargées sont rapidement dispersées suite à l'évaporation du solvant, souvent accélérée pour les grands débits par l'utilisation d'un courant d'air co-axial et également suite à la collision avec les molécules environnantes à pression atmosphérique. Ceci conduit à la réduction de la taille des gouttelettes. Ces dernières devenant trop petites; une explosion coulombienne survient alors, lorsque la limite de Rayleigh est atteinte où le champ électrostatique devient plus grand que la tension de surface qui maintient l'intégrité des microgouttelettes. À ce moment des microgouttelettes constituées de molécules protonnées $[M+nH]^{n+}$ (le cas de ce projet) ou déprotonnées $[M-nH]^{n-}$ et porteuses de charges simples ou multiples sont libérées. Les ions gazeux ainsi produits sont ensuite transférés de la chambre d'ionisation à pression atmosphérique vers l'analyseur de masse où la pression est basse et est de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-7} Torr (vide poussé). Plusieurs paramètres peuvent influencer l'émission des gouttelettes, entre autres, la valeur du voltage appliqué, le débit de l'échantillon introduit et aussi le solvant utilisé. En effet, ces paramètres doivent être optimisés pour permettre la

meilleure ionisation des analytes et donc l'obtention d'un meilleur signal. Effectivement plus le débit de l'échantillon est grand, plus la désolvatation devient difficile ce qui va directement influencer le signal. Également, le pourcentage eau-solvant organique constituant la phase mobile est un paramètre important, car le pourcentage d'eau élevé au départ du gradient influence l'ionisation des analytes qui sont élués en premier sur la colonne analytique.

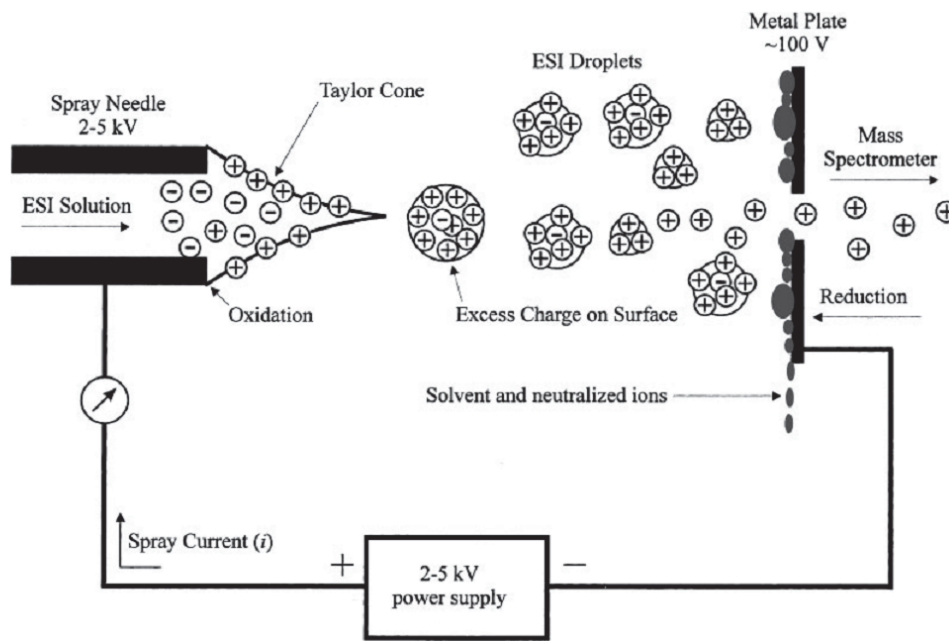


Figure 1.3.2: Source électro-nébulisation-ESI [72]

Le triple quadripôle QqQ proprement dit, est constitué de trois quadripôles placés en série qui sont sous forme de deux analyseurs de masses ou filtres de masses Q1 et Q3, séparés par q qui est sous forme d'une cellule de collision où a lieu la fragmentation des ions (**Figure1.3.3**).

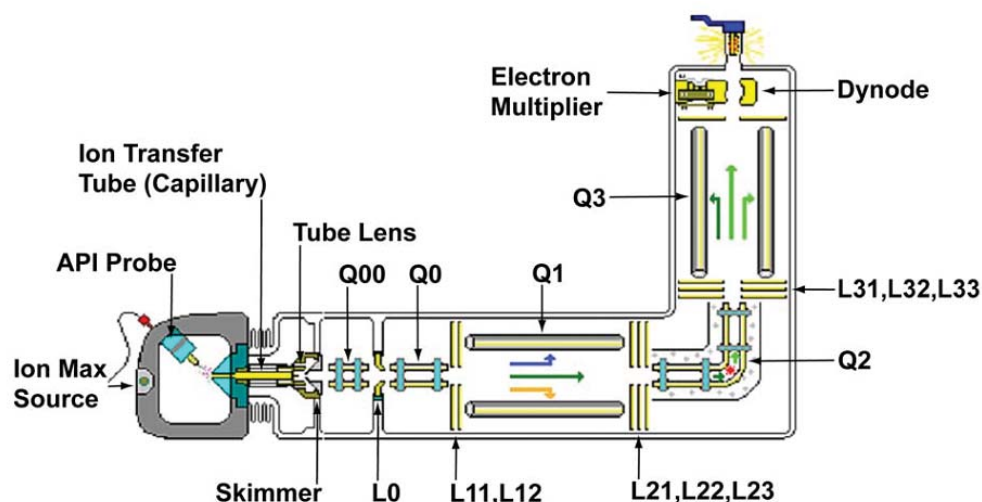


Figure 1.3.3: Triple quadripôle (TSQ-Quantum)-Guide de référence de Thermo

Le balayage d'ions fragments sélectionnés (SRM-*Selected Reaction Monitoring*) est l'un des différents types d'acquisition des ions possible par le triple quadripôle [73]. Ce mode a été utilisé pour l'analyse quantitative des molécules dans le cadre de ce projet. Les ions provenant de la source entrent dans Q1, les analytes d'intérêt appelés ions parents ou ions précurseurs sont sélectionnés selon la valeur de leurs rapports m/z , ils sont ensuite envoyés vers q où ils sont fragmentés par dissociation de collision induite (CID) à l'aide d'un gaz inerte, l'argon. En effet, à l'intérieur de q, les ions sont accélérés suite à l'application d'une différence de potentiel qui va induire des collisions entre les ions et le gaz; les ions fragments appelés ions fils sont alors générés. Ces derniers sont également filtrés à leur tour par l'analyseur Q3 selon leurs m/z et détectés par un photomultiplicateur. Une cascade d'électrons sont produits pour chaque ion qui frappe le détecteur induisant ainsi un courant qui est traduit par un signal d'intensité variable. Deux SRM ont été choisies

dans ce cas par composé. Il s'agit des fragments les plus intenses, donc la première SRM qui constitue le fragment le plus abondant a été utilisée pour la quantification et la deuxième SRM pour la confirmation (**Figure 1.3.4**).

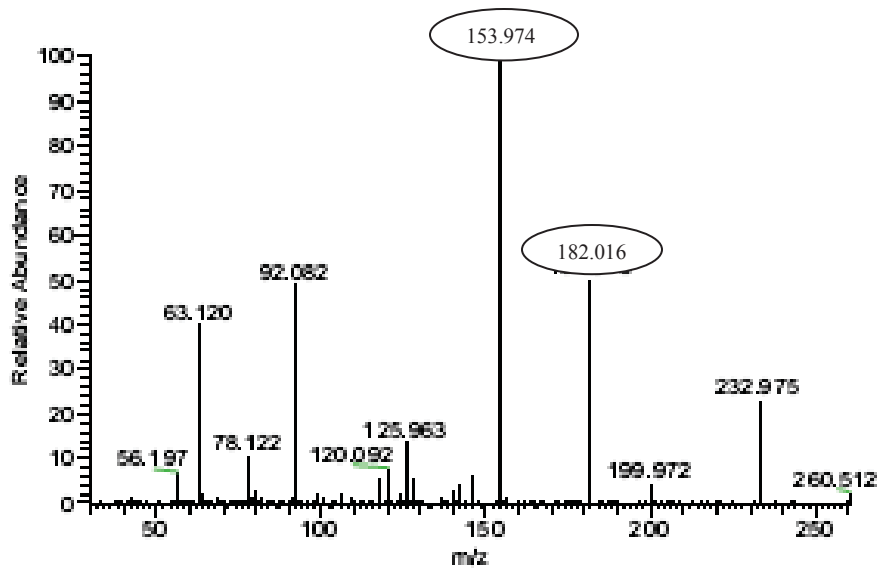


Figure 1.3.4: Exemple de scan d'ions fragments (IF)

Chapitre 2. Détermination des agents de chimiothérapie dans les eaux municipales utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem précédée d'une extraction sur phase solide-Développement validation de la méthode et analyses des échantillons réels

Note sur la réalisation des travaux de recherche

Ma contribution pour la réalisation de ce projet de maîtrise se résume comme suit: Revue de toute la littérature pertinente, réalisation de toutes les expériences au laboratoire, exploitation et interprétation des résultats, rédaction de tout l'article à part la partie sur le volume de fuite (2.2.7 *Breakthrough volume estimation*).

