

Université de Montréal

***Développement de méthodes analytiques pour la détection  
et la quantification de traces de produits pharmaceutiques dans les eaux  
du fleuve Saint Laurent***

par

Araceli Garcia Ac

Département de Chimie

Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Chimie

Septembre, 2010

© Garcia- Ac Araceli, 2010

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

***Développement de méthodes analytiques pour la détection  
et la quantification de traces de produits pharmaceutiques dans les eaux  
du fleuve Saint Laurent***

Présentée par  
Araceli Garcia Ac

a été évaluée par le jury composé des personnes suivantes :

Président rapporteur : Dominic Rochefort

Directeur de recherche : Sébastien Sauvé

Membre du Jury : Pierre Chaurand

Examineur externe : Michel Lebeuf

Représentant du doyen de la FESP : Dominic Rochefort

## Résumé

Le présent projet vise à documenter la nécessité d'augmenter notre connaissance de la présence des contaminants organiques tels que les médicaments dans l'environnement et d'évaluer leur devenir environnemental. On a étudié la présence de composés pharmaceutiques dans différents échantillons d'eau. On a focalisé nos efforts spécialement sur les échantillons d'eau de l'usine d'épuration de la Ville de Montréal et ses effluents, les eaux de surface avoisinantes et l'eau du robinet dans la région de Montréal. Pour ce faire, on a tout d'abord développé deux méthodes analytiques automatisées basées sur la chromatographie liquide avec extraction en phase solide (SPE) couplée à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

On a également étudié les performances des trois techniques d'ionisation à pression atmosphérique (API), pour ensuite les utiliser dans la méthode analytique développée. On a démontré que l'ionisation par électronébulisation (ESI) est une méthode d'ionisation plus efficace pour l'analyse des contaminants pharmaceutiques dans des échantillons de matrices très complexes comme les eaux usées.

Une première méthode analytique SPE couplée à la LC-MS/MS a été développée et validée pour l'étude des échantillons complexes provenant de l'usine d'épuration de la Ville de Montréal et des eaux de surface près de l'usine. Cinq médicaments de prescription ont été étudiés: le bézafibrate (un régulateur de lipides), le cyclophosphamide et le méthotrexate (deux agents anticancéreux), l'orlistat (un agent anti-obésité) et l'énalapril (utilisé dans le traitement de l'hypertension). La plupart de ces drogues sont excrétées par le corps humain et rejetées dans les eaux usées domestiques en faisant par la suite leur chemin vers les usines municipales de traitement des eaux usées. On a pu démontrer qu'il y a un faible taux d'élimination à l'usine d'épuration pour le bézafibrate et l'énalapril. Ces deux composés ont aussi été détectés dans les eaux de surface sur un site à proximité immédiate de la décharge de l'effluent de la station d'épuration.

En observant la nécessité de l'amélioration des limites de détection de la première méthode analytique, une deuxième méthode a été développée. Pour la deuxième méthode, un total de 14 contaminants organiques, incluant trois agents anti-infectieux (clarithromycin, sulfaméthoxazole et triméthoprime), un anticonvulsant (carbamazépine) et son produit de dégradation (10,11-dihydrocarbamazépine), l'agent antihypertensif (enalapril), deux antinéoplastiques utilisés en chimiothérapie (cyclophosphamide et méthotrexate), des herbicides (atrazine, cyanazine, et simazine) et deux produits de transformation de l'atrazine (deséthylatrazine et déisopropylatrazine) ainsi qu'un agent antiseptique (triclocarban). Ces produits ont été quantifiés dans les eaux de surface ainsi que dans l'eau du robinet. L'amélioration des limites de détection pour cette méthode a été possible grâce à la charge d'un volume d'échantillon supérieur à celui utilisé dans la première méthode (10 mL vs 1 mL).

D'autres techniques de confirmation, telles que les spectres des ions produits utilisant une pente d'énergie de collision inverse dans un spectromètre de masse à triple quadripôle et la mesure des masses exactes par spectrométrie de masse à temps d'envol, ont été explorées. L'utilisation d'un analyseur de masse à temps d'envol a permis la confirmation de 6 des 14 analytes.

Finalement, étant donné leur haute toxicité et pour évaluer leur persistance et leur transformation au niveau du traitement des eaux potables, la cinétique d'oxydation du cyclophosphamide et de méthotrexate avec l'ozone moléculaire et des radicaux OH a été étudiée. Les constantes de dégradation avec l'ozone moléculaire ont été calculées et la qualité de l'eau après traitement a pu être évaluée. Le rendement du processus d'ozonation a été amélioré pour la cyclophosphamide dans les eaux naturelles, en raison de la combinaison de réactions directes et indirectes. Cette étude a montré que l'ozone est très efficace pour oxyder le méthotrexate mais que le cyclophosphamide serait trop lent à s'oxyder pour un traitement efficace aux conditions usuelles de traitement de l'eau potable.

**Mots-clés** : LC-MS/MS, composés pharmaceutiques, ozonation, eaux usées, eaux de surface, eau potable, analyse de traces, extraction sur phase solide

## Abstract

This project aims to document the need to increase our knowledge of organic contaminants such as pharmaceuticals in the environment and to assess their environmental fate. We studied the presence of pharmaceutical compounds in different water samples. We studied their presence in wastewater samples from the treatment plant of the City of Montreal, effluents, surface and tap water. To do this we developed two analytical methods based on solid phase extraction (SPE) coupled to liquid chromatography -tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

The performance of three atmospheric pressure ionization (API) techniques was also studied for their subsequent use in the developed method. It was demonstrated that electrospray ionization (ESI) is a more effective ionization method for the analysis of pharmaceutical contaminants in samples as complex as wastewaters.

A first analytical LC-MS/MS method, was developed and validated for the investigation of samples from the wastewater treatment plant and surface waters near the plant of Montreal. Five prescription drugs were studied: bezafibrate (lipid regulator), cyclophosphamide, and methotrexate (two anticancer agents), orlistat (an anti-obesity agent) and enalapril used in the treatment of hypertension. Most of these drugs are excreted by the human body in high percentages and released into domestic wastewaters, making their way to the municipal wastewater treatment plants. It was demonstrated that there is a low rate of elimination at the wastewater treatment plant for bezafibrate and enalapril. These two compounds were also detected in surface waters on a site close to the discharge of the treatment plant effluents.

For this first analytical method we observed the necessity of improvement of the detection limits of the method. A second method was then developed to improve the detection limits and to study a total of 14 organic contaminants, including three anti-infective agents (clarithromycin, sulfamethoxazole and trimethoprim), an anticonvulsant (carbamazepine) and its degradation product 10,11-dihydrocarbamazepine, the

antihypertensive agent (enalapril), two antineoplastic (methotrexate and cyclophosphamide), herbicides (atrazine, cyanazine, and simazine) and two transformation products of atrazine (desethylatrazine and désopropylatrazine) and an antiseptic agent (triclocarban). These products were quantified in surface water and tap water. The improvement of the detection limits of this method was possible due to the loading of a greater sample volume than that used in the first method (10 mL vs 1 mL).

Other confirmation techniques, such as the data-dependent reverse energy ramp scan on a triple quadrupole and accurate mass measurements on a time-of-flight mass spectrometer were explored. Using time-of-flight mass spectrometer determinations allowed the confirmation of six of the 14 analytes.

Finally, due to their toxic properties, the oxidation kinetics of cyclophosphamide and methotrexate with molecular ozone and OH radicals was studied in bench scale. The degradation constants with molecular ozone were calculated and the water quality after treatment was assessed. The overall process performance was improved for cyclophosphamide in natural waters, due to the combination of direct and indirect reactions. The study showed that ozone is very effective for the oxidation of methotrexate, but cyclophosphamide is too slowly oxidized for an effective drinking water treatment under usual conditions.

**Keywords:** LC-MS/MS, pharmaceutical compounds, ozonation, wastewaters, surface waters, drinking water, trace analysis, solid-phase extraction.

# Table des matières

<b>RESUME</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	v
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	xi
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	xiii
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	xvi
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	xx

<b>CHAPITRE 1 : Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
1.1 Contaminants émergents.....	2
1.1.1 Les produits pharmaceutiques et produits d'hygiène personnelle dans l'environnement .....	3
1.1.2 Premières études analytiques.....	5
1.1.3 État actuel des connaissances.....	5
1.1.4 Sélection des composés ciblés.....	9
1.1.5 Régulateurs lipidiques et cholesteriques, cytostatiques et anti-obésité .....	12
1.2 Les procédés de traitement dans l'industrie des eaux usées .....	16
1.2.1 Sédimentation chimiquement assistée (SCA).....	18
1.2.2 Boues Activées conventionnelles (CAS).....	19
1.2.3 Bioréacteurs de membranes (MBR).....	19
1.2.4 Comparaison d'efficacité d'élimination entre les trois procédés.....	20
1.3 Station d'épuration des eaux usées à Montréal.....	21
1.3.1 Le fleuve Saint Laurent .....	22
1.3.2 Le procédé général de traitement à Montréal .....	23
1.4 Objectifs de recherche .....	25

1.5 Structure de la thèse.....	26
1.6 Références .....	29
<b>CHAPITRE 2 : Techniques expérimentales.....</b>	<b>35</b>
2.1 LC- MS/MS .....	36
2.1.1 Principe de la technique.....	36
2.1.2 Les sources d'ionisation a pression atmosphérique .....	40
2.1.3 Électronébulisation (ESI).....	40
2.1.4 Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).....	44
2.1.5 Photoionisation à pression atmosphérique (APPI) .....	46
2.2 Analyses de masse par temps d'envol (TOF).....	48
2.3 L'extraction en phase solide (SPE) .....	51
2.3.1 Principe de l'extraction en phase solide.....	52
2.3.2 La phase stationnaire et la phase mobile.....	53
2.4 Ozonation et traitements d'oxydation avancée (AOPs) .....	57
2.5 Dégradation de produits pharmaceutiques en solution aqueuse par ozonation.....	59
2.6 Cinétique d'oxydation .....	60
2.7 Références.....	62
<b>CHAPITRE 3 : Comparaison de la performance d'APPI, APCI et ESI dans l'analyse LC-MS/MS de BEZ, CYP, ENA, MTX et ORL dans les eaux usées.....</b>	<b>66</b>
Abstract.....	67
3.1. Introduction.....	68
3.2. Experimental.....	69
3.2.1 Chemicals and Reagents .....	69
3.2.2 Instrumentation .....	69
3.2.3 Preparation of Standards.....	70
3.2.4 Flow injection analysis (FIA) conditions .....	70



3.2.5 On-line preconcentration and chromatographic conditions for the analysis on-column.....	70
3.2.6 Mass Spectrometry .....	71
3.2.7 Evaluation of detection limit and matrix effects for SPE on-line analysis.	72
3.3. Results and discussion.....	72
3.3.1 Comparison of APPI, APCI and ESI Mass Spectra obtained by FIA .....	72
3.3.2 Optimization of experimental parameters .....	74
3.3.3 Effect of TOL as a dopant on APPI.....	75
3.3.5 Comparison of signal intensity and S/N ratio.....	76
3.3.6 Evaluation of matrix effects on-column by SPE on-line.....	80
3.3.7 Comparison of Limits of Detection .....	82
3.4. Conclusions .....	83
3.5. Références .....	84
Matériel Supplémentaire .....	87

**CHAPITRE 4 : Détermination de BEZ, CYP, ENA, MTX et ORL dans les eaux de surface et usées avec SPE couplé à la LC-MS/MS.....92**

Abstract.....	91
4.1. Introduction.....	94
4.2. Experimental.....	96
4.2.1 Chemicals and materials.....	96
4.2.2 Instrumentation.....	97
4.2.3 Sample collection and preparation .....	98
4.2.4 On-line SPE and liquid chromatography.....	99
4.2.5 Electrospray-tandem mass spectrometry.....	101
4.2.6 Method Validation.....	102
4.3 Results and Discussion.....	103

4.3.1 On-line SPE and liquid chromatography optimization .....	104
4.3.2 Method validation.....	108
4.3.3 Analysis of waste and surface water samples.....	111
4.4 Conclusion .....	114
4.5 Références .....	115
Matériel Supplémentaire .....	117

**CHAPITRE 5 : SPE d'injection de grands volumes couplée à la LC-MS/MS pour la quantification et la confirmation de 14 contaminants organiques au niveau de trace dans l'eau potable et de surface.....120**

Abstract.....	121
5.1. Introduction.....	122
5.2. Experimental.....	124
5.2.1 Reagents and solutions .....	124
5.2.2 Instrumentation.....	125
5.2.3 Sample collection and preparation .....	125
5.2.4 Breakthrough volume estimation .....	126
5.2.5 On-line SPE and LC parameters.....	127
5.2.6 Mass spectrometry parameters .....	128
5.2.7 Method validation.....	129
5.3 Results and discussion.....	131
5.3.1 Breakthrough volume estimation .....	131
5.3.2 Development of a method for the analysis of PPCPs and pesticides in drinking and surface waters .....	134
5.3.3 Method validation.....	134
5.3.4 Matrix effects.....	135
5.3.5 Improvement of limits of detection .....	136

5.3.6 Analysis of drinking and surface water samples .....	136
5.3.7 Alternative methods of confirmation.....	141
5.4 Conclusions .....	145
5.5 Références .....	146
Matériel Supplémentaire .....	149

**CHAPITRE 6 : Cinétique d'oxydation de CYP et MTX par Ozone dans l'eau potable.....159**

Abstract.....	160
6.1. Introduction.....	161
6.2. Objectives of study .....	163
6.3. Experimental.....	163
..... 6.3.1 Chemicals and reagents.....	163
6.3.2 Standards preparation .....	164
6.3.3 Instrumentation.....	166
6.3.4 Natural water samples .....	166
6.3.5 Ozone residual and pCBA analysis .....	167
6.3.6 Bench scale ozonation experiments.....	167
6.3.7 Determination of rate constants for the reaction with molecular ozone.....	169
6.3.8 Reaction kinetics with OH radicals .....	170
6.3.9 Data analysis.....	171
6.4 Results and discussion .....	171
6.4.1 Analytical determination of the chemotherapy drugs .....	171
6.4.2 Ozone decomposition .....	173
6.4.3 Ozone oxidation of target compounds.....	175
6.5 Conclusion .....	180

6.6 Références.....	181
<b>CHAPITRE 7 : Conclusions et perspectives.....</b>	<b>184</b>
7.1. Conclusions.....	185
7.2 Perspectives.....	189

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1.</b> physico-chimiques et structure moléculaire des composés ciblés.....	10
<b>Tableau 1.2-</b> Données de la littérature sur l'occurrence des composés étudiés dans des échantillons environnementaux .....	11
<b>Tableau 1.3-</b> Pourcentages d'excrétion et métabolites des composés étudiés.....	13
<b>Tableau 3.1-</b> Physicochemical Properties and molecular structure of target drugs.....	86
<b>Tableau 3.2-</b> MS gradient for the target compounds separation ESI at 0.2 mL min <sup>-1</sup> and APPI and APCI at 0.6 mL min <sup>-1</sup> .....	86
<b>Tableau 3.3-</b> Tube lens, collision energies, precursor and fragment ions of the compounds of interest generated by ESI, APCI and APPI. ....	87
<b>Tableau 3.4-</b> Effect of TOL as a dopant on the APPI source studied by FIA .....	75
<b>Tableau 3.5-</b> Comparison of APPI, APCI and ESI peak area and S/N by Flow Injection Analysis FIA.....	76
<b>Tableau 3.6-</b> Comparison of APPI, APCI and ESI Performance by on-column analysis in DI-H <sub>2</sub> O.....	77
<b>Tableau 3.7-</b> Comparison of APPI, APCI and ESI Performance by on-column analysis in water from the raw sewage collector of the Montreal WWTP.....	77
<b>Tableau 3.8-</b> Matrix effects evaluation.....	80
<b>Tableau 4.1-</b> Timetable for the on-line preconcentration and analysis of the target compounds in wastewater samples.....	116
<b>Tableau 4.2-</b> Recovery and matrix effects evaluation (%MEE), recovery was calculated using the calibration curve in milliQ water for WWTP effluent.....	107
<b>Tableau 4.3-</b> Pharmaceuticals measured in the North and South raw sewage collectors, the Montreal WWTP effluents and surface water with their corresponding calibration curve correlation coefficients (R <sup>2</sup> ).....	109
<b>Tableau 4.4-</b> Analytical performance of the SPE-LC-ESI(±)-MS/MS method.....	109

<b>Tableau 5.1</b> -Columns tested for breakthrough of seventeen selected organic contaminants.....	147
<b>Tableau 5.2</b> -Load and analytical pumps program.....	148
<b>Tableau 5.3</b> -LC-TOFMS pump program .....	149
<b>Tableau 5.4</b> -SRM transitions parameters.....	150
<b>Tableau 5.5</b> -Method validation parameters for the analysis of drinking water.....	151
<b>Tableau 5.6</b> -Method validation parameters for the analysis of surface water.....	152
<b>Tableau 5.7</b> - Comparison of estimated breakthrough volumes ( $V_b$ ) of 17 selected trace organic contaminants in the on-line SPE columns tested.....	131
<b>Tableau 5.8</b> -Analysis of drinking and surface water samples of the region of Montréal.....	135
<b>Tableau 6.1</b> -Physico-chemical properties and molecular structure of target drugs.....	163
<b>Tableau 6.2</b> -Collision energies, tube lens, precursor and fragment ions of the compounds of interest generated by electro-spray ionization (ESI), atmospheric pressure photoionisation (APPI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI).....	164

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> -Nombre annuel de documents liés aux pharmaceutiques publiés dans six journaux environnementaux de 1998 à 2006.....	6
<b>Figure 1.2</b> -Devenir de contaminants organiques durant les procédés de traitement.....	17
<b>Figure 1.3</b> -Technologies alternative de traitement des eaux usées.....	18
<b>Figure 1.4</b> -Schéma de traitement des eaux usées à la UTE de Montréal.....	23
<b>Figure 2.1</b> -Connexions électriques entre les électrodes d'un analyseur de masse quadripolaire.....	37
<b>Figure 2.2</b> -Schéma d'un analyseur de masse quadripolaire.....	37
<b>Figure 2.3</b> -Analyseur de masse triple-quadripolaire.....	39
<b>Figure 2.4</b> -Schéma d'une source ESI .....	40
<b>Figure 2.5</b> -Schéma du mécanisme de formation des ions avec ESI.....	41
<b>Figure 2.6</b> -Schéma d'une source APCI.....	44
<b>Figure 2.7</b> -Une vue plus détaillée du mécanisme d'APCI. ....	45
<b>Figure 2.8</b> -Représentation schématique de l'APPI utilisée dans ce travail .....	48
<b>Figure 2.9</b> -Principe de la séparation de masse par spectrométrie de masse de temps d'envol.....	50
<b>Figure 2.10</b> -Schéma d'un spectromètre de masse de temps d'envol avec accélération orthogonale.....	51
<b>Figure 3.1</b> -Comparison of signal intensity of the three ionization techniques by FIA at different flow rates.....	88
<b>Figure 3.2</b> -Effects of APCI corona needle discharge current ( $\mu\text{A}$ ) on major ion product intensity.....	89
<b>Figure 3.3</b> -SPE on-line and LC separation of the target compounds. Loading of 1.00 mL of standards (200 pg mL <sup>-1</sup> ) in deionized water.....	78
<b>Figure 3.4</b> -SPE on-line and LC separation of the target compounds. Loading of 1.00 mL of standards (200 pg mL <sup>-1</sup> ) in wastewater.....	79

<b>Figure 4.1</b> -Molecular structures and physicochemical properties of the pharmaceuticals investigated.....	95
<b>Figure 4.2</b> -Map of the St. Lawrence River and surrounding area, as well as target area of study. The sampling sites are marked as by a bull's-eye symbol in the inset region.....	96
<b>Figure 4.3</b> -Instrumental set-up of the on-line SPE platform coupled to a LC-MS/MS.....	98
<b>Figure 4.4</b> -Experimental variations of peak area and filters with Milli-Q .....	102
<b>Figure 4.5</b> -Experimental variations of peak area and loading volume with Milli-Q purified water pharmaceuticals.....	116
<b>Figure 4.6</b> -Effect of sample load flow rate on analysis response area with Milli-Q purified water samples.....	117
<b>Figure 4.7</b> -Effect of addition of methanol to water samples .....	117
<b>Figure 4.8</b> -Single reaction monitoring (SRM) mass chromatograms for the target compounds.....	106
<b>Figure 4.9</b> -Removal efficiency of Montreal WWTP for the four pharmaceuticals detected in its influent.....	110
<b>Figure 5.1</b> . LC-MS/MS chromatograms in the SRM mode of the target compounds spiked at the 25 ng L <sup>-1</sup> level in 0.1 % F.A. in H <sub>2</sub> O.....	153
<b>Figure 5.2</b> . LC-MS/MS Chromatograms in the SRM mode of the detected compounds in the drinking water sample A (not spiked). .....	136
<b>Figure 5.3</b> . LC-MS/MS chromatograms in the SRM mode of the detected compounds in the St. Lawrence River sample (not spiked). .....	137
<b>Figure 5.4</b> . LC-MSTOF extracted ion chromatogram of the Des Prairie River sample spiked at the 50 ng L <sup>-1</sup> level. ....	139
<b>Figure 5.5</b> . LC-MS/MS chromatograms and mass spectra of ENA. (A) SRM transition of ENA. (B) TIC of the RER scan. (C) ENA mass spectrum generated by the RER scan of a 0.1 % F.A in H <sub>2</sub> O sample spiked at the 100 ngL <sup>-1</sup> level. (D) ENA mass spectrum of a standard solution spiked at the 1 mg L <sup>-1</sup> level. ....	141
<b>Figure 5.6</b> . LC-TOFMS extracted ion chromatogram of the St. Lawrence River sample (not spiked).....	154



<b>Figure 5.7.</b> LC-MS/MS chromatograms and mass spectra of SIM. (A) SRM transition of SIM. (B) TIC of the RER scan. (C) SIM mass spectrum generated by the RER scan of a Des Prairies River sample spiked at the 25 ngL <sup>-1</sup> level. (D) ENA mass spectrum of a standard solution spiked at the 1 mg L <sup>-1</sup> level.....	155
<b>Figure 6.1</b> -Chromatograms of methotrexate and cyclophosphamide .....	170
<b>Figure 6.2</b> -Examples of ozone residual decay for ozonation in buffered ultrapure water (pH = 8.10) and in DWTP natural water samples (pH = 8.04).....	172
<b>Figure 6.3.</b> Evolution of normalized cyclophosphamide concentration with CT value .....	175

## Liste de sigles et abréviations

Les mots dans la langue anglaise sont indiqués en italique. Certaines termes n'apparaissent que dans une langue parce qu'elles n'ont pas été utilisées dans l'autre langue.

A. A.	<i>Acetic acid</i>
ACN	Acétronitrile; <i>acetonitrile</i>
AOP	Traitements d'oxidation avancé, <i>advanced oxidation processes</i>
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique; <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
API	Ionisation à pression atmosphérique; <i>Atmospheric pressure ionization</i>
APPI	Photoionisation à pression atmosphérique; <i>Atmospheric pressure photo ionization</i>
ATZ	<i>Atrazine</i>
AZI	<i>azithromycin</i>
BEZ	Bézafibrate; <i>bezafibrate</i>
CAF	Caféine; <i>caffeine</i>
CAS	Boues Activées conventionnelles
CBZ	Carbamazépine; <i>carbamazepine</i>
CE	Énergie de collision; <i>collision energy</i>
CIP	Ciprofloxacine
CLA	Clarithromycine; <i>clarithromycin</i>
CUM	Communauté urbaine de Montréal
CYP	<i>Cyclophosphamide</i>
CYA	<i>Cyanazine</i>
CT	Temps de contact; <i>contact time</i>
D	Dopant
DEA	<i>deethylatrazine</i>
DHC	<i>10;11-dihydrocarbamazepine</i>
DIA	<i>deisopropylatrazine</i>

DI-H <sub>2</sub> O	Eau déionisée; <i>deionized water</i>
DWTP	Usine de traitement d'eau potable; <i>Drinking water treatment plant</i>
ESI	Électronébulisation; <i>Electrospray</i>
ENA	Énalapril; <i>enalapril</i>
F. A	Acide formique; <i>formic acid</i>
FIA	<i>Flow Injection Analysis</i>
GC	Chromatographie en phase gazeuse; <i>gas chromatography</i>
GC-MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse; <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
IE	énergie d'ionisation; <i>ionization energy</i>
I.D.	Diamètre interne; <i>internal diameter</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use</i>
i-PrOH	Isopropanol
IS	Étalon interne; <i>internal standard</i>
LC	Chromatographie en phase liquide; <i>liquid chromatography</i>
LC-MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse; <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LC-MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem; <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LC-TOFMS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse de temps de vol; <i>liquid chromatography-time of flight mass spectrometry</i>
LEV	levofloxacin
LOD	Limite de détection; <i>limit of detection</i>
log D <sub>ow</sub>	Constante de partage octanol-eau; <i>octanol-water distribution constant</i>
log K <sub>ow</sub>	Logarithme de la constante de partage octanol-eau <i>Logarithm of the octanol-water partition coefficient</i>
LOQ	Limite de quantification; <i>limit of quantification</i>
%MEE	<i>matrix effects evaluation</i>

MeOH	Méthanol; <i>methanol</i>
MCL	<i>method confirmation limits</i>
MDL	<i>Method detection limit</i>
MTX	méthotrexate
m/z	<i>mass-to-charge ratio</i>
OH•	radical hydroxyl
ORL	orlistat
PA	affinité protonique; <i>proton affinity</i>
PPCPs	<i>Pharmaceuticals and personal care products</i>
PPSPs	produits pharmaceutiques et de soins personnels
QqQ	Triple quadropole
RER	Gradient d'énergie inverse ; <i>reverse energy ramp</i>
r <sup>2</sup>	<i>Determination coefficient</i>
RP	Polarité de phases inversée; <i>reversed phase</i>
RPLC	Chromatographie à polarité de phases inversées; <i>reversed phase liquide chromatography</i>
RSD, %RSD	Écart-type relatif ; <i>relative standard deviation</i>
SCA	Sédimentation chimiquement assistée
S/N	Rapport signal sur bruit; <i>signal-to-noise ratio</i>
SIM	Simazine
SMX	Sulfaméthoxazole ; <i>Sulfamethoxazole</i>
SPE	Extraction sur phase solide; <i>solid phase extraction</i>
SRM	Suivi des réactions de fragmentation caractéristiques; <i>Selected reaction monitoring</i>
STD	Écart-type ; <i>Standard deviation</i>
MBR	Bioréacteurs de membranes ; membrane bioreactor
TCC	Triclocarban
TIC	<i>Total ion current</i>
TL	<i>Tube lens</i>
TOF	Analyses de masse par temps de vol
TOL	Toluène

tr	<i>Retention time</i>
TRI	Triméthopri $\acute{m}$ e
u	<i>Unified atomic mass unit</i>
USEPA	<i>United States Environment Protection Agency</i>
UTE	Usine de traitement d'eau
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>
V <sub>b</sub>	<i>Estimated breakthrough volume</i>
V <sub>m</sub>	<i>Void volume</i>
WW	<i>Wastewater</i>
WWTP	<i>Wastewater treatment plant</i>
XIC	<i>Extracted ion current</i>

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Sébastien Sauvé pour m'avoir suivie au cours de ces années d'études comme directeur de thèse, pour sa disponibilité, sa patience et ses conseils avisés et pour son soutien quotidien.

Mes sincères remerciements vont au Dr. Dominic Rochefort, Professeur à l'Université de Montréal, président du jury lors de la soutenance. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour son intérêt à mon travail.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. Pierre Chaurand, Professeur à l'Université de Montréal, et au Dr. Michel Lebeuf, Professeur à l'Université de Sherbrooke, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'être membres du jury et d'examiner ce travail.

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à une bourse d'étude du CONACYT (Conseil National de Science et Technologie) du Gouvernement mexicain, que je remercie particulièrement pour la confiance que le Conseil a témoignée à mon égard.

J'adresse également mes sincères remerciements à Monsieur Christian Gagnon d'Environnement Canada. Aussi je tiens à remercier le groupe *Environmental and Food Chemistry* de ThermoFisher Scientific; trouvez ici l'expression de ma gratitude.

Je remercie Madame la Professeure Michèle Prévost de l'École polytechnique de Montréal et son équipe de travail à qui je suis particulièrement reconnaissante pour leur collaboration, leur confiance et leur aide précieuse.

Mes remerciements les plus vifs sont pour mes collègues de laboratoire et très chers amis: Liza, Pedro, Khadija, Romain, Koffi, Lucie et Paul. L'amitié que vous m'avez témoignée et votre humour ont été de vrais réconforts dans les moments difficiles.

Merci à ma famille pour leur patience et leur soutien.

---

---

# **CHAPITRE 1: Introduction générale**

---

---

## 1.1 Les contaminants émergents

Les effets des contaminants émergents sur l'environnement ont été reconnus récemment. Ceci implique que la plupart d'entre eux sont présents dans l'environnement depuis longtemps, mais leur présence a été élucidée il n'y a pas si longtemps et, par conséquent, leur contrôle échappe encore pour la grande majorité d'entre eux aux réglementations environnementales<sup>1,2</sup>. Pour le moment, il n'existe pas d'accord clair au sujet de quels composés doivent être considérés comme contaminants émergents. Ils peuvent être classifiés par famille chimique (produits chimiques de structure totalement nouvelle), par le type d'application (nouvelles applications de type industriel ou domestique), par le type d'effet toxique qu'ils génèrent (nouveaux effets découverts), par le type de source (comme les nouvelles sources précédemment inconnues pour les produits chimiques existants) et par le type d'exposition (voies qui n'avaient pas été prévues ou avaient été précédemment jugées négligeables)<sup>3</sup>. Tenant compte de ces critères, les produits pharmaceutiques et les produits de soins personnels (PPSPs) doivent être considérés comme des contaminants émergents en raison des possibles effets toxiques qu'ils peuvent générer. Les produits pharmaceutiques suscitent un intérêt particulier en raison de leur grand volume de consommation et de leur forte activité biologique (comme par exemple les perturbateurs endocriniens) mais aussi en raison de leur qualité d'agents causatifs de résistance bactérienne (comme les antibiotiques)<sup>4</sup>.

Pour la plupart des classes émergentes de contaminants, il n'existe que quelques données environnementales, car pour la plupart, ils ne sont pas réglementés. Une autre raison pour le peu d'information disponible est le manque de méthodes analytiques pour éventuellement permettre une évaluation appropriée des risques, pour la surveillance de la qualité des eaux de surface et de l'eau potable. En dépit du manque de telles directives, il reste un besoin d'identifier et d'évaluer les dangers possibles des produits pharmaceutiques dans l'environnement. Il est important de développer des procédures analytiques pour surveiller certains problèmes environnementaux spécifiques qui permettront d'obtenir des mesures fiables. Seules de telles mesures peuvent nous fournir



les bases scientifiques nécessaires pour estimer l'occurrence et la persistance des résidus pharmaceutiques dans l'environnement.

### **1.1.1 Les produits pharmaceutiques et produits d'hygiène personnelle dans l'environnement**

Les produits pharmaceutiques et de soins personnels (PPSPs) sont couramment employés aujourd'hui et ils représentent plusieurs milliers de substances chimiques qui sont consommées par des personnes (ou des animaux) pour des raisons de santé, cosmétiques (ceux-ci incluent, en plus des produits pharmaceutiques, les parfums, les protecteurs solaires, les produits d'hygiène personnelle et les suppléments alimentaires) ou encore pour améliorer les rendements de l'élevage animal<sup>5, 6</sup>. Les PPSPs sont généralement des composés organiques synthétiques et à ce jour il n'existe aucune liste officielle de ces composés<sup>7</sup>. L'impact environnemental des PPSPs est un sujet de recherche de défi en partie par le fait qu'il est souvent difficile d'estimer les quantités de PPSPs vendues ou consommées annuellement<sup>8</sup>. Par exemple, les produits de soins personnels sont produits en très grandes quantités (milliers de tonnes par an) alors que certains produits pharmaceutiques sont fabriqués en quantités annuelles de quelques kilogrammes seulement. De plus, de nouveaux produits pharmaceutiques sont constamment développés et introduits sur le marché sans qu'aucun contrôle environnemental systématique ne soit effectué. Les produits pharmaceutiques sont, pour la grande majorité, des médicaments thérapeutiques de prescription et en vente libre, notamment les régulateurs de lipides, les antihypertenseurs, les agents anti-obésité et les agents cytostatiques que nous étudierons plus particulièrement dans cette thèse. Durant ces dernières années, le devenir des produits pharmaceutiques est devenu une question importante due à leur relargage continu dans l'environnement, principalement par les excréctions humaines ou par le rejet dans l'environnement des drogues inutilisées<sup>9, 10</sup>. Les drogues sont absorbées par l'organisme humain peu après avoir été prises et sont sujettes à des réactions métaboliques telles que l'hydroxylation, le clivage ou la glucuronation<sup>11, 12</sup>. Cependant, une quantité significative de la substance originale quitte l'organisme sous forme non métabolisée via l'urine ou les selles. Une fois excrétés, les

drogues et leurs dérivés peuvent échapper à toute dégradation dans les usines municipales de traitement des eaux usées (UTES)<sup>13, 14, 15</sup>. Des effluents des UTES sont rejetés dans les eaux de surface, et les produits pharmaceutiques peuvent ainsi être retrouvés dans les eaux de surface et même dans les eaux souterraines<sup>16-20</sup>.

La présence des produits pharmaceutiques dans l'environnement dépend de différentes variables, telles que<sup>14, 15</sup>:

- quantité manufacturée
- dose thérapeutique
- fréquence d'utilisation et voies métaboliques
- efficacité du traitement des eaux usées

Plusieurs études traitant de l'impact des résidus pharmaceutiques sur l'environnement aquatique ont clairement montré que leur élimination dans les UTES municipales est souvent incomplète<sup>4, 10, 21, 22</sup>. Les valeurs des taux d'élimination par traitement dans les UTES sont généralement entre 60 et 90% pour des drogues moyennement polaires<sup>18</sup>. Aussi le rejet potentiel dans les eaux usées change d'un produit chimique à l'autre et d'une UTE à l'autre. C'est pour cette raison que l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) a souligné dans un récent communiqué que les UTES municipales ne sont pas adéquates pour l'élimination des PPSP<sup>7</sup>.

L'analyse des polluants d'origine pharmaceutique est un véritable défi scientifique pour les raisons suivantes :

- La grande variété chimique des composés pharmaceutiques.
- Le besoin d'identifier non seulement les polluants en question mais également leurs dérivés et métabolites.
- La diversité des matrices (par exemple, sédiments, eaux de surface, eaux usées et échantillons biologiques) et les différences dans les niveaux de contamination.
- La possibilité d'interférences entre les composants de l'échantillon ayant des caractéristiques physico-chimiques semblables.
- Le manque de normes appropriées et de matériaux de référence certifiés.

### **1.1.2 Les premières études analytiques**

Dans les années 70, les premières études analytiques mettent en évidence l'existence dans les effluents municipaux de composés organiques comme les hydrocarbures aromatiques<sup>23</sup>, pesticides et herbicides<sup>24</sup>, composés chlorés<sup>25</sup>, phtalates<sup>26</sup> et stéroïdes<sup>27</sup>. L'information scientifique générée à cette époque a été utilisée depuis pour faire le suivi environnemental des effluents, pour quantifier les polluants, développer des procédés de traitement des eaux contaminées et enfin pour évaluer l'impact environnemental des contaminants présents dans ces effluents.

Cependant, il reste beaucoup de lacunes à combler concernant, par exemple, les composés polaires ainsi que les produits chimiques organiques ionisables ou polyfonctionnels comme les pesticides, biocides et drogues, vers lesquels l'attention s'est tournée.

Dans les années 1990, en raison des avancées techniques, plusieurs composés pharmaceutiques ont été détectés dans les effluents et les eaux de surface<sup>28, 29</sup>, à des concentrations extrêmement basses dans différents systèmes aquatiques comme de petits cours d'eau ou des grands fleuves tel que le Rhin<sup>18</sup> mais aussi dans des lacs (lac Constance, lacs suisses)<sup>30, 31</sup>, dans les eaux souterraines<sup>32</sup> et en mer du Nord<sup>31</sup>. Les composés détectés sont d'origines diverses et incluent les hormones, les régulateurs de lipides, les analgésiques, les antibiotiques, les cytostatiques et d'autres composés cytotoxiques, les antiépileptiques ainsi que les régulateurs de tension artérielle.