Mes co-auteurs ont contribué par la correction préliminaire de l'article, ont agi comme conseillers scientifiques et techniques, M. Pedro Segura a rédigé le paragraphe sur l'optimisation du volume de fuite (2.2.7 *Breakthrough volume estimation*).

Toute la bibliographie consultée et utilisée pour cet article a été intégrée dans la bibliographie globale de ce mémoire.

Determination of six chemotherapeutic agents in municipal wastewater using online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Farida W. Rabii^a, Paul B. Fayad^a, Pedro A. Segura^b, Sébastien Sauvé^a

^aDépartement de chimie, Université de Montréal, CP 6128, succ. Centre ville, Montréal, QC, H3C 3J7.

^bDepartment of Chemical Engineering, McGill University, 3610 University, Montréal, QC, H3A 2B2.

Keywords: Chemotherapy; cytotoxic agents; online solid phase extraction; LC-MS/MS; emerging contaminants; wastewater.

Abstract

Due to the importance of chemotherapeutic agents and their occurrence in the aquatic environment, an analytical method based on online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry was developed and validated. A 1 mL injection volume was used to quantify six of the most widely used cytotoxic drugs (cyclophosphamide, gemcitabine, ifosfamide, methotrexate, irinotecan and epirubicin) in municipal wastewater. The validation results in wastewater influent showed coefficients of determination (R^2) between 0.9831 and 0.9979 and intra-day precision ranging from 7 to 13% (expressed as relative standard deviation %RSD), and from 9 to 23% for inter-day precision. Limits of detection ranged from 4 to 20 ng L⁻¹ while recovery values were greater than 70% except for gemcitabine, which is the most hydrophilic compound in the selected group and showed a recovery of 47%. Matrix effects were interpreted by signal suppression and ranged from 55 to 118% with cyclophosphamide showing the highest value. Two of the target anticancer drugs (cyclophosphamide and methotrexate) were detected and quantified in wastewater (effluent and influent) in a range from 17 to 60 ng L⁻¹.

2.1. Introduction

In recent years, an increasing concern about the occurrence of pharmaceutical compounds in the environment was observed and pharmaceuticals have been identified as contaminants of emerging concern [1]. Different classes of drugs have been detected in wastewater treatment plant (WWTP) effluents, surface waters and groundwater as well as in drinking water [8, 11]. The high polarity and water solubility of the majority of these compounds make them less likely to be degraded or removed during the WWTP processes and more susceptible to reach the aquatic environment.

The number of cancer patients has increased during the last decades with the Canadian Cancer Society (CCS) reporting that the occurrence of many cancer types has increased by 2 to 7% per year in the decade spanning 1998-2007 [74]. The increased incidence of cancer most certainly increases anticancer drug consumption as chemotherapy is one of the most commonly used treatment option [75]. The development of cancer chemotherapy began in the 1940s and involved the use of alkylating agents which was a real success and opened the door for the development of a large number of anticancer drugs [75]. Chemotherapeutic agents, also called cytotoxic or antineoplastic agents are a group of compounds used to prevent or disrupt cell division. They are mainly used in hospitals and are administered for outpatients and inpatients [76]. According to the International Agency for Research on Cancer [19], anticancer drugs are toxic and some of them are carcinogenic as is the case of cyclophosphamide (CP). Therefore their presence in the aquatic environment could have a significant impact on human and ecological health. For this reason, it is important to develop analytical methods which allow their detection at low nanogram-per-liter concentrations. For this study, a group of six cytotoxic agents (cyclophosphamide, ifosfamide, methotrexate, gemcitabine, epirubicin and irinotecan) were chosen. Several reasons were considered in making this choice. First, the selected compounds are considered highly toxic and carcinogenic [19]. Second, these compounds are among the most used in chemotherapy protocols in

Quebec hospitals¹. Third, the presence of some of these compounds in the aquatic environment has already been demonstrated [8, 26, 29, 56]. Fourth, the selected cytotoxic drugs have different physico-chemical properties and chemical structures which make their analysis with a single method a daunting analytical and chromatographic challenge especially if one integrates automated pre-concentration.

To date, several studies using numerous analytical procedures have been carried out to identify and quantitate chemotherapeutic agents in water and biological matrices in different countries around the world. They often include the use of chromatography (liquid, LC or gas, GC) coupled to ultraviolet detection (UV) [77], fluorescence detection [31], mass spectrometry [45] and tandem mass spectrometry [49]. Pre-concentration and purifying processes such as a solid phase extraction (SPE) are necessary because of matrix complexity and low nanogram-per-liter levels at which they have been reported [46, 78]. Cyclophosphamide (CP) is one of the most widely used drugs in cancer treatment since it was introduced in the 1950s [20]. Its structural isomer, ifosfamide (IF), has emerged as an important alkylating agent since the 1970s [19]. They have both been found in hospital effluent samples by GC-MS analysis preceded by off-line solid phase extraction (SPE) at concentrations of 146 ng L⁻¹ and 24 ng L⁻¹ respectively [45]. Yin et al [30] developed a method based on off-line SPE coupled to ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for quantification for CP and IF in wastewaters in China. The limit of detection (LOD) varied from 0.5 ng L⁻¹ to 2.5 ng L⁻¹ in wastewater (influent and effluent) samples. Another study carried out in Spain [29] based on off-line solid phase extraction (SPE) and LC-MS/MS revealed a method detection limit (MDL) in the range of 1.3 ng L⁻¹ to 2.3 ng L⁻¹ in surface water, influent and effluent wastewater. The cytotoxic agents CP and IF were also studied and quantified in biological samples [22]. Given the importance of methotrexate (MTX), several studies have been conducted for its detection and quantification in different matrices (mostly biological for medical purposes). This was related in an earlier review that described more than 70 studies between 1975 and 2000 [48]. In a study realized in China [79], MTX was quantified in hospital effluents in a range

from 2 to 19 ng L⁻¹. Gemcitabine (GCA) is a cytotoxic recently used in chemotherapy [50], was quantified at concentrations varying from 2.4 ng L⁻¹ to 9.3 ng L⁻¹ in several water matrices and the reported MDL varied from 1.1 ng L⁻¹ to 1.7 ng L⁻¹ in different water matrices [29]. GCA has also been quantified in wipe samples used to monitor surface contamination in drug preparation and administration rooms at hospital in Italy [51]. Few studies have been published for epirubicin (EPI). Sottani et al [55] published a method for the quantification of EPI in urine samples based on off-line SPE and LC-MS/MS, the LOD was 40 ng L⁻¹. Furthermore, EPI has been quantified in effluent wastewater of the Vienna university Hospital (Austria) [31], the results obtained over a time period of one month indicated a range of EPI between 100 ng L⁻¹ and 1400 ng L⁻¹. Irinotecan (CPT-11) was studied but not detected in water as shown in the study achieved by Martin et al [29], the method limits of detection (MDL) were between 0.9 and 1.1 ng L⁻¹ in different water matrices. Another study was performed for the determination of CPT-11 in human blood using LC combined with fluorescence detection [57].

From the literature review, the LC-MS/MS preceded by an off-line SPE was the preferred technique used for the detection and quantification of chemotherapeutic agents in different matrices. Recently, several methods have included the use of online pre-concentration methods coupled to LC-MS/MS for the analysis of endocrine disrupters [80], pharmaceutical compounds and pesticides in water matrices [71, 81, 82]. Both methods of SPE (off-line and online) follow the same steps and are governed by the same principles. The difference is that the off-line SPE is a sample preparation step completely independent of the analytical chromatographic separation and quantitation. The published literature reviews [65, 70, 83] confirm that the online SPE is one of the most robust and promising techniques for a rapid extraction for pharmaceuticals to analyze in environmental matrices. Effectively, the online SPE coupled to LC allows high sensitivity and performance while showing a good reproducibility [70]. The use of standard additions is usually considered lengthy and painful when combined with labor-intensive manual SPE but becomes easier when used with an automated online SPE.

Online SPE also lowers sample volume, limits sample loss and reduces the possibility of contamination compared to traditional off-line SPE methods that require several manipulation steps and much more human resources. However, a key SPE problem remains the optimization of conditions of this technique. Using this approach for chemotherapeutic agents presents some significant challenges. First, those compounds are usually very hydrophilic and the selected group combine hydrophobicity characteristics (evaluated using the water-octanol partition coefficient- K_{ow}), varying from $\log K_{ow} = -1.85$ for MTX to $\log K_{ow} = 4.37$ for CPT-11. Second, hydrophilic compounds such as a GCA are poorly retained by conventional reversed phase columns (such as C_{18}) and require alternative stationary phases. Third, unlike off-line SPE, the optimization of the nature and percentage of solvents required for desorption (from SPE column towards analytical column) must be compatible with the MS source and must lead for a quantitative desorption since a nonquantitative desorption of compounds leads to a decrease of the signal and greatly affects the reproducibility [70] and fourth, using different stationary phases between the SPE and the analytical columns could increase peak broadening and require further optimizations [65].

The majority of methods developed for the analysis of chemotherapeutic agents focus on only a limited number of compounds, but a single method including several cytotoxic drugs is relevant and needed. Furthermore all published methods were based on off-line SPE, the only published studies on chemotherapeutic agents that used online SPE were the multi-residue methods of Garcia et al [26, 84] in which the authors included two of these compounds i.e. CP and MTX. The objective of this study was to develop a sensitive, rapid and reliable analytical using online SPE coupled to LC-MS/MS for the analysis of the six selected cytotoxic drugs with different physico-chemical structures and properties in wastewater matrices. Online SPE optimization (nature of sorbents, breakthrough volume and loading flow rate) and method validation will be presented.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Materials and Chemicals

HPLC grade water (H₂O), 0.1% formic acid in H₂O (0.1% F.A in H₂O), acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were purchased from Fisher scientific (Fair Lawn, NJ, USA). HPLC grade formic acid (F.A) (98% pure) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Cyclophosphamide (**CP**) (97-100%), ifosfamide (**IF**) ($\geq 98\%$), gemcitabine (**GCA**) (≥ 98), methotrexate (**MTX**) ($\geq 98\%$), irinotecan (**CPT-11**) ($\geq 97\%$) and epirubicin (**EPI**) ($\geq 90\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Atrazine-¹³C (**ATZ**) used as internal standard (IS) was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The chemical structures and the physico-chemical properties for the target anticancer drugs are shown in Table 1. Stock solutions (1000 mg L⁻¹) of each compound were prepared by dissolving the corresponding pure powder in an appropriate solvent MeOH for CP, IF, GCA, CPT-11, EPI and 1% formic acid in H₂O-MeOH 3:7 for MTX. All stock solutions were stored at -20°C.

2.2.2. Instrumentation

LC-MS/MS analysis for wastewater samples was achieved using the Environmental Quantification (EQuan) system supplied by Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA). The setup consisted of two quaternary pumps: one for sample loading into SPE column (Accela 1200, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) and the other for sample elution and separation on the analytical column (Accela 600, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), a HTC thermopal autosampler manufactured by CTC analytics AG (Zwingen, Switzerland) for loading samples into a 1 mL loop, two columns (a SPE online column and an analytical column for chromatographic separation) and a TSQ Quantum Ultra AM triple quadrupole mass spectrometer for detection. The online SPE column was a Hypersil Gold PFP (20 x 2.0mm, 12 μ m particle size) and the analytical column was also a Hypersil Gold PFP (100 x 2.1mm, 3 μ m) which was preceded by a guard cartridge (10 x 2.1mm, 3 μ m) of the same packing material. All columns were manufactured by Thermo Fisher Scientific. An

SPE reversed phase styrene divinylbenzene copolymer Strata-X (20 x 2.0mm, 28 μ m) from Phenomenex was also used and compared to the PFP column in order to optimize the breakthrough volume.

2.2.3. Samples collection and preparation

Samples were taken at several physico-chemical wastewater treatment plants (WWTPs) in the Montreal area (Quebec, Canada). Influent and effluent samples were collected in clean amber glass bottles and were immediately transported to the laboratory. In WWTP-A grab samples were collected in two different days, while in WWTP-B a grab sample and a 24-h composite sample were taken the same day. For WWTP-C only an effluent grab sample was collected. All samples were kept at 4 °C for less than 24h before preparation and analysis. To remove suspended particles, samples (0.5 L) were vacuum-filtered through 1.2 μ m, then 0.8 μ m and finally through 0.45 μ m pore size, nitrocellulose membranes. Samples were acidified by adding 0.1% formic acid and then were spiked with the corresponding IS for a final concentration of 150 ng L⁻¹. The samples were then transferred to 10 mL amber glass vials for online SPE-LC-MS/MS analysis.

2.2.4. Online SPE and LC parameters

The online SPE process takes place in three steps. First the 1 mL loop was filled with 2 mL of the sample using a 2.5 mL dispenser syringe. A volume exceeding than maximum capacity of the loop was used in order to reduce the dilution effect of the sample inside the loop. Therefore a 2 mL fill up ensures the presence of only the sample inside the loop; this was reflected by a signal improvement observed during the method development after several assays. After the loop was filled, the 1 mL of sample was introduced into the SPE column (Hypersil Gold PFP) with the load pump using the conditioning solution (0.1% F.A in H₂O) at a flow rate of 1000 μ L min⁻¹. Once the sample was loaded onto the SPE column, the divert valve of the column switching array was actuated at 1.15 min and the target analytes were back-flushed into the analytical column where the separation takes place using the LC mobile

phase A (0.1% F.A in H₂O) and B (0.1% F.A in ACN:MeOH, 50:50 v/v) delivered by the analytical pump at a flow rate of 350 $\mu\text{L min}^{-1}$. The back-flushing helps to avoid peak broadening [65] and allows the elution of strongly retained analytes at the head of the column. The chromatographic separation was achieved at 45°C in order to improve the peak shape and also reduce the total run time. The elution started at 30% of eluent B followed by a linear gradient to 80% of B in 7 min which was maintained for 0.5 min. The column was then equilibrated during 3.4 min at the initial elution conditions. In order to eliminate carry over, the wash of the syringe and the injection valve was programmed before each injection, first with an organic solution of 0.1% F.A in ACN:MeOH, 50:50 v/v and then with 0.1% F.A in H₂O. All the SPE online procedures are fully automated and the total run time per sample was 11 min. All chromatographic conditions are summarized in **Table S1**.

2.2.5. Mass spectrometry parameters

In order to optimize all the MS parameters, a standard solution (1 mg L⁻¹) of each analyte and the IS was infused directly into the mass spectrometer. Electrospray ionization (ESI) was performed in the positive mode using a spray voltage of 4.5 kV; the sheath gas (N₂) was set to 50 arbitrary units and the auxiliary gas (N₂) to 35 arbitrary units. The ion transfer tube temperature was set to 400 °C and the skimmer offset to 0 V. The TSQ Quantum ultra AM triple quadrupole was operated in selected reaction monitoring (SRM) mode at unit resolution (FWHM: 0.7 u). Collision energies were optimized to get the maximum intensity for each SRM. Two SRM transitions were selected for identification but only the most intense (SRM#1) was used for quantification. The second most abundant transition (SRM#2) was used for confirmation along with the chromatographic retention time of each compound as compared to those from reference standards. Individual parameters for each analyte and IS are summarized in **Table S2**.

2.2.6. Method validation

Method validation was achieved using two types of calibration, first an internal calibration done in deionized water (d-H₂O); then we used a calibration using IS and standard additions in wastewater influent (raw sewage). Calibration solutions of the target compounds of 0,15, 25, 50, 75, 100, 150 and 300 ng L⁻¹ were prepared by dilution of a mixed working solution of 500 µg L⁻¹. Formic acid (0.1%, v/v) and IS (150 ng L⁻¹) were added to all samples. The IS was used to reduce method variability and so allows to improve method precision. The use of atrazine as an internal standard is justified by the lack of standards labelled with stable isotopes that could fit this set of cytotoxic agents. Moreover atrazine gave the good results when used in the multi-residue method developed by Garcia et al [59] and which contains two of the cytotoxic agents studied in this project while the standard additions method was used to compensate for matrix effects and to determine the limits of detection, quantification and precision values according to the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) [85]. The limits of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were calculated using the following equations:

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S} \quad \text{Eq. (2)}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Eq. (3)}$$

Where σ is the standard error of the intercept and S is the slope of the standard additions calibration curve.

Intra-day and inter-day precisions were determined for a concentration of 80 ng L⁻¹ of cytotoxic compounds spiked in d-H₂O and wastewater influent. Intra-day precision was calculated as the relative standard deviation in percentage (RSD %) of the peak area ratio of the cytotoxic compounds to the IS (n=5). The inter-day precision was determined by combining the results of this process over three consecutive days (n=10).

Matrix effects (n=5) were determined by comparing mean peak areas of the cytotoxic compounds spiked (80 ng L⁻¹) in d-H₂O with those of the cytotoxic compounds spiked in wastewater influent samples (*WW_s*) after correcting for the peak area of the standard in the unspiked matrix (*WW_{ns}*) and were reported as percentages:

$$\text{Matrix effects}\% = \left(\frac{WW_s - WW_{ns}}{d-H_2O} \right) 100\% \quad \text{Eq. (4)}$$

A value of 100% indicates that there is no absolute matrix effect. While values below 100% indicate ion suppression and values above 100% represent ion enhancement [86].