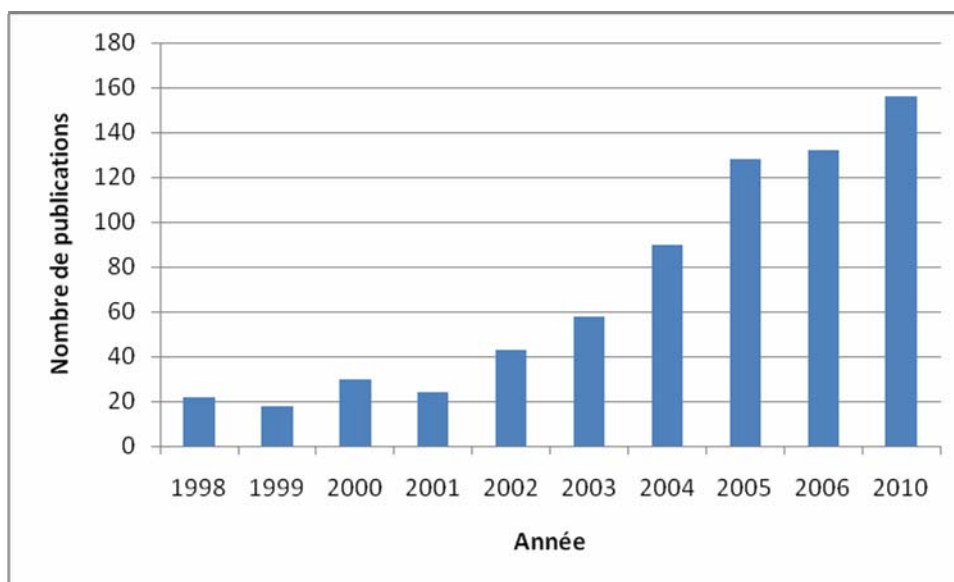
### **1.1.3 État actuel des connaissances.**

Les produits pharmaceutiques et les produits de soins personnels sont actuellement reconnus comme étant une partie importante des produits chimiques qui sont présents en faibles concentrations dans l'environnement<sup>33</sup>. Aujourd'hui, nous savons que si les médicaments, leurs métabolites et leurs produits de transformation ne sont pas éliminés

lors du traitement des eaux usées, ils peuvent pénétrer dans l'environnement aquatique et finir par atteindre les eaux de surface et l'eau potable.

### *Aperçu bibliographique*

L'indication la plus claire d'un effort ciblé pour comprendre l'introduction, la transformation et les effets potentiels sur la santé et l'environnement est le nombre de rapports publiés. En 1998, il y avait 22 articles publiés sur les produits pharmaceutiques dans les six revues sur l'environnement qui publient régulièrement des documents liés aux PPSPs (**Figure 1.1**). En 2006, ce nombre a sextuplé à 132 articles<sup>34</sup>. En 2010 il y en a eu approximativement 156.



**Figure 1.1**-Nombre annuel de documents liés aux pharmaceutiques publiés dans six journaux environnementaux de 1998 à 2006, adapté de Glassmeyer 2008<sup>34</sup>.

Grâce à l'information générée durant ces dernières années, nous savons qu'une substance chimique peut subir différents changements structuraux par des processus biotiques et non biotiques avant et après son introduction dans l'environnement<sup>35</sup>. Par exemple, certaines transformations structurelles peuvent également être le résultat du traitement des effluents<sup>36-40</sup>.

La plupart des études menées jusqu'à présent décrivent la présence des composés dans les compartiments environnementaux. Les substances médicales ont été mesurées dans les effluents des unités de soins médicaux, les effluents des usines de traitement des eaux usées, les eaux de surface et souterraines et l'eau potable<sup>41</sup>.

#### *Aperçu des options de traitement*

Les difficultés à éliminer les micropolluants, notamment les produits pharmaceutiques, présents dans les eaux usées sont dues au fait que leurs concentrations sont de l'ordre de  $10^{-3}$ – $10^{-6}$  mg L<sup>-1</sup>, ce qui est beaucoup plus faible que celles des macropolluants classiques (azote et composés phosphorés)<sup>42</sup>.

Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe aucun traitement spécifique capable de supprimer efficacement tous les types de micropolluants, en raison de leur comportement différent pendant les traitements. Le traitement physico-chimique par coagulation-floculation ne peut clairement pas éliminer totalement les PPSPs. Plusieurs études décrivent l'efficacité de l'osmose inverse dans l'élimination des PPSPs et des composés perturbateurs endocriniens dans les effluents d'eaux usées<sup>43, 44</sup>. L'ozonation et les procédés d'oxydation avancée sont prometteurs pour une dégradation efficace de plusieurs produits pharmaceutiques dans l'eau de consommation et les eaux usées<sup>39, 45, 46</sup>.

#### *Aperçu des effets toxiques*

Il est encore difficile de prévoir quels effets favorables ou défavorables pourraient être provoqués chez les organismes aquatiques. L'exposition de l'écosystème aquatique aux PPSPs est d'un intérêt particulier puisque ces composés sont employés tout au long de l'année et ils sont conçus pour produire des effets biologiques spécifiques<sup>47</sup>. Un exemple bien connu des effets nuisibles sur l'environnement provoqués par des drogues est l'effet de perturbation endocrinienne des hormones stéroïdes chez les poissons<sup>48</sup>.

La quantité d'information disponible sur les effets toxiques est en augmentation mais elle reste très modeste<sup>49</sup>. Il y a des études sur les antibiotiques, le diclofénac, l'ibuprofène, et la carbamazépine, mais avec des concentrations plus élevées que celles observées dans les effluents des usines d'épuration<sup>50-53</sup>.

Il faut ajouter aussi que dans l'environnement les organismes (y compris les humains) sont exposés non seulement aux micropolluants isolés, mais aussi aux mélanges chimiques complexes. Les effets additifs ou même synergiques peuvent rendre de tels mélanges dangereusement puissants. On a longtemps supposé que seuls les composés avec le même mode d'action toxique étaient additifs, mais des recherches récentes ont prouvé que même les mélanges de composés avec différents modes d'action peuvent exhiber des effets non négligeables, voir même synergiques<sup>54-57</sup>. En général, les connaissances sur la toxicité des mélanges des composés sont très limitées.

Aperçu des tendances analytiques

On peut trouver des méthodes analytiques pour le dosage des médicaments dans les eaux axées sur des classes thérapeutiques. Mais, en raison de leur approche globale, les méthodes d'analyse multi-résiduelles sont devenues des outils privilégiés pour le suivi de différentes catégories thérapeutiques, ce qui réduit le temps et les coûts<sup>58-60</sup>.

La tendance générale pour l'analyse est l'automatisation à travers le couplage des unités de préparation des échantillons et des systèmes de détection (extraction en ligne de phase solide), l'application de sorbants, tels que les polymères imprimés moléculaires, les immunoadsorbants et les nanomatériaux<sup>61</sup>.

Une autre question clé dans la surveillance des contaminants est la confirmation de résultats positifs. Une approche récemment utilisée pour confirmer les résultats positifs implique l'application d'instruments qui permettent d'effectuer une analyse quantitative sensible associée à une identification sans équivoque et la confirmation des composés ciblés. Il y a plusieurs études où les instruments d'analyse de masse par temps de vol

(TOF) ont été utilisés pour confirmer l'identité des composés identifiés par un triple quadripôle (QqQ)<sup>62-64</sup>.

#### **1.1.4 Sélection des composés ciblés.**

Dans cette thèse, les composés ciblés ont été choisis parmi différentes catégories de composés pharmaceutiques, ils ont été sélectionnés en englobant plusieurs classifications thérapeutiques, y compris: bézafibrate (BEZ), un régulateur de lipide, méthotrexate (MTX) et cyclophosphamide (CYP), des médicaments de chimiothérapie, orlistat (ORL), un inhibiteur de lipase, et énalapril (ENA), un médicament utilisé dans le traitement de l'hypertension. Le **Tableau 1.1** compile les données des propriétés physico-chimiques et les structures moléculaires des cinq composés.

Quatre critères principaux ont été examinés au cours du processus de sélection. Le premier critère a été la vraisemblance de la présence dans l'environnement. Des publications précédentes de revues et de rapports gouvernementaux ont été examinées. BEZ, CYP, ENA et MTX ont été identifiés dans les eaux de surface, les eaux souterraines et les eaux usées aux États-Unis, en Europe, en Asie et ailleurs (**Tableau 1.2**). Ces publications ne mentionnaient pas ORL.

Le deuxième critère a été leur utilisation au Canada et leur pertinence toxicologique. Les composés ont été choisis en fonction des quantités vendues et des doses<sup>65</sup>, du degré de métabolisation et de la biodisponibilité (**Tableau 1.3**). Les composés cytostatiques ont aussi été choisis pour leurs propriétés mutagéniques.

Le troisième critère est la diversité structurelle et la traitabilité. Ceci est reflété par la large gamme des facteurs suivants : poids moléculaire, solubilité dans l'eau, coefficient de partition octanol/eau et propriétés acide/base. L'élimination de chaque composé est intrinsèquement liée à sa structure chimique et requiert un processus de traitement particulier. La diversité des structures chimiques assure une durée raisonnable de traitement pour une évaluation objective du procédé de traitement à l'usine d'épuration.

**Tableau 1.1**-Propriétés physico-chimiques et structure moléculaire des composés ciblés\*  $pK_a$ : constant de dissociation,  $\log P$ : coefficient de partition (octanol/eau).

Composé	Structure	Utilisation	$pK_a$	$\log P$
Bézafibrate $C_{19}H_{20}ClNO_4$		Réducteur de cholestérol	3.6 <sup>66</sup>	4.3 <sup>67</sup>
Cyclophosphamide $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$		Agent cytostatique	4.5- 6.5 <sup>68</sup>	0.6 <sup>68</sup>
Enalapril $C_{20}H_{28}N_2O_5$		antihypertenseur	3.0 and 5.4 <sup>69</sup>	0.7 <sup>70</sup>
Méthotrexate $C_{20}H_{22}N_8O_5$		Agent Cytostatique	4.8 and 5.5 <sup>71</sup>	-1.9 <sup>72</sup>
Orlistat $C_{29}H_{53}NO_5$		Agent anti-obésité	-	7.6 <sup>73</sup>

Le quatrième et dernier critère est la capacité analytique au laboratoire. Les facteurs limitants sont la disponibilité des standards de référence et la performance de la méthode analytique pour les composés avec l'équipement analytique disponible. Certains composés ne pouvaient pas être considérés en raison d'un manque de standards disponibles (métabolites). Comme tous les composés ont été extraits par une seule méthode d'extraction en phase solide, certains analytes ne pouvaient pas être déterminés (nous avons initialement ciblé mecoprop et bisphénol, mais ils ne s'ionisent pas aux débits d'ionisation des autres composés).



**Tableau 1.2-**Données de la littérature sur l'occurrence des composés étudiés dans des échantillons environnementaux.

<b>Analyte</b>	<b>Type d'échantillon</b>	<b>Concentration du composé étudié (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Localisation et date</b>	<b>Réf</b>
BEZ	Eaux usées	2200	Allemagne 1998	18
	Eau de fleuve	350		
	Eau de fleuve	12.5	Autriche 2001	74
	Eaux usées	70	Canada 2002	75
CYP	Eaux usées	17	Allemagne 1997	76
	Eaux usées	10	Suisse 2006	77
	Près des effluents	0.17		
	Eau de fleuve	10	Italie 2000	78
	Effluent	5	Canada 2002	79
ENA	Eaux de surface	0.54	Italie 2003	80
	Eaux usées	0.85	États-Unis 2006	81
MTX	Eau de fleuve	12.6	Italie 2005	82

**Tableau 1.3-**Pourcentages d'excrétion et métabolites des composés étudiés

<b>Composé</b>	<b>Excrétion ( %) Sans changement</b>	<b>Métabolites et référence</b>
BEZ	50	20% glucuronides <sup>83</sup> Composés hydroxylés
CYP	30	4-OH-cyclophosphamide et 4-OOH-cyclophosphamide <sup>84</sup>
ÉNA	10	Composé hydroxylé <sup>85</sup>
MTX	90	7-hydroxy-méthotrexate et 6 autres composés mineurs <sup>86</sup>
ORL	80	Lactone cyclique hydrolysé à 4 membres <sup>87</sup>

### **1.1.5 Les régulateurs lipidiques et cholestériques, cytostatiques et agents anti-obésité.**

#### *Antinéoplastiques, méthotrexate et cyclophosphamide*

Les agents antinéoplastiques sont principalement utilisés dans les hôpitaux pour les traitements de chimiothérapie. Ces composés agissent comme des agents d'alkylation non spécifiques (i.e. que des récepteurs spécifiques ne sont pas impliqués) et pourtant ils sont des agents mutagènes/carcinogènes et tératogènes dans n'importe quel organisme<sup>88</sup>. Le méthotrexate (MTX) est un antagoniste folique qui se lie au site catalytique actif de la réductase de dihydrofolate et interfère avec la formation d'acide désoxiribonucléique, d'acide ribonucléique et des protéines<sup>89</sup>. MTX est couramment employé dans la chimiothérapie de diverses maladies néoplastiques telles que la leucémie aiguë et le sarcome ostéogénique<sup>86</sup>.

La cyclophosphamide (CYP) est un des plus anciens cytostatiques connus et c'est un des agents les plus souvent utilisés en chimiothérapie<sup>90</sup>. Après injection au patient, l'agent pharmaceutique est excrété par voie rénale. Jusqu'à 30% de la dose administrée est excrétée sous forme non métabolisée<sup>84</sup>. Par conséquent, des quantités importantes de l'agent administré pourraient être retrouvées dans les eaux usées municipales. En plus de ses effets cytotoxiques, la CYP possède des propriétés tératogéniques et mutagéniques et est un carcinogène humain reconnu<sup>76</sup>. Par conséquent, de nombreuses études ont été entreprises pour déterminer le risque sanitaire potentiel pour les patients de cancer et le personnel médical impliqués en chimiothérapie utilisant la CYP<sup>91, 92</sup>.

La cyclophosphamide et le méthotrexate ont été détectés dans les effluents à des concentrations de ng/L<sup>18, 76, 77, 93, 94</sup>. La cyclophosphamide a été détectée dans les eaux de surface près des effluents des eaux usées<sup>77, 78</sup> et aussi dans les eaux potables<sup>95</sup>. Au Canada dans la région des Grands Lacs, la CYP a été détectée à une concentration de 5 ng/L<sup>79</sup> et à une concentration de 9 ng/L dans les effluents de l'UTE de la Ville de Montréal<sup>93</sup>. Steger-Hartmann et al. ont mesuré des niveaux de cyclophosphamide dans les eaux usées d'hôpitaux allemands de l'ordre de 143 ng/L ; et dans les effluents municipaux, de 17 ng/L. Ils ont observé que ce composé est fortement toxique et probablement réfractaire à la dégradation microbienne des UTEs et peut ainsi réussir à s'infiltrer dans l'environnement<sup>76</sup>.

Dans une étude détaillée sur la génotoxicité des eaux usées, White et Rasmussen ont montré que bien que la génotoxicité des eaux usées industrielles est souvent élevée, la décharge globale dans les eaux de surface des composés génotoxiques provenant des installations de traitement municipales est bien plus élevée, jusqu'à plusieurs ordres de grandeur<sup>96</sup>. Les auteurs présentent une corrélation entre l'occurrence des agents mutagènes et la population humaine servie par les UTEs. Cette corrélation permet de conclure que les activités non industrielles et le métabolisme des humains sont à l'origine de la présence dans l'environnement de ces agents mutagènes. Ces études montrent que les antinéoplastiques appartiennent à une classe de médicaments dont

l'impact potentiel sur l'environnement peut être très important, non simplement à cause de leur toxicité aiguë mais aussi à cause de leur capacité à provoquer des changements génétiques subtils, dont l'impact cumulatif avec le temps peut mener à un changement écologique plus profond.

#### *Bézafibrate, régulateur de lipides dans le sang*

Le bézafibrate (BEZ) est un agent de régulation des lipides. Les régulateurs de lipides sont des substances utilisées pour diminuer les niveaux sanguins de triglycérides et de lipoprotéines à basse densité et pour augmenter les niveaux de lipoprotéines à haute densité<sup>97</sup>. Ces substances sont employées chez les personnes en danger de crise cardiaque ou souffrant de hauts taux de cholestérol. Le bézafibrate a été détecté dans des effluents des UTEs et dans les eaux de surface en Europe, au Brésil et Canada<sup>18, 74, 75, 93, 98, 99</sup>. Miao *et al.* ont rapporté l'occurrence du bézafibrate dans des échantillons d'effluents et d'eaux de surface provenant du Canada<sup>75</sup>. En Allemagne, BEZ a été détecté dans des effluents et dans différents fleuves<sup>18</sup>. Stumpf *et al.* ont rapporté que les taux d'élimination des usines d'épuration brésiliennes pour BEZ sont seulement de 50% pour les procédés utilisant les boues activées et 27% pour les procédés utilisant des filtres biologiques, démontrant ainsi que la dégradation de ce composé est extrêmement limitée<sup>98</sup>. L'omniprésence des fibrates dans l'environnement est essentiellement due au fait que les doses thérapeutiques quotidiennes sont généralement élevées (de l'ordre du gramme par jour).

#### *L'énalapril, drogue pour le traitement des maladies cardiovasculaires*

L'énalapril (ENA) est un inhibiteur de l'enzyme convertissant l'angiotensine et est employé dans le traitement de l'hypertension et de quelques autres types de faiblesses cardiaques chroniques. ENA empêche la conversion enzymatique de l'angiotensine qui est à l'origine de l'hypertension artérielle<sup>100</sup>. On estime que presque un milliard de personnes dans le monde entier sont affectées par l'hypertension et on prévoit que ce chiffre grimpera jusqu'à 1.5 milliard en 2025<sup>101</sup>. On estime que 43 millions de personnes aux États-Unis uniquement souffrent d'hypertension ou prennent des médicaments anti-hypertenseurs, ce qui correspond à presque 24% de la population adulte<sup>102</sup>. La présence

de cette drogue dans l'environnement est intimement liée à la quantité vendue et à ses propriétés physico-chimiques. Car comme c'est le cas de plusieurs produits pharmaceutiques employés couramment pour la médecine humaine et vétérinaire, ENA est excrétée sous forme de métabolites actifs à des pourcentages élevés. Ainsi presque 10% de la drogue ingérée est excrétée et sa présence dans l'environnement aquatique est élevée<sup>85</sup>. L'ENA a été récemment détecté dans des échantillons d'effluents et d'eaux de surface<sup>80, 81, 93</sup>. Calamari *et al.* ont détecté ENA à des concentrations de 0.05 à 0.54 ng/L dans les fleuves Po et Lambro dans le nord de l'Italie<sup>80</sup>. Vanderford *et al.* ont détecté ENA dans les effluents des usines d'épuration à Las Vegas aux États Unis à des concentrations maximales de 0.85 ng/L<sup>81</sup>.

#### *L'orlistat, un inhibiteur de lipases*

L'orlistat est un inhibiteur de lipases spécifique pour le traitement du surpoids et de l'obésité, il fonctionne en inhibant les esters carboxylique gastriques et les lipases pancréatiques. Orlistat réduit spécifiquement l'absorption de la graisse diététique due à l'inhibition de l'hydrolyse des triglycérides<sup>103</sup>.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime que d'ici 2015, environ 2,3 milliards d'adultes seront en surpoids et plus de 700 millions seront obèses. Auparavant le surpoids et l'obésité étaient considérés comme des problèmes spécifiques aux pays dont la population bénéficie de hauts revenus, mais ils augmentent spectaculairement dans les pays où elle dispose de faibles ou moyens revenus, essentiellement en milieu urbain<sup>104</sup>. Étant donné l'augmentation du surpoids de la population mondiale, la consommation des traitements anti-obésité a elle aussi augmentée. L'orlistat est une drogue importante en termes de volume de ventes et aussi d'effets toxiques potentiels. On sait que l'orlistat est un inhibiteur efficace et irréversible des lipases pancréatiques chez plusieurs espèces animales, y compris chez l'homme<sup>103, 105</sup>. Jusqu'ici, aucune littérature n'a été trouvée sur la détection de l'orlistat dans l'environnement.

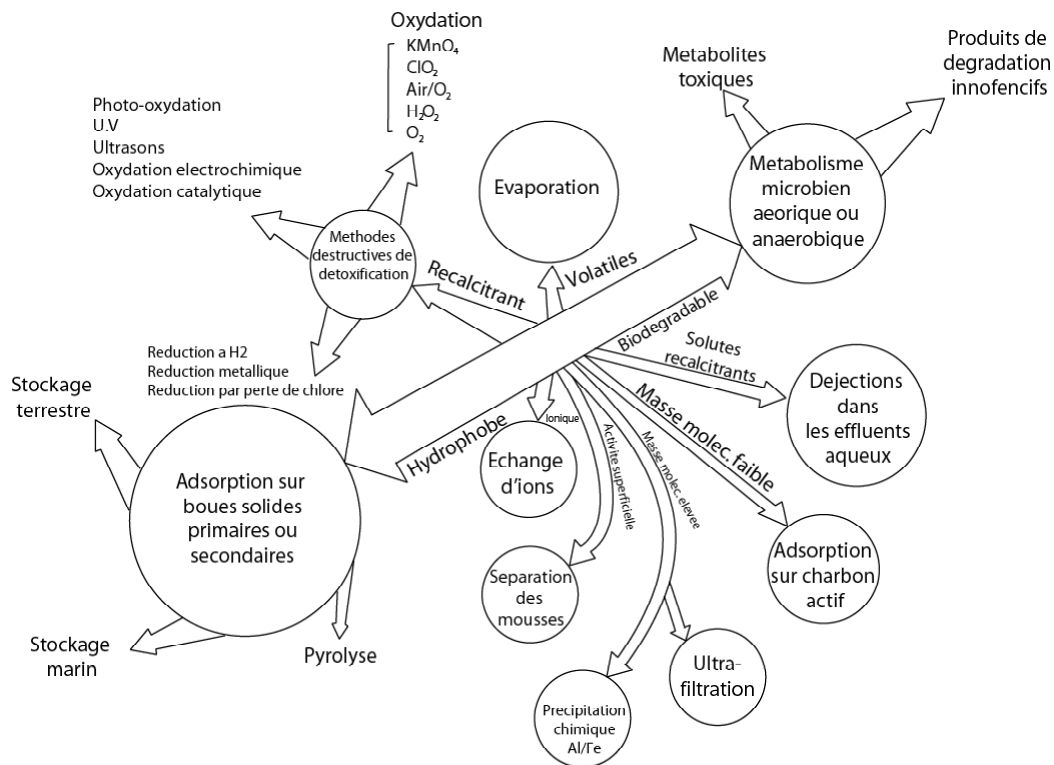
## 1.2 Les procédés de traitement dans l'industrie des eaux usées

Les usines de traitement des eaux (UTES) jouent un rôle déterminant dans l'introduction des produits pharmaceutiques dans l'environnement. Des contaminants organiques dans les effluents peuvent être enlevés par différents processus (**Figure 1.2**). Cependant, la plupart de ces techniques sont seulement appropriées aux effluents spécifiques d'origine industrielle et sont dispendieuses<sup>106</sup>.

Les UTES municipales ont été conçues principalement pour traiter les déchets humains principalement d'origine naturelle, souvent par l'intermédiaire de l'action dégradante des micro-organismes et de la coagulation/floculation des solides en suspension parfois complétée par un traitement tertiaire (par exemple, oxydation chimique/ ultra-violette)<sup>107</sup>.

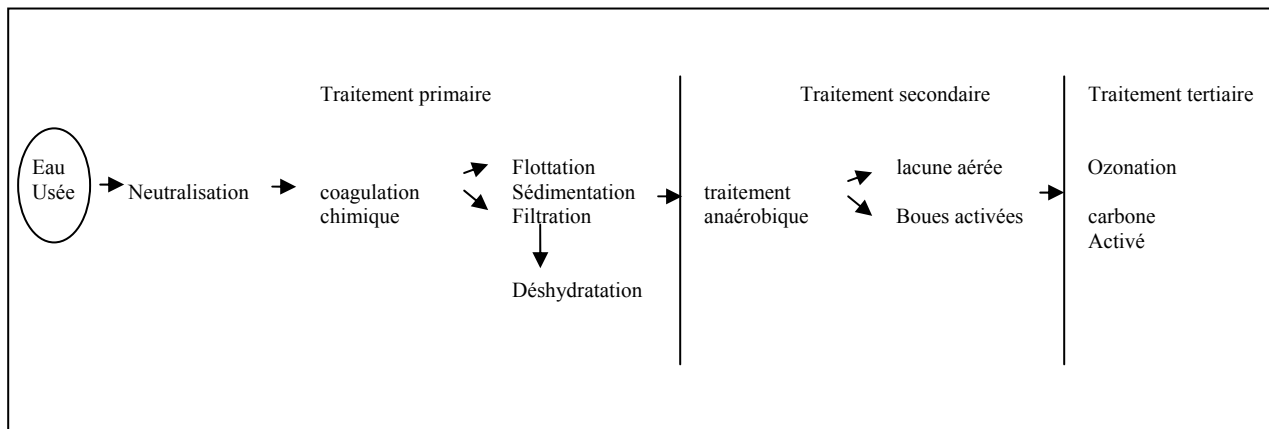
Deux mécanismes pour enlever les composés organiques sont principalement utilisés :

- a) La sorption aux solides filtrables, qui plus tard sont enlevés avec les boues, avec sédimentation chimique assistée par l'ajout de flocculants et/ou de tensioactifs.
- b) La transformation des produits de faible poids moléculaire avec dégradation microbienne, menant parfois à une minéralisation totale générant  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ , ou traitement de boues activées.



**Figure 1.2-**Devenir de contaminants organiques durant les procédés de traitement  
Adapté de Rogers 1996<sup>106</sup>.

Pendant une sédimentation primaire, les contaminants hydrophobes peuvent se répartir dans les solides primaires des boues. Cette tendance à s'accumuler dans les solides peut être estimée avec le coefficient de partition octanol-eau ( $K_{ow}$ ). Un traitement secondaire peut impliquer les deux procédés: aérobie (filtres biologiques, traitement de boue activée, étangs d'oxydation) ou anaérobie biodégradative (digestion de boues)<sup>106</sup>.



**Figure 1.3-**Technologies alternatives de traitement des eaux usées  
Adapté de Meyers 1998<sup>108</sup>.

### 1.2.1 Sédimentation chimiquement assistée (SCA)

Un des processus physico-chimiques les plus communs pour le déplacement de solides est la sédimentation chimiquement assistée (SCA). Celle-ci est utilisée à la station de la Ville de Montréal. Différents types de produits chimiques sont employés pour l'enlèvement des solides, du pétrole/des graisses et du phosphore. La coagulation des composants dissous en utilisant les sels ferriques ( $\text{FeCl}_3$  ou d'alum) est très commune. Ce produit chimique peut être appliqué individuellement ou en combinaison avec d'autres traitements. Des polymères organiques synthétiques à longue chaîne sont employés avec des coagulants pour former de floccs colloïdaux<sup>109</sup>.

Les solides en suspension, des colloïdes inorganiques et organiques dans l'eau usée, sont typiquement enlevés par coagulation, processus qui consiste à ajouter un ion chargé positivement, tel que le  $\text{Fe}^{3+}$ , ou un polyélectrolyte cationique, causant la déstabilisation des particules et la neutralisation des charges<sup>108</sup>. Quand l'agent de précipitation est une solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$ , le changement du pH dans la gamme alcaline a comme conséquence un précipité volumineux d'hydroxyde ferrique qui peut adsorber efficacement et éliminer plusieurs composés contenus dans l'eau usée.



### **1.2.2 Boues activées conventionnelles (CAS)**

Les boues activées conventionnelles (CAS), utilisent une suspension de masse microbienne, ils sont le processus de traitement des eaux résiduelles employé le plus couramment<sup>110</sup>. Dans ce processus, l'eau usée est mélangée à la population bactérienne dans un réservoir d'aération qui est alors transporté à un réservoir de sédimentation où la biomasse floculée se sépare, tandis que l'effluent continue vers la prochaine étape. Cela signifie que le réservoir d'aération et le clarificateur final forment une seule étape du procédé. La séparation des eaux et des boues traitées se produit dans le clarificateur via sédimentation<sup>111</sup>. Par conséquent, la capacité de sédimenter est un critère important. La concentration de biomasse dans le mélange est limitée par la capacité du clarificateur.

### **1.2.3 Bioréacteurs à membranes (MBRs)**

Le bioréacteur à membranes (MBR) est un système qui combine le traitement biologique des micro-organismes et le procédé de séparation avec membranes, qui remplace les purificateurs secondaires en une seule étape<sup>112</sup>. L'eau à traiter est mélangée à la biomasse, et ce mélange est filtré à l'aide de la membrane en séparant la biomasse de l'eau traitée. Dans des bioréacteurs à membranes, la concentration de la biomasse a beaucoup moins d'influence que dans les CAS, car la séparation est réalisée par la filtration sur membrane. Ainsi, l'usine peut fonctionner à des concentrations plus élevées de biomasse, ce qui permet d'opérer des usines de plus petite taille. Les MBRs sont souvent utilisés pour leur potentiel à améliorer l'enlèvement de substances dangereuses des eaux pour l'environnement aquatique<sup>113, 114</sup>. En outre, comme toutes les bactéries sont retenues, leur adaptation à la minéralisation est plus efficace.

En général, il y a plusieurs avantages à employer les MBRs. L'avantage principal des MBRs comparativement aux CAS est que la quantité de solides en suspension restant dans l'effluent d'un MBR est moindre, donnant ainsi pour résultat une meilleure qualité de l'eau traitée<sup>112</sup>. Les inconvénients bien connus sont les coûts de production et

d'entretien plus élevés ainsi qu'une consommation d'énergie accrue en comparaison avec les systèmes conventionnels.

#### **1.2.4 Comparaison de l'efficacité d'élimination des trois procédés de traitement**

Il existe un grand nombre d'études comparant les taux d'efficacité de traitement des UTEs ainsi que les techniques de traitement. Ternes *et al.* ont été parmi les premiers à rapporter l'efficacité d'élimination d'une série d'UTEs allemandes pour 32 médicaments représentant cinq catégories physiologiques, dont le régulateur de lipides bézafibrate et l'agent cytostatique cyclophosphamide<sup>18</sup>. Dans cette étude, les échantillons provenaient d'UTEs traitant principalement des décharges domestiques (utilisant les CAS). L'élimination/remédiation du composé parent (sans oublier que les métabolites possibles n'ont pas été quantifiés) va de 7% (pour la carbamazépine, un antiépileptique) à 96% (pour le propranolol, un bêtabloquant); la plupart des taux d'efficacité d'enlèvement étaient en moyenne d'environ 60%.

Schröder *et al.* ont trouvé des résultats similaires dans les échantillons d'une usine d'épuration physico-chimique avec sédimentation chimiquement assistée. Leur résultats ont montré que l'efficacité de traitement de polluants organiques polaires est quasiment nulle<sup>115</sup>. Stumpf *et al.* ont rapporté que l'efficacité d'enlèvement des usines d'épuration brésiliennes pour le bézafibrate est seulement de 50% en utilisant un traitement de boues activées et de 27% en utilisant des filtres biologiques, confirmant que la dégradation est extrêmement limitée pour ce composé<sup>98</sup>.

Une étude récente d'efficacité d'abattement des pharmaceutiques incluant le bézafibrate dans des échantillons d'eau usée a été faite par Radjenovic *et al.*. Les auteurs ont comparé le traitement par boues activées conventionnel (CAS) et un traitement avec bioréacteur de membrane (MBR) à échelle pilote<sup>116, 117</sup>. L'étude a montré que certains composés ont été bien éliminés par les deux systèmes et d'autres, tels que le bézafibrate, ont eu un enlèvement très satisfaisant, de 80% dans le CAS, alors que les réacteurs MBRs réalisaient une élimination de 90% de cette drogue.

L'enlèvement des micropolluants aisément biodégradables par les MBRs pourrait résulter de la taille de floculation plus petite des boues, qui augmente le transfert de masse par diffusion et augmente donc l'élimination. La composition des boues provenant d'un bioréacteur de membrane (micro-organismes spécialisés, grande quantité de biomasse active en suspension) a aussi été prise en compte pour la diminution des taux de rejets. Les résultats ont démontré que la technologie de MBRs surpasse généralement le traitement de CAS pour enlever les PPSPs dans les eaux usées.

Celiz *et al.* ont publié une autre étude de comparaison de deux systèmes de traitement, MBR à l'échelle pilote vs CAS dans l'analyse de traces de produits pharmaceutiques polaires telle que l'énalapril<sup>118</sup>. Dans cette étude les auteurs ont démontré que l'énalapril est légèrement éliminé par un traitement CAS, mais il est réduit de plus de 95% dans le MBR. Encore une fois les résultats indiquent que le MBR a un rendement plus élevé pour l'élimination de nombreux produits pharmaceutiques polaires dans les eaux usées.

Clara *et al.* ont aussi réalisé des études comparatives sur le devenir de quelques composés pharmaceutiques, dont le bézafibrate, en incluant un traitement MBR à échelle pilote et un traitement conventionnel de boues activées (CAS)<sup>119</sup>. Pour les deux usines étudiées, BEZ est dégradé avec un taux d'élimination de plus de 90% ayant pour résultat de très faibles concentrations dans l'effluent. Pour ce composé, des différences minimales ont pu être détectées entre le traitement conventionnel de boues activées et le traitement par bioréacteur à membranes. Cette observation mène à la conclusion que la membrane d'ultrafiltration n'offre pas d'avantage significatif lorsque comparée aux autres type de rétention.

### **1.3 La station d'épuration des eaux usées de Montréal**

La station d'épuration des eaux usées de la Ville de Montréal intercepte et épure les eaux usées de toute l'île de Montréal afin de contribuer à l'assainissement des cours

d'eau. La station traite un volume d'eaux usées représentant 50 % des eaux usées traitées du Québec. Avec sa capacité d'environ 7,6 millions de mètres cubes par jour (deux milliards de gallons par jour), il s'agit de la plus importante station de traitement physico-chimique des Amériques<sup>120</sup>.

La station d'épuration des eaux usées de la Ville de Montréal se conforme à certains paramètres de rejets établis par le ministère des Affaires municipales du Québec. Ces paramètres visent essentiellement la récupération de la majeure partie des matières en suspension et du phosphore contenu dans les eaux usées arrivant à la station. Les principales conditions de rejet auxquelles doit se soumettre la station d'épuration concernent les matières en suspension et le phosphore total, avec des concentrations respectivement de <20 et <0.50 mg/L sur la base des concentrations moyennes annuelles<sup>121</sup>.

Heureusement, les politiciens municipaux ont annoncé que dans les prochaines années, la station sera équipée d'un procédé d'ozonation avancée pour la désinfection et l'enlèvement des composés domestiques et émergents, ce qui devrait permettre d'améliorer considérablement la qualité de l'eau du fleuve Saint-Laurent<sup>122</sup>.

### **1.3.1 Le fleuve Saint Laurent**

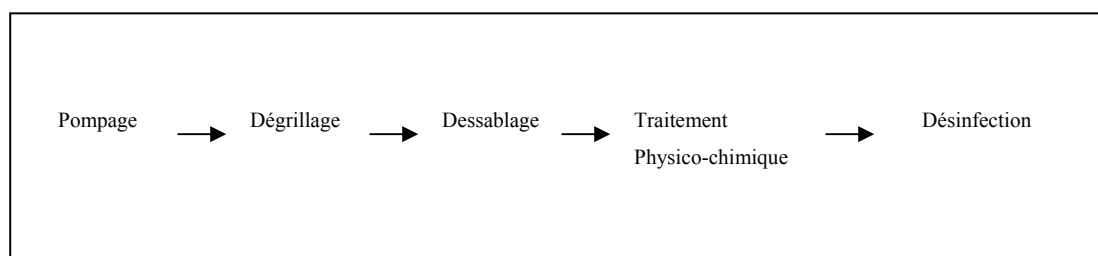
Le Saint-Laurent est le plus important cours d'eau du Québec et l'un des grands fleuves du monde. L'urbanisation, l'industrialisation et l'intensification des activités agricoles, liées à un changement du mode de production, ont toutefois contribué, au cours du 20<sup>e</sup> siècle, à la détérioration de la qualité de ses eaux<sup>123</sup>. Comme résultat des efforts financiers et techniques qui ont été consacrés, actuellement plus de 98 % des municipalités desservies par un réseau d'égouts sont dotées d'une station d'épuration. Le traitement des eaux usées, presque inexistant au début des années 1980, est maintenant généralisé.

Durant les dernières années, les produits pharmaceutiques tels que les composés anti-inflammatoires et les anticonvulsants ont fait l'objet d'études visant à évaluer leur écotoxicité dans l'effluent de la plus grande station d'épuration d'eaux usées se déversant dans le fleuve Saint-Laurent<sup>124, 125</sup>. Les produits pharmaceutiques qui ont été trouvés dans les eaux usées et les eaux de surface sont susceptibles de contaminer l'environnement aquatique, y compris les eaux souterraines. Les résultats indiquent que des effets létaux aigus sont peu susceptibles de se produire dans l'environnement, mais que des effets chroniques à long terme pourraient toutefois se manifester<sup>126</sup>.

Bien qu'à ce jour les effets des anti-inflammatoires chez la moule exposée en laboratoire aux rejets urbains n'ont pu être démontrés, des scientifiques ont récemment observé que le sulfaméthoxazole, le naproxène et l'ibuprofène produisent des effets toxiques à des concentrations dix fois inférieures aux valeurs mesurées dans les effluents municipaux (ou plus faibles encore)<sup>127</sup>. De plus, certaines substances considérées peu ou non toxiques, comme la caféine, peuvent causer des dommages oxydatifs dans les tissus de certains organismes aquatiques comme la moule<sup>125, 128</sup>.

### 1.3.2 Le procédé général de traitement des eaux à Montréal

Les installations municipales de traitement des eaux de la Ville de Montréal mettent en oeuvre des mécanismes et des processus de base de traitement pour des eaux qui ont été contaminées par des activités anthropogéniques domestiques, municipales, industrielles et commerciales avant sa décharge dans l'environnement. Pour enlever les contaminants, quelques stratégies de traitement primaire sont employées, les solides sont enlevés en utilisant des techniques de sédimentation, de filtration et de floculation avec addition de polymères (**Figure 1.4**).