Recoveries were determined from the same procedure as matrix effects, the results were expressed using the equation below:

$$\text{Recovery}(\%) = \left(\frac{C_{sm} - C_m}{C_s} \right) 100\% \quad \text{Eq. (5)}$$

Where C_{sm} is the measured concentration of the analyte in the spiked matrices, C_m is the original concentration of the analyte in the matrices and C_s is the concentration spiked in the matrices.

2.2.7. Breakthrough volume estimation

In order to rapidly compare the two online SPE columns, their breakthrough volumes were estimated using a graphical extrapolation method, described elsewhere [84]. Briefly, 25 μL injections of a 500 ngL⁻¹ standard mix solution were used and the analytes were eluted isocratically from the online SPE column (for this setup no divert valve was used and the online SPE column is connected directly to the ion source). Different combinations of solvents A (0.1 % F.A. in H₂O) and B (MeOH) were tested in triplicate starting from 10 % B and increased in steps of 10% up to 90 % B. The retention times of each analyte in the different isocratic elution conditions were then used to calculate the logarithm of the capacity factors ($\log k'$), which were

then plotted as a function of the volume fraction (ϕ) of MeOH in the mobile phase (**Figure S1**). The y-axis intercept of this graph is used to calculate k'_w , the capacity factor of the analyte when the mobile phase is 100% aqueous [84]. Finally the estimated breakthrough volume (V'_b) is estimated using the following equation:

$$V'_b = V_m(k'_w + 1) \quad \text{Eq. (6)}$$

Where V_m is the void volume of the column.

2.3. Results and discussion

2.3.1. LC optimization

A chromatographic separation taking 11 min (**Figure 2.1**) for the six cytotoxic drugs was achieved using a PFP column which allowed baseline separation for all analytes except for the structural isomers CP and IF that could not be separated. These two compounds differ only on the position of the two chloroethyl groups which in CP are bonded to the same nitrogen atom while in IF they are bonded to different nitrogen atoms (**Table 2.1**). This structural difference results in different fragmentation patterns which allow us to differentiate them by MS/MS. Two online SPE cartridges were tested with the analytical PFP column to provide the best combination of recovery values, breakthrough volumes and peak shapes. It was first attempted to use a Strata-X SPE column because it gave better breakthrough volume results (**Table 2.2**) but it was later decided to use the PFP SPE online column instead, due to peak broadening observed for the target compounds with the Strata-X SPE column (e.g CPT-11 had a width at 10% of the peak height (w_{10}) of 0.57 min). Peak broadening was possibly caused by the incompatibility between the two stationary phases. The online PFP SPE column coupled with the PFP analytical column resulted in a much improved chromatography, with relatively narrower (w_{10} was between 0.21 and 0.24 min) and symmetrical peaks (asymmetry factor (A_s) was between 1.16 and 1.55 for all target analytes). Several tests (results not shown) were conducted for the optimization of the mobile phase used for desorption and chromatographic separation. We found that a solution of ACN:MeOH, 50:50, v/v was the best mix which gave adequate desorption for most of the compounds and good separation. To

increase the ionization in ESI (+) and improve peak shapes we added 0.1% of formic acid to the mobile phases A and B.

It was observed that in the majority of published methods for the analysis of chemotherapeutic agents in water matrices, C₁₈ analytical columns were the most frequently used [29-31, 78]. In order to improve the retention of the more hydrophilic compound, a PFP analytical column was used, given that this column provides alternative selectivity particularly for halogenated and substituted aromatics when compared to C₁₈. This could be explained by the presence of the carbon-fluorine bond on the PFP which is more polar than the carbon-hydrogen bond and which enhances the retention of the analytes by forming electrostatic bonding (hydrogen bond). Furthermore, the presence of the aromatic rings on the PFP phase result in π - π interactions with the aromatic rings of the analytes, further increasing their retention.

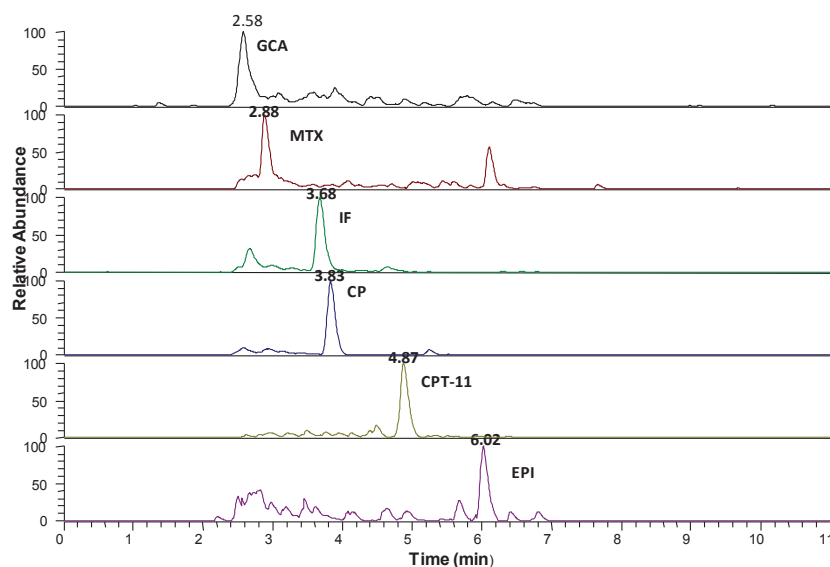


Figure 2.1 LC-MS/MS chromatogram in SRM mode of the selected compounds spiked at 75 ng L⁻¹ in influent wastewater.

Table 2.1 Physico-chemical properties and molecular structures of cytotoxic agents

Compounds	Structures	MW/g.mol ⁻¹	pKa	LogK _{ow}
Cylophosphamide C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P (CP)		261.086	2.84 [22] 4.5-6.5 [23]	0.6 [21]
Gemcitabine C ₉ H ₁₁ F ₂ N ₃ O ₄ (GCA)		263.198	3.6 [24]	-1.24 [25]
Ifosfamide C ₇ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O ₂ P (IF)		261.086	1.54 [22]	0.86 [21]
Methotrexate C ₂₀ H ₂₂ N ₈ O ₅ (MTX)		454.439	4.7 [21] 4.8-5.4 [26]	-1.85 [21]
Irinotecan C ₃₃ H ₃₈ N ₄ O ₆ (CPT-11)		586.678	N.A	4.37 [27]
Epirubicin C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁ (EPI)		543.519	8.08 [28] 7.7 [22]	1.85 [21]

Mw: Molecular weight

Table 2.2 Estimated breakthrough volumes for the two SPE columns tested.

Compounds	Columns					
	Hypersil Gold PFP			Strata-X		
	V' _b (mL)	Error (%)	R ²	V' _b (mL)	Error (%)	R ²
GCA	0.3	5	0.9823	0.3	6	0.8021
MTX	2.8	32	0.9784	2.0	40	0.9444
IF	1.4	20	0.9923	35.5	93	0.9773
CP	2	22	0.9926	68.7	98	0.9807
CPT-11	334	142	0.9807	17.8	51	0.9974
EPI	800	27	0.9995	NA	NA	NA

NA: Not available

2.3.2. Online SPE optimization

To enable the best sensitivity of the target compounds, two parameters were optimized during the pre-concentration step: the breakthrough volume and load flow rate.

2.3.2.1. Breakthrough volume estimation

The estimation of the breakthrough volume (V'_b) allows us to calculate the maximum volume of sample that could be percolated through the SPE column without any losses of compounds and therefore get the maximum detector response for the target analytes and improved LODs. Results shown in **Table 2.2** indicate that overall, the Strata-X SPE column gave higher V'_b values than PFP, however their errors were also high (> 50 %). The retention was so strong in the Strata-X column that for EPI, the breakthrough volume estimation was impossible to perform due to the lack of enough experimental points (peaks were observed only with 60-90% of MeOH in the mobile phase). This was mainly due to the high retention of this column which means that the maximum % MeOH in the mobile phase that could elute most of the analytes was > 50%. Extrapolation to the y-axis induces a considerable amount of uncertainty compared to V'_b values obtained with the PFP column, which had lower retention capacity. Unfortunately, the Strata-X column did not seem to be compatible with the PFP column since broad peaks were observed. It was decided to

choose PFP, because when coupled online with the analytical PFP column it resulted in better peak shape and no significant peak broadening was observed.

Table 2.2 also shows that injection volumes > 3 mL should not be used with the PFP online SPE column since significant losses would be observed for GCA, MTX, IF and CP. Therefore we decided to use injections of 1 mL in order to have optimal sensitivity for most of the compounds and limit losses of GCA.