**Figure 1.4**-Schéma de traitement des eaux usées à l'UTE de Montréal

À leur arrivée à la station d'épuration, les eaux usées sont relevées en surface par la station de pompage, elles sont dirigées vers les grilles du bâtiment de prétraitement. Le dégrillage enlève les plus grosses matières solides contenues dans les eaux usées, tels les roches, les bouts de bois, les chiffons, les contenants de plastique, etc. À la sortie des dégrilleurs, un canal d'alimentation permet de diriger les eaux usées vers les dessableurs ou, en cas d'urgence, dans une conduite souterraine d'évacuation jusqu'à l'émissaire de la station via la conduite souterraine de dérivation de l'intercepteur nord.

Après, les eaux usées sont dirigées vers des dessableurs aérés, la vitesse de l'eau y est réduite afin de favoriser le dépôt des particules dans les bassins. Les sables sont constitués de 97 à 98 % de matières inorganiques et varient en grosseur entre la taille d'un grain de sable et celle d'un caillou de moins de 2,5 cm de diamètre. En moyenne quatorze tonnes de sables sont retirées des eaux usées chaque jour<sup>121</sup>.

#### *Traitement primaire physico-chimique*

Le but du traitement primaire physico-chimique des eaux usées est de procéder à la réduction de la quantité de phosphore et d'augmenter le rendement global de la décantation de la matière en suspension. Le procédé comprend l'ajout d'un coagulant et d'un aide coagulant en vue de former des floccs facilement décantables. Le chlorure ferrique (parfois l'alum) est utilisé comme coagulant et un polymère anionique sert d'aide coagulant. Le coagulant est injecté dans les eaux usées à l'aide de canaux placés aux grilles, alors que l'aide coagulant est injecté dans les déversoirs à la sortie des dessableurs. Les eaux usées sortant des dessableurs sont acheminées vers des décanteurs, elles y séjournent durant une période d'environ deux heures afin de permettre aux matières en suspension et aux floccs (hydroxydes insolubles) formés par les produits chimiques de se déposer au fond des décanteurs, formant une matière appelée « boues ». Ces processus, cependant, tendent à produire un grand volume de boues contenant beaucoup d'eau, qui peuvent être longues à filtrer et difficiles à assécher.

### *Le traitement des boues et des écumes*

Quatre réservoirs servent à l'emmagasinement des boues avant leur transfert au bâtiment de traitement des boues et des écumes. De l'air est injecté au fond des réservoirs afin de maintenir en suspension ces boues très liquides et pour en conserver les caractéristiques qui faciliteront leur traitement. Les boues sont conditionnées à l'aide d'un polymère cationique avant leur déshydratation. L'ajout de ce produit chimique a pour but de favoriser la séparation des solides et de l'eau. Ensuite, elles sont filtrées avec des presseurs rotatifs qui servent à réduire leur teneur en eau et ainsi à augmenter leur siccité (concentration en solides). Les boues ainsi obtenues sont appelées « gâteaux ». Les gâteaux sont asséchés dans des fours, puis ils sont incinérés.

## **1.4 Objectifs de recherche**

L'objectif principal de cette thèse est de développer des méthodes analytiques LC-MS/MS pour étudier la présence de certains composés pharmaceutiques dans les eaux provenant du fleuve Saint Laurent et les effluents s'y déversant. Différents aspects ont été étudiés : (i) la performance des trois techniques d'ionisation (ESI, APPI et APCI) dans la détection des composés d'étude ; (ii) la quantification de la présence des composés pharmaceutiques ciblés dans des échantillons d'eau usée, d'eau de surface et d'eau du robinet ; (iii) l'étude de l'élimination par ozonation de deux agents cytostatiques.

Les trois techniques API les plus utilisées (ESI, APCI et APPI) diffèrent dans leur processus d'ionisation et leur applicabilité. Étant donné les effets de matrice dans des échantillons d'eau, il était essentiel de connaître le potentiel de chaque source d'ionisation. Il a été démontré que les effets de matrice peuvent différer d'une technique d'ionisation à l'autre selon le mode d'ionisation (positif ou négatif) et les conceptions technologiques des différentes sources d'ionisation.

L'objectif est de démontrer que ESI est une méthode plus efficace que APPI et APCI pour l'analyse des contaminants dans des échantillons avec matrices complexes comme les eaux usées. Afin de démontrer la capacité d'ionisation d'ESI, des études d'intensité de signal, de limites de détection et d'effets de matrice ont été réalisées.

Il est reconnu qu'à cause de la faible efficacité d'enlèvement des processus primaires de traitement des eaux usées, les usines d'épuration sont une source importante de libération de différents composés organiques dans l'environnement. Le deuxième objectif est de quantifier les composés ciblés dans différents échantillons d'eaux usées, de surface et du robinet. Deux méthodes analytiques de chromatographie liquide avec extraction en phase solide en ligne couplée à la spectrométrie de masse ont été développées.

Finalement, étant donné que l'ozonation est un procédé important dans l'oxydation et l'élimination d'une large gamme de polluants organiques dans l'eau, il est proposé d'oxyder les deux composés cytostatiques étudiés dans ce travail. L'objectif dans ce cas est d'étudier la cinétique d'oxydation du cyclophosphamide et du méthotrexate à l'échelle du laboratoire.

## **1.5 Structure de la thèse**

La thèse est constituée de quatre articles dont trois publiés dans des journaux scientifiques reconnus, un quatrième en cours de révision au moment où cette thèse est déposée. Après un premier chapitre d'introduction présentant une revue bibliographique du sujet d'étude ainsi que le contexte du projet de recherche, nous décrivons dans un deuxième chapitre les différentes techniques analytiques utilisées pour réaliser ce travail de thèse, en incluant une introduction au procédé d'oxydation par ozonation que nous avons étudié pour le traitement du méthotrexate et de la cyclophosphamide.

Dans le chapitre 3 nous étudions les performances des trois techniques d'ionisation: ESI, APPI et APCI. Pour étudier et comparer la performance des sources, nous avons utilisé



le système avec colonne analytique (*on-column*) et aussi sans colonne analytique par analyse de flux direct (FIA). Cette étude a fait l'objet d'un troisième article intitulé: « **Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS Analysis of Bezafibrate, Cyclophosphamide, Enalapril, Methotrexate and Orlistat in Municipal Wastewater** » (Araceli Garcia-Ac, Pedro A. Segura, Liza Viglino, Christian Gagnon and Sébastien Sauvé), qui a été accepté dans le *Journal of Mass Spectrometry*.

Dans le chapitre 4 nous développons une première méthode analytique pour la quantification de cinq composés pharmaceutiques à utiliser dans les eaux provenant d'une usine d'épuration et des eaux de surface proches de l'usine. Cette étude a fait l'objet d'un article qui a été publié sous le titre : « **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**» (Araceli Garcia-Ac, Pedro A. Segura, Christian Gagnon and Sébastien Sauvé. *Journal of Environmental Monitoring* (11): 830-838, 2009).

Le cinquième chapitre traite d'une deuxième méthode analytique LC-MS/MS, pouvant utiliser un échantillon de grand volume pour améliorer les limites de détection de la méthode. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Chromatography A* et peut être trouvée sous la référence: « **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**» (Araceli Garcia-Ac, Pedro A. Segura, Liza Viglino, Alexandra Fürtös, Christian Gagnon, Michèle Prévost et Sébastien Sauvé. *Journal of Chromatography A* 48 (1216): 8518-8527, 2009).

Le sixième chapitre étudie la dégradation aqueuse par l'ozone de deux agents cytostatiques, la cyclophosphamide et le méthotrexate à l'échelle du laboratoire. Nous avons déterminé les constantes de vitesse du second ordre pour la réaction avec l'ozone moléculaire et avec les radicaux OH. Cette étude a été publiée dans le journal *Chemosphere*, et s'intitule « **Oxidation Kinetics of Cyclophosphamide and**

**Methotrexate by Ozone in Drinking Water** » (Araceli Garcia-Ac, Romain Broséus, Simon Vincent, Benoit Barbeau, Michèle Prévost and Sébastien Sauvé. *Chemosphere* 79 (11): 1056-63 2010.

Le septième et dernier chapitre discute de la portée générale des résultats obtenus dans les différentes études et présente certaines avenues de recherches futures.

## 1.6 Références

- (1) Barreriro, J. L. In *Focus on Water Resource Research*, First ed.; Heikkinen, E., Ed.; Nova Science Publishers: New York, 2008, pp 3-14.
- (2) Glassmeyer, S. In *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*, First ed.; Aga, D. S., Ed.; Taylor & Francis Group: Boca Raton, London, New York, 2008, pp 3-52.
- (3) Daughton, C. G. *Environmental Impact Assessment Review* **2004**, *24*, 711-732.
- (4) de Alda, M. J. L.; Diaz-Cruz, S.; Petrovic, M.; Barcelo, D. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 503-526.
- (5) Lambropoulou, D. A.; Giokas, D. L.; Sakkas, V. A.; Albanis, T. A.; Karayannis, M. I. *Journal of Chromatography A* **2002**, *967*, 243-253.
- (6) Ternes, T. A.; Herrmann, N.; Bonerz, M.; Knacker, T.; Siegrist, H.; Joss, A. *Water Research* **2004**, *38*, 4075-4084.
- (7) <http://www.epa.gov/esd/chemistry/pharma/faq.html>.
- (8) Daughton, C. In *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment, Scientific and Regulatory Issues* First ed.; Daughton, C., Ed.; American Chemical Society: Washington D. C, 2001.
- (9) Diaz-Cruz, M. S.; Barcelo, D. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2005**, *24*, 645-657.
- (10) Jorgensen, S. E.; Halling-Sorensen, B. *Chemosphere* **2000**, *40*, 691-699.
- (11) Kummerer, K. *Pharmaceuticals in the environment-Sources, Fate, Effects, and Risk*, Second ed.; Springer: Berlin Heidelberg, 2004.
- (12) Ternes, T. In *Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment, Scientific and Regulatory Issues* Daughton, C., Ed.; American Chemical Society: Washington D. C, 2001, pp 39-54.
- (13) Daughton, C. G. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2001**, *12*, 1067-1076.
- (14) Joss, A.; Andersen, H.; Ternes, T.; Richle, P. R.; Siegrist, H. *Environmental Science & Technology* **2004**, *38*, 3047-3055.
- (15) Joss, A.; Keller, E.; Alder, A. C.; Gobel, A.; McArdell, C. S.; Ternes, T.; Siegrist, H. *Water Research* **2005**, *39*, 3139-3152.
- (16) Petrovic, M.; Gonzalez, S.; Barcelo, D. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2003**, *22*, 685-696.
- (17) Reddersen, K.; Heberer, T.; Dünnebier, U. *Chemosphere* **2002**, *49*, 539-544.
- (18) Ternes, T. A. *Water Research* **1998**, *32*, 3245-3260.
- (19) Zwiener, C.; Frimmel, F. H. *Science of the Total Environment* **2003**, *309*, 201-211.
- (20) Hirsch, R.; Ternes, T.; Haberer, K.; Kratz, K. L. *Science of the Total Environment* **1999**, *225*, 109-118.
- (21) Andreozzi, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P. *Chemosphere* **2003**, *50*, 1319-1330.
- (22) Boyd, G. R.; Reemtsma, H.; Grimm, D. A.; Mitra, S. *Science of the Total Environment* **2003**, *311*, 135-149.
- (23) Hites, R. A.; Biemann, K. *Science* **1972**, *178*, 158-160.
- (24) Okun, D. A.; Weiss, C. M. *J Water Pollut Control Fed* **1964**, *36*, 791-863.

- (25) Ahling, B.; Jensen, S. *Anal Chem* **1970**, *42*, 1483-1486.
- (26) Ogner, G.; Schnitzer, M. *Science* **1970**, *170*, 317-318.
- (27) Forlin, L.; Hansson, T. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1982**, *6*, 41-48.
- (28) Heberer, T.; Schmidt-Baumler, K.; Stan, H. J. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **1998**, *26*, 272-278.
- (29) Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. *Environmental Science & Technology* **2002**, *36*, 1202-1211.
- (30) Poiger, T.; Buser, H. R.; Muller, M. D. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2001**, *20*, 256-263.
- (31) Buser, H. R.; Muller, M. D.; Theobald, N. *Environmental Science & Technology* **1998**, *32*, 188-192.
- (32) Heberer, T.; Butz, S.; Stan, H. J. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **1995**, *58*, 43-53.
- (33) Schwarzenbach, R. P.; Escher, B. I.; Fenner, K.; Hofstetter, T. B.; Johnson, C. A.; von Gunten, U.; Wehrli, B. *Science* **2006**, *313*, 1072-1077.
- (34) Glassmeyer, S. In *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*  
First ed.; Aga, D. S., Ed.; Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2008, pp 3-52.
- (35) Kummerer, K. *Journal of Environmental Management* **2009**, *90*, 2354-2366.
- (36) Lee, C.; Schmidt, C.; Yoon, J.; von Gunten, U. *Environmental Science & Technology* **2007**, *41*, 2056-2063.
- (37) Mendez-Arriaga, F.; Esplugas, S.; Gimenez, J. *Water Research* **2008**, *42*, 585-594.
- (38) Ravina, M.; Campanella, L.; Kiwi, J. *Water Research* **2002**, *36*, 3553-3560.
- (39) Ternes, T. A.; Stuber, J.; Herrmann, N.; McDowell, D.; Ried, A.; Kampmann, M.; Teiser, B. *Water Research* **2003**, *37*, 1976-1982.
- (40) Zuhlke, S.; Dunnbier, U.; Heberer, T. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1050*, 201-209.
- (41) Heberer, T. *Toxicology Letters* **2002**, *131*, 5-17.
- (42) Verlicchi, P. *Journal of Hydrology* **2010**, *389*, 426-428.
- (43) Oppenheimer, J.; Stephenson, R.; Burbano, A.; Liu, L. *Water Environ. Res.* **2007**, *79*, 2564-2577.
- (44) Snyder, S. A.; Westerhoff, P.; Yoon, Y.; Sedlak, D.L. *Environ. Eng. Sci* **2003**, *20* 449-469.
- (45) Andreozzi, R.; Canterino, M.; Marotta, R.; Paxeus, N. *Journal of Hazardous Materials* **2005**, *122*, 243-250.
- (46) Machado, E. L.; Kist, L. T.; Schmidt, R.; Hoeltz, J. M.; Dalberto, D.; Alcayaga, E. L. A. *Environ Technol* **2007**, *28*, 1135-1143.
- (47) Oaks, J. L.; Gilbert, M.; Virani, M. Z.; Watson, R. T.; Meteyer, C. U.; Rideout, B. A.; Shivaprasad, H. L.; Ahmed, S.; Chaudhry, M. J. I.; Arshad, M.; Mahmood, S.; Ali, A.; Khan, A. A. *Nature* **2004**, *427*, 630-633.
- (48) Sumpter, J. P. *Toxicology Letters* **1995**, *82-3*, 737-742.
- (49) Fent, K.; Weston, A. A.; Caminada, D. *Aquatic Toxicology* **2006**, *78*, 207-207.
- (50) Al-Ahmad, A.; Daschner, F. D.; Kummerer, K. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1999**, *37*, 158-163.

- (51) Backhaus, T.; Grimme, L. H. *Chemosphere* **1999**, *38*, 3291-3301.
- (52) Boxall, A. B. A.; Kolpin, D. W.; Halling-Sorensen, B.; Tolls, J. *Environmental Science & Technology* **2003**, *37*, 286A-294A.
- (53) Lutzhoft, H. C. H.; Halling-Sorensen, B.; Jorgensen, S. E. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1999**, *36*, 1-6.
- (54) Altenburger, R.; Walter, H.; Grote, M. *Environmental Science & Technology* **2004**, *38*, 6353-6362.
- (55) Backhaus, T.; Arrhenius, A.; Blanck, H. *Environmental Science & Technology* **2004**, *38*, 6363-6370.
- (56) Cleuvers, M. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2004**, *59*, 309-315.
- (57) Silva, E.; Rajapakse, N.; Kortenkamp, A. *Environmental Science & Technology* **2002**, *36*, 1751-1756.
- (58) Kasprzyk-Hordern, B.; Dinsdale, R. M.; Guwy, A. J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *391*, 1293-1308.
- (59) Loos, R.; Gawlik, B. M.; Locoro, G.; Rimaviciute, E.; Contini, S.; Bidoglio, G. *Environmental Pollution* **2009**, *157*, 561-568.
- (60) Rodil, R.; Quintana, J. B.; Lopez-Mahia, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodriguez, D. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 2958-2969.
- (61) Zorita, S.; Boyd, B.; Jonsson, S.; Yilmaz, E.; Svensson, C.; Mathiasson, L.; Bergstrom, S. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *626*, 147-154.
- (62) Hernandez, F.; Ibanez, M.; Pozo, O. J.; Sancho, J. V. *Journal of Mass Spectrometry* **2008**, *43*, 173-184.
- (63) Marin, J. M.; Sancho, J. V.; Pozo, O. J.; Lopez, F. J.; Hernandez, F. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1133*, 204-214.
- (64) Pozo, O. J.; Sancho, J. V.; Ibanez, M.; Hernandez, F.; Niessen, W. M. A. *Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 1030-1042.
- (65) [http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top\\_Line\\_Data/Top%2015%20Global%20Therapeutic%20Classes\\_2009.pdf](http://www.imshealth.com/deployedfiles/imshealth/Global/Content/StaticFile/Top_Line_Data/Top%2015%20Global%20Therapeutic%20Classes_2009.pdf).
- (66) Nikolaou, A.; Meric, S.; Fatta, D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *387*, 1225-1234.
- (67) Mompelat, S.; Le Bot, B.; Thomas, O. *Environment International* **2009**, *35*, 803-814.
- (68) Wang, L.; Albasi, C.; Faucet-Marquis, V.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Dorandeu, C.; Marion, B.; Causserand, C. *Water Research* **2009**, *43*, 4115-4122.
- (69) Qin, X. Z.; Demarco, J.; Ip, D. P. *Journal of Chromatography A* **1995**, *707*, 245-254.
- (70) McInnes, G. *Clinical pharmacology and therapeutics of hypertension*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008.
- (71) Reid, T.; Yuen, A.; Catolico, M.; Carlson, R. W. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1993**, *33*, 82-84.
- (72) Steele, W. H.; Stuart, J. F. B.; Lawrence, J. R.; McNeill, C. A.; Sneader, W. E.; Whiting, B.; Calman, K. C.; McVie, J. G. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1979**, *3*, 235-237.
- (73) <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01083>

- (74) Ahrer, W.; Scherwenk, E.; Buchberger, W. *Journal of Chromatography A* **2001**, *910*, 69-78.
- (75) Miao, X. S.; Koenig, B. G.; Metcalfe, C. D. *Journal of Chromatography A* **2002**, *952*, 139-147.
- (76) StegerHartmann, T.; Kummerer, K.; Hartmann, A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1997**, *36*, 174-179.
- (77) Buerge, I. J.; Buser, H. R.; Poiger, T.; Muller, M. D. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40*, 7242-7250.
- (78) Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M.; Fanelli, R. *Lancet* **2000**, *355*, 1789-1790.
- (79) Metcalfe, C. D.; Miao, X. S.; Koenig, B. G.; Struger, J. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2003**, *22*, 2881-2889.
- (80) Calamari, D.; Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R. *Environmental Science & Technology* **2003**, *37*, 1241-1248.
- (81) Vanderford, B. J.; Snyder, S. A. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40*, 7312-7320.
- (82) Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Calamari, D.; Fanelli, R.; Zuccato, E. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1092*, 206-215.
- (83) Abshagen, U.; Bablok, W.; Koch, K.; Lang, P. D.; Schmidt, H. A. E.; Senn, M.; Stork, H. *European Journal of Clinical Pharmacology* **1979**, *16*, 31-38.
- (84) Liu, Z. F.; Chan, K. K.; Wang, J. J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2581-2590.
- (85) Macfadyen, R. J.; Meredith, P. A.; Elliott, H. L. *Clinical Pharmacokinetics* **1993**, *25*, 274-282.
- (86) Kuo, C. Y.; Wu, H. L.; Kou, H. S.; Chiou, S. S.; Wu, D. C.; Wu, S. M. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1014*, 93-101.
- (87) Bennett, P. K.; Li, Y. T.; Edom, R.; Henion, J. *Journal of Mass Spectrometry* **1997**, *32*, 739-749.
- (88) Boesen, E. *Cytotoxic Drugs in the Treatment of Cancer*, First ed.; Edward Arnold London, 1969.
- (89) Golan, D. *Principles of Pharmacology, the Pathophysiologic Basic of Drug Therapy*; Wolters Kluwer Health: Philadelphia, 2008.
- (90) Gilard, V.; Martino, R.; Maletmartino, M. C.; Kutscher, B.; Muller, A.; Niemeyer, U.; Pohl, J.; Polymeropoulos, E. E. *Journal of Medicinal Chemistry* **1994**, *37*, 3986-3993.
- (91) Sessink, P. J. M.; Boer, K. A.; Scheefhals, A. P. H.; Anzion, R. B. M.; Bos, R. P. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **1992**, *64*, 105-112.
- (92) Sottani, C.; Turci, R.; Schierl, R.; Gaggeri, R.; Barbieri, A.; Violante, F. S.; Minoia, C. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 1289-1296.
- (93) Garcia-Ac, A.; Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauve, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2009**, *11*, 830-838.
- (94) Kummerer, K.; StegerHartmann, T.; Meyer, M. *Water Research* **1997**, *31*, 2705-2710.
- (95) Aherne, G. W.; Hardcastle, A.; Nield, A. H. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1990**, *42*, 741-742.

- (96) White, P. A.; Rasmussen, J. B. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **1998**, *410*, 223-236.
- (97) Schlesinger, Z.; Vered, Z.; Friedenson, A.; Reisin, L.; Jafari, J.; Flieb, T.; Sclarovsky, S.; Friedman, Y.; Ostfeld, B.; Solodky, A.; Abinader, E.; Rochfleish, S.; Palant, A.; Schneider, H.; Rosenfeld, T.; Khalid, S.; Wolfson, E.; Kishon, Y.; Narinsky, R.; Rotzak, R.; Davidov, A.; Levine, G.; Zahavi, I.; Vitrai, J.; Diker, D.; Pelled, B.; Pardu, J.; Galamidi, J.; Majadla, R.; Laniado, S.; Sherf, L.; Braun, S.; Eschar, Y.; Caspi, A.; Arditi, A.; Botwin, S.; Arkavi, L.; Ziv, M.; David, D.; Weisenberg, D.; Kohanovski, M.; Meisel, S.; Rougin, N.; Yahalom, M.; Glusman-Vazan, A.; Markiewitz, W.; Motlak, D.; Lessick, J.; Kagan, G.; Marmour, A.; Flich, M.; Solomon, R.; Tzivoni, D.; Zion, M.; Balkin, J.; Rabinowitz, B.; Barasch, E.; Brill, Z.; Aharon, L.; Asman, A.; Battler, A.; Gueron, M.; Cristal, N.; Liel, N.; Tsatskis, B.; Henkin, J.; Grp, B. I. P. S. *Circulation* **2000**, *102*, 21-27.
- (98) Stumpf, M.; Ternes, T. A.; Wilken, R. D.; Rodrigues, S. V.; Baumann, W. *Science of the Total Environment* **1999**, *225*, 135-141.
- (99) Farre, M.-I.; Ferrer, I.; Ginebreda, A.; Figueras, M.; Olivella, L.; Tirapu, L.; Vilanova, M.; Barcelo, D. *Journal of Chromatography A* **2001**, *938*, 187-197.
- (100) McMurray, J. J. V. *New England Journal of Medicine*, *362*, 228-238.
- (101) Kearney, P. M.; Whelton, M.; Reynolds, K.; Muntner, P.; Whelton, P. K.; He, J. *Lancet* **2005**, *365*, 217-223.
- (102) Burt, V. L.; Whelton, P.; Roccella, E. J.; Brown, C.; Cutler, J. A.; Higgins, M.; Horan, M. J.; Labarthe, D. *Hypertension* **1995**, *25*, 305-313.
- (103) Borgstrom, B. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1988**, *962*, 308-316.
- (104) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.
- (105) Hadvary, P.; Lengsfeld, H.; Wolfer, H. *Biochemical Journal* **1988**, *256*, 357-361.
- (106) Rogers, H. R. *Science of the Total Environment* **1996**, *185*, 3-26.
- (107) Daughton, C. G.; Ternes, T. A. *Environmental Health Perspectives* **1999**, *107*, 907-938.
- (108) Meyers, R. A. In *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*, 1st ed.; Meyers, R. A., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1998; Vol. 8, pp 5150-5220.
- (109) Station d'épuration des eaux usées, V. d. M. **2010**.
- (110) Gray, N. F. *Activated Sludge: Theory and Practice*, First ed.; Oxford University Press: New York, 1990.
- (111) Viessman, W. *Water Supply and Pollution Control*, 7th ed.; Pearson Education: London, 2005.
- (112) Manem, J. In *Water Treatment Membrane Processes*, First ed.; Mallevalle, J., Ed.; McGraw-Hill: New York, 1996, pp 17.11.
- (113) Kimura, K.; Hara, H.; Watanabe, Y. *Environmental Science & Technology* **2007**, *41*, 3708-3714.
- (114) Perez, S.; Eichhorn, P.; Aga, D. S. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24*, 1361-1367.
- (115) Schroder, H. F. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **1996**, *15*, 349-362.
- (116) Radjenovic, J.; Petrovic, M.; Barcelo, D. *Water Research* **2009**, *43*, 831-841.

- (117) Radjenovic, J.; Petrovic, M.; Barcelo, D. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *387*, 1365-1377.
- (118) Celiz, M. D.; Perez, S.; Barcelo, D.; Aga, D. S. *Journal of Chromatographic Science* **2009**, *47*, 19-25.
- (119) Clara, M.; Strenn, B.; Gans, O.; Martinez, E.; Kreuzinger, N.; Kroiss, H. *Water Research* **2005**, *39*, 4797-4807.
- (120) Env.Canada-a **2010**.
- (121) [http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?\\_dad=portal&\\_pageid=6497,54385602&\\_sc\\_hema=PORTAL](http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?_dad=portal&_pageid=6497,54385602&_sc_hema=PORTAL).
- (122) [http://www.radio-canada.ca/regions/Montreal/2009/07/08/005-desinfection\\_eaux\\_usees.shtml](http://www.radio-canada.ca/regions/Montreal/2009/07/08/005-desinfection_eaux_usees.shtml).
- (123) [www.mddep.gouv.qc.ca](http://www.mddep.gouv.qc.ca).
- (124) Gagné, F.; Blaise, C.; Andre, C. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2006**, *64*, 329-336.
- (125) Gagné, F.; Blaise, C.; Fournier, M.; Hansen, P. D. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **2006**, *143*, 179-186.
- (126) <http://www.ec.gc.ca/inre-nwri/default.asp?lang=Fr&n=C00A589F1&xml=C00A589F-1CB5-4B81-93C9-8305E2BFEED3&offset=9&toc=show>.
- (127) Blaise, C., F. Gagné, P. Eullaffroy et J.-F. Férard. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* **2006**, *10*, 29-51.
- (128) Gagné, F., C. Blaise et J. Hellou *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **2004**, *138*, 33-44.



---

## **CHAPITRE 2: Techniques expérimentales**

---

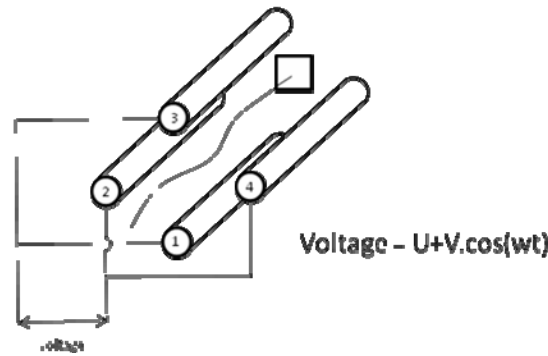
## 2.1 LC- MS/MS

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) est une technique analytique qui combine les capacités de séparation physique de la chromatographie liquide avec les capacités d'analyse de masse de la spectrométrie de masse. La LC-MS est une technique puissante utilisée pour de nombreuses applications qui ont une très haute sensibilité et de spécificité. En général, son application est orientée vers la détection et l'identification spécifique des produits chimiques dans un mélange complexe.

L'application de la LC-MS et de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) à l'analyse environnementale a permis la détermination d'une large gamme des composés et a ainsi permis la compréhension de la présence des contaminants environnementaux. La LC-MS/MS offre une amélioration au-dessus de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), puisque l'étape de dérivatisation n'est pas nécessaire. Généralement les LODs (limites de détection) obtenues avec la LC-MS/MS sont légèrement plus élevés que celles obtenues avec la GC-MS; cependant, LC-MS/MS a des avantages en termes de versatilité et préparation. Bien que la séparation complète ne soit pas nécessaire pour la détection en tandem, une bonne séparation améliore généralement la détectabilité et réduit les effets de suppression d'ions.

### 2.1.1 Principe de la technique: Analyse de masse par Quadrupôle et Triple Qaudrupôle (QqQ)

Un analyseur de masse de type Quadrupôle se compose de quatre électrodes parallèles. Les électrodes sont disposées comme le montre la **Figure 2.1**, qui montre aussi leurs connexions électriques. Un voltage constitué d'une composante de courant continu,  $U$ , et une radio fréquence (rf) :  $V \cos \omega t$  avec amplitude ' $V$ ' et fréquence ' $\omega$ ', est appliquée aux électrodes adjacentes<sup>1,2</sup>.

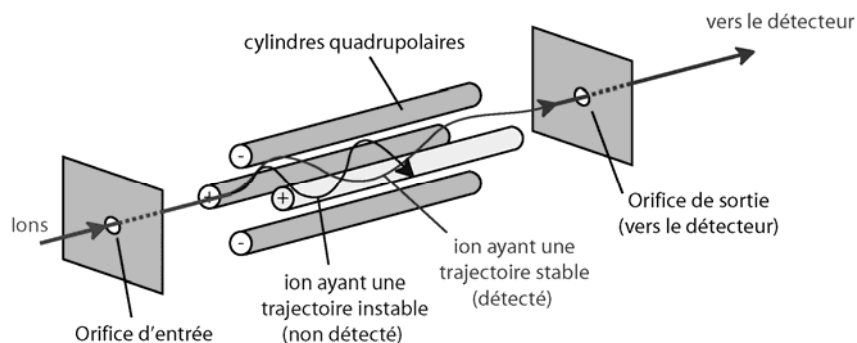


**Figure 2.1**-Connexions électriques entre les électrodes d'un analyseur de masse quadripolaire, adapté de Davis 1987<sup>1</sup>.

Les ions produits dans la source de l'instrument sont alors focalisés et passent au milieu des quadripôles. La séparation de masse est réalisée par le mouvement vibratoire stable d'ions dans une haute fréquence d'oscillation du champ électrique qui est créé par l'application du voltage<sup>3,4</sup> :

$$v = U + V \cos(\omega t) \quad (2.1)$$

Leur mouvement dépendra des champs électriques, de sorte que seulement des ions d'un ratio  $m/z$  sélectionnée auront une trajectoire stable et atteindront ainsi le détecteur. La radio fréquence est modulée pour apporter des ions de différents ratios  $m/z$  dans le centre du détecteur et ainsi permettre de former le spectre de masse (**Figure 2.2**).



**Figure 2.2**-Schéma d'un analyseur de masse quadripolaire, adapté de Niessen 2006<sup>4</sup>.

Les deux électrodes opposées dans le quadripôle ont un potentiel (marqué '+' dans la **Figure 2.2**) de :

$$+ (U+V\cos (\omega t)) \quad (2.2)$$

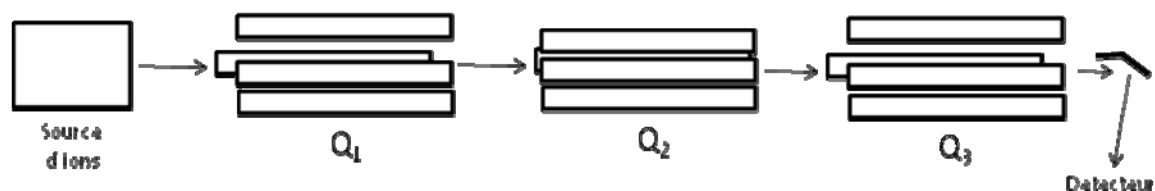
et les deux autres

$$- (U+V\cos (\omega t)) \quad (2.3)$$

Les potentiels appliqués sur les paires d'électrodes opposées varient sinusoïdalement comme  $\cos (\omega t)$  cycles avec du temps 't'. Ceci a comme conséquence que les ions peuvent traverser la région libre de champ au long de l'axe central des électrodes mais avec oscillations parmi les pôles. Ces oscillations modulent la trajectoire des ions en fonction de leur ratio  $m/z$ . Des combinaisons spécifiques des potentiels 'U' et 'V' et de la fréquence ' $\omega$ ' auront comme effets que les ions spécifiques auront une trajectoire stable à travers le quadripôle vers le détecteur. Tous les autres valeurs  $m/z$  auront une trajectoire instable et frapperont les quadripôles et ne seront pas détectées (**Figure 2.2**).

### *Triple quadripôle (QqQ)*

Dans l'analyse de masse avec triple quadripôle QqQ, les quadripôles sont placés en tandem, en ayant comme base des principes de travail qui ont été déjà décrits<sup>4</sup>. Dans ce dispositif simple, trois quadripôles sont disposées de façon séquentielle (**Figure 2.3**). Le premier ( $Q_1$ ) et le dernier quadripôle ( $Q_3$ ) fonctionnent comme des filtres de masse normaux (c'est à dire pour l'analyse de masse), les potentiels en courant continu (dc) et radio fréquence rf contrôlent leur fonctionnement. Celui du milieu ( $Q_2$ ) fonctionne seulement avec le potentiel de radio fréquence, cela signifie que  $Q_2$  permet de passer tous les ions au travers de lui.  $Q_2$  fonctionne comme une cellule de collision<sup>3</sup>.



**Figure 2.3-**Analyseur de masse triple-quadripolaire, adapté de Dass 2007<sup>3</sup>.

La spectrométrie de masse en tandem est un moyen de produire la fragmentation des ions générés dans la source d'ions<sup>4</sup>. Les méthodes modernes d'ionisation (par exemple ESI) produisent souvent seulement la molécule ionisée avec une fragmentation minimale.

Un mode fondamental de fonctionnement d'un QqQ, est le balayage de l'ion produit<sup>5</sup>. Il est communément la première étape dans l'identification d'un inconnu, ou de l'identification d'un spectre d'un composé standard, qui sera comparé avec le spectre d'un composé inconnu. Dans ce cas-ci, l'ion précurseur d'un inconnu ou d'un contaminant émergent suspect est sélectionné dans le première quadrupôle ( $Q_1$ ), l'ion est ensuite transféré dans le deuxième quadrupôle ( $Q_2$ ). Le dispositif de radio fréquence agit seulement comme cellule de collision, où il subit une fragmentation pour générer le spectre d'ion produit.

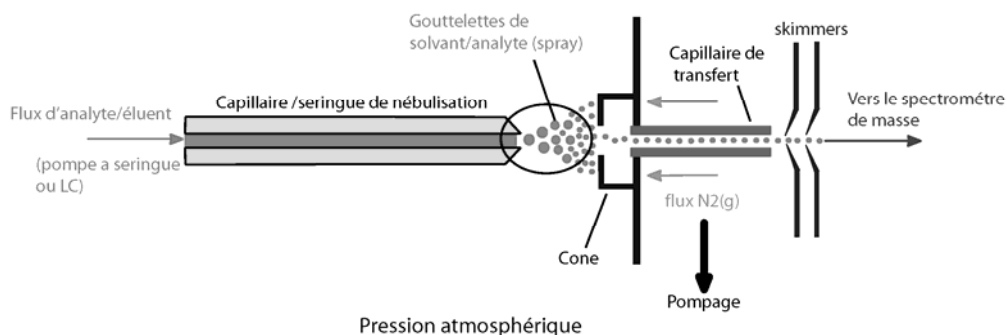
Toutefois, d'autres modes de balayage sont également possibles. Le suivi d'une réaction choisie (SRM)<sup>4, 5</sup>. Dans une telle expérience,  $Q_1$  sélectionne un ion précurseur particulier (ion parent), qui est dissocié au  $Q_2$  (par une dissociation de collision induite, CID) avec des atomes d'argon. Les ions produits (ions filles) sont de nouveau sélectionnés en fonction de leur ratio  $m/z$  avec  $Q_3$ . Le SRM est le mode de choix dans l'analyse quantitative, dans notre cas analyse quantitative environnementale pour des matrices complexes.

### 2.1.2 Sources d'ionisation à pression atmosphérique (API)

La formation des ions gazeux à pression atmosphérique est appelée technologie API, où l'analyte provenant de la chromatographe liquide est nébulisé dans une chambre, en présence du gaz à pression atmosphérique. Pour dissocier les molécules d'analyte et générer des ions une chambre de désolvatation et d'ionisation est nécessaire, ainsi qu'une aiguille de décharge couronne ou une lampe pour ioniser l'échantillon pour finalement entrer à une section d'analyse de masse. Les trois sources API les plus courantes sont l'électronébulisation (ESI), la photoionisation à pression atmosphérique (APPI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

### 2.1.3 Électronébulisation (ESI)

L'électronébulisation est une méthode par laquelle les ions d'une solution sont transférés à la phase gazeuse<sup>6</sup>. Le mélange de solvants de l'effluent de la colonne est nébulisée en petites gouttelettes par action combinée d'un potentiel électrique entre l'aiguille et la contre-électrode (2.5 à 4 kV), et un débit de N<sub>2</sub> à haute vitesse<sup>4, 7</sup> (**Figure 2.4**).