To summarize the results, Strata-X appears to be a better online SPE column for the target analytes; however this column did not give a good chromatography when used online. On the other hand, the PFP column seems to be a good option since no breakthrough should be observed for 1 mL injections for the target analytes except for GCA.

2.3.2.2. Load flow rate

The second parameter to consider was the load flow rate. In order to evaluate the flow rate that yields the highest signal, an experiment was performed by varying the flow rate ($500 \mu\text{L min}^{-1}$, $800 \mu\text{L min}^{-1}$, $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ and $1500 \mu\text{L min}^{-1}$) while keeping the load volume (1 mL) and the concentration (500 ng L^{-1}) constant, then measuring the peak areas for each compound. Results shown in **Figure 2.2** indicate that at higher flow rate, the analyte response increases significantly for all the compounds, with the exception of GCA whose response decreases. A possible explanation is that low flow rates allow these compounds to penetrate deeper into the stationary phase and therefore they are more strongly retained, consequently, this leads to a nonquantitative desorption during the elution step. Previous authors [71] interpreted this same observation as a consequence of deconditioning of the stationary phase. The authors argued that high amount of H_2O at low flow rates in the SPE column could cause a collapse of the C_{18} chains resulting in low retention. GCA is the compound with the lowest affinity towards the stationary phase and increased flow rate accelerates its desorption which in turn leads to a decrease in signal. It was

decided to use $1000 \mu\text{L min}^{-1}$ as load flow rate for all subsequent analysis since it was good compromise for all compounds.

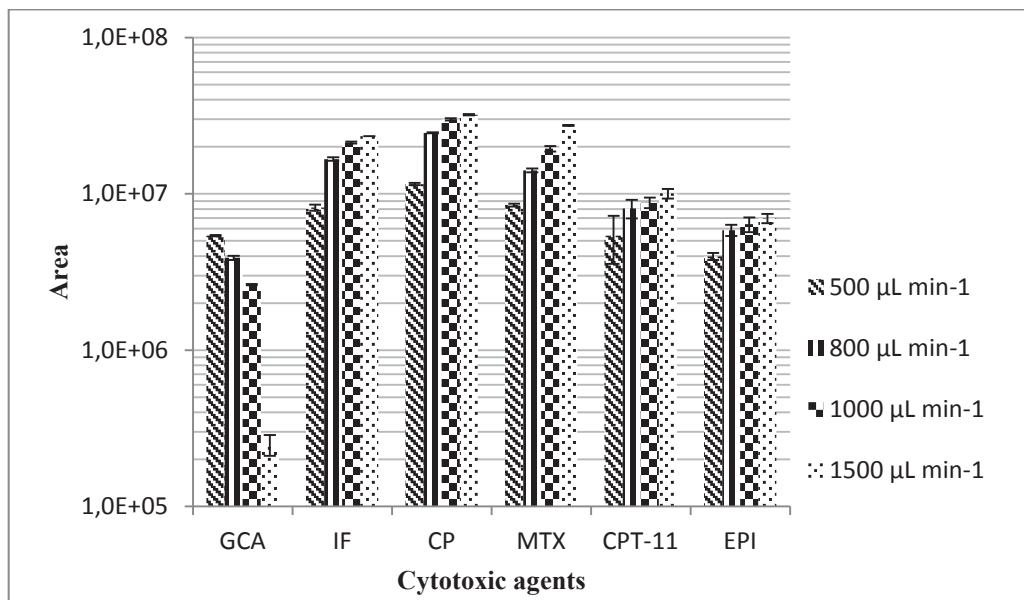


Figure 2.2 Experimental determination of the effect of variation of the flow rate on analysis response area achieved with 0.5 ng of the cytotoxic agents (n=3) in $\text{d-H}_2\text{O}$.

2.3.3. Method validation

The optimized method was validated using wastewater influent (raw sewage). Standard addition was the calibration method chosen in order to minimize or eliminate matrix effects and to quantify compounds. Also an IS was used to correct for the signal distortion. Validation results are summarized in **Table 2.3**. It can be observed that the coefficients of determination (R^2) for the calibration curves were within an acceptable range for all the compounds (0.9831-0.9979). Intra-day precision (n=5) expressed in terms of RSD % was in the range of 7 to 13% and the inter-day precision (n=10) was less than 20% except for GCA which gave a value of 23%. The limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) ranged from 4 to 20 ng L^{-1} and from 13 to 60 ng L^{-1} respectively (with GCA showing the highest value). The values obtained are comparable to those in the previously published

methods, Garcia et al [26] using LC-MS/MS, online SPE and 1 mL of sample, reported limits of detection for CP and MTX of 5 and 11 ng L⁻¹ in influent wastewater. Other authors [30] reported (LOD) of 2.5 ng L⁻¹ for IF in wastewater influent using LC-MS/MS and off-line SPE and using 500 mL of sample. In the study conducted by Martin et al [29] using LC-MS-MS, off-line SPE and 250 mL of sample in the analysis of wastewater influent, the authors reported lower (MDL) values, with 3.8 ng L⁻¹ for EPI, 1.4 ng L⁻¹ for GCA and 1.1 ng L⁻¹ for CPT-11.

Recovery (R) values achieved for the majority of analytes were greater than 70%, except for GCA with a value of 45%. This could result from its high hydrophilic character which led to poor retention on a column such as PFP. It is known that ESI often leads to higher matrix effects compared to other sources due to co-eluting matrix constituents [87, 88]. The evaluation of matrix effects (ME) is also subjected to the complexity of the samples [26, 29] and is compound-dependent. The use of stable isotope labelled drugs as IS and standard additions have been highly recommended to reduce matrix effects [89]. Otherwise, results showed that matrix effects obtained ranged from 55 to 118%. These interferences were interpreted as signal suppression rather than signal enhancement and the most affected compound was GCA, the least retained analyte. MTX and CP were the analytes with the highest matrix effects (118% and 117%).

Table 2.3 Analytical performances of the SPE-LC-ESI-MS/MS method.

Compounds	R ²	Effluent wastewater						
		D-R ng/L	%RSD		LOD ng/L	LOQ ng/L	%R (n=5)	%ME (n=5)
			Intra-Day (n=5)	Inter-Day (n=10)				
GCA	0.9831	20-300	13	23	20	60	47±22	55 ± 10
MTX	0.9899	12-300	11	12	12	37	73±11	118 ±12
IF	0.9976	4-300	9	17	4	14	82 ± 9	80 ± 14
CP	0.9979	4-300	7	9	4	13	85±16	117 ±16
CPT-11	0.9965	6-300	11	10	6	19	90±10	65 ± 9
EPI	0.9838	18-300	11	18	18	54	73±14	78 ± 23

(%R): Recovery; (%ME): Matrix effects; (D-R): Dynamic range

2.3.4. Analysis of wastewater influent and effluent

The developed method was evaluated for the analysis of nine wastewater samples (influent and effluent) taken from three wastewater treatment plants (WWTPs) in the Montreal (Quebec, Canada) area. Results are summarized in **Table 2.4**. Two out of six (CP and MTX) cytotoxic drugs studied were detected (**Figure 2.3**); concentration levels of CP ranged from 17 to 22 ng L⁻¹, and as expected, there was no significant difference between concentration levels in influent and effluent samples of WWTP-A. This confirms the results of previous studies [33, 45, 78] in which no degradation of CP was observed. Surprisingly, the same concentration of CP was similar despite different weather conditions during the first (rainfall = 7 mm) and second (rainfall = 23 mm) sampling days. Therefore, the only way to explain the similarities between the two results for CP would be a variation between consumption on the sampling days or possibly an artefact from variations due to time of sampling (samples were collected in the mornings). It is known that not only the parent molecules are of importance but also metabolites and transformation products, but in this study we just focused in the quantification of parent molecules. MTX was found in most of samples analysed at concentrations levels between 17 and 60 ng L⁻¹. No significant difference was observed between influent and effluent, despite some authors reporting the biodegradation of MTX within seven days [78]. A possible explanation may be the type of wastewater treatment conditions (physico-chemical)

with a low residence time in the treatment plant (< 3 hours), not long enough to allow the degradation of MTX. The concentration was different between the first and the second sampling days, it would be surprising that this would be a change in consumption but rather reflects an increased dilution of the compounds when subjected to higher rainfall.

Concentrations of the two anticancer drugs found in aquatic environment in several countries are different and could possibly depend on different factors, including the number of patients requiring administration of those drugs, the amount of the drug administered which may vary from patient to patient and also the amount of water consumed which could contribute to the dilution of the drug in the wastewater system. CP was detected in influent and effluent wastewater in Zurich (Switzerland) [90] at concentration of 11 and 10 ng L⁻¹ respectively. CP was also quantified in influent wastewater in Germany [33] in concentration ranging from 7 to 143 ng L⁻¹. Castiliogni et al [91] reported a concentration of 12.5 ng L⁻¹ in effluent waster in Italy. MTX was also quantified in range from 1.6 to 18 ng L⁻¹ in influent wastewater in China [30].

Table 2.4 Cytotoxic agent concentrations measured in different influents and effluents.

Compounds	WWTP-A		WWTP-A (3 weeks after)		WWTP-B		WWTP-B (1 day after)		WWTP-C	
	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.	Inf.	Eff.
GCA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MTX	60 ± 4	53 ± 15	20 ± 4	< LOD	<i>17 ± 3</i>	20 ± 5	20 ± 5	22 ± 9	ND	ND
IF	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CP	17 ± 3	21 ± 4	22 ± 2	18 ± 1	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
CPT-11	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EPI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Values in italics were > LOD but < LOQ; ND: Not detected. Values identified as < LOD show measurable SRM transition but the quantification results were below the calculated LOD. ND results showed no measurable SRM transition

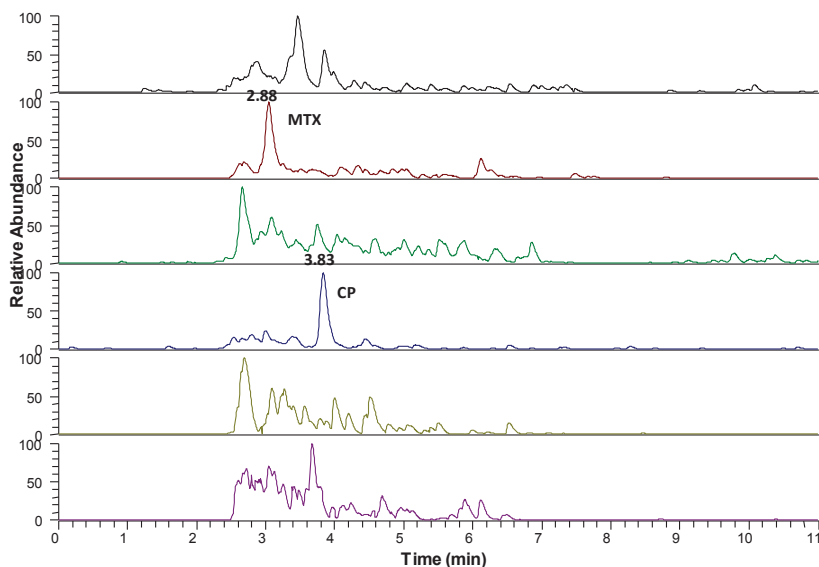


Figure 2.3 LC-MS/MS chromatogram in SRM mode of the detected compounds (not spiked) in a real effluent wastewater (WWTP-A).

2.4. Conclusion

Chemotherapeutic agents are among the contaminants of emerging concern that must be monitored in environmental waters given their cytotoxicity and carcinogenic character. A sensitive, rapid and completely automated method was developed for their quantification in wastewater, which includes six cytotoxic drugs among the most commonly used in Quebec (Canada), with a broad range of hydrophobicity and different chemical structures. Using a PFP column and online SPE-LC-ESI-MS/MS setup with only 1 ml of sample, two (cyclophosphamide and methotrexate) of the six cytotoxic drugs studied in real samples (influent and effluent) were observed and quantified in a range from 17 to 60 ngL⁻¹. It was a particular challenge to combine compounds with such chemistries using a single completely automated setup. Further work on chemotherapeutic agents should focus on the integration of 5-Fluorouracil, the most important chemotherapeutic agent used in Quebec (Canada), which had to be removed from this multi-residue method because it could not be efficiently retained on the PFP column.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and the Canada Foundation for Innovation (equipment). We also thank the staff of the Industrial Chair of Drinking Water and Environnement Canada for their help with sample collection. We also thank Professor Marius D'Amboise and Khadija Aboulfadl for their comments and fruitful discussions.

Supplementary material

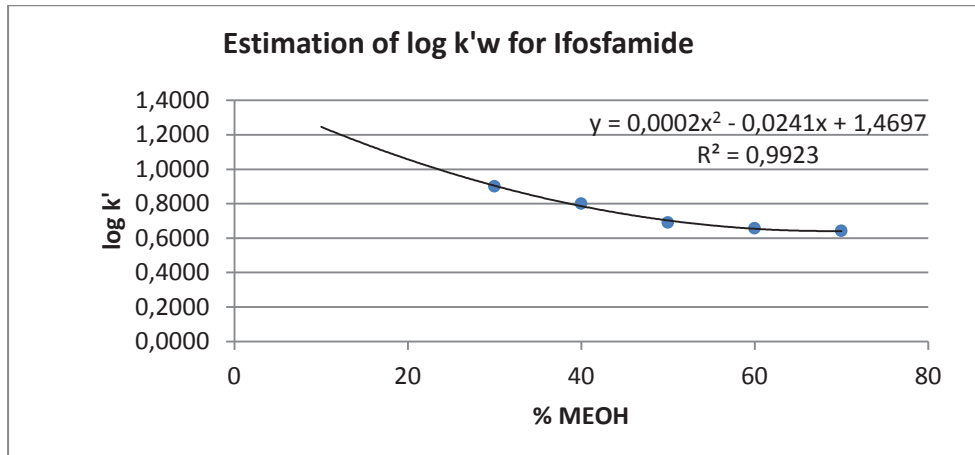


Figure S1 Example of curves for determination of breakthrough volumes with PFP column.

Table S1 Load and analytical pumps program.

Time (min)	Load pump			Analytical pump		
	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow rate ($\mu\text{L min}^{-1}$)	Solvent A (%)	Solvent B (%)	Flow rate ($\mu\text{L min}^{-1}$)
0.00	100		1000	70	30	350
1.15	100		1000	70	30	350
1.20		100	1000	20	80	350
7.00		100	1000	20	80	350
7.50		100	1000	20	80	350
9.50	100		1000	70	30	350
11.00	100		1000	70	30	350

Table S2 LC-MS-MS acquisition parameters for the six cytotoxic agents and the internal standard (IS).

Compounds	Precursor ion (m/z)	SRM#1 (m/z)	CE (eV)	SRM#2 (m/z)	CE (eV)	Tube lens (V)
Gemcitabine (GCA)	264	112	18	95	41	131
Methotrexate (MTX)	455	308	20	175	36	167
Ifosfamide (IF)	261	154	21	182	17	131
Cyclophosphamide(CP)	261	140	22	233	18	118
Irinotecan (CPT-11)	587	124	33	167	40	202
Epirubicin (EPI)	544	361	28	397	13	215
Atrazine (ATZ)	219	177	17	70	31	126

Chapitre 3. Conclusion

Les premiers agents de chimiothérapie découverts, ont été les agents alkylants durant les années 1940 [75], ils ont été les précurseurs dans le traitement du cancer par chimiothérapie. Suite à cela d'autres molécules ont été synthétisées et utilisées pour le traitement des différents cancers. Cependant si ses molécules restent efficaces quant à leur utilisation dans le traitement de certains cancers, elles demeurent très toxiques et certaines sont même cancérigènes d'après « *International Agency for Research on Cancer* » [19]. Ce qui leur confère le titre de contaminant à caractère émergent, une fois retrouvées dans l'environnement aquatique.

Suite à la revue de littérature effectuée, il a été constaté que plusieurs études ont été conduites dans le but de détecter et de quantifier les agents de chimiothérapie dans plusieurs matrices, mais ce qui est à relever, est que ces études ont été plus axées sur les matrices biologiques que sur les échantillons environnementaux. Donc peu d'études ont été réalisées pour l'analyse de traces de ces contaminants dans l'environnement aquatique. L'analyse de ces composés dans les eaux de rejets des hôpitaux, eaux usées municipales ou de surface, a démontré leur présence à des concentrations de l'ordre de nano-gramme par litre. Le but de ce projet de maîtrise est de présenter une nouvelle méthode d'analyse de traces de ces contaminants en utilisant la LC-MS/MS couplée à la SPE automatisée, une nouvelle méthode rapide (11 min), utilisant un volume d'injection de 1 mL et regroupant six agents cytotoxiques de structures et propriétés physico-chimiques différentes. Cette méthode constitue à ma connaissance la seule qui regroupe plus de deux agents cytotoxiques et qui utilise la SPE en ligne après les deux méthodes multi-résidus proposées par Garcia et al [26, 59] qui ont analysé deux de ces molécules. Les tests d'optimisation réalisés ont permis de comparer deux types de colonnes de charge. Les résultats ont démontré de meilleurs volumes de fuite avec la colonne du type copolymère de

divinylbenzène « *styrene divinylbenzene copolymer* », Strata-X que celle du type pentafluoro-phényle « *pentafluoro-phenyl* », PFP. Mais une fois couplée en ligne l'incompatibilité de la colonne analytique PFP avec la colonne de charge Strata-X s'est manifestée par l'apparition de pics élargies, ce qui m'a poussé à utiliser la colonne de charge PFP pour la méthode finale. La méthode des ajouts dosés avec l'utilisation d'un standard interne (IS) a été utilisée pour la validation de la méthode dans une matrice d'eau usée municipale non traitée. Les LOD varient de 4 à 20 ng L⁻¹. Deux des composés étudiés, en l'occurrence la cyclophosphamide et le méthotrexate, ont été détectés et quantifiés dans plusieurs échantillons d'affluent et d'effluent, les concentrations varient entre 17 et 60 ng L⁻¹.