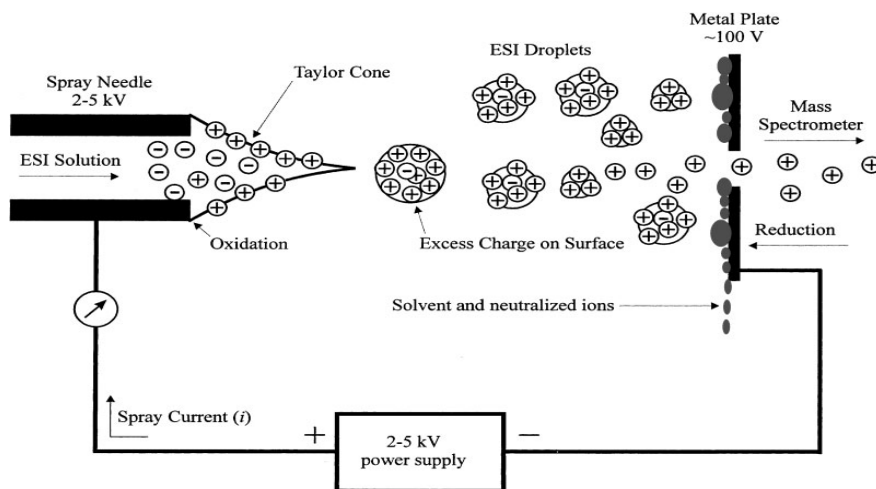


**Figure 2.4**-Schéma d'une source ESI, adapté de Gates 2004<sup>8</sup>.

La présence du potentiel électrique conduit à la formation d'une couche dipolaire au niveau du ménisque du liquide à l'extrémité du capillaire. La double couche est due à une séparation spatiale partielle des ions d'électrolyte. Ce processus de nébulisation a pour résultat la formation de petites gouttelettes avec un excès de charge, c'est à dire,

charges positives lorsque la source est en mode positif et charges négatives dans le mode négatif. Ces excès de charge sont dus aux ions électrolytes ou aux ions préformés à analyser.

Durant leur voyage entre le bout de l'aiguille et le block source, les molécules neutres de solvant sont évaporées de la surface des gouttes (zone encadrée sur la **Figure 2.4** et agrandie dans la **Figure 2.5**). Par conséquent, la taille des gouttelettes diminue. Ce qui réduit les distances entre les charges en excès à la surface des gouttelettes. Les gouttelettes rapetissent jusqu'à ce qu'elle atteigne le point où la tension superficielle ne peut plus soutenir la charge (limite de Rayleigh). La gouttelette arrive à telle point qu'une «explosion Coulombique» ou processus induit de désintégration électrohydrodynamique mène à la désintégration des gouttelettes. Le processus d'évaporation de solvant et la désintégration électrohydrodynamique des gouttelettes peuvent être répétés plusieurs fois produisant des gouttelettes de plus en plus petites.



**Figure 2.5**-Schéma du mécanisme de formation des ions avec ESI. Adapté de Cech 2001<sup>9</sup>.

Au moins trois processus sont responsables de la formation des ions analyte en phase gazeuse à partir des micro-gouttelettes: (1) désolvation douce, (2) ionisation par évaporation ionique, et (3) ionisation chimique à la surface des gouttelettes ou par

réaction molécule -ion en phase gazeuse. Finalement, les ions en phase gazeuse générées par ces processus peuvent être analysés.

### *Mécanismes de production des ions en phase gazeuse*

Il existe deux mécanismes principaux pour expliquer la formation des ions en phase gazeuse. Le premier est le modèle de charge résiduelle de Dole<sup>10</sup>, dans lequel les molécules à analyser sont présentes en solution sous forme d'ions préformés, par exemple en choisissant un pH approprié inférieure au pKa d'une molécule basique. La séquence d'évaporation du solvant et la désintégration électrohydrodynamique des gouttelettes se produit jusqu'à ce que les micro-gouttelettes contiennent qu'un seul ion analyte préformé solvaté par gouttelette. Après l'évaporation du solvant, l'ion analyte préformé est libéré dans la phase gazeuse.

Le deuxième mécanisme est le modèle d'évaporation des ions d'Iribarne et Thomson<sup>11</sup>. Dans ce modèle, les processus d'évaporation de solvant et la désintégration électrohydrodynamique conduisent également à la production de microgouttelettes. Les ions en phase gazeuse peuvent être générés à partir de micro-gouttelettes très chargées, l'intensité du champ local étant suffisamment élevée pour permettre que les ions préformés en solution soient émis ou désorbés de la gouttelette dans la phase gazeuse évitant ainsi que l'explosion coulombienne ait lieu.

En plus de ces deux processus, il existe au moins deux autres procédés en phase gazeuse, qui déterminent le spectre de masse de l'analyte. Certains d'entre eux sont identiques aux processus d'ionisation d'APCI (section 2.1.4) où les réactions ion-molécule peuvent avoir lieu entre les ions du tampon en phase gazeuse et les molécules d'analyte neutres, à la surface de la goutte, ou en phase gazeuse, après la désolvation douce de molécules neutres<sup>12</sup>.

ESI est mieux décrite comme un mode d'ionisation mixte, où divers processus contribuent au résultat final. Nous pouvons souligner toutefois l'importance de générer



des ions d'analyte préformés en solution<sup>4</sup>. Pour la plupart des analytes ayant des fonctions chimiques basiques, (amines ou amides), ou des fonctions acides (acide carboxylique ou phénols), les ions préformés peuvent être produits par la sélection d'un pH approprié de la phase mobile. Pour les composés basiques, une phase mobile acide est sélectionnée, et des conditions basiques pour les composés acides.

### *Voltages de nébulisation*

Comme nous l'avons mentionné, en ESI la formation de l'aérosol dépend de la compétition entre la répulsion coulombique et la tension superficielle. Une nébulisation stable dépend de paramètres expérimentaux tels que la différence de potentiel appliquée, le diamètre interne et externe ainsi que la forme de l'aiguille, et la composition du liquide<sup>6</sup>. Lorsque le potentiel appliqué augmente, la taille des gouttelettes est réduite et leur mouvement commence à avoir une composante horizontale ainsi qu'une vitesse élevée. A des potentiels plus élevés, la colonne de liquide s'allonge et une pointe assez fine est formée à son extrémité, connue sous le nom de "cône de Taylor"<sup>13</sup>. Les gouttelettes sont produites à la suite d'instabilités électriques de Rayleigh à la surface du jet liquide sortant du cône de Taylor.

Les voltages de nébulisation  $V_{on}$  peuvent être estimés par<sup>13</sup> :

$$V_{on} \approx 2 \times 10^5 \ln \frac{4d}{r_c} \sqrt{\sigma r_c} \quad (2-4)$$

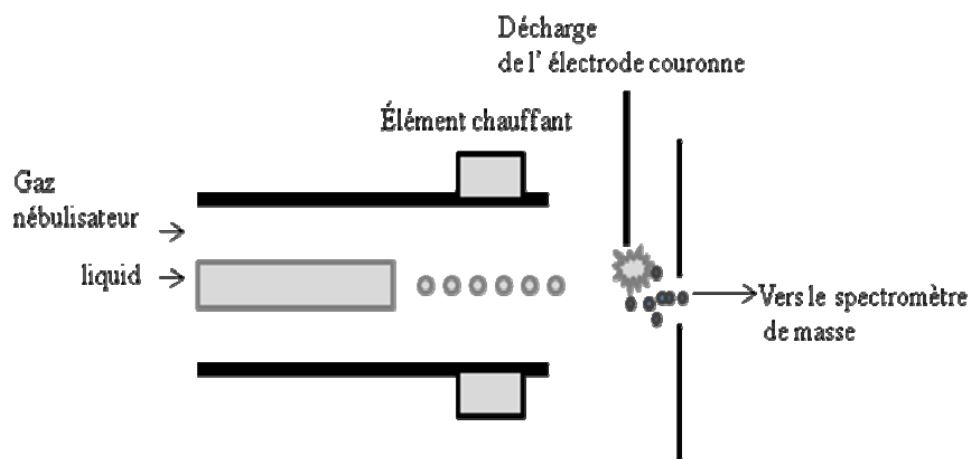
Où  $\sigma$  est la tension superficielle du liquide,  $r_c$  est le diamètre intérieur de l'aiguille, et  $d$  est la distance entre l'électrode capillaire et la contre électrode. Par exemple, pour un système typique, avec un  $r_c = 0,1$  mm et  $d = 40$  mm, cette équation calcule des voltages pour le méthanol, l'acétonitrile et l'eau de 2,2, 2,5 et 4,0 kV, respectivement.

La plus grande restriction pour l'ionisation par ESI est que les analytes doivent être dissous dans un solvant ayant une conductivité modérée, il est appropriée pour l'ionisation de composés ioniques et polaires<sup>14</sup>. Les composés polaires qui ne contiennent pas de groupements fonctionnels acides ou basiques ne peuvent pas être

ionisés par protonation ou déprotonation. Comme alternative, ces molécules polaires peuvent être ionisées par association avec d'autres ions en solution, (par exemple, sous la forme  $[M + NH_4]^+$  ou  $[M + Na]^+$ ).

#### 2.1.4 Ionisation chimique à pression atmosphérique ( APCI)

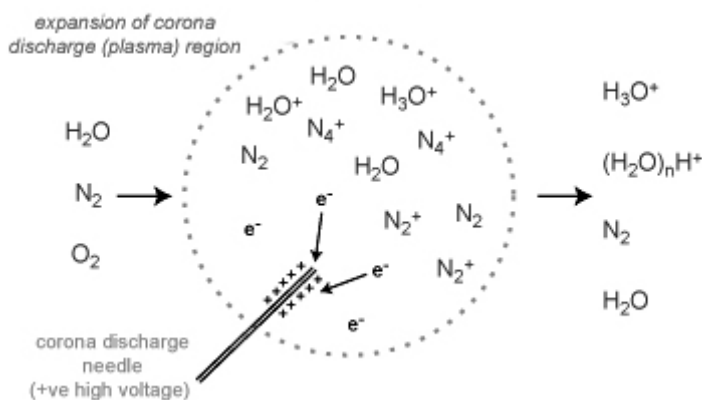
L'ionisation chimique à pression atmosphérique APCI, est une méthode d'ionisation analogue à l'ionisation chimique. La différence est que l'APCI se produit à la pression atmosphérique et a ses principales applications dans les domaines de l'ionisation de composés pharmaceutiques à faible masse (APCI n'est pas adapté à l'analyse des composés thermiquement labiles)<sup>3, 15</sup>. La mise en place générale de la source (**Figure 2.6**) partage une grande ressemblance avec l'ionisation par électronébulisation et aussi est le plus souvent utilisé en conjonction avec la chromatographie liquide de haute performance. L'APCI diffère de l'ESI, par la façon dont l'ionisation est générée. Dans l'APCI, la solution d'analyte est introduite dans un nébuliseur pneumatique et désolvatée dans un tube de quartz chauffé avant son interaction avec la décharge corona pour l'ionisation.



**Figure 2.6**-Schéma d'une source APCI, adapté de Schalley 2009<sup>16</sup>.

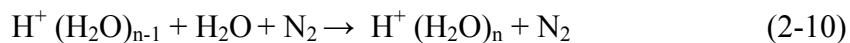
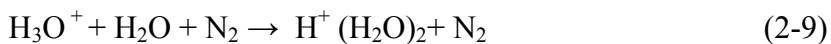
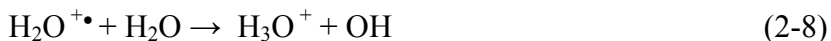
La décharge couronne remplace le filament d'électrons dans l'ionisation chimique et produit  $N_2^{+\bullet}$  et  $N_4^{+\bullet}$  par ionisation électronique<sup>4</sup>. Ces ions primaires entrent en collision avec les molécules de solvant vaporisés pour former des ions secondaires réactifs en

phase gazeuse - par exemple  $\text{H}_3\text{O}^+$  et  $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$  (**Figure 2.7**). Ces ions de gaz réactifs subissent des collisions répétées avec l'analyte et entraînent la formation des ions à analyser. La fréquence très élevée des collisions se traduit par une efficacité d'ionisation élevée et une thermalisation des ions de l'analyte. Une fois que les ions sont formés, ils entrent dans le pompage et sont mis dans le même parcours que les autres sources d'ionisation atmosphérique.



**Figure 2.7**-Une vue plus détaillée du mécanisme d'APCI. Adapté de Gates 2004<sup>8</sup>.

L'azote (gaz nébulisateur) et la vapeur d'eau atmosphérique présents dans la source, auront des réactions primaires et secondaires qui se produisent dans la région de la décharge corona (plasma) comme suit:



L'agrégat d'ions secondaires le plus abondant est  $(\text{H}_2\text{O})_2\text{H}^+$  avec des quantités importantes de  $(\text{H}_2\text{O})_3\text{H}^+$  et  $\text{H}_3\text{O}^+$ . Les réactions ci-dessus sont des moyens pour tenir compte de la formation de ces ions au cours de la phase plasma.

Les ions protonés d'analyte sont ensuite formés par des réactions ion-molécule en phase gazeuse de ces ions clusters chargés avec les molécules d'analyte. Il en résulte une formation abondante d'ions  $[M + H]^+$ .

### 2.1.5 Photoionisation à pression atmosphérique (APPI)

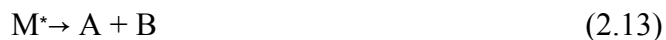
L'APPI induit l'ionisation par photoionisation qui est basée sur l'interaction d'un faisceau de photons produits par une lampe à décharge avec les vapeurs formées par la nébulisation d'une solution liquide. Tout d'abord, l'absorption d'un photon ( $E = hv$ ) par une molécule (M) conduit à une molécule électroniquement excitée<sup>17</sup> :



Si l'énergie d'ionisation (IE) de l'analyte est inférieure à  $hv$ , la molécule libère un électron énergétique ( $E_e(\text{max}) - hv - IEM$ ) conduisant à un cation avec un électron désapparié (un phénomène que se produit généralement avec des molécules avec double liaisons conjuguées, telles que les composés aromatiques<sup>18</sup> :



Les ions moléculaires ( $M^{*+}$ ) avec un électrons désapparié, montrent une tendance à réagir dans des environnements de collision<sup>19</sup>. En outre, des molécules avec IE faible et / ou haute basicité en phase gazeuse, appelée affinité protonique (PA), ont tendance à dominer les spectres d'ions positifs en raison de leur haute fréquence de collisions<sup>20</sup>. Toutefois, lorsque  $IE > hv$ ,  $M^*$  subit un processus de désexcitation, tels que photodissociation (2.12), l'émission de photons (2.13) ou l'atténuation par transfert collisionné (2.14) avec une molécule non excitée (C):





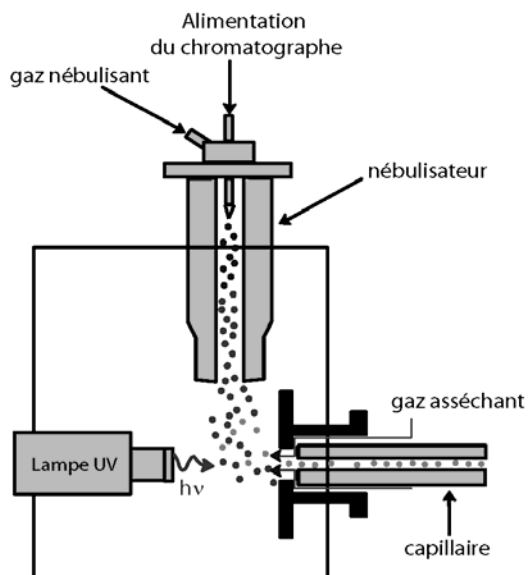
Dans de tels cas, l'utilisation d'une substance ionisée de préférence, appelé dopant (D), a été proposé afin de promouvoir l'ionisation de M:



Le dopant est ajouté en grandes quantités par rapport aux analytes, et il agit comme intermédiaire entre les photons et les analytes. Le dopant doit donc produire des photoions avec une énergie de recombinaison élevée et / ou une faible PA.

La plus grande partie des études menées par APPI sont effectuées avec une lampe de krypton, qui peut produire des photons de 10,03 et 10,64 eV dans un rapport de 4:1<sup>21,22</sup>. Le krypton est sélectionné principalement parce que la plupart des analytes ont des valeurs IE inférieures à l'énergie du photon, alors les solvants communément utilisés et les gaz présents dans la source (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, etc) ont des valeurs plus élevées.

Seuls deux sources APPI sont disponibles dans le commerce. La première est basée sur le prototype développé par Robb et al<sup>23</sup> (PhotoSpray). La deuxième source est appelée PhotoMate<sup>19</sup>, celle-ci a été utilisé dans ce travail. PhotoMate diffère par sa géométrie orthogonale (**Figure 2.8**).



**Figure 2.8-**Représentation schématique de l'APPI utilisée dans ce travail (source PhotoMate inspirée de documents d'Agilent)

Dans ce modèle, le nébulisateur chauffant et la lampe de PI sont perpendiculaires au chemin ionique du spectromètre de masse, aucun tube guide d'ions n'est utilisé.

## 2.2 Analyse de masse par temps d'envol (TOF)

Le principe essentiel de la spectrométrie de masse TOF, est qu'une population d'ions se déplaçant dans la même direction et en ayant une distribution de masses, mais une énergie cinétique (plus ou moins) constante, aura donc une distribution correspondante de vitesses dans lequel la vitesse est inversement proportionnelle à la racine carrée de  $m/z$ <sup>24</sup>.

Quand une particule chargée traverse un champ électrique, elle subit une accélération, comme c'est le cas lorsque les ions voyagent dans la région d'accélération d'une source d'ions<sup>3</sup>. L'énergie cinétique (KE) de l'ion accéléré est donnée par:

$$KE = zeU = \frac{mv^2}{2} \quad (2-17)$$

$m$  est la masse,  $v$  est la vitesse,  $ze$  est la charge de l'ion et  $U$  le voltage d'accélération

En spectrométrie de masse TOF, une courte impulsion d'ions avec énergie cinétique définie est dispersé dans le temps, il se déplace au long d'un tube de vol (de longueur  $L = 100$  cm). Les vitesses,  $v$ , des ions sont une fonction inverse de la racine carrée de leurs valeurs  $m/z$ :

$$v = \sqrt{\frac{2zeU}{m}} \quad (2-18)$$

Par conséquent, les ions avec  $m/z$  inférieure voyagent plus rapidement et atteindront le détecteur plus tôt que les ions avec  $m/z$  supérieures. Ainsi, une petite impulsion d'ions est dispersée dans des paquets d'ions avec la même masse (**Figure 2.9**). Le temps d'arrivée d'un ion est donnée par :

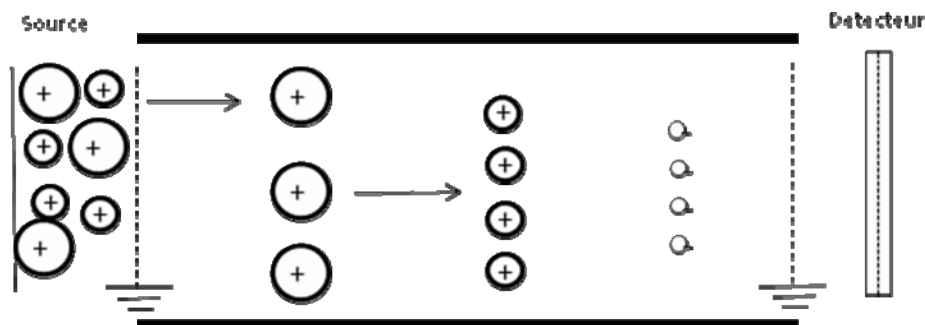
$$t = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2zeU}} \quad (2-19)$$

et à partir du temps de vol, le rapport  $m/z$  peut être calculé si le voltage d'accélération  $U$  et la longueur du chemin  $L$  sont connus<sup>16</sup>:

$$\frac{m}{ze} = \frac{2Ut^2}{L^2} \quad (2-20)$$

Le temps d'arrivée mesurés de tous les ions, fournit un spectre de temps qui est converti en un spectre de masse. Comme un signal défini « initial et final » est nécessaire pour les mesures du temps, une condition préalable essentielle à l'opération du TOF est que tous les ions entrent dans le tube de vol au même moment. Pour cette raison, les instruments TOF sont combinés de façon optimale avec les sources d'ions en mode pulsé, tels que MALDI. Alternativement, la pulsation du potentiel d'accélération peut

fournir un faisceau d'ions pulsés à partir de sources d'ions continus (par exemple, l'ionisation électronique et l'ionisation électrospray)

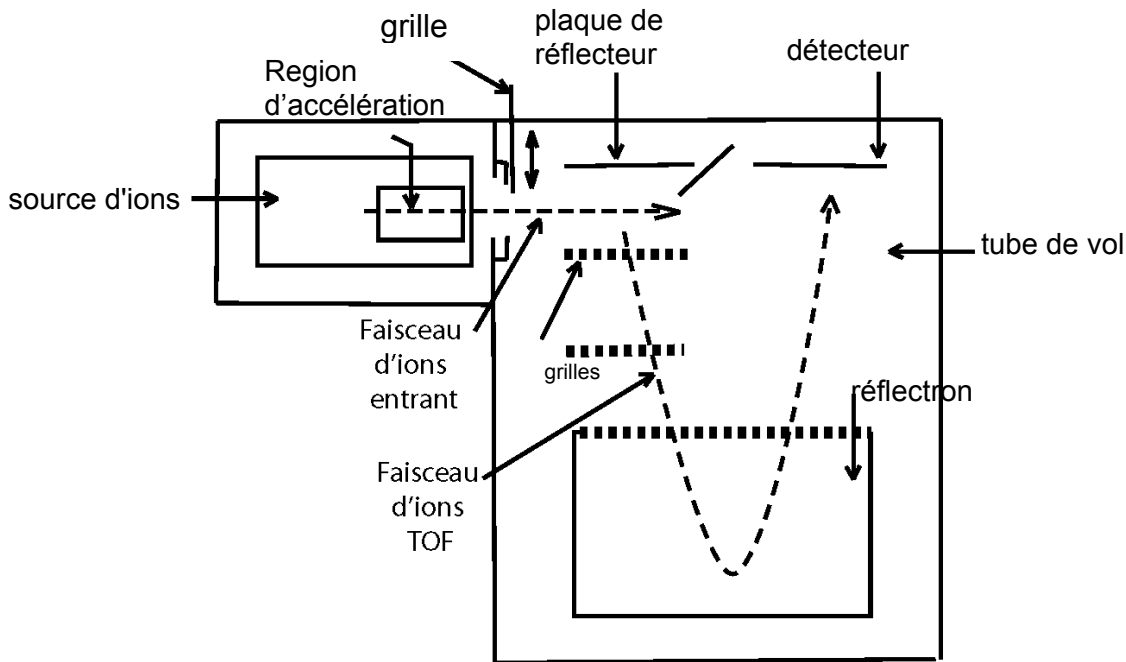


**Figure 2.9**-Principe de la séparation de masse par spectrométrie de masse de temps de vol. Les ions sont séparés sur la base de leur  $m/z$ ; les ions ayant un ratio  $m/z$  élevé voyagent plus lentement que les ions ayant un  $m/z$  inférieur. Reproduit de Dass 2007<sup>3</sup>.

#### *Spectromètre de masse TOF avec accélération orthogonale*

L'accélération orthogonale (oa) dans un analyseur de masse TOF, lui permet d'être utilisé avec une source d'ions en continu (ESI). Dans ce travail nous avons utilisé un spectromètre de masse de temps de vol avec accélération orthogonale. Dans cette configuration, le faisceau d'ions de la source d'ionisation externe, entre dans une région d'accélération avec une direction perpendiculaire à l'axe principal de l'instrument TOF (**Figure 2.10**). Le but de ce changement de direction est de concentrer optiquement l'énergie cinétique des ions de telle sorte que leurs énergies cinétiques soient le plus semblables possible<sup>5</sup>.





**Figure 2.10**-Schéma d'un spectromètre de masse de temps de vol avec accélération orthogonale. Un faisceau d'ions à partir d'une source d'ionisation continue, comme ESI, est transmis entre la plaque orthogonale d'extraction d'ions et de la grille. Un segment du faisceau est ensuite poussé dans la région de champ libre par une impulsion dans la direction orthogonale. Reproduit de Dass 2007<sup>3</sup>.

### 2.3 L'extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide est une technique très importante dans le domaine des sciences de la séparation. Le développement de la SPE a eu lieu en raison de la pression pour diminuer l'utilisation de solvants organiques dans les laboratoires<sup>25</sup>, et aussi comme une alternative aux faibles taux de récupération de l'extraction liquide-liquide<sup>26</sup>.

La SPE peut être effectuée manuellement (off-line): la préparation de l'échantillon est séparé de l'analyse chromatographique ultérieure, ou en ligne (on-line) par une connexion directe au système de séparation chromatographique<sup>27</sup>. Les techniques en ligne ne nécessitent pas de traitement ultérieur des échantillons entre l'enrichissement de traces et l'étape de séparation.

La SPE en ligne avec la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse représente un moyen rapide, moderne et fiable pour les analyses des traces. Des avantages importants sont une diminution du risque de contamination de l'échantillon, la suppression des pertes par évaporation de l'analyte, et enfin, le transfert et l'analyse de la totalité des espèces extraites. Contrairement aux SPE off-line où seulement une partie de l'aliquot de l'extrait est injectée dans le chromatographe. Aussi, l'analyse de l'échantillon complet permet que le volume de l'échantillon soit considérablement réduit.

### **2.3.1 Principe de l'extraction en phase solide**

Le principe de la SPE est similaire à celui de l'extraction liquide-liquide, mais implique le partage des solutés entre deux phases : une solide et une liquide <sup>28</sup>. L'extraction solide-liquide d'un échantillon a pour but d'extraire certains composés présents dans des échantillons liquides complexes avant leur analyse par chromatographie liquide. Cette démarche permet de remédier à l'absence de sélectivité du système de séparation entre les constituants de la matrice et les composés d'intérêt, ou à la faible sensibilité du détecteur dans le cas de solutions diluées ou d'un effet matrice. Enfin, l'extraction solide-liquide permet de purifier l'échantillon avant son injection, et de préserver ainsi le matériel chromatographique. Parmi les avantages de la SPE, les plus importants sont, premièrement, la consommation plus faible de solvants organiques par rapport à l'extraction liquide-liquide et deuxièmement la grande variété de supports disponibles commercialement<sup>29</sup>.

Une méthode SPE est composée la plupart du temps de 4 étapes successives:

- 1<sup>ère</sup> étape : *le conditionnement*: il correspond au passage d'un solvant approprié pour mouiller la cartouche, suivi par le passage d'un deuxième solvant de même composition que celui dans lequel est dissous l'échantillon à déposer. Cette étape a pour but d'assurer la solvatisation des groupements fonctionnalisés du support, d'éliminer l'air et les impuretés éventuelles présentes sur la cartouche. Il est recommandé de ne pas

sécher la cartouche avant l'étape suivante, afin d'assurer une bonne rétention des solutés.

- 2<sup>ème</sup> étape : *le dépôt* : il correspond à la percolation de l'échantillon. En fonction du système (volume disponible pour échantillon et quantité d'adsorbants) les volumes déposés varient de quelques  $\mu\text{L}$  à plusieurs mL. La vitesse de passage doit être suffisamment faible pour assurer la rétention des solutés. La plupart du temps pendant cette étape, les solutés sont concentrés sur l'adsorbant, certains composants de la matrice peuvent être retenus, eux aussi, sur le support, et d'autres passer à travers. On réalise ainsi une purification de l'échantillon.

- 3<sup>ème</sup> étape : *le lavage*: il correspond au passage de solvants appropriés pour éliminer les composants de la matrice qui ont pu être retenus sur le support, mais sans affecter la rétention des solutés. Ces solvants doivent donc avoir une faible force d'élution par rapport aux solutés. Le séchage de la cartouche lors de cette étape peut être envisagé, spécialement dans le cas de matrices aqueuses, afin d'éliminer les traces d'eau du support.

- 4<sup>ème</sup> étape : *l'élution*: elle correspond à l'élution spécifique des solutés à l'aide d'un solvant approprié, tout en évitant l'élution des composants de la matrice qui seraient encore retenus sur le support. Le volume de solvant doit être optimisé de manière à éluer l'intégralité de la quantité de soluté retenu sur le support tout en limitant au maximum la dilution. La vitesse de passage du solvant doit être ajustée de manière à assurer l'élution efficace des solutés<sup>29</sup>.

### **2.3.2 La phase stationnaire et la phase mobile**

Il existe une grande variété de matériaux utilisés comme phase stationnaire. Cela peut être considéré à la fois comme un point fort mais aussi comme un point faible: le large éventail de matériaux permet d'optimiser la performance de l'extraction, mais le choix du type d'emballage est souvent difficile. Parmi les matériaux les plus courants on trouve les silices de phase inverse chimiquement liés, les adsorbants copolymériques (styrène-divinylbenzène), les adsorbants par pairage d'ions et échangeurs d'ions, adsorbants d'extraction par immunoaffinité et polymères moléculairement imprimés.

Pour choisir une phase stationnaire et une phase mobile, il est nécessaire de connaître les propriétés physico-chimiques des analytes d'intérêt, leur niveau de concentration, la nature de la matrice, le type de chromatographie impliquée dans l'étape de séparation et le mode de détection<sup>29</sup>. Dans notre cas, le choix de l'adsorbant a été d'abord guidé par la nature de la matrice. Une matrice aqueuse implique la sélection d'une phase inverse ou d'un échange d'ions. Dans notre cas, c'était une phase inverse car la capacité d'ionisation de tous les analytes est faible. Les analytes d'intérêts possèdent un grand éventail de propriétés physico-chimiques ce qui rend leur extraction en une seule étape très difficile. Etant donné que l'on désire détecter des analytes à des niveaux de traces ( $\text{ng L}^{-1}$ ) et que la nature de la matrice est très complexe, nous avons décidé d'utiliser le mode de détection par spectrométrie de masse.

Pour mettre au point une méthode simple et rapide d'extraction de tous nos composés d'intérêts, nous avons testé deux cartouches d'extraction ou précolonnes avec des supports commercialement disponibles (un support greffé C18 et un support polymérique Strata X) et une colonne analytique C18.

Le système le plus efficace est idéalement obtenu à partir d'un cartouche d'extraction et une colonne analytique de même nature<sup>30</sup>. L'utilisation de la SPE en ligne compte deux limitations: la compatibilité entre les sorbants du cartouche et de la colonne analytique et la taille du cartouche d'extraction qui doit être petit afin d'éviter l'élargissement de bande lors du transfert de la précolonne à la colonne analytique.

#### *Comment les composés sont retenus par l'adsorbant dans la SPE en phase inverse*

Les séparations par phase inverse impliquent un échantillon de matrice polaire ou moyennement polaire et une phase stationnaire non polaire<sup>31, 32</sup>. La rétention des analytes organiques à partir de solutions polaires (comme l'eau par exemple) sur des matériaux en phase inverse est principalement attribuable aux forces d'attraction entre les liaisons carbone-hydrogène dans l'analyte et les groupes fonctionnels de la surface

de silice. Ces forces attractives entre composés non polaires sont communément appelés forces de van der Waals, ou forces de dispersion. Pour éluer un composé adsorbé en phase inverse, nous utilisons un solvant non polaire pour briser les forces qui lient le composé à la phase stationnaire. Les phases inverses les plus souvent utilisées sont à base de silice chimiquement modifiées ou de copolymères de styrène-divinylbenzène.

#### *Phases inverses à base de silice chimiquement modifiées*

Ce type de phases stationnaires est utilisé pour l'extraction en phase inverse de composés non polaires à moyennement polaires. Malgré la grande variété de phases greffées disponibles, la phase d'octadecylsilane (C18) est actuellement devenue la phase la plus populaire. Toutefois, en pratique, en raison de son caractère hydrophobe, la C18 n'est pas bien adapté pour la rétention au niveau de trace, car ces dernières sont souvent très polaires ou ioniques<sup>25</sup>.

#### *Phases stationnaires copolymériques*

Le problème de l'extraction de composés polaires de l'eau environnementale a été en partie résolu par l'introduction de phases stationnaires polymériques réticulées à base de divinyl benzène . Elles sont souvent présentées comme les phases stationnaires universelles, car elles sont conçues pour extraire un grand spectre d'analytes, c'est à dire, lipophiliques, hydrophobes, acides, basiques et neutres. La plus typique est à base de copolymère de divinylbenzène et de N-vinylpyrrolidone (Oasis HLB, Waters).

Une autre aussi très utilisée est la Strata-X, utilisée dans ce travail. Il s'agit d'une surface polymérique de divinylbenzène styrène modifié<sup>33</sup>. Elle est utilisée pour des analytes polaires et non polaires. En plus de l'interaction hydrophobe qui se produit dans les C18, Strata X développe des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  avec les analytes aromatiques pour une meilleure rétention. Elle est utilisé dans des applications qui

nécessitent une extraction simultanée d'analytes polaires ( $\text{Log } P < 3$ ) et non-polaires ( $\text{Log } P > 3$ ).

### *Le solvant*

La SPE en ligne peut être décrite comme un simple processus chromatographique, mais dans ce cas la phase mobile est le seul solvant à utiliser lors de l'étape de désorption<sup>29</sup>. Notre matrice aqueuse a guidé le choix d'une extraction par phase inverse. Les solvants typiquement utilisés en phase inverse avec chromatographie liquide et spectrométrie de masse, sont un solvant aqueux (eau) et un solvant organique (acétonitrile, méthanol, propanol).

Le solvant aqueux est généralement de l'eau de qualité chromatographique avec de l'acide 0,1%. Le solvant organique est généralement l'acétonitrile ou le méthanol avec de l'acide 0,1%. Ces solvants sont choisis sur la base de leurs interactions sélectives. Plus précisément, le méthanol possède une forte liaison hydrogène acide et l'acétonitrile a de fortes interactions dipôle<sup>34</sup>.

Les acides les plus couramment utilisés sont l'acide formique, l'acide trifluoroacétique et l'acide acétique. Leur utilisation est justifiée pour deux raisons fondamentales<sup>35</sup>. Premièrement, la majorité des séparations chromatographiques sont bénéficiées en termes de rétention et / ou de forme des pics dans des conditions acides. Deuxièmement, la plupart des mesures par spectrométrie de masse sont effectuées en mode d'ionisation positive, qui est accompli par l'addition d'un proton pour former l'ion moléculaire  $[M + H]^+$ . Les acides organiques mentionnés ci-dessus ont l'acidité et la volatilité nécessaires pour fournir un excès de cations à cet effet.

Lorsque de nombreux composés doivent être désorbés et séparés sur une large gamme de polarité, leur séparation nécessite des phases mobiles à la fois riches en eau et riches en solvant organique<sup>36</sup>, c'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser un gradient d'élution. La phase mobile doit contenir suffisamment de solvant organique (méthanol ou

acétonitrile) pour permettre une bonne désorption des analytes de la précolonne vers la colonne d'analyse et d'éviter une large bande élargissement<sup>29</sup>.

Le type de solvant doit être correctement choisi pour assurer une forte affinité de l'analyte pour le solvant<sup>36</sup>. Il est de première importance d'éluer sélectivement seulement les espèces cibles. Donc, si elles sont plus fortement retenues sur la phase stationnaire que les composés interférents, une étape de lavage avec un solvant de force d'élution modérée est conseillée avant l'élution de l'espèce cible avec un solvant approprié.

## **2.4 Ozonation et traitements d'oxydation avancée (AOPs)**

Une des parties de notre projet a visé l'exploration de la dégradation des deux agents cytostatiques, cyclophosphamide et méthotrexate par l'ozone moléculaire et les radicaux hydroxyles (OH•). La première méthode analytique LC-MS/MS a été utilisée pour la détection simultanée de ces deux contaminants. Ces deux composés ont été choisis car parmi les différentes classes de produits pharmaceutiques, les médicaments cytostatiques sont nocifs à l'environnement en raison de leur potentiel cancérigène, mutagène et génotoxique, même à faible concentration. En raison de l'augmentation de la demande de médicaments de chimiothérapie, leur présence potentielle dans les eaux de surface demande qu'on vérifie l'efficacité des processus de traitement d'eau potable. Le traitement par oxydation chimique utilisant l'ozone a démontré son efficacité pour un large spectre de micropolluants organiques dans les eaux usées et l'eau potable et ce selon différentes échelles (bench-, pilote et à grande échelle)<sup>37-40</sup>

L'ozonation et les procédés avancés d'oxydation (AOPs) sont une classe importante de technologies pour l'oxydation et l'élimination d'une large gamme de polluants organiques dans l'eau<sup>41, 42</sup>. Les AOPs sont caractérisés par une variété de réactions radicalaires qui impliquent des combinaisons d'agents chimiques: par exemple, l'ozone (O<sub>3</sub>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), les métaux de transition, les oxydes métalliques et différentes sources d'énergie auxiliaires comme le rayonnement ultraviolet-visible

(UV- Vis), courant électrique, et ultrasons<sup>43</sup>. Les AOPs comprennent O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>/UV, O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, Fenton (Fe<sup>2+</sup>/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), photo-oxydation hétérogènes à l'aide du dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>/hν), g-radiolyse et sonolyse.

Les radicaux hydroxyles sont l'oxydant primaire dans les AOPs tandis que d'autres espèces de radicaux et d'oxygène actifs, tels que les anions radicaux de superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>); radicaux d'hydropéroxyde (HO<sub>2</sub>); l'oxygène triplet (3O<sub>2</sub>), et peroxyradicals organiques (R-O-O<sup>-</sup>) sont également impliqués<sup>44</sup>. L'ozonation à pH élevé (> 8) est également considérée comme un AOP en raison de la production élevée de radicaux hydroxyles dans de telles conditions<sup>45</sup>.

Les potentiels d'oxydation de l'ozone moléculaire et des radicaux hydroxyles sont 2,07 et 2,80 V/ENH, respectivement, ce qui indique qu'ils sont des oxydants très puissants<sup>42</sup>. Les réactions d'ozone moléculaire sont sélectives pour les molécules organiques ayant des fractions nucléophiles telles que les doubles liaisons, des cycles aromatiques, et les groupes fonctionnels avec soufre, de phosphore, d'azote et des atomes d'oxygène. Tandis que les réactions d'hydroxyle radicalaires sont non sélectives vers divers composés organiques et inorganiques par abstraction d'hydrogène, réactions radical-radical, addition électrophile, et réactions par transfert d'électrons, qui produisent éventuellement une minéralisation complète des composés organiques<sup>42, 44 46</sup>.

Parmi les avantages de ces processus, on compte une minéralisation complète des contaminants organiques, la production de sous-produits moins nocifs et plus biodégradables<sup>47</sup>. La performance des AOPs est également affectée par la présence d'autres constituants de l'eau et des eaux usées, tels que les matières organiques naturelles, les matières dissoutes ou en suspension, l'alcalinité, ainsi que par le pH de l'eau et la température<sup>44</sup>. Les solides en suspension et la couleur peuvent entraver les réactions photochimiques par diffusion de la lumière et absorption et peuvent nuire à la performance des AOPs photochimiques, comme O<sub>3</sub>/UV, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV, photo-Fenton, et le processus de TiO<sub>2</sub>/hν.



Les ions carbonatés, bicarbonatés et chlorés, ainsi que certains composés organiques naturels sont connus pour agir comme pièges à radicaux. Ces composés entrent en compétition avec les polluants cibles pour les radicaux hydroxyl, par conséquent, leur présence augmente la demande d'oxydant et diminue l'efficacité du traitement. En outre, les coûts des matériaux et équipements, ainsi que les besoins en énergie et d'efficacité doivent être pris en compte pour apprécier la performance globale de l'AOPs.

## **2.5 Dégradation de produits pharmaceutiques en solution aqueuse par ozonation**

La dégradation des polluants organiques récalcitrants tels que les produits pharmaceutiques dans l'eau et les eaux usées peut être atteinte par ozonation ou par AOPs. Ces procédés de traitement peuvent éliminer complètement de tels polluants grâce à leur minéralisation ou les convertir en produits moins nocifs pour la santé humaine et l'environnement aquatique.

Pendant le traitement par ozonation ou d'oxydation avancée, les polluants organiques tels que les composés pharmaceutiques subissent une série de transformations spontanées d'oxydation. En d'autres termes, les produits de dégradation primaire sont souvent dégradés lors des traitements prolongés. Dans certains cas, la disparition des composés parents ne signifie pas un traitement efficace, parce que les sous-produits formés peuvent être biologiquement actifs.

Certains paramètres de qualité conventionnels dans l'eau, peuvent être utilisés pour évaluer l'efficacité du processus, tels que le carbone organique total, la demande chimique d'oxygène, le carbone organique dissous, les halogènes organiques adsorbables, et l'aromaticité. Toutefois, les paramètres de qualité conventionnels ne donnent pas d'information directe sur l'identité des produits de dégradation et de la sécurité de l'eau traitée. Par conséquent, l'analyse de composés pharmaceutiques et leurs produits de dégradation (sous-produits) par chromatographie en phase gazeuse ou

chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, sont de plus en plus communs et prioritaires dans les études environnementales<sup>48, 49</sup>.

## 2.6 Cinétique d'oxydation

Afin de prévoir le potentiel d'abattement par ozonation, il est important de déterminer les constantes de vitesse des réactions des micropolluants avec l'ozone et les radicaux hydroxyles. Dans ce travail de thèse, les constantes de vitesse de la cyclophosphamide et du méthotrexate et de l'oxydant (ozone moléculaire et des radicaux hydroxyles) ont été déterminées.

Typiquement, la cinétique de la réaction peut être décrite par la loi de vitesse de deuxième ordre:

$$r(-M) = -d[M]_t / dt = k_{\text{oxydant, M}} [M] [\text{oxydant}] \quad (2-21)$$

où  $r(-M)$  représente le taux de diminution de la concentration de M (substrat organique = produit pharmaceutique), et  $k_{\text{oxydant, M}}$  est la constante de second ordre pour la réaction d'oxydant ( $O_3$  ou  $OH\bullet$ ) et M.

Dans ce travail nous avons en premier lieu déterminé l'efficacité de l'ozone pour dégrader les deux composés cytostatiques à l'échelle du laboratoire. Deuxièmement, nous avons déterminé les constantes de vitesse de deuxième ordre pour la réaction avec l'ozone moléculaire et les radicaux  $OH\bullet$  dans l'eau MilliQ tamponnée. Finalement, nous avons évalué l'impact de la qualité de l'eau sur la cinétique d'oxydation d'ozone moléculaire en utilisant des matrices naturelles représentatives d'eaux de surface traitée de manière conventionnelle.

Pour la décomposition par ozone, les courbes de décroissance d'ozone dilué dans différents échantillons d'eau ont été étudiés. Les études ont été réalisées avec de l'eau

naturelle pure, de l'eau naturelle dopée avec tert-butanol, de l'eau naturelle dopée avec du peroxyde d'hydrogène et de l'eau ultrapure tamponnée dopée avec tert-butanol.

Pour l'étude de l'oxydation par ozone, le méthotrexate a réagi rapidement à l'ozone moléculaire ( $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_3$ ) avec un abattement supérieur à 1,4 log. Des expériences complémentaires ont été menées par dopage avec des doses supérieures de MTX et des dosages plus faibles d'ozone. Méthotrexate contient des groupes amino, un cycle aromatique et deux cycles aromatiques contenant des N-, qui sont des fragments connus pour réagir rapidement avec l'ozone<sup>50</sup>.

La cyclophosphamide ne contient pas de liaisons non saturées ou des fractions aromatiques, mais elle contient deux groupes électroattracteurs (double liaison chloro-substitués) qui réduisent la réactivité vers l'ozone<sup>51</sup>. Il n'y a pas de groupes fonctionnels présents dans la cyclophosphamide dont on pourrait s'attendre à présenter une affinité minimale pour l'ozone.

Plusieurs études ont déjà montré l'efficacité de la combinaison d'ozone avec peroxyde d'hydrogène pour améliorer l'oxydation des micropolluants au niveaux de traces<sup>52</sup>. Dans nos expériences, quand la formation de radicaux  $\text{OH}\cdot$  a été promue avec l'addition de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'oxydation de la cyclophosphamide était en effet très rapidement en conformité avec les résultats de Venta et al.<sup>53</sup>, qui ont utilisé 6 et 15 min de temps de réaction avec un concentration molaire  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  de 3:1.

## 2.7 Références

- (1) Davis, R. *Mass Spectrometry*, 1st ed.; John Wiley & Sons: New York, 1987.
- (2) Dawson, P. H. *Mass Spectrometry Reviews* **1986**, *5*, 1-37.
- (3) Dass, C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, 1st ed.; John Wiley & Sons: New Jersey, 2007.
- (4) Niessen, W. M. A. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*, 1st ed.; Taylor & Francis: Boca Raton, 2006.
- (5) Thurman, E. M. In *Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry, MS/MS and Time-of-Flight MS Analysis of Emerging Contaminants*, 1st ed.; Quadrupole Time-of-Flight, T. q., and Ion-Trap Mass Spectrometry for the Analysis of Emerging Contaminants., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, 2003, pp 14-30.
- (6) Kebarle, P. In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*; Cole, R. B., Ed.; Wiley-Interscience: New York, 1997, pp 3-63.
- (7) Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. *Mass Spectrometry Reviews* **1990**, *9*, 37-70.
- (8) <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/apci-ionisation.html>.
- (9) Cech, N. B.; Enke, C. G. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 362-387.
- (10) Gieniec, J.; Mack, L. L.; Nakamae, K.; Gupta, C.; Kumar, V.; Dole, M. *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 259-268.
- (11) Thomson, B. A.; Iribarne, J. V.; Dziedzic, P. J. *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 2219-2224.
- (12) Amad, M. H.; Cech, N. B.; Jackson, G. S.; Enke, C. G. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 784-789.
- (13) Ikonomou, M. G.; Blades, A. T.; Kebarle, P. *Analytical Chemistry* **1991**, *63*, 1989-1998.
- (14) Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Barcelo, D. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5441-5449.
- (15) Bruins, A. P. *Mass Spectrometry Reviews* **1991**, *10*, 53-77.

- (16) Schalley, C. A. *Mass Spectrometry and Gas -Phase Chemistry of Non-covalent Complexes*, 1st ed.; John Wiley & Sons: Amsterdam, 2009.
- (17) Marchi, I.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. *Talanta* **2009**, *78*, 1-18.
- (18) Kauppila, T. J.; Kostianen, R.; Bruins, A. P. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 808-815.
- (19) Hanold, K. A.; Fischer, S. M.; Cormia, P. H.; Miller, C. E.; Syage, J. A. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 2842-2851.
- (20) Raffaelli, A.; Saba, A. *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 318-331.
- (21) Robb, D. B.; Blades, M. W. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 130-138.
- (22) Short, L. C.; Cai, S. S.; Syage, J. A. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 589-599.
- (23) Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3653-3659.
- (24) Guilhaus, M. *Journal of Mass Spectrometry* **1995**, *30*, 1519-1532.
- (25) Hennion, M. C.; Cau-Dit-Coumes, C.; Pichon, V. *Journal of Chromatography A* **1998**, *823*, 147-161.
- (26) Chiron, S.; Alba, A. F.; Barcelo, D. *Environmental Science & Technology* **1993**, *27*, 2352-2359.
- (27) Fernandez-Alba, A. R.; Aguera, A.; Contreras, M.; Penuela, G.; Ferrer, I.; Barcelo, D. *Journal of Chromatography A* **1998**, *823*, 35-47.
- (28) Camel, V. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2003**, *58*, 1177-1233.
- (29) Hennion, M. C. *Journal of Chromatography A* **1999**, *856*, 3-54.
- (30) Nielen, M. W. F. In *Journal of Chromatography Library, Vol. 39A*; R.W. Frei, K. Z., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1988; Vol. 39A, pp p. 5.
- (31) Snyder, L. R. *Introduction to modern Liquid Chromatography*, Second ed.; Wiley Interscience: new York, 1979.
- (32) Snyder, L. R. *High-Performance Gradient Elution*, First ed.; Wiley-Interscience: New Jersey, 2007.
- (33) [www.phenomenex.com](http://www.phenomenex.com).

- (34) Heftmann, E. *Chromatography: Fundamentals and techniques*, 6th ed.; Elsevier, 2004.
- (35) [www.sigma-aldrich.com/lc-ms-solvents](http://www.sigma-aldrich.com/lc-ms-solvents).
- (36) Sadek, P. *The HPLC Solvent Guide*, Second ed.; Wiley-Interscience: New York, 2002.
- (37) Huber, M. M.; Gobel, A.; Joss, A.; Hermann, N.; Loffler, D.; McArdeell, C. S.; Ried, A.; Siegrist, H.; Ternes, T. A.; von Gunten, U. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 4290-4299.
- (38) Ternes, T. A.; Meisenheimer, M.; McDowell, D.; Sacher, F.; Brauch, H. J.; Gulde, B. H.; Preuss, G.; Wilme, U.; Seibert, N. Z. *Environmental Science & Technology* **2002**, *36*, 3855-3863.
- (39) Ternes, T. A.; Stuber, J.; Herrmann, N.; McDowell, D.; Ried, A.; Kampmann, M.; Teiser, B. *Water Research* **2003**, *37*, 1976-1982.
- (40) Westerhoff, P.; Yoon, Y.; Snyder, S.; Wert, E. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 6649-6663.
- (41) Alvares, A. B. C.; Diaper, C.; Parsons, S. A. *Environmental Technology* **2001**, *22*, 409-427.
- (42) Legrini, O.; Oliveros, E.; Braun, A. M. *Chemical Reviews* **1993**, *93*, 671-698.
- (43) Oppenlander, T.; Gliese, S. *Chemosphere* **2000**, *40*, 15-21.
- (44) Oppenlander, T.; Walddorfer, C.; Burgbacher, J.; Kiermeier, M.; Lachner, K.; Weinschrott, H. *Chemosphere* **2005**, *60*, 302-309.
- (45) Rivas, J.; Gimeno, O.; Beltran, F. *Chemosphere* **2009**, *74*, 854-859.
- (46) Ljubic, I.; Sabljic, A. *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106*, 4745-4757.
- (47) Zhou, H.; Smith, D. W. *Canadian Journal of Civil Engineering* **2001**, *28*, 49-66.
- (48) Debska, J.; Kot-Wasik, A.; Namiesnik, J. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2004**, *34*, 51-67.
- (49) Ternes, T. A. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **2001**, *20*, 419-434.
- (50) Rey, R. P.; Padron, A. S.; Leon, L. G.; Pozo, M. M.; Baluja, C. *Ozone-Science & Engineering* **1999**, *21*, 69-77.
- (51) von Gunten, U. *Water Research* **2003**, *37*, 1443-1467.

- (52) Ning, B.; Graham, N. J. D. *Journal of Environmental Engineering-Asce* **2008**, *134*, 944-953.
- (53) Venta, M. B.; Castro, C. H.; Garcia, L. A. F.; Marzo, A. L.; Lorenzo, E. V.; Alvarez, C. A. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* **2005**, *54*, 403-410.

---

---

# **CHAPITRE 3: Comparaison de la performance d'APPI, APCI et ESI dans l'analyse LC-MS/MS de BEZ, CYP, ENA, MTX et ORL dans les eaux usées.**

---

---

Comparison of APPI, APCI and ESI for the LC-MS/MS analysis of bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in municipal wastewater.

Araceli Garcia-Ac<sup>a</sup>, Pedro A. Segura<sup>b</sup>, Liza Viglino<sup>a</sup>, Christian Gagnon<sup>b</sup> and Sébastien Sauvé<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada*

<sup>b</sup> *Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 105 McGill St., Montreal, QC, Canada H2Y 2E7*

\* Corresponding author: Tel.: +1 514 343 6749; fax: +1 514 343 7586.

Accepted International Journal of Mass Spectrometry.



## **Abstract**

The applicability of three different ionization techniques: atmospheric pressure photoionization (APPI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI) was tested for the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis of five target pharmaceuticals (cyclophosphamide, methotrexate, bezafibrate, enalapril and orlistat) in wastewater samples. Performance was compared both by flow injection analysis (FIA) and on-column analysis in deionized water and wastewater samples. A column switching technique for the on-line extraction and analysis of water samples was used. For both FIA and on-column analysis, signal intensity and signal-to-noise (S/N) ratio of the target analytes in the three sources were studied. LOD and matrix effects during the analysis of wastewater samples were also investigated. ESI generated significantly larger peak areas and higher S/N ratios than APCI and APPI in FIA and in on-column analysis. ESI proved to be the most suitable ionization method as it enabled the detection of the five target compounds, whereas APCI and APPI ionized only four compounds.

**Keywords:** pharmaceuticals; cytostatic agents; mass spectrometry; APPI; APCI and ESI.

### 3.1 Introduction

In recent years, healthcare spending has outpaced economic growth in developed countries, with pharmaceutical expenditures being a key driver of this trend. Analysts suggest that growth in personal use, rather than price, has been the major cause of increased pharmaceutical spending.<sup>1</sup> This growing consumption trend is expected to increase the likelihood that pharmaceuticals may appear in the environment. The issues pertaining to pharmaceuticals in the environment and mainly in the aquatic environment has troubled the scientific community, hence the current concerns to better understand the fate of anthropogenic substances released in the aquatic environment. This has led to the development of numerous analytical methods predominantly using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to carry out such projects. Nowadays, the most commonly used ionization sources in LC-MS/MS are electrospray (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric pressure photoionization (APPI). These techniques provide a soft ionization process and are highly suitable for the analysis of pharmaceutical drugs in various water matrixes.

To date, only a few studies are available in which the suitability of LC-MS/MS methods coupled to different ionization sources has been compared for the analysis of pharmaceuticals in water<sup>2, 3</sup>. The present work is an investigation in which ESI, APCI and APPI are compared for the analysis of five pharmaceuticals in wastewater. Given the known matrix effects potentially observed in such complex matrices, a comparison of the ionization sources is critical to help choose the optimum methods to carry out environmental analyses.

The selected compounds belong to various therapeutic classes: lipid regulators (bezafibrate), antineoplastics (methotrexate and cyclophosphamide), anti-obesity agents (orlistat) and antihypertensives (enalapril). These substances are a good choice for this study because of their variable hydrophobic character and their different physico-chemical properties (Matériel supplémentaire **Table 3.1**). Orlistat and cyclophosphamide are neutral, bezafibrate and

methotrexate are acids, where as enalapril is an ampholyte. Also, these compounds are of special interest because many factors influence the occurrence of these drugs in the environment: total quantities consumed, pharmacokinetics, physico-chemical properties and wastewater treatment processes.

## **3.2 Experimental**

### **3.2.1 Reagents**

Bezafibrate (BEZ), cyclophosphamide (CYC), orlistat (ORL) and methotrexate (MTX) with a certified purity  $\geq 99\%$  were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Enalapril (ENA) was kindly supplied as a formulation by a local drugstore. LC-MS grade acetonitrile (ACN), water (H<sub>2</sub>O), methanol (MeOH) and toluene (TOL) were purchased from J. T Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Deionized-H<sub>2</sub>O (DI-H<sub>2</sub>O) was obtained from a Milli-Q ultrapure water system. HPLC-grade reagent acetic acid (A.A.) from Fisher Science (Fair Lawn, NJ, USA) and formic acid 98% (F.A.) was purchased from Sigma-Aldrich Canada.

### **3.2.2 Instrumentation**

Thermo Scientific's Equan system (Waltham, MA) was used to carry out the preconcentration and analysis. The components and functioning of this system have been described elsewhere<sup>4</sup>. Shortly it consists in a sample delivery system (autosampler and a load pump), a switching-column array (six-port switching valve, load column, LC pump and an analytical column) and a ionization and detection system (source and tandem mass spectrometer). For ESI and APCI the Ion Max API source manufactured by Thermo Scientific was used. For APPI, the PhotoMate orthogonal source manufactured by Syagen (Tustin, CA) was used. This source is composed of a discharge lamp filled with Kr and emits photons having energy of 10.0 eV.

### 3.2.3 Preparation of Standards

Stock solutions  $500 \text{ mg L}^{-1}$  of each compound were prepared by weighting and dissolving the corresponding pure powder in an appropriate solvent (MeOH for BEZ, CYC, ORL and ENA; 0.3 % F.A. in 30% H<sub>2</sub>O-70 % MeOH v/v for MTX). Mixed working solutions containing  $50 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  of the compounds were prepared weekly by dilution of the stock solutions in ACN and were kept at 4 °C.

### 3.2.4 Flow injection analysis (FIA) conditions

A mass of 1 ng (i.e., 20  $\mu\text{L}$  of a  $0.05 \text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$  solution ) of each analyte was infused by FIA. Acquisition scan time was 0.2 s and the mobile phase used was 50% of 0.1% A.A. in DI-H<sub>2</sub>O (eluent A) and 50% of ACN (eluent B). Infusion experiments by FIA using the three sources and individual standard solutions were carried out to obtain the optimal flow rate conditions. For APCI the corona needle discharge current was also optimized. TOL was tested as APPI dopant in the FIA experiments, because it has an ionization energy (IE = 8.83 eV) lower than the photon energy of the emitted light of the Kr lamp (10.6 eV). Its photoions have a high recombination energy or low proton affinity (PA)<sup>5</sup>. This photon-emission energy is higher than the ionization energy (IE) of the target molecules (7-10 eV for many organic molecules) and lower than the IE of the constituents of air and the mobile phase. The optimal flow rate of TOL in our experiments was  $20 \mu\text{L min}^{-1}$ , which produced a sufficient amount of dopant ions in the source.

### 3.2.5 On-line preconcentration and chromatographic conditions for the analysis on-column.

A total mass of 0.5 ng (i.e., 1 mL of  $0.5 \text{ ng mL}^{-1}$ ) of each analyte was preconcentrated and analyzed by on-line SPE. The procedure used for the on-column analysis was based on a previously published method.<sup>6</sup> Briefly, it consisted in the conditioning of the Strata-X load column (20×2 mm, 28  $\mu\text{m}$ , manufactured by Phenomenex, Torrance CA) with a conditioning solution (0.1% A.A. in MeOH/DI-H<sub>2</sub>O 1:40 v/v) at a flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . An aliquot of 1.00

mL of sample was then loaded into the load column using the same conditioning solution. After the sample was loaded, the load column was back-flushed and the retained components of the sample were transferred to the analytical column using the solvent gradient delivered by the analytical pump. ESI experiments were achieved on a Synergi Max RP-C12 column (75×2 mm, 4µm, manufactured by Phenomenex) preceded by a guard cartridge (4×2 mm, 4µm) of the same packing material at flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. A Synergi Max RP-C12 analytical column (150×4 mm, 4µm) preceded by a guard cartridge (4×2 mm, 4µm) were used for separation for APCI or APPI applications with a flow rate of 600 µL min<sup>-1</sup>. The mobile phase consisted of 0.1% A.A. in DI-H<sub>2</sub>O (eluent A) and ACN (eluent B). Liquid chromatography was carried out at ambient temperature using a mobile phase gradient (Matériel supplémentaire **Table 3.2**). At the end of the last step, a new cycle begins for the analysis of the next sample. All the online operations are fully automated for routine analysis with a run time of 15 min (combining the chromatographic run and conditioning for the next sample).

### 3.2.6 Mass Spectrometry

The tandem mass spectrometer was operated in positive and negative ion mode. The optimization of the operation parameters for ESI was carried out by the infusion of 1 µg mL<sup>-1</sup> standards of each compound at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup>. Sheath gas was set to 10 arbitrary units and the auxiliary gas to 5 arbitrary units. A spray voltage of ± 3.5 kV was used for the negative and positive ionization. Ion transfer capillary temperature was set to 350°C and skimmer offset to 5 V. For the APPI and APCI sources, a concentration of 10 µg mL<sup>-1</sup> and a flow rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup> were used. Common APPI and APCI parameters and conditions were as follows: vaporizer temperature 500°C, capillary temperature 270 °C, sheath gas pressure 20 arbitrary units, auxiliary gas 5 arbitrary units and skimmer offset 4 V. For all experiments, the collision gas was Ar and the sheath and auxiliary gas was N<sub>2</sub>. Detection was performed in the selected reaction monitoring (SRM) mode. For both quadrupoles, resolution was mode at unit resolution (full width at half maximum=0.7 u). Tube lens and collision energies of the SRM transitions are compound-specific and appear in **Table 3.3**.

### 3.2.7 Evaluation of detection limit and matrix effects for SPE on-line analysis

Key analytical performance parameters such as limits of detection (LOD) and matrix effects were evaluated. LOD were determined using the standard error of the intercept and the slope of the calibration curve, as proposed by the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH)<sup>7</sup>. Matrix effects were determined with the same extraction processes in wastewater effluent samples according to Salvador et al.<sup>8</sup>. They were calculated by comparing the peak areas of known amounts of standard spiked in DI-H<sub>2</sub>O (*DW*) with the peak area of those standards spiked in wastewater effluent (*WW<sub>S</sub>*) after correcting for the peak area of the analyte in the unspiked matrix (*WW<sub>NS</sub>*) according to the following equation:

$$\text{Matrix effects (\%)} = \left( \frac{WW_S - WW_{NS}}{DW} \right) \times 100\% \quad (3-1)$$

A value of 100% indicates that there is no absolute matrix effect, if the value is above 100 %, there is a signal enhancement and there is signal suppression if the value is < 100 %. To avoid false positives, confirmation criteria were set so that the LC retention time remained within 1-2 % of the retention time of the standard compound<sup>9</sup>. Three replicate analyses were performed at the 200 pg mL<sup>-1</sup> concentration level.

## 3.3 Results and Discussion

### 3.3.1 Comparison of APPI, APCI and ESI Mass Spectra obtained by FIA

Full scan and product ion scan of each analyte were performed using the above-described instrumental conditions and parameters. Our experiments showed that the pseudo-molecular ion [M+H]<sup>+</sup> was the most abundant for four compounds: 261 *m/z* for CYC, 377 *m/z* for ENA, 455 *m/z* for MTX and 496 *m/z* for ORL. The major ion detected for BEZ was [M-H]<sup>-</sup> (360*m/z*), which was more intense and had a higher S/N ratio than the positive pseudo-molecular ion<sup>10</sup>. Observed

precursor and fragment ions are given in **Table 3-3**. The results show that the three sources generate very clean and identical spectra for the tested compounds. However, all the compounds were better ionized by ESI. APPI and APCI neither failed to produce the precursor ion of MTX with sufficient intensity for its identification, nor adducts of MTX were observed. ESI was able to ionize MTX as a pseudo-molecular positive ion with excellent signal intensity. MTX has basic amino groups in its structure, capable of retaining a proton during the ionization process<sup>11</sup>. In APCI(+), the mobile phase and the analytes are first vaporized and then ionized by acid-base reactions in the gas phase. In this process, strong gas phase acids produced by the corona discharge, transfer a proton to the analyte if the proton affinity (PA) of the former is higher than that of the later. In addition to proton affinity, signal intensity in APCI is dependent on the volatility of the compounds. Charged species are less volatile than the neutral forms<sup>12</sup> therefore, because MTX is ionic at the pH of the mobile phase (pH=2.9) it was poorly vaporized in APCI and consequently, not detected.

Similarly to APCI, the solvent in APPI is vaporized with a heated nebulizer, but the ionization process is initiated by using a vacuum ultraviolet (VUV) lamp instead of a corona discharge. The compounds possessing ionization energies (IE) below 10 eV are directly ionized by the emitted photons, producing a molecular ion ( $M^+$ ). In the presence of a protic solvent, the molecular ion of the analyte abstracts a hydrogen atom from the solvent to form a protonated molecule. The analyte is ionized by the proton transfer reaction if its PA is higher than that of the solvent molecule. Since CYC, ENA and ORL were detected as  $[M+H]^+$  ions, the ionization with APPI occurs via proton transfer reaction under the chosen conditions. For BEZ the production of  $[M-H]^-$  ions could be via electronic capture or charge exchange. The results using APPI were quite similar to those for APCI. Notably, MTX could not be detected by using this ionization source. The reason is probably the same as for APCI, i.e. poor vaporization of MTX in its ionic form.

### 3.3.2 Optimization of experimental parameters

#### *Flow rate*

The effects of the different flow rates on the abundance of the peak areas of the compounds are shown in **Figure 3.1**. For ESI, **Figure 3.1a** indicates that the highest signal intensity for each analyte was obtained when the flow rate was low ( $0.2 \text{ mL min}^{-1}$ ). In ESI, low flow rate provides the finest droplets during the nebulization process, thereby increasing the surface area of each droplet, which is favorable for ion transfer into the gas phase, resulting in enhanced ionization efficiency.<sup>10</sup>

For APPI and APCI, the best signal intensity of the target analytes was obtained at a flow rate of  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$  (**Figure 3.1-b** and **3.1 c**). Because the vaporized mobile phase acts as a reagent gas in APCI, at a higher flow rates more reagent gas molecules are available to react with the target analyte, thus the ionization efficiency of the APCI process is enhanced<sup>13</sup>. For APPI, some studies have demonstrated that a low flow rate may improve its ionization efficiency resulting from lower photo absorption by the solvent<sup>14, 15</sup>. However, our data showed that a lower flow rate does not provide better ionization efficiency in APPI. Since solvent molecules are involved in the ionization process, the ions formed by proton transfer are better produced in high flow rate conditions.

#### *Corona needle discharge current*

The effects of APCI corona needle discharge electric current on mass spectra and ion intensity of target analytes were investigated by FIA using the parameters and conditions described above. Full scan analysis was performed at discharge current of 0 to  $20 \text{ }\mu\text{A}$ , and a clear trend was observed as shown in Matériel supplémentaire **Figure 3-2**. The magnitude of the discharge current did not significantly affect the overall appearance of mass spectra over the tested current



range, but it affected the absolute intensity of the ions on the spectra. We found from this test that a discharge current in the range of 4-6  $\mu\text{A}$  resulted in maximum ion intensities for the target compounds. Therefore the discharge current used for all the compounds was 6  $\mu\text{A}$ .

### 3.3.3 Effect of TOL as a dopant on APPI

Several groups have demonstrated that the addition of a photoionizable substance like TOL to the LC flow can increase the ionization yield of the target compounds<sup>16, 17</sup>. As can be observed in **Table 3.4**, TOL was found to enhance the APPI signal intensity of only two of the five target compounds: CYC (by a factor of 4.0) and ORL (by a factor of 1.8). However, the dopant was also found to increase the background noise and consequently generated lower S/N ratios than the dopant-free APPI tests. Our findings are in agreement with previous studies demonstrating that the addition of dopants results in an increase of the background noise<sup>18, 19</sup>. It has been reported that the type of APPI source in this work is not designed for the use with a dopant<sup>5</sup>, nevertheless several applications have made use of it to increase method sensitivity<sup>16, 17</sup>. As there was little or no significant improvement for using a dopant, it was not introduced into the APPI source in subsequent investigations.

**Table 3.4**-Effect of TOL as a dopant on the APPI source studied by FIA<sup>ψ</sup>

Analyte	Peak area $\pm$ SD ( $\times 10^4$ )		Dopant enhancement factor	S/N ratio $\pm$ SD ( $\times 10^4$ )		Dopant enhancement factor
	APPI + dopant	APPI		APPI + dopant	APPI	
BEZ	2.0 $\pm$ 0.5	29 $\pm$ 7	0.1 x	0.1 $\pm$ 0.003	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 x
CYC	8670 $\pm$ 623	2160 $\pm$ 138	4 x	0.2 $\pm$ 0.02	13 $\pm$ 2	0.02 x
ENA	569 $\pm$ 15	751 $\pm$ 60	0.8 x	4.1 $\pm$ 0.2	21 $\pm$ 2	0.2 x
MTX	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ	Φ
ORL	411 $\pm$ 4	229 $\pm$ 7	2 x	0.2 $\pm$ 0.03	3.3 $\pm$ 0.3	0.1 x

<sup>Φ</sup> MTX was not ionized with APPI nor APCI

<sup>Ψ</sup> Average of triplicate peak areas analysis of FIA were determined for 2 ng injections. Mobile phase= (1:1) ACN/H<sub>2</sub>O pH 2.9 with A.A. . Dopant flow rate was 20  $\mu\text{L min}^{-1}$ . TOL IP= 8.8eV. Kr lamp photon energy = 10.6 eV.

### 3.3.5 Comparison of signal intensity and S/N ratio

#### *Flow injection analysis*

Results obtained by FIA appear in **Table 3.5**. All the resulting peak area obtained using the three sources were statistically different ( $p < 0.05$ ) applying the Student's t test<sup>20</sup>. These results show that ESI peak areas obtained by FIA were always higher than those of APCI and APPI. Also S/N ratio results were better for ESI than for APPI and APCI. MTX presents the best results with the ESI source, it is the most polar compound of the five, and as it has been demonstrated that ESI works well on species of this kind.<sup>11</sup> We expected better results for ORL (the least polar compound) with APCI or APPI. However, poor ionization of apolar compounds in APCI can be explained by the formation of protonated solvent clusters. Thus, only compounds with a higher proton affinity (PA) than the solvent clusters are ionized<sup>21</sup>.

**Table 3.5**-Comparison of APPI, APCI and ESI peak area and S/N by Flow Injection Analysis FIA.

Analyte	Peak area $\pm$ SD ( $\times 10^4$ )			S/N $\pm$ SD ( $\times 10^4$ )		
	ESI	APPI	APCI	ESI	APPI	APCI
BEZ	3740 $\pm$ 406	29 $\pm$ 7	22 $\pm$ 1	14.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ .009
CYC	1136 $\pm$ 267	2160 $\pm$ 138	32 $\pm$ 3	24.1 $\pm$ 1	13.3 $\pm$ 2	1.3 $\pm$ 0.2
ENA	2975 $\pm$ 739	751 $\pm$ 60	27 $\pm$ 5	19.1 $\pm$ 1	21.1 $\pm$ 2	0.2 $\pm$ 0.008
MTX	7218 $\pm$ 989	$\Phi$	$\Phi$	21.7 $\pm$ 0.8	$\Phi$	$\Phi$
ORL	2375 $\pm$ 195	229 $\pm$ 7	17 $\pm$ 2	3.8 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.02

<sup>$\Phi$</sup>  MTX was not ionized with APPI nor APCI

<sup>$\Psi$</sup>  Average of triplicate peak areas analysis of FIA were determined for 1 ng injections. Mobile phase= (1:1) ACN/H<sub>2</sub>O pH 2.9 with A.A. . ESI flow rate was 0.2 mL min<sup>-1</sup>. APPI and APCI flow rate was 0.6 mL min<sup>-1</sup>. For peak area all the results are statistically different according to the t test.

#### *On-column analysis*

The on-column ESI peak areas presented similar results than those obtained by FIA. **Tables 3.6** and **4.7** show the results in DI-H<sub>2</sub>O and wastewater, respectively. The ESI on-column area is higher than that of APCI and APPI for both cases. Differences in the dimensions of the columns

used for the experiments (7.5×2 mm for ESI versus 150×4 mm for APPI and APCI) did not contribute to the results observed as there is no correlation between the low plate height and the peak areas observed (**Table 3.6**). We can also observe that using FIA (e.g. without an HPLC column) ESI areas were also higher than those obtained by on-column analysis.

In DI-H<sub>2</sub>O and wastewater on-column analysis, APCI S/N ratio was lower for all the compounds among the three ionization sources (**Table 3.6** and **3.7**). Cai et al.<sup>18</sup> found identical results in the comparison of APPI and APCI baselines. APCI signals were noisier than those of APPI for the on-column analysis and some possible reasons are the ionization of column bleeding components and probably the presence of uneven electron discharge (sparking) at the tip of corona needle in APCI.

**Table 3.6**-Comparison of APPI, APCI and ESI Performance by on-column analysis in DI-H<sub>2</sub>O.

Analyte	LOD (µg mL <sup>-1</sup> )			S/N ± SD ( × 10 <sup>4</sup> )			Peak area ± SD (×10 <sup>4</sup> )			H		
	ESI	APPI	APCI	ESI	APPI	APCI	ESI	APPI	APCI	ESI	APPI	APCI
BEZ	7	15	15	1.51 ± 0.1	0.34 ± 0.004	0.13 ± 0.07	323 ± 5	4.12 ± 0.7	9.14 ± 0.3	26	21	19
CYC	3	14	10	0.84 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.52 ± 0.2	328 ± 5	17.11 ± 1	23.3 ± 0.3	72	12	12
ENA	13	83	48	0.44 ± 0.001	0.03 ± 0.001	0.12 ± 0.01	65 ± 0.8	2.34 ± 0.06	6.20 ± 0.2	72	40	49
MTX	4	Φ	Φ	4.71 ± 0.01	Φ	Φ	36 ± 1	Φ	Φ	77	Φ	Φ
ORL	9	17	17	1.34 ± 0.3	0.24 ± 0.001	0.14 ± 0.01	6 ± 0.04	0.43 ± 0.1	1.31 ± 0.1	11	7	10

<sup>Φ</sup> MTX was not ionized with APPI nor APCI For peak area all the results are statistically different according to the t test. On-column LODs were determined using the standard error of the intercept and the slope of the calibration curve. Average peak areas of triplicate analysis were determined for 0.5 ng injections. No dopants were used for any of the analytes.

**Table 3.7-**Comparison of APPI, APCI and ESI Performance by on-column analysis in water from the raw sewage collector of the Montreal WWTP.

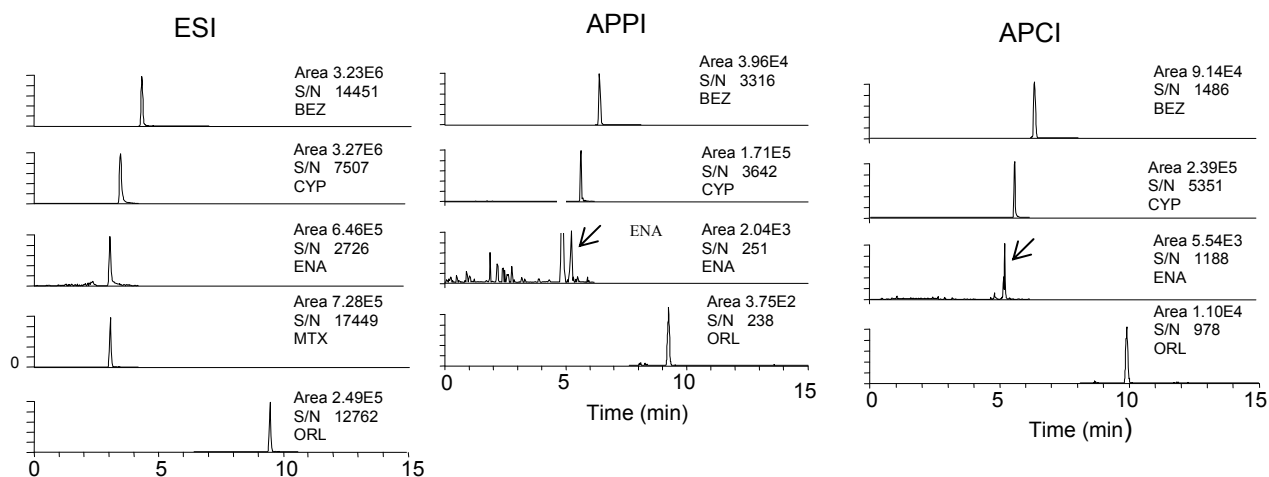
Analyte	LOD (pg mL <sup>-1</sup> )			S/N± SD (×10 <sup>4</sup> )			Peak area ± SD (×10 <sup>4</sup> )		
	ESI	APPI	APCI	ESI	APPI	APCI	ESI	APPI	APCI
BEZ	7	Π	14	0.72 ± 0.03	0.33 ± 0.121	0.3 ± 0.12	191 ± 8.1	12 ± 3.2	30 ± 2.4
CYC	5	11	7	0.53 ± 0.1	0.44 ± 0.093	0.64 ± 0.01	317 ± 9.3	17 ± 1.3	25 ± 2.1
ENA	38	Λ	Λ	1.54 ± 0.03	0.41 ± 0.061	0.23 ± 0.02	116.1 ± 0.3	13 ± 1.1	28 ± 3.0
MTX	11	Φ	Φ	0.31 ± 0.03	Φ	Φ	72.8 ± 0.4	Φ	Φ
ORL	15	9	17	2.41 ± 0.02	0.10 ± 0.002	0.11 ± 0.05	25 ± 2.2	5.21 ± 0.0	2.0 ± 0.2

For peak area all the results are statistically different according to the t test.