Beaucoup de difficultés ont été rencontrées quant à l'optimisation de ces composés vu le caractère très hydrophile de certains et vu que l'éventail d'hydrophobicité exprimé en terme de constante de partition entre l'octanol et l'eau ($\text{Log}K_{o-w}$) qui varie de -1.85 à 4.37. Le défi pour ces molécules est en fait la pré-concentration. Le 5-Fu qui est le composé le plus consommé au Québec¹ a été considéré dans cette étude mais a été finalement écarté car sa rétention était faible sur une colonne comme la PFP (donc difficile à pré-concentrer) et comme il s'ionise en mode négatif, il était très difficile de le séparer de la gemcitabine.

Les travaux futurs devront se concentrer essentiellement sur l'intégration du 5-Fu au groupe de molécules déjà étudiées en essayant d'utiliser d'autres phases stationnaires pour avoir une meilleure rétention de ce dernier, ou encore de tenter de développer une méthode dédiée uniquement pour le 5-Fu et ses métabolites, en sachant que le taux de métabolisation de ce composé varie de 10 à 50% [43, 44], aussi d'autres travaux pourraient viser l'amélioration de la présente méthode en diminuant le temps de l'analyse et/ou en augmentant le volume d'injection en utilisant d'autres phases stationnaires. La quantification des ces composés dans les rejets d'hôpitaux en utilisant la méthode développée dans ce projet de maîtrise, serait

également une option à envisager dans le but de constituer une base de données pour mieux évaluer les risques pour l'environnement et la santé humaine causés par les rejets de composés utilisés en chimiothérapie.

Bibliographie

1. Daughton, C.G. and T.A. Ternes, *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?* Environmental Health Perspectives, 1999. **107**: p. 907-938.
2. Beausse, J., *Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances*. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(10-11): p. 753-761.
3. Halling-Sørensen, B., et al., *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review*. Chemosphere, 1998. **36**(2): p. 357-393.
4. Meyer, M.T., et al., *Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry*. Science of the Total Environment, 2000. **248**(2-3): p. 181-187.
5. Kümmerer, K., *Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review*. Chemosphere, 2001. **45**(6-7): p. 957-969.
6. Erickson, B.E., *Analyzing the Ignored Environmental Contaminants*. Environmental Science and Technology, 2002. **36**(7): p. 140A-145A.
7. Brooks, B.W., et al., *Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005. **24**(2): p. 464-469.
8. Kümmerer, K., *Pharmaceuticals in the Environment – A Brief Summary*, in *Pharmaceuticals in the Environment*, K. Kümmerer, Editor. 2008, Springer Berlin Heidelberg. p. 3-21.
9. Thomas A, T., *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Research, 1998. **32**(11): p. 3245-3260.
10. Stan, H.J. and T. Heberer, *Pharmaceuticals in the aquatic environment*. Analisis, 1997. **25**(7): p. M20-M23.
11. Thomas, H., *Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data*. Toxicology Letters, 2002. **131**(1-2): p. 5-17.

12. Golan, D.E., *Principles of pharmacology : the pathophysiologic basis of drug therapy*. 2nd ed. 2008, Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins. xxi, 985.
13. Díaz-Cruz, S. and D. Barceló, *Occurrence and Analysis of Selected Pharmaceuticals and Metabolites as Contaminants Present in Waste Waters, Sludge and Sediments*, in *Water Pollution*, D. Barceló, Editor. 2004, Springer Berlin / Heidelberg. p. 47-63.
14. Oppel, J., et al., *Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection*. *Science of the Total Environment*, 2004. **328**(1-3): p. 265-273.
15. Ternes, T.A., et al., *Irrigation of treated wastewater in Braunschweig, Germany: An option to remove pharmaceuticals and musk fragrances*. *Chemosphere*, 2007. **66**(5): p. 894-904.
16. Al-Ahmad, A., F.D. Daschner, and K. Kümmerer, *Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicillin G, and Sulfamethoxazole and Inhibition of Waste Water Bacteria*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999. **37**(2): p. 158-163.
17. Kümmerer, K., A. Al-Ahmad, and V. Mersch-Sundermann, *Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test*. *Chemosphere*, 2000. **40**(7): p. 701-710.
18. Fent, K., A.A. Weston, and D. Caminada, *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. *Aquatic Toxicology*, 2006. **76**(2): p. 122-159.
19. *IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 2011 5, May, 2011]; Available from: <http://monographs.iarc.fr/>.
20. Thurston, D.E., *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*. 2007, Boca Raton: CRC Press. 290.
21. *SRC*. 2011 5, May, 2011]; Available from: <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>.
22. Sottani, C., et al., *Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2008. **22**(17): p. 2645-2659.

23. Wang, L., et al., *Cyclophosphamide removal from water by nanofiltration and reverse osmosis membrane*. Water Research, 2009. **43**(17): p. 4115-4122.
24. Wang, L.-Z., et al., *Rapid Determination of Gemcitabine and its Metabolite in Human Plasma by LC-MSMS through Micro Protein Precipitation with Minimum Matrix Effect*. J. Pharm. Sci. & Res., 2009. **1**(3): p. 23-32.
25. Arias, J.L., L.H. Reddy, and P. Couvreur, *Superior Preclinical Efficacy of Gemcitabine Developed As Chitosan Nanoparticulate System*. Biomacromolecules, 2010. **12**(1): p. 97-104.
26. Garcia-Ac, A., et al., *Determination of bezafibrate, methotrexate, cyclophosphamide, orlistat and enalapril in waste and surface waters using on-line solid-phase extraction liquid chromatography coupled to polarity-switching electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Environmental Monitoring, 2009. **11**(4): p. 830-8.
27. Yang, X.-X., et al., *A Mechanistic Study on Reduced Toxicity of Irinotecan by Coadministered Thalidomide, a Tumor Necrosis Factor- α Inhibitor*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2006. **319**(1): p. 82-104.
28. Li, R. and J. Huang, *Chromatographic behavior of epirubicin and its analogues on high-purity silica in hydrophilic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A, 2004. **1041**(1-2): p. 163-169.
29. Martín, J., et al., *Simultaneous determination of a selected group of cytostatic drugs in water using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(22): p. 3166-3177.
30. Jie, Y., et al., *Analysis of Anticancer Drugs in Sewage Water By Selective SPE and UPLCESI-MSMS*. Journal of Chromatographic Science, 2010. **48**: p. 781-789.
31. Mahnik, S.N., et al., *Development of an analytical method for the determination of anthracyclines in hospital effluents*. Chemosphere, 2006. **65**(8): p. 1419-1425.
32. Powis, G., *Anticancer drugs: reactive metabolism and drug interactions*. 1st ed. International encyclopedia of pharmacology and therapeutics ; section 141. 1994, Oxford: Pergamon Press. xv, 444.
33. Steger-Hartmann, T., K. Kümmerer, and A. Hartmann, *Biological Degradation of Cyclophosphamide and Its Occurrence in Sewage Water*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1997. **36**(2): p. 174-179.

34. Wagner, T., *Ifosfamide clinical pharmacokinetics*. Clinical pharmacokinetics, 1994. **26**(6): p. 439-56.
35. Pratt, W.B., *The Anticancer drugs*. 2nd ed. 1994, New York: Oxford University Press. viii, 352.
36. Gilard, V., et al., *Determination of the urinary excretion of ifosfamide and its phosphorylated metabolites by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1993. **31**(5): p. 387-394.
37. Duffull, S.B. and B.A. Robinson, *Clinical pharmacokinetics and dose optimisation of carboplatin*. Clin Pharmacokinet, 1997. **33**(3): p. 161-83.
38. *B C Cancer Agency*
 - 8, May 2012]; Available from: <http://www.bccancer.bc.ca/HPI/DrugDatabase/DrugIndexPro/default.htm>.
39. Alarcón, G.S., *Methotrexate use in rheumatoid arthritis. A clinician's perspective*. Immunopharmacology, 2000. **47**(2-3): p. 259-271.
40. Comella, P., *A review of the role of capecitabine in the treatment of colorectal cancer*. Therapeutics and clinical risk management, 2007. **3**(3): p. 421-31.
41. McEvoy, G.K. and American Society of Health-System Pharmacists, *AHFS drug information : essentials 2005-06*. 2005, Bethesda, Md.: American Society of Health-System Pharmacists. xvi, 2060.
42. Chabner, B. and D.L. Longo, *Cancer chemotherapy and biotherapy : principles and practice*. 4th ed. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xv, 879 , [2] de pl.
43. Bernadou, J., et al., *Complete urinary excretion profile of 5-fluorouracil during a six-day chemotherapeutic schedule, as resolved by 19F nuclear magnetic resonance*. Clinical Chemistry, 1985. **31**(6): p. 846-8.
44. Ochoa, L., et al., *Pharmacokinetics and bioequivalence of a combined oral formulation of eniluracil, an inactivator of dihydropyrimidine dehydrogenase, and 5-fluorouracil in patients with advanced solid malignancies*. Annals of Oncology, 2000. **11**(10): p. 1313-1322.
45. Steger-Hartmann, T., K. Kümmerer, and J. Schecker, *Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by twostep*

- solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1996. **726**(1–2): p. 179-184.
46. Turci, R., et al., *Biological monitoring of hospital personnel occupationally exposed to antineoplastic agents*. Toxicology Letters, 2002. **134**(1-3): p. 57-64.
 47. Guo, P., S. Li, and J.M. Gallo, *Determination of carboplatin in plasma and tumor by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2003. **783**(1): p. 43-52.
 48. Rubino, F.M., *Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001. **764**(1–2): p. 217-254.
 49. Sabatini, L., et al., *A new high-performance liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil as markers of surface contamination for occupational exposure monitoring*. Journal of Mass Spectrometry, 2005. **40**(5): p. 669-674.
 50. Seo, J., et al., *Phase II study of a gemcitabine and cisplatin combination regimen in taxane resistant metastatic breast cancer*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2007. **59**(2): p. 269-274.
 51. Sottani, C., et al., *Simultaneous determination of gemcitabine, taxol, cyclophosphamide and ifosfamide in wipe samples by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: protocol of validation and uncertainty of measurement*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(7): p. 1289-1296.
 52. Micoli, G., et al., *Determination of 5-fluorouracil in environmental samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001. **750**(1): p. 25-32.
 53. Mullot, J.-U., et al., *Development and validation of a sensitive and selective method using GC/MS-MS for quantification of 5-fluorouracil in hospital wastewater*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **394**(8): p. 2203-2212.
 54. Remaud, G., et al., *Sensitive MS/MS–liquid chromatography assay for simultaneous determination of tegafur, 5-fluorouracil and 5-fluorodihydrouracil in plasma*. Journal of Chromatography B, 2005. **824**(1–2): p. 153-160.

55. Sottani, C., et al., *Trace determination of anthracyclines in urine: a new high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for assessing exposure of hospital personnel*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(20): p. 2426-2436.
56. Nussbaumer, S., et al., *Analysis of anticancer drugs: A review*. Talanta, 2011. **85**(5): p. 2265-2289.
57. de Jong, F.A., et al., *Determination of irinotecan (CPT-11) and SN-38 in human whole blood and red blood cells by liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Chromatography B, 2003. **795**(2): p. 383-388.
58. Llewellyn, N., et al., *Determination of cyclophosphamide and ifosfamide in sewage effluent by stable isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(47): p. 8519-8528.
59. Garcia-Ac, A., et al., *On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(48): p. 8518-27.
60. Simpson, N.J.K., *Solid-phase extraction : principles, techniques, and applications*. 2000, New York: Marcel Dekker. xi, 514.
61. Braus, H., F. Middleton, and G. Walton, *Organic Chemical Compounds in Raw and Filtered Surface Waters*. Analytical Chemistry, 1951. **23**(8): p. 1160-1164.
62. Venn, R.F., et al., *96-Well solid-phase extraction: a brief history of its development*. Journal of Chromatography B, 2005. **817**(1): p. 77-80.
63. Hennion, M.C., C. Cau-Dit-Coumes, and V. Pichon, *Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples. Tools for the rapid prediction and optimization of the solid-phase extraction parameters*. Journal of Chromatography, A, 1998. **823**(1-2).
64. Chiron, S., A. Fernandez Alba, and D. Barcelo, *Comparison of on-line solid-phase disk extraction to liquid-liquid extraction for monitoring selected pesticides in environmental waters*. Environmental Science and Technology, 1993. **27**(12): p. 2352-2359.

65. Hennion, M.-C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **856**(1–2): p. 3-54.
66. Pawliszyn, J., *Theory of Solid-Phase Microextraction*. Journal of Chromatographic Science, 2000. **38**(7): p. 270-278.
67. Rouessac, F., A. Rouessac, and D. Cruché, *Analyse chimique : méthodes et techniques instrumentales modernes : cours et exercices corrigés*. 6e éd. ed. Sciences sup. Chimie. 2004, Paris: Dunod. xviii, 462.
68. Wells, M.J.M., *Principles of Extraction and the Extraction of Semivolatile Organics from Liquids*, in *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. 2003, John Wiley & Sons, Inc. p. 37-138.
69. Chapuis, F., V. Pichon, and M.-C. Hennion, *Méthode de préconcentration par extraction en phase solide : principe et application aux industries environnementales et pétrolières*. Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP, 2005. **60**(6): p. 899-912.
70. Oliferova, L., et al., *On-line coupling of sorption preconcentration to liquid-chromatographic methods of analysis*. Journal of Analytical Chemistry, 2006. **61**(5): p. 416-441.
71. Segura, P.A., C. Gagnon, and S. Sauvé, *A fully automated on-line preconcentration and liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of anti-infectives in wastewaters*. Analytica Chimica Acta, 2007. **604**(2): p. 147-157.
72. Cech, N.B. and C.G. Enke, *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. Mass Spectrometry Reviews, 2001. **20**(6): p. 362-387.
73. Niessen, W.M.A., *Liquid chromatography-mass spectrometry*. 3rd ed. Chromatographic Science Series. 2006, Boca Raton: CRC/Taylor & Francis. 608 p.
74. CCS, *Comité directeur de la Société Canadienne sur le Cancer, Statistiques canadiennes sur le cancer 2012, Société Canadienne du cancer*. 2012 20, November, 2012]; Available from: www.cancer.ca.
75. Shewach, D.S. and R.D. Kuchta, *Introduction to Cancer Chemotherapeutics*. Chemical Reviews, 2009. **109**(7): p. 2859-2861.
76. Allwood, M., A. Stanley, and P. Wright, *The Cytotoxics Handbook*. 2002: Radcliffe Medical Press. 484.

77. Collier, C.P., S.M. MacLeod, and S.J. Soldin, *Analysis of methotrexate and 7-hydroxymethotrexate by high-performance liquid chromatography and preliminary clinical studies*. Therapeutic drug monitoring, 1982. **4**(4): p. 371-380.
78. Kiffmeyer, T., et al., *Trace enrichment, chromatographic separation and biodegradation of cytostatic compounds in surface water*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 1998. **361**(2): p. 185-191.
79. Yin, J., et al., *A Preliminary Study on the Occurrence of Cytostatic Drugs in Hospital Effluents in Beijing, China*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2010. **84**(1): p. 39-45.
80. López de Alda, M.J. and 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**(2): p. 203-210.
81. Viglino, L., et al., *On-line solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry to quantify pharmaceuticals, pesticides and some metabolites in wastewaters, drinking, and surface waters*. Journal of Environmental Monitoring, 2008. **10**(4): p. 482-489.
82. Bones, J., et al., *On-line preconcentration of pharmaceutical residues from large volume water samples using short reversed-phase monolithic cartridges coupled to LC-UV-ESI-MS*. Talanta, 2006. **70**(5): p. 1117-1128.
83. Chen, L., et al., *On-line Coupling of Solid-Phase Extraction to Liquid Chromatography A Review*. Journal of Chromatographic Science, 2009. **47**(8): p. 614-623.
84. Garcia-Ac, A., et al., *On-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(48): p. 8518-27.
85. *The international Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use (ICH), Validation of the analytical Procedures: Text and Methodology Q2-R1_Guideline* 2012 27, June, 2012]; Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf

86. Salvador, A., et al., *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**(1–2): p. 102-109.
87. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Matrix Effect in Quantitative LC/MS/MS Analyses of Biological Fluids: A Method for Determination of Finasteride in Human Plasma at Picogram Per Milliliter Concentrations*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(5): p. 882-889.
88. Schuhmacher, J., et al., *Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry: practical approaches to their elimination*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2003. **17**(17): p. 1950-1957.
89. Kloepfer, A., J.B. Quintana, and T. Reemtsma, *Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples*. Journal of Chromatography A, 2005. **1067**(1–2): p. 153-160.
90. Buerge, I.J., et al., *Occurrence and Fate of the Cytostatic Drugs Cyclophosphamide and Ifosfamide in Wastewater and Surface Waters†*. Environmental Science and Technology, 2006. **40**(23): p. 7242-7250.
91. Castiglioni, S., et al., *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**(2): p. 206-215.