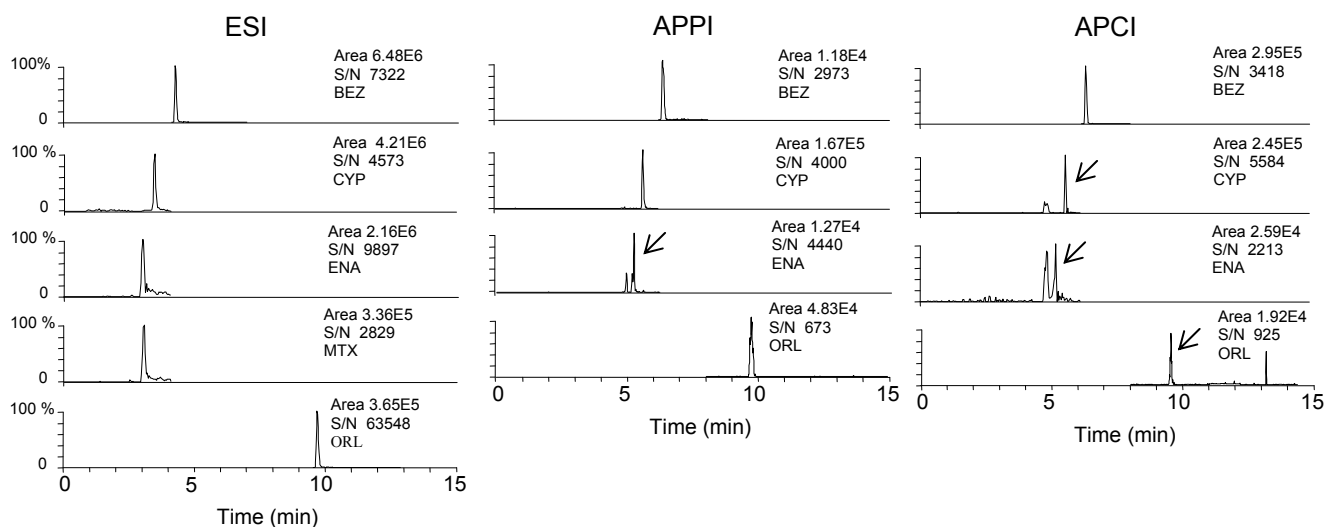
Φ Methotrexate was not ionized with APPI and APCI

Π and Λ a very poor linearity was obtained and no LOD was calculated

**Figures 3.3** and **3.4** show the separation of the target compounds using the SPE on-line LC-MS/MS, for the injection and preconcentration of 0.2 ng of each compound, respectively. Probably due to the combined effects of ion suppression and elevated APPI or APCI baselines, ENA and ORL did not produce a high ion intensity by both sources (**Figure 3.3** and **3.4**). The SRM chromatograms of the DI-H<sub>2</sub>O and WWTP effluents show that a spiked standard of BEZ was not sufficiently ionizable using APPI. From direct S/N comparisons between the two figures, the second figure gives the wrong impression that dirtier samples yield better quality MS data for almost all the experiments, but these results are due to the higher concentration of the analytes already present in the wastewater (BEZ 50, CP 9, ENA 369, MTX 59 ng/L, respectively)<sup>4</sup>.



**Figure 3.3**-SPE on-line and LC separation of the target compounds. Loading of 1.00 mL of standards ( $200 \text{ pg mL}^{-1}$ ) in DI- $\text{H}_2\text{O}$ .



**Figure 3.4**-SPE on-line and LC separation of the target compounds. Loading of 1.00 mL of standards ( $200 \text{ pg mL}^{-1}$ ) in wastewater.

### 3.3.6 Evaluation of matrix effects on-column by SPE on-line

A critical aspect in quantitative analysis with LC-MS/MS is the influence of the matrix on the ionization process. Matrix effects can be defined as an unexpected suppression or enhancement of the analyte response due to co-eluting matrix constituents<sup>22-24</sup>. It has been demonstrated that the occurrence of matrix effects may differ between ionization techniques (ESI, APCI or APPI), ionization mode (positive or negative), or between equipment with different source design<sup>25</sup>. Matrix effects in ESI, APCI and APPI sources were investigated using a wastewater treatment plant (WWTP) effluent sample. They were determined using the same on-line extraction processes and by comparing the peak areas of spiked standards in WWTP effluent samples to those of standards spiked in DI-H<sub>2</sub>O. As shown in **Table 3.8**, the WWTP effluent matrix led to alterations in the results depending on the source. In all three ionization sources, signal enhancement was observed for ORL (140-173%) and signal suppression for ENA (47-63%) while CYC and was subjected to weak matrix effects (95-118%).

**Table 3.8**-Matrix effects evaluation.

Analyte	MEE ± SD	MEE ± SD	MEE ± SD
	ESI	APPI	APCI
BEZ	108 ± 9	30 ± 7	155 ± 21
CYC	118 ± 1	95 ± 7	102 ± 7
ENA	63 ± 8	54 ± 4	47 ± 8
MTX	46	Φ	Φ
ORL	140 ± 31	160 ± 23	173 ± 45

<sup>Φ</sup> Methotrexate was not ionized with APPI nor APCI

It has been reported that APCI and APPI can be less sensitive to matrix effects than ESI,<sup>22, 26-28</sup> however we observed strong matrix effects using APCI and APPI (**Table 3.8**). Similar results

were obtained by other groups during the LC-MS/MS analysis of other pharmaceuticals in biological matrices using APCI or APPI sources<sup>29, 30</sup>. Other studies have also concluded that the extent of matrix effects may be also dependent on the LC-MS interface employed in a given method, because the ionization mechanism is different and may affect the efficiency of formation of the desired ions in the presence of the same co-eluting compounds<sup>23, 31</sup>.

The analytes most affected by matrix effects were ENA (47 to 63%) and ORL (140 to 173%). The main source of the problem is commonly reported to be the presence of endogenous substances, i.e. organic or inorganic molecules present in the sample that are co-extracted. ENA matrix effects may be explained by its short retention time, close to the solvent front (Figure 2), where the amount of weakly retained (and possibly interfering) compounds is the highest<sup>32, 33</sup>. We did attempt to improve the chromatographic separation by changing the gradients and mobile phases, but none of the combinations we tried provided significant improvements. ORL, an apolar compound, was adequately separated from the other compounds, however co-eluted components of the sample could interfere with its ionization. A solution to the matrix effects observed might be a more selective analyte extraction<sup>34, 35</sup>. The drastic difference between Figure 1 and 2, mainly for ENA, is due to the trace level concentration present in the wastewater matrix (369 ng/L).

When available, the best option to tackle matrix effects is to use isotopically-labeled internal standards<sup>36</sup>. In our case it was not possible to obtain labeled internal standards for all the compounds. For that reason, we used the standard additions method. When working with a fully automated on-line preconcentration and detection system, this method is much less time consuming and laborious and becomes the most efficient way to correct for the signal distortion effects caused by matrix components<sup>36, 37</sup>.

### 3.3.7 Comparison of Limits of Detection

APPI, APCI and ESI on-column limits of detection (LOD) were determined by SPE-on line in spiked DI-H<sub>2</sub>O and WWTP effluent samples. The standard additions calibration curve was used to calculate the LOD, expressed as 3.3 the ratio of the standard error of the intercept and the slope of the curve. For ESI, the lowest LOD was of 2.5 pg mL<sup>-1</sup> for CYC in DI-H<sub>2</sub>O, the limits achieved for all the compounds were satisfactory for environmental analysis. All the LOD obtained by ESI were significantly lower than those obtained by APPI and APCI. This is explained by a lower background noise with ESI, suggesting that it is a superior ionization source for the analysis of our target substances in such environmental samples. Most published methods on the determination of pharmaceuticals in the environment samples with LC-ESI-MS/MS present LOD and limits of quantification in the low pg mL<sup>-1</sup> range (0.1–9 pg mL<sup>-1</sup>)<sup>38-41</sup>. Castiglioni et al. quantified BEZ, ENA, CYC and MTX, in eight Italian effluents and have shown some of the lowest LOQs (0.1, 1.9, 0.71 and 0.83 pg mL<sup>-1</sup>, respectively)<sup>38</sup>. The LOD achieved with APCI in this work are low enough to quantify BEZ, CYC and ORL in contaminated wastewater samples but not in more diluted samples such as tap water. Poor goodness-of-fit ( $R^2 < 0.7$ ) was obtained for the calibration curves of BEZ and ENA consequently only CYC and ORL could be analyzed in wastewaters by APPI. Standard additions compensates for matrix effects but does not improve the analytical sensitivity, as it was concluded by a study on pharmaceuticals in municipal wastewaters<sup>42</sup>.



### 3.4 Conclusions

In the above work, the results of the comparison of the three most used atmospheric pressure ionization sources for LC-MS/MS showed that ESI is the best ionization source for the analysis of the target compounds. ESI detected protonated molecules of the target compounds with higher relative abundance; it was shown to be an ideal ionization technique because of its high sensitivity and high selectivity for the determination of the five selected compounds in municipal wastewater and lower background signal. ESI exhibited superior performance, offering better detection limits, higher peak areas and higher S/N ratio. ESI signal intensity was about 95% higher for all the compounds by FIA, only for CP APPI was 90% better than ESI. For on-column analysis in DI-H<sub>2</sub>O, the five studied compounds presented ESI signal intensities 90% higher. In presence of a complex matrix as wastewater samples ESI signal was about 80% higher than the APPI and APCI signal, maybe due as a result of interferences from the sample matrix that were lower when using ESI. It was further shown than ESI provides less matrix ionization effects for three of the target compounds, which may suggest than the ESI source is less sensitive to matrix ion effect than either APCI or APPI sources, for the analytes and method developed in this work.

### 3.5 References

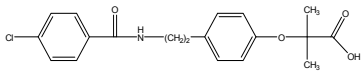
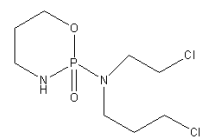
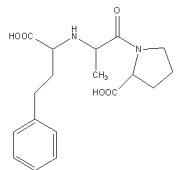
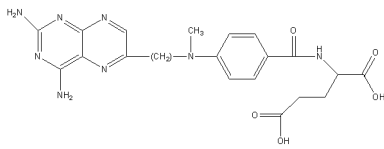
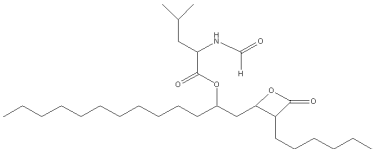
- (1) Liu, L.; Cline, R. R.; Schondelmeyer, S. W.; Schommer, J. C. *The Annals of Pharmacotherapy* **2008**, *42*, 368.
- (2) Dijkman, E.; Mooibroek, D.; Hoogerbrugge, R.; Hogendoorn, E.; Sancho, J. V.; Pozo, O.; Hernandez, F. *Journal of Chromatography A* **2001**, *926*, 113-125.
- (3) Yamamoto, A.; Kakutani, N.; Yamamoto, K.; Kamiura, T.; Miyakoda, H. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40*, 4132-4137.
- (4) Garcia-Ac, A.; Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauve, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2009**, *11*, 830-838.
- (5) Raffaelli, A.; Saba, A. *Mass Spectrometry Reviews* **2003**, *22*, 318-331.
- (6) Garcia-Ac, A.; Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauv e, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2009**, *11*, 830-838.
- (7) ICH; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- (8) Salvador, A.; Moreton, C.; Piram, A.; Faure, R. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1145*, 102-109.
- (9) Lagana, A.; Bacaloni, A.; Fago, G.; Marino, A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 401-407.
- (10) Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1067*, 153-160.
- (11) Thurman, E. M.; Ferrer, I.; Barcelo, D. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 5441-5449.
- (12) Willoughby, R.; Sheehan, E.; Mitrovich, S. *A Global View of LC/MS*; Global View Publishing: Pittsburgh, 1998.
- (13) Asperger, A.; Efer, R.; Koal, T.; Engewald, W. *Journal of Chromatography A* **2001**, *937*, 65-72.
- (14) Kauppila, T. J.; Bruins, A. P.; Kostianen, R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1399-1407.
- (15) Robb, D. B.; Blades, M. W. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1275-1290.
- (16) Hanold, K. A.; Fischer, S. M.; Cormia, P. H.; Miller, C. E.; Syage, J. A. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 2842-2851.
- (17) Hoffmann, T.; Bandur, R.; Hoffmann, S.; Warscheid, B. *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* **2002**, *57*, 1635-1647.
- (18) Cai, S. S.; Hanold, K. A.; Syage, J. A. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 2491-2498.
- (19) Takino, M.; Daishima, S.; Nakahara, T. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 1965-1972.
- (20) Miller, J. C.; Miller, J. N. *Analyst* **1988**, *113*, 1351-1356.
- (21) Mauri, P.; Minoggio, M.; Iemoli, L.; Rossoni, G.; Morazzoni, P.; Bombardelli, E.; Pietta, P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, *32*, 633-639.
- (22) Theron, H. B.; van der Merwe, M. J.; Swart, K. J.; van der Westhuizen, J. H. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 1680-1686.

- (23) Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3019-3030.
- (24) Schuhmacher, J.; Zimmer, D.; Tesche, F.; Pickard, V. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 1950-1957.
- (25) Antignac, J. P.; de Wasch, K.; Monteau, F.; De Brabander, H.; Andre, F.; Le Bizec, B. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *529*, 129-136.
- (26) Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 3653-3659.
- (27) Vanderford, B. J.; Pearson, R. A.; Rexing, D. J.; Snyder, S. A. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 6265-6274.
- (28) Zuehlke, S.; Duennbier, U.; Heberer, T. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 6548-6554.
- (29) Liang, H. R.; Foltz, R. L.; Meng, M.; Bennett, P. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 2815-2821.
- (30) van Hout, M. W. J.; Niederlander, H. A. G.; de Zeeuw, R. A.; de Jong, G. J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 245-250.
- (31) King, R.; Bonfiglio, R.; Fernandez-Metzler, C.; Miller-Stein, C.; Olah, T. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2000**, *11*, 942-950.
- (32) Choi, B. K.; Hercules, D. M.; Gusev, A. I. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *369*, 370-377.
- (33) Pascoe, R.; Foley, J. P.; Gusev, A. I. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 6014-6023.
- (34) Benijts, T.; Dams, R.; Lambert, W.; De Leenheer, A. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1029*, 153-159.
- (35) Van De Steene, J. C.; Mortier, K. A.; Lambert, W. E. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1123*, 71-81.
- (36) Stüber, M.; Reemtsma, T. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 910-916.
- (37) Reemtsma, T. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2001**, *20*, 533-542.
- (38) Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Calamari, D.; Fanelli, R.; Zuccato, E. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1092*, 206-215.
- (39) Gros, M.; Petrovic, M.; Barcelo, D. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26*, 1553-1562.
- (40) Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. *Water Research* **2005**, *39*, 2219-2228.
- (41) Quintana, J. B.; Reemtsma, T. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 765-774.
- (42) Zhao, X. M.; Metcalfe, C. D. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 2010-2017.
- (43) Pedrouzo, M.; Reverte, S.; Borrull, F.; Pocurull, E.; Marce, R. M. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 297-303.
- (44) Barbieri, A.; Sabatini, L.; Indiveri, P.; Bonfiglioli, R.; Lodi, V.; Violante, F. S. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 1889-1893.
- (45) Castiglia, L.; Miraglia, N.; Pieri, M.; Genovese, G.; Simonelli, A.; Basilicata, P.; Sannolo, N.; Acampora, A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 1858-1866.
- (46) Liu, Z. F.; Chan, K. K.; Wang, J. J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2581-2590.

- (47) Lee, J.; Son, J.; Lee, M.; Lee, K. T.; Kim, D. H. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 1157-1162.
- (48) Pérez, S.; Eichhorn, P.; Barceló, D. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 8293-8300.
- (49) Wieboldt, R.; Campbell, D. A.; Henion, J. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **1998**, *708*, 121-129.

## **Matériel supplémentaire**

**Tableau 3.1**-Physicochemical Properties and molecular structure of target drugs\*

Compound	Structure	MW (g/mol)	pK <sub>a</sub>	log P
Bezafibrate C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>4</sub>		361.11	3.6	4.3
Cyclophosphamide C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> C <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P		260.02	4.5-6.5	0.6
Enalapril C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		377.5	3.0-5.4	0.7
Methotrexate C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>		454.45	4.8 and 5.5	-1.9
Orlistat C <sub>29</sub> H <sub>53</sub> NO <sub>5</sub>		495.73	-	7.6

\* MW: molecular weight, pK<sub>a</sub>: dissociation constant, log P: partition coefficient (octanol/water)

**Tableu 3.2**-MS gradient for the target compounds separation ESI at 0.2 mL min<sup>-1</sup> and APPI and APCI at 0.6 mL min<sup>-1</sup>.

Time (min)	ESI		Time (min)	APPI/APCI	
	A (%)	B (%)		A (%)	B (%)
0	60	40	0	60	40
1	0	100	2	0	100
9	0	100	9	0	100
10	60	40	10	60	40
15	60	40	15	60	40

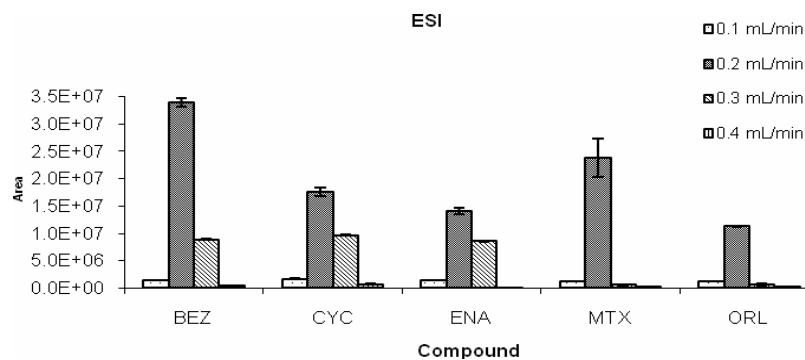
A: 0.1% A.A. in MeOH/DI-H<sub>2</sub>O 1:40 v/v and B: ACN

**Tableu 3.3**-Tube lens, collision energies, precursor and fragment ions of the compounds of interest generated by ESI, APCI and APPI. The cited references give explanations for the ESI conditions of the observed fragments.

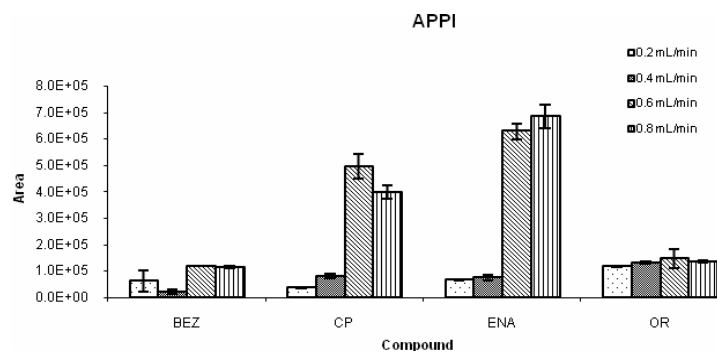
Analyte	ESI		APCI		APPI		Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
	CE (V)	Tube lens	CE (V)	Tube lens	CE (V)	Tube lens		
BEZ	21	-96.1	19	-119.9	20	-99.1	360.1	273.9 <sup>44</sup>
CYC	23	81.1	23	101.1	26	121.6	261.0	140.0 <sup>45-47</sup>
ENA	17	94.6	18	111.4	17	107.1	377.2	234.1 <sup>48, 49</sup>
MTX	21	101.6	Φ	Φ	Φ	Φ	455.1	308.0 <sup>45</sup>
ORL	12	110.9	14	121.4	14	132.1	496.4	319.2 <sup>50</sup>

<sup>Φ</sup> Methotrexate was not ionized with APPI nor APCI, CE: collision energy

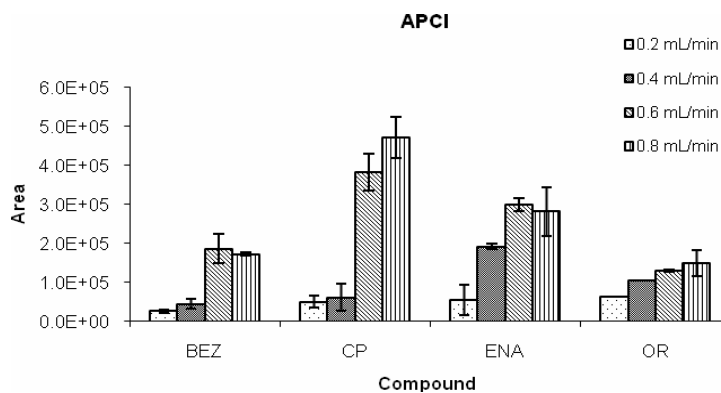
A



B

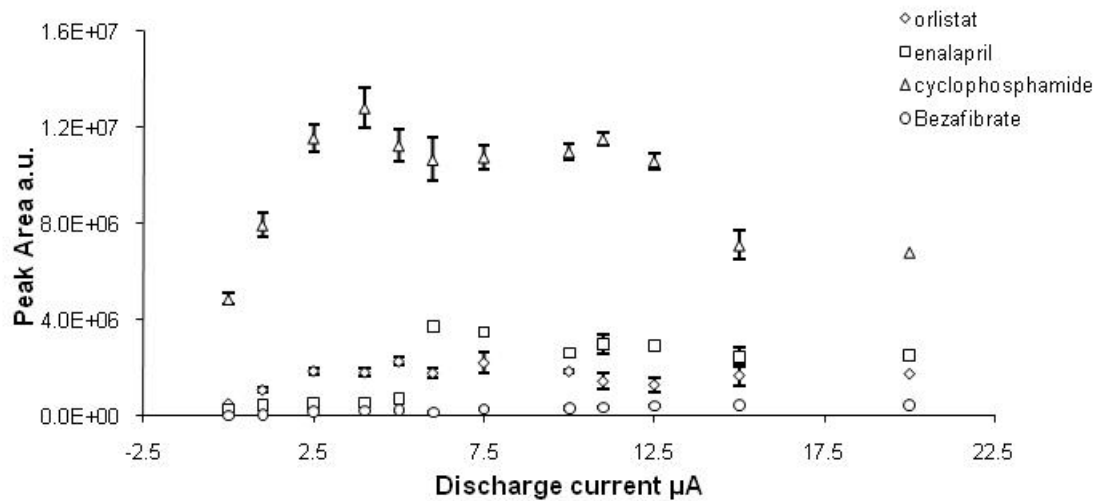


C



**Figure 3.1**-Comparison of signal intensity of the three ionization techniques by FIA at different flow rates.





**Figure 3.2**-Effects of APCI corona needle discharge current ( $\mu\text{A}$ ) on major ion product intensity,  $n=3$ , FIA. Optimum current: BEZ = 5  $\mu\text{A}$ ; CYC = 4  $\mu\text{A}$ ; ENA= 6  $\mu\text{A}$ ; ORL= 6  $\mu\text{A}$ .

---

---

## **CHAPITRE 4: Détermination de BEZ, CYP, ENA, MTX et ORL dans les eaux de surface et usées avec SPE couplé à la LC-MS/MS**

---

---

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

Araceli Garcia-Ac<sup>a</sup>, Pedro A. Segura<sup>b</sup>, Christian Gagnon<sup>b</sup> and Sébastien Sauvé<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada*

<sup>b</sup> *Aquatic Ecosystem Protection Research Division, Environment Canada, 105 McGill St., Montreal, QC, Canada H2Y 2E7*

\* Corresponding author: Tel.: +1 514 343 6749; fax: +1 514 343 7586.

Publié dans le Journal of Environmental Monitoring 11(4) 830-838 (2009)

## Abstract

We developed a rapid method for the monitoring of five selected pharmaceuticals in the influent and effluent of municipal wastewater treatment plants (WWTP) as well as in the effluent receiving waters. To that end, we optimized and validated an analytical method based on on-line solid-phase extraction (SPE) coupled with reversed-phase liquid chromatography-switching polarity electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI( $\pm$ )-MS/MS). Representing analytical challenges, the target analytes have a variable hydrophobic character and belong to various therapeutic classes including the lipid regulator bezafibrate, the chemotherapy drugs methotrexate and cyclophosphamide, the lipase inhibitor Orlistat and the angiotensin converting enzyme inhibitor used in the treatment of hypertension, enalapril. The method combines positive and negative voltage switching mode, therefore all analytes can be determined using a single injection and without any reduction in sensitivity. In order to detect traces of these compounds, a preconcentration step before detection is performed by loading 1.00 mL of sample in an on-line SPE cartridge and eluting from the cartridge using a reversed-phase liquid chromatography gradient. Analysis of wastewater and surface water samples was greatly affected by coeluting matrix compounds, therefore to compensate for matrix effects; quantitation was performed using standard additions. Method intra-day precision was less than 6.5% and limits of detection in fortified matrix effluent samples ranged from 9 to 20 ng L<sup>-1</sup>. Four of the target pharmaceuticals were detected in the WWTP effluents, enalapril and bezafibrate being the most abundant compounds with concentrations of 35 and 239 ng L<sup>-1</sup>, respectively. Concentrations of these same compounds in surface water samples from sites downstream in the St. Lawrence River were 8 and 63 ng L<sup>-1</sup> respectively, which was due mainly to dilution.

## 4.1 Introduction

The world consumption of pharmaceuticals in 2006 was approximately \$643 billion<sup>1</sup>, twice the sale costs from that of 1999, which was \$342 billion. Pharmaceuticals costs, as well as total consumption, are likely continuously rising. Depending on the pharmacokinetics, a significant portion of pharmaceuticals is excreted after ingestion by humans, either as the parent compound and/or as metabolites that are discharged into domestic wastewaters. Many factors influence the occurrence of these drugs in the environment: total quantities consumed, pharmacokinetics, physico-chemical properties and wastewater treatment processes. Some pharmaceuticals such as methotrexate and orlistat are excreted 80-90% unchanged<sup>2, 3</sup> and about 50% of the lipid metabolism regulator bezafibrate is excreted as the parent compound<sup>4</sup>. Discharges from municipal sewage effluents are considered as the main source of environmental release of pharmaceuticals<sup>5-7</sup>. Because of their high polarity and their acid-base character, the target compounds have the potential to be widely transported and dispersed in the aquatic environment. For this reason it is important to develop a simple, rapid and sensitive method of detection that could be used for environmental monitoring of such compounds.

Bezafibrate has been found in influent, effluent and receiving surface waters mainly in samples from European environments<sup>8-12</sup>. Bezafibrate has been also quantitated in a wastewater irrigation system, soil drainage and spring samples in Mexico<sup>13</sup>. Castiglioni<sup>12</sup> developed a method based on off-line solid-phase extraction (offline SPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to study bezafibrate, methotrexate and cyclophosphamide, in eight Italian effluents (with maximum concentrations of 117, 12.6 and 9 ng L<sup>-1</sup> respectively). Enalapril was also studied but not detected in any urban waste waters with a limit of quantification (LOQ) of 0.71 ng L<sup>-1</sup>. In another study in northern Italy<sup>14</sup>, bezafibrate and enalapril were reported in surface waters near wastewater stations along the rivers Po and Lambro (with maximum concentrations of 57.15 and 0.54 ng L<sup>-1</sup> respectively), and cyclophosphamide was not detected (cyclophosphamide LOQ was 0.3 ng L<sup>-1</sup>). Orlistat has been determined in

plasma and serum only by LC-MS/MS<sup>15</sup>, but to the authors' knowledge it has not been yet quantitated in environmental waters.

Most published methods of determination of pharmaceuticals are based on off-line SPE followed by LC-MS/MS. In these methods, the extraction and preconcentration steps are done separately from the analytical chromatographic separation and quantitation. Typically, LOQs are in the low ng L<sup>-1</sup> range (0.1-9 ng L<sup>-1</sup>)<sup>9-12</sup>. One of the main disadvantages is the extensive labour required for sample preparation, which can take from hours up to days. Thus, some automated on-line methods have been developed in the last few years for the preconcentration of estrogens and endocrine disruptors<sup>16</sup> and pharmaceuticals including bezafibrate<sup>17</sup>. Although these procedures are rapid and simple, they require relative large sample volumes (up to 200 ml), consequently they are more susceptible to introduce contaminants in the system and suffer from column fouling when complex samples (i.e., river waters or wastewaters) are analyzed. Other authors<sup>18</sup> have proposed an automated on-line SPE coupled to LC-MS/MS method using 1.3-mL sample volume injections. They obtained excellent repeatability and detection limits on the order of 0.5-60 ng L<sup>-1</sup> for pesticides and their metabolites. This method was validated for relatively clean matrices, ground and surface water, but it remains a significant challenge to adapt those methods to cope with raw sewage or wastewater treatment plant (WWTP) effluents. Recently, Salvador<sup>19</sup> used a similar system with 1-mL injections for the extraction of three estrogens in sewage water and WWTP effluents. They obtained limits of detection and quantification in the range of 0.4 to 1 ng L<sup>-1</sup>. In this case, a derivatization with dansychloride was necessary and a second washing step was therefore needed to remove the excess of reagents (this also restricted their work on three estrogens of similar chemical properties).

On-line SPE is definitely one of the most promising techniques for the rapid extraction and preconcentration of most pharmaceuticals in aqueous samples. However, there are two cases in which the optimization of conditions for the extraction with the classical reverse phase sorbents presents a particularly difficult challenge: 1) the extraction of fairly polar analytes, such as cyclophosphamide and methotrexate (log P= 0.6 and -1.9),

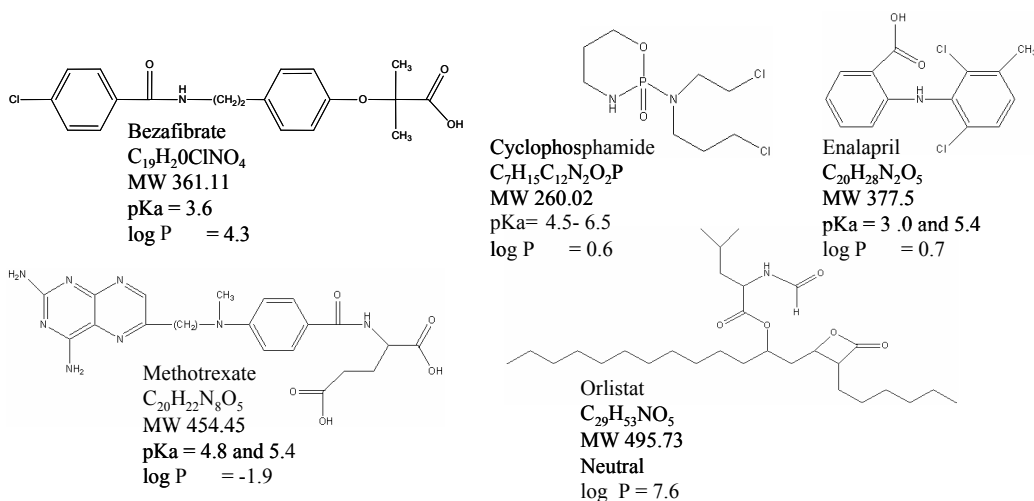
which are poorly retained in commonly used sorbents such as C<sub>18</sub> and 2) combining the analysis of a group of compounds with a wide range of hydrophobicities.

The objective of the present study was to develop a fast, simple, economic and completely automated method to simultaneously determine pharmaceuticals with highly variable hydrophobicity, bezafibrate, cyclophosphamide, enalapril, methotrexate and orlistat in environmental water samples. In order to do this, it was necessary to optimize the on-line solid-phase extraction method to study and minimize matrix effects.

## 4.2 Experimental

### 4.2.1 Chemicals and materials

LC-MS grade acetonitrile, water and methanol were purchased from J. T Baker (Phillipsburg, NJ). Reagent water was obtained from a Milli-Q ultrapure water system (Billerica, MA). HPLC-grade acetic acid was purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ) and formic acid (98% pure) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Bezafibrate (BEZ), cyclophosphamide (CYP), orlistat (ORL) and methotrexate (MTX) (certified purity  $\geq 99\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich Canada. Enalapril (ENA) was purchased as its formulation. **Figure 4.1** shows the chemical structures and physicochemical properties of these compounds. Stock solutions ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) of each compound were prepared by dissolving the corresponding pure powder in an appropriate solvent (MeOH for BEZ, CYP, OR and EN; MeOH/1% aqueous formic acid 7:3 v/v for MTX). Stock solutions were stored at  $4^\circ\text{C}$ . A mixed working solution containing  $50 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  of the target compounds was prepared weekly by dilution of the stock solutions in acetonitrile. All solutions were stored in amber bottles at  $4^\circ\text{C}$ , and allowed to equilibrate to room temperature just prior to use.



**Figure 4.1-**Molecular structures and physicochemical properties of the pharmaceuticals investigated.

#### 4.2.2 Instrumentation

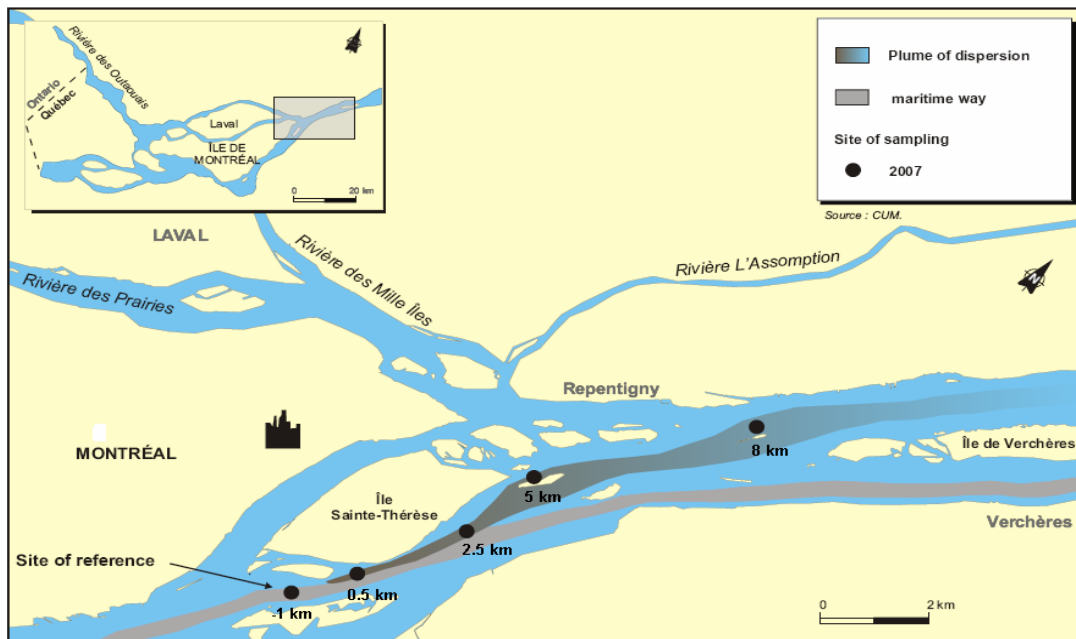
The Environmental Quantification system (EQuan) made by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA USA) was used to carry out the preconcentration and analysis. EQuan utilizes two quaternary pumps (a Finnigan Surveyor LC-Pump Plus and a Surveyor MS Pump Plus for eluting the compounds off the loading column and separation on the analytical column), a Surveyor Autosampler Plus for loading the samples in a 1-mL loop, two columns (a small load column for preconcentration and a standard analytical column for chromatographic separation) and a TSQ Quantum Ultra AM triple quadrupole mass spectrometer for detection. Sample ionization was done by ESI $\pm$ , with the Ion Max API Source. The system is equipped with a six-port valve 7750 E85 Rheodyne (Berkeley, CA) that was used for column switching.

The SPE preconcentration was performed using a reversed phase styrene divinylbenzene copolymer Strata-X cartridge (20 $\times$ 2.0 mm, 28  $\mu$ m particle size) made by Phenomenex (Torrance, CA). Separation was achieved on a Synergi Max RP-C12 column (75 $\times$ 2.00 mm, 4 $\mu$ m) made by Phenomenex and was preceded by a guard cartridge (4.0 $\times$ 2.00 mm, 4 $\mu$ m) of the same packing material.

### 4.2.3 Sample collection and preparation

**Figure 4.2** shows the locations of WWTP effluent and surface water sampling sites on the St. Lawrence River. The Montreal wastewater treatment plant treats a volume of water representing 50% of the wastewaters treated in the province of Québec and has a capacity of about 7.6 million m<sup>3</sup> day<sup>-1</sup>. It is the largest primary physico-chemical treatment plant in America. To reduce the phosphorus found in water, a coagulant is added to destabilize the colloids, after which an anionic polymer is injected to agglomerate the particles. The effluent of the plant is discharged into the St. Lawrence River.

Water samples from the Montreal WWTP were collected in amber glass bottles with Teflon-lined caps and kept at 4°C in the dark until analysis. Surface water samples were collected (1-m depth) with a Teflon pump from St. Lawrence River at -1, 0.5, 2.5, 4.5 and 8 km 98downstream the effluent outfall (**Figure 4.2**). They were then transported to the laboratory in a Spartanburg stainless steel container and stored in the dark at 4°C for less than 24h until the extraction step.



**Figure 4.2**-Map of the St. Lawrence River and surrounding area, as well as target area of study. The sampling sites are marked as by a bull's-eye symbol in the inset region.



Losses during filtering step were addressed, especially for the non-polar compounds, this study consisted of four different tests. The WWTP and surface water samples (0.25 L) were vacuum-filtered through a 1.2- $\mu\text{m}$  pore size fiberglass filter and then through a 0.45- $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane to removed suspended particles. The sample pH was adjusted to 2.8 with formic acid 98%, so as to favor the molecular form of the acidic molecules and promote their retention in the SPE column. Samples were prepared in 50-ml volumetric glass flasks, adding 2.5% methanol to prevent sample loss by adsorption on sample containers and tubing. Sub samples of 1.8 ml were then transferred to amber glass vials for online SPE-LC-ESI( $\pm$ )-MS/MS analysis.

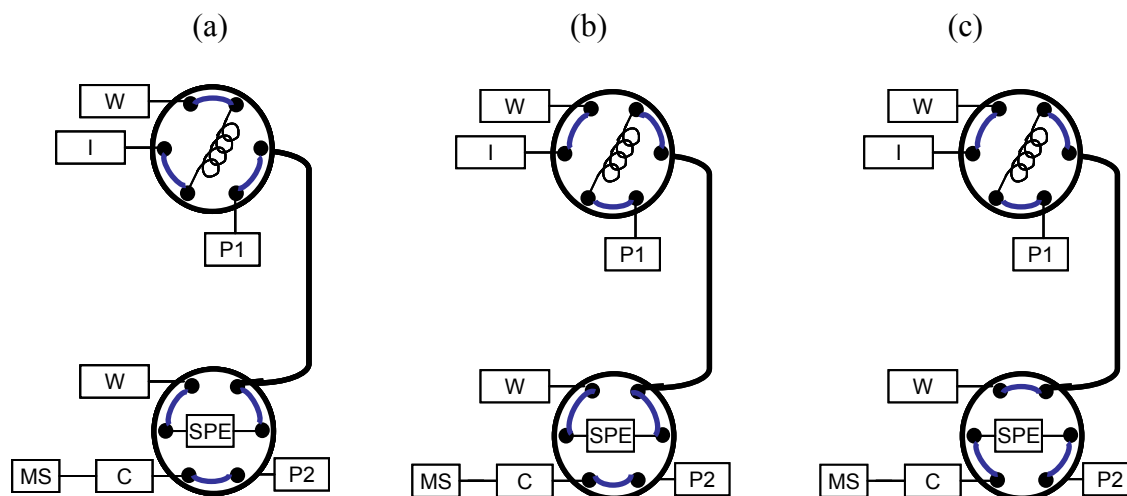
#### 4.2.4 On-line SPE and liquid chromatography

To increase the efficiency of the on-line sample preconcentration, three key system parameters were optimized: sample flow rate, loading volume of the sample and organic solvent content of the load sample. The column-switching procedure and the flow path of the on-line SPE system are illustrated in **Figure 4.3** and all chromatographic conditions are summarized in **Table 4.1** (see Matériel supplémentaire). The mobile phase was LC-MS grade water acidified to pH 2.9 with acetic acid (eluent A) and acetonitrile (eluent B). Vials containing the samples were placed in the autosampler tray kept at 4 °C. The SPE preconcentration was performed using a Strata-X cartridge (20x2.0 mm I.D with a reversed phase styrene divinylbenzene copolymer - Phenomenex, Torrance CA.). Separation was achieved on a Synergi Max RP-C12 column (75x2.00 mm, 4 $\mu\text{m}$ ) preceded by a guard cartridge (4.0x2.00 mm, 4 $\mu\text{m}$ ) of the same packing material (Phenomenex, Torrance CA.). The on-line SPE procedure consisted of three steps:

*Step 1 (valves 1 and 2 in position 1):* The autosampler draws 1.00 mL of the sample from the vial and injects it in the 1-mL injection loop. The divert valve (v1) is in the load position (pos 1) at this point and the conditioning of the SPE cartridge is achieved with a conditioning solution (acidified water with acetic acid pH 2.9 and methanol 2.5%) at a flow rate of 1.00 mL min<sup>-1</sup> (**Figure 4.3a**).

*Step 2 (valve 1 in position 2 and valve 2 in position 1):* The sample in the loop was loaded onto the load column (Strata-X cartridge) with pump 1 (P1) using the conditioning solution at a flow rate of 1.00 mL min<sup>-1</sup>. During the injection step 1 and 2, the pump 2 (P2) delivered mobile phase to the analytical column (C) at a flow rate of 0.2 mL min<sup>-1</sup> (**Figure 4.3b**).

*Step 3 (valve 1 in position 2 and valve 2 in position 2):* Once the sample was loaded into the load column, the valve 2 was actuated to the inject position 2 and the target compounds were backflushed onto the analytical column (C) and separated with the gradient from the pump (P2). The backflushing process was used in order to ensure the elution of strongly-held compounds at the head of the column and to avoid peak tailing, (**Figure 4.3c**).



**Figure 4.3**-Instrumental set-up of the on-line SPE platform coupled to a LC-MS/MS. Positions of the two 6-port switching valves depicted (a-c) correspond to the different steps of analysis. At the start of the analysis (a) the autosampler draw the sample and the SPE column (SPE) is conditioned with pump 1 (P1). The analytical column (C) is equilibrated with pump 2 (P2), (b) the sample is loaded with pump 1 and conditioning solution. (c) Desorption of the target compounds from the SPE column and introduction to the mass spectrometer (MS). P1 and P2, pumps; C, analytical column; SPE, solid-phase extraction column; W, waste.

Pharmaceutical standard solutions used for quantification were also preconcentrated by on-line SPE using the same procedure. The chromatographic separations were carried out at ambient temperature using a mobile phase gradient at a flow rate of  $0.2 \text{ mL min}^{-1}$ . The elution started with 40% of eluent B, followed by a 1-min linear gradient to 100% of eluent B, 8-min isocratic elution, and finally a 1-min linear gradient to 40% of B, which was maintained for 5 min to equilibrate the analytical column. At the end of the last step, a new cycle begins for the analysis of the next sample. All the SPE on-line operations are fully automated for routine analysis with a total run time of 15 min (including the chromatographic run and conditioning for the next sample), with standard addition method one should need at least 45 min ( $n=3$ ) for the analysis of one sample and about 8 hours more to build the calibration curve. Also, it is advisable to change the column frits after the analysis of approximately 100 samples because they gradually become clogged, especially when working with raw sewage and wastewater effluents.

#### 4.2.5 Electrospray-tandem mass spectrometry

Infusion experiments with individual standard solutions were carried out to find ion source parameters with the syringe pump of the TSQ Quantum Ultra AM and mixed using a tee with the LC flow ( $0.2 \text{ L min}^{-1}$ ) before being introduced to the interface. The collision gas was argon and sheath gas and auxiliary gas were nitrogen. The sheath gas was set to 10 arbitrary units and the auxiliary gas to 5 arbitrary units. A spray voltage of  $\pm 3.5 \text{ kV}$  was used for the negative and positive ionization. When using the switching voltage mode, it is important to have the same positive and negative ion source parameters because the switching is very fast and it would take a long time to stabilize the system if different parameters were chosen. Ion transfer capillary temperature was set to  $350 \text{ }^\circ\text{C}$  and skimmer offset 5 V. Selected reaction monitoring (SRM) transitions parameters in the positive and negative ionization mode were: BEZ ( $[\text{M-H}]^-$  precursor ion:  $360.1 \text{ m/z} \rightarrow$  product ion:  $273.9 \text{ m/z}$ , collision energy (CE): 21 V, tube lens (TL): 96 V; CYP ( $[\text{M+H}]^+$   $261.0 \text{ m/z} \rightarrow 140.0 \text{ m/z}$ ), CE: 23 V, TL: 81 V; ENA ( $[\text{M+H}]^+$   $377.2 \text{ m/z} \rightarrow 234.1 \text{ m/z}$ ), CE: 17 V, TL: 95 V; MTX ( $[\text{M+H}]^+$   $455.1 \text{ m/z} \rightarrow 308.0 \text{ m/z}$ ), CE: 21 V, TL: 102 V; ORL ( $[\text{M+H}]^+$   $496.4 \text{ m/z} \rightarrow 319.2 \text{ m/z}$ ), CE: 12 V, TL: 111 V.

#### 4.2.6 Method Validation

The target analyte compounds were identified and determined by LC-ESI( $\pm$ )-MS by comparison with the chromatographic retention time of reference standards (1-2 % maximum difference) <sup>20</sup>. Two different types of calibration curves were tested for quantitation: (a) Milli Q-water with external calibration and (b) in wastewater treatment plant effluent with standard additions. Calibration solutions of the target compounds of 0, 50, 100, 200, 500, 700 and 1000 ng L<sup>-1</sup> were prepared by serial dilution of the mixed working solution (50  $\mu$ g L<sup>-1</sup>). Standard additions were performed by taking equal volumes of the sample solution, all but one were separately spiked with different amounts of the analyte (0-1000 ng L<sup>-1</sup>), and all were diluted to the same volume.

The standard addition method was used to determine the overall method limits of detection, quantitation and precision values. The precision values (expressed as coefficient of variation, CV %) were obtained by analyzing the compounds in distilled water, raw sewage and wastewater effluents. Daily precision was evaluated by determining the compounds spiked at 50 ng L<sup>-1</sup> level ( $n=7$ ) in MQ-distilled water. In raw sewage and wastewater effluent, only MTX, ORL and CYC were spiked at 50 ng L<sup>-1</sup>, BEZ and ENA were determined with the concentration already present in the sample.

Recoveries were obtained by analyzing the target compounds in wastewater effluent samples by analyzing five replicates and then applying the following equation:

$$\text{Recovery (\%)} = \left( \frac{C_{wvs} - C_{ww}}{C_s} \right) \times 100\% \quad (4-1)$$

Where  $C_{wvs}$  is the measured concentration of the analyte in the spiked matrix,  $C_{ww}$  the original concentration of the analyte in the matrix and  $C_s$  is the concentration spiked in the matrix. The limits of detection (LOD), defined as the lowest concentration that the analytical process can reliably differentiate from background levels, were determined using the standard error of the intercept and the slope of the calibration curve, as

proposed by the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of Pharmaceutical for Human Use (ICH) <sup>21</sup>.

Matrix effects were determined with the same extraction processes in wastewater effluent samples, by comparing the peak areas of known amounts of standard spiked in distilled water (*DW*) with the peak area of those standards spiked in wastewater effluent (*WW<sub>S</sub>*) after correcting for the peak area of the analyte in the unspiked matrix (*WW<sub>NS</sub>*):

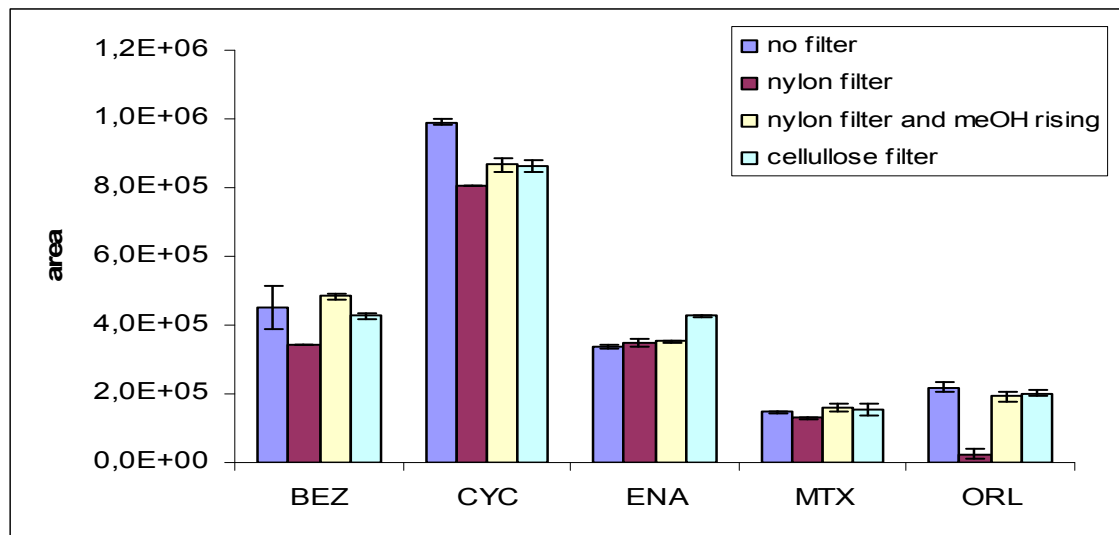
$$\text{Matrix effects (\%)} = \left( \frac{WW_S - WW_{NS}}{DW} \right) \times 100\% \quad (4-2)$$

A value of 100% indicates that there is no absolute matrix effect, if the value is above 100 %, there is a signal enhancement and there is signal suppression if the value is < 100 % <sup>19</sup>. The incidence of ion signal intensity fluctuation was monitored by injecting a standard solution every 8-10 injections.

### 4.3 Results and Discussion

Preliminary filtration experiments were carried out to address losses during the filtration step especially for compounds with low polarity. Both 0.45- $\mu\text{m}$  nylon filters and 0.45- $\mu\text{m}$  cellulose ester membranes were tested. This study consisted in four tests (**Figure 4.4**).

Results show that the cellulose filter was found to be preferable than the nylon filter (Figure 4.4). ORL is especially well retained by the nylon membranes, given its log  $K_{ow}$  of 8.5, this is not too surprising. Hence, when using this type of filter it is critical to rinse the filter with an organic solvent (e.g. methanol) to reduce adsorption losses.



**Figure 4.4**-Experimental variations of peak area and filters with Milli-Q purified water samples having a constant amount of 0.1 ng of the pharmaceuticals (n=3). Loading flow rate 1 mL/min.

### 4.3.1 On-line SPE and liquid chromatography optimization

Three parameters of the preconcentration step were optimized to obtain the highest sensitivity. These parameters were the sample load volume, the sample load flow rate and the percentage of organic solvent in the sample.

#### *Sample load volume*

For trace level determination, the sample load volume is a critical parameter, because it allows lowering the limits of detection by introducing a larger mass of analyte in the mass spectrometer. It is the maximum sample volume which can be thus percolated through the load column giving the maximum detector response. The method used for determining the optimal sample loading volume consisted in measuring peaks areas corresponding to the analysis of different sample volumes containing the same mass of each analyte. Providing that breakthrough does not occur, the peak areas should be constant, however when breakthrough does occur, the amount retained decreases and a diminution in the

peak area should be observed. As expected, in our method conditions (see **Figure 4.5** in Matériel Supplémentaire) CYP and MTX have the lowest load volume value (at 500  $\mu\text{L}$  breakthrough is observed). The less polar compounds have higher volumes than 1000  $\mu\text{L}$ . Maybe for CYP and MTX pH 3 of the sample is not convenient for their maximum retention on the Strata-X loading column, because these molecules have  $-\text{NH}_2$  groups, and at this pH they are not in the neutral form optimal for their retention. All the compounds were percolated with low breakthrough with a volume of 1000  $\mu\text{L}$  to get lower detection limits, though the lost of analyte is small enough to justify the convenience of 1000  $\mu\text{L}$  sample volume. Loading volumes higher than 1 mL were not tested because the current configuration of our system is limited by the volume of the vials (1.8 mL) and because the dead volume increases when using the partial loop mode and a 2 mL loop (peak tailing).

#### *Sample load flow rate*

Sample flow rate is another key parameter to optimize in an on-line device. Optimization was determined by varying the load rates and then measuring peak areas of the different compounds under the same experimental conditions (**Figure 4.6** in Matériel Supplémentaire).

The sample loading volume (1000  $\mu\text{L}$ ) and the concentration (100  $\text{ng L}^{-1}$ ) were kept constant, and the sample flow rate varied: 400, 500, 800 and 1000  $\mu\text{L min}^{-1}$ . The goal was to determine the fastest flow rate that yields the highest areas. These experiments showed that satisfactory results were obtained for flow rates of 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Flow rates higher than 1  $\text{mL min}^{-1}$  could not be used because leaks in the system were observed. At 1  $\text{mL min}^{-1}$ , the peak areas of the analytes were found to be better than those from samples loaded at 0.8  $\text{mL min}^{-1}$ . As can be observed (**Figure 4.6**), at lower flow rates, the analyte response is greatly reduced. Theoretically, the height equivalent of theoretical plates,  $H$ , is clearly influenced by the flow rate. So the SPE device could be operated most efficiently if we get a minimum value for  $H$ . By diminishing the flow rate<sup>22</sup> stronger signals should then be expected for lower flow rates. However, we observed the opposite. A possible explanation of this could be that as can be identified in the graphical representation of the

Van Deemter equation, there is a minimum value of  $H$  that it is possible to reach with a given flow, whereas using lower or higher flow rates, superior values of  $H$  are reached. Other possible reason is that the slowest flow rates could have contributed to decondition the stationary phase, thus reducing its capacity to retain analytes<sup>23</sup>. Also with very low flow rates, a peak broadening was observed and attributed to the large dead volume of the system. A sample flow rate of  $1 \text{ ml min}^{-1}$  presented a better response, at least for ORL, MTX and ENA, while it reaches the same response for BEZ and CYP with  $0.8 \text{ ml min}^{-1}$ , but with the advantage of being faster with  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . A sample flow rate of  $1 \text{ mL min}^{-1}$  was used for all subsequent analysis.

#### *Percentage of organic solvent in the sample*

In order to gain better enrichment factors with the on-line SPE, the fraction of methanol added to the water samples was optimized. An organic modifier is recommended to prevent sample loss by adsorption on sample containers and tubing, since the hydrophobic effects responsible for the adsorption is reduced considerably when the water sample contains a small proportion of organic modifier<sup>22</sup>. Therefore the effect of the addition of methanol on elution was examined for the five compounds. This was done by measuring the peak areas corresponding to the on-line elution of the precolumn after preconcentration of different MQ-water samples, which contains three different percentages of methanol (1, 2.5 and 5% v/v). The results are summarized in **Figure 4.7** in Matériel Supplémentaire. With 1% of methanol, a small quantity of the compounds was adsorbed by the materials. With 2.5% of methanol, the response is better as there is no appreciable breakthrough of the compounds. We can suggest that the increase of the elution strength of the sample, due to the addition of 2.5% of methanol, was a contributor to the improved response observed. Also the addition of this amount of methanol reduced the surface tension of the sample relative to that of water, thus improving flow and sorbent penetration. Finally with 5% of methanol the response is lower than the previous case, a possible explanation is that with this amount of methanol the breakthrough volume of the compounds is inferior to 1 mL. This amount of organic present in the sample can also cause a diminution in the retention of the compounds in reverse phase

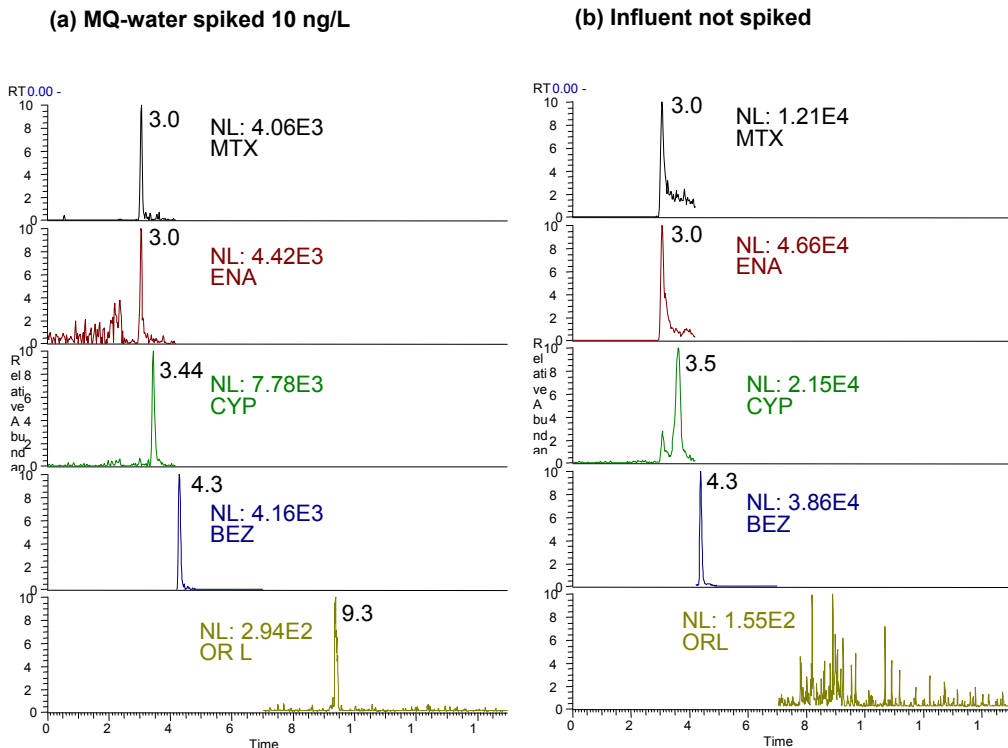


polymeric adsorbents like Strata-X. Therefore the volume of sample that can be loaded in the precolumn diminishes as the proportion of organic solvent increases in the sample,<sup>24</sup>.

### *Liquid Chromatography*

The targeted compounds were not easily separated using C18 columns, and their great difference in hydrophobicity complicates the problem. Analytes do not necessarily have to be fully separated to be identified and quantitated in LC-MS/MS, as is required using conventional detectors. However, in our case, because we need to use the switching voltage mode between positive and negative, it was necessary to have minimal separation of our analytes to properly time the switching sequence.

On-line SPE experiments were initially assayed with an analytical column and precolumn packed with a C18 phase (Hypersil Gold™ 50 x 2.1 mm 3µm and 20 x 2.1mm 12 µm); but it was unsuccessful. Cyclophosphamide and methotrexate were not sufficiently retained in the C18 phase, and also the elution and transfer of orlistat from the C18 precolumn to the C18 analytical column seemed to be unfavourable and no desorption of the compound was obtained. Finally, a Strata-X precolumn packed with a polymeric reverse phase and a C12 analytical column were assayed with good results. In these conditions, relatively narrow and symmetrical peaks were obtained for the analytes, providing the use of the switching voltage function, as can be observed in the chromatogram of the application of this method in MQ-water and influent sample (**Figure 4.8**). Some peak tailing can be observed in the raw sewage samples (**Fig. 4.8 b**). We have tried to prevent this by adding triethylamine. The results were indeed better but we had a lot of contamination of our LCMS/MS system, producing high noise levels. We have thus decided not to add modifiers to the mobile phase. Given that the double peak observed for CYP (**Fig. 4.8 b**) only occurred in the sewage sample, we attributed this to an impurity.



**Figure 4.8**-Single reaction monitoring (SRM) mass chromatograms for the target compounds in a) spiked Mili-Q water at initial concentration of 10 ng/L and b) WWTP influent not spiked, using LC-ESI( $\pm$ )-tandem MS. Details on the optimized MS/MS and chromatographic parameters are described in experimental.

### 4.3.2 Method validation

Recovery experiments were performed by spiking the target compounds in the WWTP effluent and tap water ( $n=3$ ) samples to a final concentration of 200 ng L<sup>-1</sup>. As shown in **Table 4.2**, the recoveries in tap water were satisfactory (between 99.6%  $\pm$  4 and 124.8%  $\pm$  6), which shows that the column-switching system is able to quantitatively concentrate and extract nanogram-per-liter levels of the analytes. In effluent water, the presence of interferences resulted in recoveries far from the ideal value of 100 %. Ionization of complex samples by electrospray are often impaired by matrix effects, thus complicating the quantitation<sup>25</sup>. Matrix interference effects were investigated in WWTP effluent samples and tap water; they were calculated using the absolute peak areas of the MS/MS response<sup>19</sup>. **Table 4.2**, shows that the less affected compound by matrix effects is BEZ (only 8% enhancement) most likely because it is analyzed in the negative mode which

produces less noise and higher S/N ratios than the positive mode <sup>26</sup>. For the remaining compounds analyzed in the positive mode, signal suppression or enhancement is high: for ORL matrix effects were equal to 208 %, twice the response of the analyte in wastewater compared to tap water.

**Table 4.2-**Recovery and matrix effects evaluation (%MEE), recovery was calculated using the calibration curve in milliQ water for WWTP effluent.

Analyte	Effluent		Tap water	
	%R	%MEE	%R	%MEE
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3))
Bezafibrate	131 ± 12	108 ± 9	121 ± 3	88 ± 2
Cyclophosphamide	148 ± 1	123 ± 1	120 ± 2	96 ± 1
Enalapril	59 ± 1	51 ± 0	100 ± 4	78 ± 2
Methotrexate	55 ± 0	33 ± 2	125 ± 6	98 ± 5
Orlistat	208 ± 12	145 ± 15	124 ± 11	120 ± 10

As observed, matrix effects are compound- and matrix-dependent. ENA and MTX, represent the most polar compounds and are the most affected, perhaps because they are not sufficiently away from the solvent front. Therefore, it is necessary to get a more selective analyte extraction or perform a more extensive sample cleanup prior to injection, which can reduce the amount of matrix components that are introduced in to the analytical system. Our results confirmed that it was not possible to use calibration curves in Milli-Q water for the quantitation of the target compounds in wastewater because of the complexity of the matrix. Kloepper <sup>26</sup> studied the effect of the amount of dissolved organic carbon (DOC) on matrix effects. They concluded that enhancement of bezafibrate and other acidic drugs, was due to matrix components with molecular mass below 1000 Da, which actually accounted for more than 70% of the DOC.

Because calibration curves in Milli-Q water cannot be used for quantification of the target compounds in wastewater, a different method of quantitation that can compensate for matrix effects should be used. The best option to tackle matrix effects and to quantify compounds in wastewater using calibration curves in pure water is to use isotopically-

labelled internal standards <sup>27</sup>. Because it was not possible to obtain labelled internal standards for our compounds to correct for these effects, the most adequate method of calibration was through standard additions <sup>27-29</sup>. When working with a fully-automated on-line preconcentration and detection system, standard addition is much less time consuming and laborious and becomes the most efficient way to correct for the signal distortion effects caused by matrix interferences. Therefore, the standard addition method was used for method validation and sample analysis.

Quantification criteria were assessed for the compound determination using the optimized methodology parameters. Correlation coefficients for these calibration curves varied between 0.99 and 0.97 (**Table 4.3**). The limits of detection (LOD) for the compounds in Milli-Q water, wastewater effluent and influent, and surface water were in the low nanogram-per-liter range from 10 to 59 ng L<sup>-1</sup> (**Table 4.3**). They were specific to the sample type and were in the same order of magnitude than previously published. Using LC-ESI-MS/MS, off-line SPE and 2 L of sample in the analysis of wastewater and surface water from the lower Great Lakes, Canada, reported limits of detection for bezafibrate and cyclophosphamide of 10 ng L<sup>-1</sup> in surface water samples, and 5 and 20 ng L<sup>-1</sup> in WWTP effluents <sup>30</sup>. Castiglioni <sup>12</sup> using LC-ESI-MS/MS, off-line SPE and 0.5 L of sample in the analysis of wastewater, reported limits of detection for BEZ, CP, ENA and MTX lower than 0.1 ng L<sup>-1</sup>.

Precision tests for the samples analyzed by the developed method were performed at 50 ng L<sup>-1</sup> level (**Table 4.4**). At this level, the method was found to be precise (RSD < 16%) for all the studied compounds.

**Table 4.3-**Pharmaceuticals measured in the North and South raw sewage collectors, the Montreal WWTP effluents and surface water with their corresponding calibration curve correlation coefficients ( $R^2$ ).

	south influent		north influent		effluent		River (0.5 km)	
	(ng L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	(ng L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	(ng L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	(ng L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Bezafibrate	50	0.9930	53	0.9862	35	0.9941	8	0.9971
Cyclophosphamide	9	0.9929	<LOD	0.9861	<LOD	0.9970	<LOD	0.9950
Enalapril	369	0.9704	201	0.9948	239	0.9947	63	0.9838
Methotrexate	59	0.9963	<LOD	0.9967	<LOD	0.9952	<LOD	0.9937
Orlistat	<LOD	0.9858	<LOD	0.9937	<LOD	0.9958	<LOD	0.9852

**Table 4.4-**Analytical performance of the SPE-LC-ESI(±)-MS/MS method.

Analyte	Influent			Effluent			MQ water		
	%CV	LOD	LOQ	%CV	LOD	LOQ	%CV	LOD	LOQ
	(n=7)	(ng L <sup>-1</sup> )	(ng L <sup>-1</sup> )	(n=7)	(ng L <sup>-1</sup> )	(ng L <sup>-1</sup> )	(n=7)	(ng L <sup>-1</sup> )	(ng L <sup>-1</sup> )
Bezafibrate	1.5	4	13	2.1	10	31	1.3	8	23
Cyclophosphamide	2.1	5	14	3.5	9	26	3.2	3	10
Enalapril	8.1	19	58	6.5	20	59	5.0	13	38
Methotrexate	2.9	11	32	4.0	16	47	3.7	6	19
Orlistat	2.8	12	37	4.0	12	36	16.0	15	44

### 4.3.3 Analysis of waste and surface water samples

Four of the five compounds were detected in the samples of raw sewage and WWTP effluents in concentrations ranging from 9 to 369 ng L<sup>-1</sup>, (**Table 4.3**). Bezafibrate and enalapril were the predominant pharmaceuticals observed in wastewater samples but both cyclophosphamide and methotrexate were also detected. The mean concentration of bezafibrate prior to the physico-chemical process in the WWTP was about 100 ng L<sup>-1</sup>,

which significantly decreased by 70% in the effluent, and about 65%, for enalapril (Figure 4.9). Cyclophosphamide and methotrexate were not detected in the effluent. Methotrexate at pH=7.5 (pH of the WWTP process) is in the anionic form, so maybe it was flocculated with the cationic coagulant (ferric chloride) that is added in the process or it was biodegraded during the process.

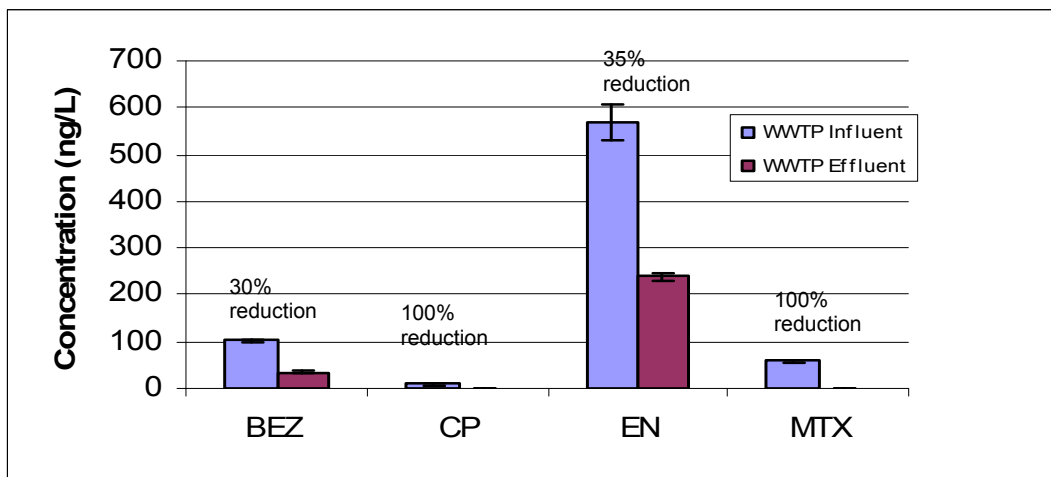


Fig. 4.9-Removal efficiency of Montreal WWTP for the four pharmaceuticals detected in its influent.

The elimination of enalapril and bezafibrate was probably not significantly promoted by the polymeric additive. Cyclophosphamide biodegradation is not a probable explanation, findings about biodegradation experiments of cytostatic compounds in surface water, including cyclophosphamide and methotrexate reported that cyclophosphamide is not biodegradable, and biodegradation process of methotrexate is combined with the generation of the toxic and persistent degradation product 7-hydroxi-methotrexate<sup>31</sup>. We detected and measured bezafibrate and cyclophosphamide in the same range of concentration as observed in the municipal effluents of other Canadian cities<sup>32, 33</sup>. Andreozzi<sup>8</sup>, reported concentrations of 1.07 µg/L in France and 0.91 µg/L in Italy; in a study monitoring seven WWTP effluents carried out in four European countries (Italy, France, Greece and Sweden). Orlistat is lipophilic and a large proportion of the compound probably partitions onto the suspended organic material and eventually ends

up in the sewage sludge. More research is necessary to study its presence in sewage sludge. But for the Montreal WWTP, the sludges are incinerated and thus the pharmaceuticals retained with the solids no longer represent an environmental issue.

In addition to establishing the presence of the target compounds in effluent-receiving waters from the St. Lawrence River, we also assessed the spatial distribution of the compounds. Enalapril and bezafibrate were only detected at concentration of 63 and 8 ng L<sup>-1</sup> (**Table 4.4**) in samples collected at a site immediately adjacent to the Montreal WWTP discharge in the St. Lawrence (site 2 500 meters downstream). The limits of detection were between 7 and 21 ng L<sup>-1</sup>. We did not detect any of those compounds further away from the wastewater effluent discharge, suggesting that the high flows of the St. Lawrence River quickly diluted the drugs to concentrations near or below detection limits. In a survey of eight sampling stations close to the inputs of wastewater from cities along the Rivers Po and Lambro in Northern Italy <sup>14</sup>, at all of the sites, bezafibrate was measured at concentration between 0.79 and 57 ng L<sup>-1</sup>, at 50% of the sites enalapril was measured with concentrations between 0.05 and 0.54 ng L<sup>-1</sup>, and cyclophosphamide was not detected in any site.

Large-scale dilution is the most likely explanation for the large reduction of our target compounds concentration observed in St. Lawrence River surface water relative to WWTP effluent. In the Ebro River basin (Northeast Spain) and in Finland, concentrations for bezafibrate in surface waters were at least one order of magnitude lower than in the effluent assessed in a series of treatment plants, the concentrations decreased significantly mainly due to dilution in the river <sup>9, 10</sup>. Also River dilution effect was suggested to account for 92 to 100% of bezafibrate and cyclophosphamide reduction at the Little River/Detroit River confluence near the City of Windsor (ON, Canada) <sup>7</sup>. We also attribute part of the decrease in the concentration of bezafibrate in the St. Lawrence River waters to the absorption of the molecules to suspended organic particles. This is possible for bezafibrate having a log K<sub>ow</sub> = 4.3, but for the other compounds, it is not a possible explanation (log K<sub>ow</sub> < 1).

For pharmaceuticals usually designed to be resistant to hydrolysis, it would suggest that the primary pathway for their abiotic transformations in surface waters is the direct and indirect photolysis as a primary degradation<sup>8</sup>. Photodegradation of enalapril in surface waters can also help explaining part of the observed decrease (> 80%). Perez<sup>34</sup> emphasized the potential of sunlight for breaking down enalapril in the environment. A study in reconstructed freshwater, demonstrated that after 40 h of irradiation more than 90% of enalapril had disappeared. For bezafibrate, its low concentrations in surface water are mostly due to dilution. The photochemical behaviour of a series of fibrate drugs in aqueous media have been previously reported<sup>35</sup>, results indicated that only 10% of bezafibrate was photodegraded after 200 hr of irradiation using a solar simulator.

#### **4.4 Conclusion**

Pharmaceutical compounds are emerging contaminants and it is necessary to develop rapid methods for monitoring their release and occurrence in the environment. The developed procedure has shown that on-line SPE-LC-ESI(±)-MS/MS proved to be a sensitive and selective method for the automated determination of trace amounts of those pharmaceuticals in aqueous environmental samples. The developed procedure allows the simultaneous determination of five pharmaceutical compounds with different functionalities and physicochemical properties in raw sewage and WWTP effluent and surface water, using only 1.0 ml of sample and a total analysis time of 15 min. Bezafibrate and enalapril were detected in the WSTP effluent. Our data confirm that the physico-chemical treatment based on flocculation processes provides low removal efficiency and these wastewater effluents are likely a significant source for the release of these compounds into the environment. Enalapril and bezafibrate were detected in the surface water at a site immediately adjacent to the Montreal WWTP discharge. Extensive dilution appears to explain the decrease of the compounds concentrations found in the WSTP effluent versus St. Lawrence River surface waters.

With this method, we can thus propose a rapid method with minimized operator interventions and using simplified conditions for the on-line SPE-LC-MS/MS analysis of those compounds and well suited for routine screening or environmental monitoring.



## 4.5 Références

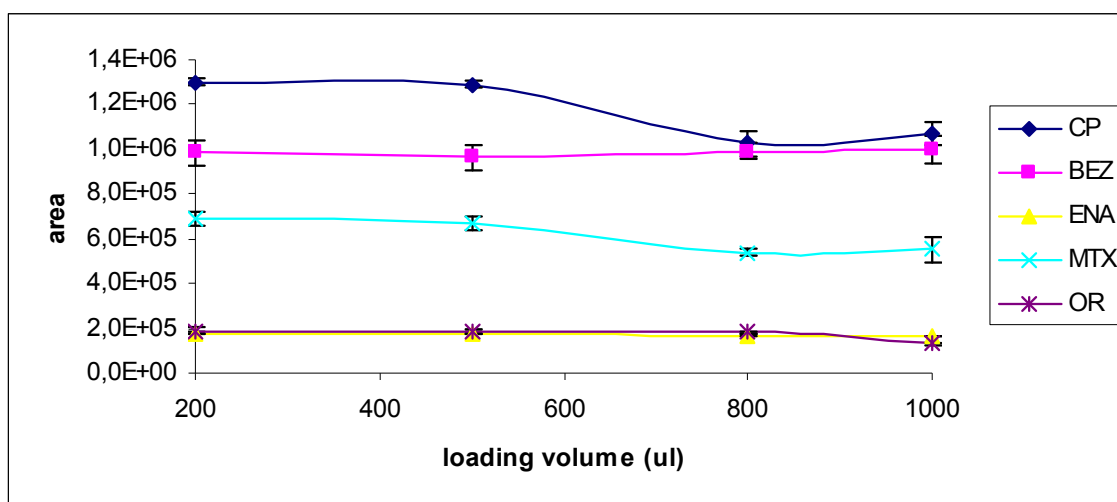
- (1) IMS In IMS World Review, 2006.
- (2) Laboratories Roche *Bezalip (bezafibrate) Product Monograph Hoffmann-La Roche 2002* **2002**.
- (3) Balis, F. M.; Holcenberg, J. S.; Poplack, D. G.; Ge, J.; Sather, H. N.; Murphy, R. F.; Ames, M. M.; Waskerwitz, M. J.; Tubergen, D. G.; Zimm, S.; Gilchrist, G. S.; Bleyer, W. A. *Blood* **1998**, *92*, 3569-3577.
- (4) Abshagen, U.; Bablok, W.; Koch, K.; Lang, P. D.; Schmidt, H. A.; Senn, M.; Stork, H. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1979**, *16*, 31-38.
- (5) Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R.; Pomati, F.; Calamari, D.; Zuccato, E. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*, 357-363.
- (6) Clara, M.; Strenn, B.; Gans, O.; Martinez, E.; Kreuzinger, N.; Kroiss, H. *Water Research* **2005**, *39*, 4797-4807.
- (7) Hua, W. Y.; Bennett, E. R.; Maio, X. S.; Metcalfe, C. D.; Letcher, R. J. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25*, 2356-2365.
- (8) Andreozzi, R.; Raffaele, M.; Nicklas, P. *Chemosphere* **2003**, *50*, 1319-1330.
- (9) Gros, M.; Petrovic, M.; Barcelo, D. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2007**, *26*, 1553-1562.
- (10) Lindqvist, N.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. *Water Research* **2005**, *39*, 2219-2228.
- (11) Quintana, J. B.; Reemtsma, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 765-774.
- (12) Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Calamari, D.; Fanelli, R.; Zuccato, E. *J. Chromatogr. A.* **2005**, *1092*, 206-215.
- (13) Siemens, J.; Huschek, G.; Siebe, C.; Kaupenjohann, M. *Water Research* **2008**, *42*, 2124-2134.
- (14) Calamari, D.; Zuccato, E.; Castiglioni, S.; Bagnati, R.; Fanelli, R. *Environmental Science and Technology* **2003**, *37*, 1241-1248.
- (15) Bennett, P. K.; Li, Y. T.; Edom, R.; Henion, J. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 739-749.
- (16) de Alda, M. J. L.; Barcelo, D. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *911*, 203-210.
- (17) Bones, J.; Thomas, K.; Nesterenko, P. N.; Paull, B. *Talanta* **2006**, *70*, 1117-1128.
- (18) Hernandez, F.; Sancho, J. V.; Pozo, O.; Lara, A.; Pitarch, E. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *939*, 1-11.
- (19) Salvador, A.; Moretton, C.; Píram, A.; Faure, R. *J. Chromatogr. A.* **2007**, *1145*, 102-109.
- (20) Lagana, A.; Bacaloni, A.; Fago, G.; Marino, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 401-407.
- (21) ICH; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005.
- (22) Simpson, N. J. K. In *Solid-Phase Extraction Principles, Techniques, and Applications*, 10th ed.; Simpson, N. J. K., Ed.; Marcel Dekker: New York, NY, 2000, pp 411-436.
- (23) Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauve, S. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *604*, 147-157.
- (24) Nakamura, M.; Nakamura, M.; Yamada, S. *Analyst* **1996**, *121*, 469-475.

- (25) Matuszewski, B. K.; Constanzer, M. L.; Chavez-Eng, C. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 882-889.
- (26) Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1067*, 153-160.
- (27) Stuber, M.; Reemtsma, T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 910-916.
- (28) Niessen, W. M. A. *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*, third ed.; Taylor & Francis: Leiden, Netherlands, 2006.
- (29) Reemtsma, T. *Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 533-542.
- (30) Metcalfe, C. D.; Miao, X. S.; Koenig, B. G.; Struger, J. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2003**, *22*, 2881-2889.
- (31) Kiffmeyer, T.; Gotze, H. J.; Jursch, M.; Luders, U. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1998**, *361*, 185-191.
- (32) Metcalfe, C. D.; Koenig, B. G.; Bennie, D. T.; Servos, M.; Ternes, T. A.; Hirsch, R. *Environ. Toxicol. Chem.* **2003**, *22*, 2872-2880.
- (33) Miao, X. S.; Koenig, B. G.; Metcalfe, C. D. *J. Chromatogr. A* **2002**, *952*, 139-147.
- (34) Perez, S.; Eichhorn, P.; Barcelo, D. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 8293-8300.
- (35) Cermola, M.; DellaGreca, M.; Iesce, M. R.; Previtera, L.; Rubino, M.; Temussi, F.; Brigante, M. *Environmental Chemistry Letters* **2005**, *3*, 43-47.

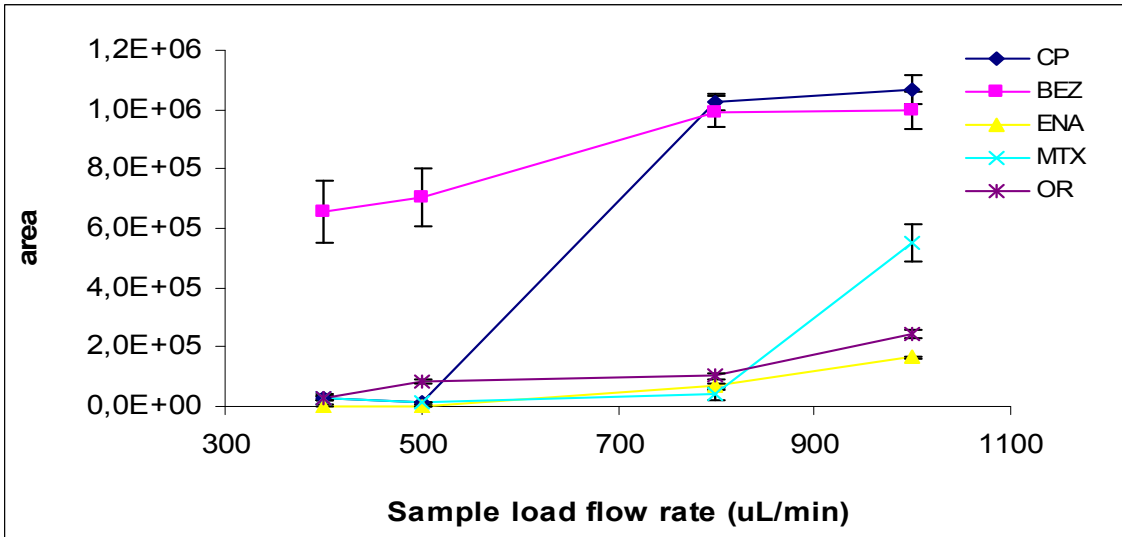
## **Matériel supplémentaire**

**Tableau 4.1**-Timetable for the on-line pre-concentration and analysis of the target compounds in wastewater samples.

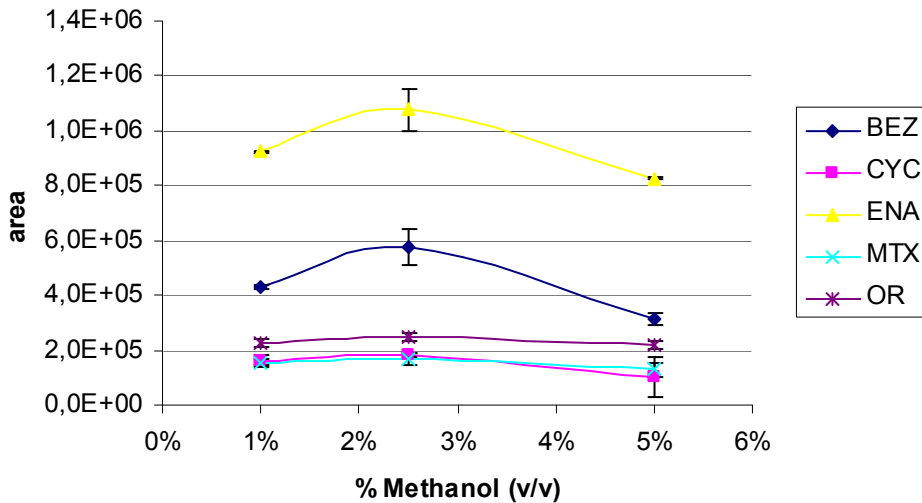
Time (min)	Pump 1	Pump 2	PC
0- 1.40	load precolumn conditioning solution 1 mL/min	analytical column conditioning initial gradient 0.2 mL/min	wait
1.41-12.0	wait	gradient 0.2 mL/min	Data acquisition
12.1-14.0	precolum cleaning 1 mL/min acn/meoh	analytical column conditioning initial gradient 0.2 mL/min	
14.1-15.0	precolum conditioning conditioning solution 1 mL/min	analytical column conditioning initial gradient 0.2 mL/min	



**Figure 4.5**-Experimental variations of peak area and loading volume with Milli-Q purified water samples having a constant amount of 0.1 ng of the pharmaceuticals (n=3). Loading column Strata-X, analytical column sinergi C12 (75 x 2.4 mm), flow rate 1 mL/min; mobile phase, acetonitrile gradient with acidified water pH 2.9 with acetic acid.



**Figure 4.6**-Effect of sample load flow rate on analysis response area with Milli-Q purified water samples having a constant amount of 0.1 ng of the pharmaceuticals (n=3). Loading column Strata-X, analytical column sinergi C12 (75 x 2.4 mm), flow rate 1 mL/min; mobile phase, acetonitrile gradient with acidified water pH 2.9 with acetic acid.



**Figure 4.7**-Effect of addition of methanol to water samples (1, 2.5 and 5% v/v) on analysis response area with Milli-Q purified water samples having a constant amount of 0.1 ng of the pharmaceuticals (n=3).

---

---

## **CHAPITRE 5: SPE d'injection de grands volumes couplée à la LC-MS/MS pour la quantification et la confirmation de 14 contaminants organiques au niveau de trace dans l'eau potable et de surface**

---

---

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

Araceli Garcia-Ac<sup>a</sup>, Pedro A. Segura<sup>a</sup>, Liza Viglino<sup>a</sup>, Alexandra Fürtös<sup>a</sup>, Christian Gagnon<sup>b</sup>,  
Michèle Prévost<sup>c</sup>, Sébastien Sauvé<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Université de Montréal, C.P. 6128, succ. Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

<sup>b</sup> Science & Technology Branch, Environment Canada, 105 McGill St., 7th floor, Montreal, QC H2Y 2E7, Canada

<sup>c</sup> École Polytechnique, C.P. 6079, succ. Centre-Ville, Montreal, QC H3C 3A7, Canada

Publié dans Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 8518–8527

## Abstract

We describe the development and validation of an on-line solid-phase extraction of large-volume injections coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitation and confirmation of 14 selected trace organic contaminants in drinking and surface water. Selected compounds were: anti-infectives (clarithromycin, sulfamethoxazole and trimethoprim), an anticonvulsant (carbamazepine) and its transformation product 10,11-dihydrocarbamazepine, an antihypertensive (enalapril), antineoplastics (cyclophosphamide and methotrexate), herbicides (atrazine, cyanazine, and simazine) and two of their transformation products (deethylatrazine and deisopropylatrazine) and an antiseptic (triclocarban). The breakthrough volume determinations showed that out of all the investigated sorbents, the Strata-X on-line solid-phase extraction column showed the best performance. The method used a load volume of 10.0 mL and was validated using the corresponding matrices, yielding for most compounds,  $R^2 > 0.99$ . Extraction recoveries ranged from 60 to 109% . The intra- and inter-day precision were  $< 14\%$  and  $< 16\%$ , respectively. The method detection limits ranged from 0.6 to 6 ng L<sup>-1</sup>. Matrix effects were in general low. The performance of the on-line method was demonstrated with the analysis of real water samples. The application of alternative techniques of confirmation was also explored using accurate mass measurements on a time-of-flight mass spectrometer and the data-dependent reverse energy ramp scan on a triple quadrupole.

## 5.1 Introduction

Numerous studies have reported the presence of traces (nanogram to micrograms-per-liter) of organic contaminants such as pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and pesticides in drinking and surface waters in many countries<sup>1-4</sup>. Pesticides are ubiquitous in today's agriculture and given their persistence and transport they appear in the aquatic environment. PPCPs are constantly released from urban centers into surface waters via wastewater treatment plants. Major concerns about the presence of organic contaminants in the environment are endocrine disruption (e.g. pharmaceuticals, personal care products, pesticides), genotoxicity (e.g. antineoplastics) and possible contribution to the spread of antibiotic resistance in bacteria as well as their toxicity to sensitive non-target species (anti-infectives)<sup>5, 6</sup>. Therefore these substances could have a significant impact on the natural environment, especially to the aquatic ecosystems where they are being released. Human exposure to trace organic contaminants, via drinking water consumption is also of potential concern due to possible long-term effects from chronic exposure at low concentrations<sup>7</sup>.

In this context, sensitive analytical methods capable of detecting traces in the low nanogram-per-liter range are essential for the monitoring of organic contaminants in the aquatic environment. In addition, high selectivity is required in order to avoid interference by matrix components. In order to avoid false positives, confirmation techniques using identification points have been implemented<sup>8</sup> or proposed<sup>9</sup>. However, these techniques are often hindered by the low concentrations found in the environment. Analyte confirmation is usually performed using a second selective reaction monitoring transition (SRM) and ion ratios, nonetheless is not always possible to obtain a strong signal for secondary SRM transitions, which in turn limits the quantitation process as the presence of the detected compound cannot be confirmed. Environmental applications of time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) to trace contaminants have been previously reported<sup>9-11</sup>, but its successful use for confirmatory purposes has been hampered by low sensitivity. Recently, novel approaches such as data-dependent scans have also been described<sup>12</sup>.

Achieving quantification of minute analyte amounts is one of the main challenges in environmental trace analysis. Usually samples must be preconcentrated before analysis with an enrichment step such as



solid-phase extraction (SPE) in order to allow trace detection in relatively clean surface waters. To date, most of the published multi-residue methods for the determination of ultra traces of organic compounds in surface and drinking water use off-line SPE followed gas by chromatography mass spectrometry (GC-MS) or by liquid-chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)<sup>13, 14</sup>. However, off-line SPE can be a lengthy sample preparation step, especially when large volumes of sample are preconcentrated and does not seem adequate for the analysis of numerous samples for monitoring programs.

Automation of SPE, by coupling it on-line to the LC system using a column-switching technique, is an alternative approach that is faster and more precise since the evaporation and reconstitution steps are eliminated and sample handling errors are reduced. Nowadays, a large number of on-line SPE column materials (e.g., alkyl-bonded silica, polymers, and porous graphitic carbon) are available, covering a wide range of selectivity and thus a large variety of applications<sup>15</sup>. Although automated on-line preconcentration methods have some clear advantages over off-line SPE<sup>16</sup>, they are often inadequate for surface and drinking water trace analysis due to their low preconcentration factor which results in relatively higher method detection limits (MDLs). To improve the MDLs of on-line SPE, it is possible to increase the preconcentration volume. Nevertheless, this would only be achievable if the analytes do not break through the SPE column. The potential for analyte breakthrough is significantly higher with polar compounds that are more difficult to retain on the SPE column.

The first objective of this paper is to describe a fully automated on-line SPE-LC-MS/MS setup that allows the analysis of different groups of organic contaminants at trace levels in surface and drinking waters. To date, several on-line SPE methods of trace determination of organic contaminants have been published<sup>17-20</sup>, however they are often limited to single class of compounds or not sensitive enough for drinking water analysis<sup>21</sup>. Our goal was to improve the MDL of previously published on-line preconcentration methods<sup>22-24</sup> by loading a higher sample volume (10 mL) in the SPE column. To ensure that the analytes are well retained by the SPE column, we estimated the breakthrough volumes of 17 target compounds for several on-line SPE columns made of different sorbent materials. Target compounds were chosen because of their high use, toxicity and previous detection in wastewaters and surface waters<sup>22-25</sup>. The column having the highest retention capacity was chosen for method

development and validation using real samples. The analytical method was then applied for a field study of PPCPs and pesticides in drinking and surface waters in the region of Montreal, Canada. Our second objective is to evaluate the potential of two alternative approaches of confirmation of the presence of trace contaminants: data-dependent reversed energy ramp (RER) scan in a triple quadrupole and accurate mass measurement using time-of-flight mass spectrometry (TOFMS).

## 5.2 Experimental methods

### 5.2.1 Reagents and solutions

Standards of atrazine (ATZ), azithromycin (AZI), caffeine (CAF), carbamazepine (CBZ), ciprofloxacin (CIP), clarithromycin (CLA), cyanazine (CYA), cyclophosphamide (CYP), deethylatrazine (DEA) [transformation product of atrazine and simazine], deisopropylatrazine (DIA) [transformation product of atrazine], 10,11-dihydrocarbamazepine (DHC) [transformation product of carbamazepine], levofloxacin (LEV), methotrexate (MTX), simazine (SIM), sulfamethoxazole (SMX), triclocarban (TCC) and trimethoprim (TRI), were obtained from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Enalapril (ENA) was kindly supplied as a formulation by a local pharmacy. The internal standard (IS) [ $^{13}\text{C}_3$ ]-atrazine was supplied by ACP Chemical Inc. (Montreal, QC, Canada) with certified purity  $\geq 99\%$ . Formic acid (F.A.) 98% pure and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Sigma-Aldrich Canada. LC-MS grade methanol (MeOH), acetonitrile (ACN),  $\text{H}_2\text{O}$  and 0.1% F.A. in  $\text{H}_2\text{O}$  were purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ). ACS grade chloroform (CLF) was supplied by Fisher Scientific (Mississauga, ON).

A working solution of 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  of the IS was prepared by dissolving 100  $\mu\text{L}$  of [ $^{13}\text{C}_3$ ]-ATZ in 1 mL of MeOH. Stock solutions of 400  $\text{mg L}^{-1}$  of each compound were prepared by dissolving the appropriate amount of each substance in MeOH except for CIP and LEV which were dissolved in 0.1 M NaOH /MeOH 5/95 (v/v) and 1% formic acid in  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH 3 : 7 for MTX. All stock solutions were conserved at  $-25^\circ\text{C}$  and used for no longer than 3 months.

## 5.2.2 Instrumentation

Three different experimental setups were used during method development and sample analysis.

### *Small injection setup*

For the estimation of breakthrough volumes, we used a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) made by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). It consists of a LC Surveyor system (Surveyor autosampler and Surveyor MS quaternary pump) coupled with an electrospray ionization (ESI) source and a Quantum Ultra triple quadrupole mass spectrometer. Information on the on-line SPE columns tested is given in **Table 6.1** (Matériel supplémentaire).

### *On-line SPE setup*

For the analysis of drinking and surface water, the Environmental Quantification (EQuan™) system manufactured by Thermo Fisher Scientific was used. This system is based on a column-switching technique<sup>22-24</sup>. It consists in a sample delivery system, a switching column array and a LC-MS/MS system. The sample delivery system consists in an HTC Pal autosampler manufactured by CTC analytics AG (Zwingen, Switzerland) and a quaternary load pump (Thermo Scientific Surveyor LC Pump Plus). The switching-column array is composed of the Rheodyne 7750E six-port switching valve made by IDEX (Oak Arbor, WA), a SPE on-line column and an analytical column. The analytical column used was a Synergi Fusion RP column (50 × 2 mm, 4 μm particle size) from Phenomenex (Torrance, CA).

### *LC-TOFMS setup*

For accurate mass measurements, a 6210 Time-of-Flight (TOF) mass spectrometer coupled to an 1100 Series liquid chromatography system manufactured by Agilent (Santa Clara, CA) was used. The columns used were the same as described in section 6.2.1.

## 5.2.3 Sample collection and preparation

### **Drinking water and surface samples**

All water samples were collected in clean glass bottles and then immediately transported to the laboratory, stored in the dark at 4 °C and analyzed within 24 h. Drinking water samples were collected

directly from residential tap water in three Montréal boroughs, and did not need any further preparation. Surface water samples were collected at three sampling sites located around the Island of Montreal: the St. Lawrence River, the One Thousand Islands River and the Des Prairies River. The Thousand Island River and St. Lawrence River, two sources of drinking water for the region of Montreal, were selected due to the documented discharges of urban and agricultural wastes <sup>23</sup>. Surface water samples were vacuum-filtered through 0.7- $\mu\text{m}$  pore size fiber glass filters followed by 0.45- $\mu\text{m}$  pore size cellulose ester membranes (Millipore - Billerica, MA), to remove suspended particles. A previous study showed that this filtration step did not cause analyte losses <sup>24</sup>.

Aliquots of 100 mL of the drinking and surface water samples were transferred to volumetric glass flasks, acidified with 100  $\mu\text{L}$  of F.A. and spiked with the IS for a final concentration of 200  $\text{ng L}^{-1}$ . The samples were then transferred to 20-mL amber glass vials for on-line SPE-LC-MS/MS analysis.

#### 5.2.4 Breakthrough volume estimation

The breakthrough volume is defined as the maximum sample volume that can be loaded in a sorbent without significant analyte losses. Breakthrough volume estimation experiments were done on the small injection setup using the graphical extrapolation method <sup>26</sup>. In order to keep dead volume of the system to a minimum, we used short PEEK tubings with narrow I.D. (127  $\mu\text{m}$ ) to make the connections.. Tests were done by injecting 10  $\mu\text{L}$  of a 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  standard mix solution on a on-line SPE column and then eluting with different isocratic mobile phase compositions using solvent A [0.1% F.A. in  $\text{H}_2\text{O}$  (v/v)] and solvent B [0.1% F.A. in MeOH (v/v)]. Five isocratic mobile phase compositions (between 25 and 97% of B, depending on the compound) were tested in triplicate for each column. The variation of the retention time of each analyte as a function of the percentage of MeOH in the mobile phase was used to estimate the breakthrough volume. First we measured the void volume ( $V_m$ ) by pycnometry <sup>27</sup>:

$$V_m = \left( \frac{W_{CLF} - W_{ACN}}{\rho_{CLF} - \rho_{ACN}} \right) \quad (5-1)$$

where  $W_{CLF}$  and  $W_{ACN}$  are the weight of the column filled with CLF and ACN respectively, and  $\rho_{CLF}$  and  $\rho_{ACN}$  the densities of the solvents at 20  $^{\circ}\text{C}$ . The dead time of the column ( $t_m$ ) was then calculated by dividing  $V_m$  by the flow rate (200  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). Next, we calculated the capacity (or retention) factor ( $k'$ ) of

each analyte at a given mobile phase composition. We used a quadratic regression to fit the logarithm of  $k'$  as a function of the volume fraction of MeOH ( $\phi$ ) in the mobile phase<sup>28</sup>:

$$\log k' = \log k'_w - a\phi + b\phi^2 \quad (5-2)$$

where the y-intercept of the quadratic regression,  $\log k'_w$ , is the logarithm of the capacity factor of the analyte when the mobile phase is 100% aqueous. This value is used to calculate the estimated breakthrough volume ( $V'_b$ ) according to:

$$V'_b = V_m(k'_w + 1) \quad (5-3)$$

### 5.2.5 On-line SPE and LC parameters

The HTC Pal autosampler allows the injection of large sample volumes using a 5.0-mL dispenser syringe. We used three consecutive 4-mL injections to fill the 10-mL loop of the autosampler. During method development we observed that method precision was improved by injecting a sample volume larger than the maximum capacity of the loop. This reduces the sample dilution effect inside the loop during the injection process. The injection of a volume of 12 mL was sufficient to minimize this effect and to obtain an acceptable precision. The syringe was filled at flow rate of  $75 \mu\text{L s}^{-1}$  and the injections were performed at the same flow rate. The sample was then introduced into the on-line SPE column using a 0.1% F.A. in  $\text{H}_2\text{O}$  (v/v) solution delivered by the load pump at a flow rate of  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ .

After the sample was loaded, the divert valve of the column-switching array was actuated (8.5 min) and the on-line SPE column was back-flushed with the LC mobile phase [solvent A: 0.1% F.A. in  $\text{H}_2\text{O}$  (v/v), solvent B: 0.1% F.A. in MeOH (v/v) and solvent C: 0.1% F.A. in ACN (v/v)] delivered by the analytical pump (details on the load and analytical pumps program are shown in the Matériel Supplémentaire, **Table 5.2**). The LC gradient allows the transfer of the retained components of the sample from the on-line SPE to the analytical column where the analyte separation takes place. All the on-line operations are fully automated for routine analysis with a total run time of  $\sim 30$  min (26.5 min for the chromatographic run and  $\sim 3.5$  min for sample injection). To avoid sample cross-contamination, the syringe, the injection port and the injection valve were washed with 5 mL of  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$  50/50 (v/v) before each injection.

For LC-TOF-MS, we employed a similar LC method (see Matériel Supplémentaire, **Table 5.3**). In order to perform accurate mass measurements on the preconcentrated samples, a two step procedure was used. In the first step, the on-line SPE column was using the on-line setup. In the second step, both, the SPE column and the analytical columns were then removed and connected to the LC-TOFMS setup for desorption and separation.

### 5.2.6 Mass spectrometry parameters

Electrospray ionization (ESI) was performed on the positive mode using a spray voltage of 4.5 kV. The sheath gas (N<sub>2</sub>) was set to 30 arbitrary units and the auxiliary gas (N<sub>2</sub>) to 5 arbitrary units. Ion transfer capillary temperature was set to 350 °C. The tandem mass spectrometer was operated in selected reaction monitoring (SRM) mode at unit resolution (full width at half maximum = 0.7 u). In order to select precursor ions for each analyte, chromatograms were initially recorded in full scan mode. In all cases, the pseudo-molecular [M+H]<sup>+</sup> ion was selected. Once precursors were selected, full product ion scans were recorded, and collision energies were optimized to get the maximum intensity of the fragment ions obtained. The pressure of the collision gas (Ar) in the collision cell was set to 1.5 mTorr. The most intense SRM transition (SRM#1) was selected for quantitation and the second most intense (SRM#2) was used for confirmation. SRM transitions, collision energy and skimmer offset were compound-dependent and appear in **Table 5.4** (Matériel Supplémentaire).

The reverse energy ramp (RER) scan allows a linear increase of the collision energy as a function of the decreasing *m/z* values scanned on the third quadrupole. RER scan energy parameters are compound-dependent, but generally collision energy was set to a low value (5-15 V) and the energy ramp to a higher value (30-40 V). This allows the acquisition of rich full product ion spectra as abundant high and low *m/z* products ions are generated by the increasing collision energy<sup>29</sup>. This data-dependent scan was triggered when the SRM signal was > 10<sup>4</sup> counts.

The TOFMS acquisition range was 105-1000 m/z with a scan rate of 1.03 scans s<sup>-1</sup>. ESI source gas (N<sub>2</sub>) temperature was set to 350 °C, flow to 12 L min<sup>-1</sup> and nebulizer gas pressure to 30 psi. Capillary voltage was set to 3.5 kV, fragmentor to 175 V and skimmer to 65 V.

### 5.2.7 Method validation

#### *Drinking water*

Internal calibration was used for the quantitation of drinking water samples. Calibration solutions of the target compounds were prepared in 0.1% F.A. in H<sub>2</sub>O (v/v) by dilution of a mixed working solution (100 µg L<sup>-1</sup>) at the following concentrations: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 250 ng L<sup>-1</sup>. The IS was added to every solution for a final concentration of 200 ng L<sup>-1</sup>. <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-atrazine was chosen as IS because it gave a strong and stable signal in ESI(+), which helped to reduce method variability and to compensate for losses in the system.

Extraction recovery of target compounds in the on-line system was determined by applying a previously published method<sup>30</sup>. Briefly, analyte peak areas resulting from 4 replicate 10-mL injections of 0.1% F.A. in H<sub>2</sub>O (v/v) spiked at 20 ng L<sup>-1</sup> level were compared to those obtained by 4 replicate 500-µL injections of spiked 0.1% F.A. in H<sub>2</sub>O (v/v) with a concentration 20 times higher (400 ng L<sup>-1</sup>). Precision was determined using spiked solutions of 0.1% F.A. in H<sub>2</sub>O (v/v) at the 5 ng L<sup>-1</sup> level injected four times each during the sequence run (intra-day precision) or four times on three different days (inter-day precision). MDLs were calculated as the standard deviation of the calculated concentration (using SRM #1) of seven replicate measurements of a low concentration solution, multiplied by the Student's *t* value for a one-tailed test at the 99% confidence level and *n*-1 degrees of freedom<sup>31</sup>. MDL is defined as the “minimum concentration of a substance that can be identified, measured and reported with 99% confidence that the analyte concentration is greater than zero”<sup>31</sup>. The MDLs of the SRM #2 were calculated the same way and will be called method confirmation limits (MCL) hereafter. The concentration of the solution was 5 or 10 ng L<sup>-1</sup> depending on the analyte. To ensure that the concentration used to determine the MDL and the MCL was appropriate, the ratio of the average of seven replicate measurements and the measured MDL or MCL should be higher than 4 and lower than 10<sup>32</sup>. Additionally, ion ratios (relative intensity of SRM#2 vs. SRM#1) of each compound detected in the samples were calculated and compared to ion ratios in pure standards. In order to confirm the

presence of an analyte in the samples, ion ratio differences between the former and the later had to be lower than maximum tolerance levels according to European Union Commission Decision 2002/657/EC<sup>8</sup>. Blanks subjected to the entire preparation and analysis procedure (method blanks) were used to correct for sample contamination.

### *Surface Water*

The method of standard additions was used for quantitation of the surface water samples and also an IS (<sup>13</sup>C<sub>3</sub>-atrazine) was added to all samples. Standard additions was necessary to compensate for the presence of matrix effects affecting the ESI process usually observed when analyzing environmental samples, while the IS contributed to improve method precision. Eight calibration solutions were prepared per sample: five spiked solutions (10, 25, 50, 75 and 100 ng L<sup>-1</sup>) and three unspiked. The amounts spiked were chosen to represent the average analyte concentration we expected to find in the surface samples according previous studies<sup>22-24</sup>. Consequently, it is important to adjust the amounts spiked on each sample depending on the sites studied. The IS (200 ng L<sup>-1</sup>) and F.A. (0.1%, v/v) were added to all solutions. Extraction recovery was measured the same way as for drinking water, except that the matrix used was surface water acidified with F.A. (0.1%, v/v). Intra- and inter-day precision and MDL were determined using the same method as for drinking water but surface river water was spiked at the 25 ng L<sup>-1</sup> level. Matrix effects were determined with the same extraction processes in surface water samples and were calculated according to the following equation:

$$\text{Matrix effects (\%)} = \left( \frac{SW_S - SW_{NS}}{W} \right) \times 100\% \quad (5-4)$$

where  $SW_S$  is the analyte peak are in spiked surface water,  $SW_{NS}$  the analyte peak are in the non-spiked surface water and ( $W$ ) the analyte peak area of a known amount spiked in 0.1% F.A. in H<sub>2</sub>O (v/v). A value of 100% indicates that there is no absolute matrix effect. Signal enhancement is indicated by matrix effects values > 100% and signal suppression by values is < 100%<sup>18</sup>.



## 5.3 Results and Discussion

### 5.3.1 Breakthrough volume estimation

The compounds studied in this work represent a wide range of octanol–water distribution coefficients and water solubilities. Furthermore, some of them are ionic depending on the pH and others are neutral (for details on the physico-chemical properties of the target compounds consult <sup>22-24</sup> and references therein). Therefore, we used the graphical extrapolation method for the estimation of breakthrough volumes ( $V_b'$ ) in order to find the on-line SPE column best fitted for the preconcentration of large sample volumes of analytes having such different physico-chemical properties. This approach has been used previously for the determination of the breakthrough volume of various pesticides <sup>30</sup> and chlorophenols <sup>33</sup>.

It is widely accepted that a quadratic equation can be used to describe the retention as a function of binary mobile phase mixtures observed in reversed-phase liquid chromatography (RPLC) systems <sup>34</sup>. The terms  $a$  and  $b$  of equation (2) depend on the size and polarity of the solute as well as the temperature <sup>28</sup>. However, according to Jandera and Kubát <sup>35</sup> the quality of the prediction is affected by the range of  $\phi$  values chosen, and the closer these values are to 0% organic modifier, the better. In practice this is not always possible and therefore accuracy may fall within an order of magnitude. For some strongly retained compounds such as CBZ, CLA and CYP it was not possible to use  $\phi < 50\%$  MeOH because of the intense peak broadening which made the identification of the peaks difficult. For these compounds, the error on the estimation of  $k'_w$  is expected to be higher than for the early eluting compounds (DIA, MTX and TRI) for which we could use  $\phi$  as low as 25%. Also this method fails to accurately determine  $k'_w$  because of the presence of preferential sorption of the organic solvent on the apolar surface of the sorbent <sup>35</sup>. Therefore we used the results shown on **Table 5.5** only as a comparative estimate that allowed us to choose the best on-line SPE column. The results obtained by this method must be interpreted with caution as large errors do not imply that a given column is not appropriate for the preconcentration of large volumes. They rather reflect the limitation of this method to predict the breakthrough volumes of strongly retained compounds.

In spite of the shortcomings and errors associated with this method, it proved useful to evaluate the on-line SPE column best suited for the preconcentration of a large array of heterogeneous organic contaminants. The results in **Table 5.5** indicate that the Strata-X column is the best candidate for the preconcentration of large sample volumes given that in most cases, the  $V_b'$  are all higher than 10 mL, even considering the estimation errors. The large error observed for many of the studied compounds on the Strata-X also suggests that the retention in this column was stronger as the  $\phi$  values used for the quadratic regression were larger compared to other columns. We paid particular attention to early eluting compounds in RPLC systems such as DIA, MTX and TRI. The common assumption that more polar columns such as C<sub>8</sub> will retain better more polar compounds could not be applied to all the target compounds, as the  $V_b'$  of the DIA, MTX and TRI in the Strata C<sub>8</sub> column was lower or similar than the  $V_b'$  of the Strata C<sub>18</sub> or Hypersil Gold columns. Our results are similar to those obtained in a previous study of breakthrough volume of nitrogen-containing pesticides, which showed that polymeric phases show higher breakthrough volume than silica-based phases<sup>36</sup>.

The hydrophobic and electrostatic interactions that occur between compounds and the polarizable surface of graphite on the Hypercarb column<sup>26</sup> may explain why some compounds were not desorbed, as strong interactions are more difficult to break. Also planar molecules show increased retention because of stronger interactions with graphite surface<sup>37</sup>. The  $V_b'$  volumes of DEA and DIA obtained with the Hypercarb on-line SPE column were high (580 mL  $\pm$  14% and 1000 mL  $\pm$  13%, respectively) which agrees with the results obtained by Barceló and Hennion<sup>38</sup> which found breakthrough volumes higher than 100 mL for these compounds.

The validity of the results obtained for  $V_b'$  by the graphical extrapolation method was confirmed by the extraction recovery tests on drinking water, as shown in **Table 5.5** (Matériel Supplémentaire) **and 5.7**. As expected, the extraction recovery values for most compounds were good (> 80%), except for the most polar compounds such as TRI (64  $\pm$  5%) and MTX (69  $\pm$  2%). Better recoveries could be obtained by using larger I.D. columns (3-4 mm)<sup>39</sup>, however on-line SPE columns of these dimensions are not always commercially available.

**Table 5.7-**Comparison of estimated breakthrough volumes ( $V_b$ ) of 17 selected trace organic contaminants in the on-line SPE columns tested.

Compound	Column																				
	C8			C18			Cyclone			Hypercarb			HypersilGold			HypersilGold PFP			Strata-X		
	$V_b$ ' (mL)	error (%)	$r^2$	$V_b$ ' (mL)	error (%)	$r^2$	$V_b$ ' (mL)	error (%)	$r^2$	$V_b$ ' (mL)	error (%)	$r^2$	$V_b$ ' (mL)	error (%)	$r^2$	$V_b$ ' (mL)	error (%)	$r^2$	$V_b$ ' (mL)	error (%)	$r^2$
ATZ	300	7	0.9998	199	5	0.9998	2000	94	0.9907	NA	NA	NA	11	47	0.9800	58	10	0.9974	1000	45	0.9991
AZI	50	20	0.9538	7	32	0.9538	300	46	0.9538	NA	NA	NA	100	121	0.9538	700000	41	0.9538	800	25	0.9538
CAF	3.7	10	0.9939	3.0	9	0.9935	2.1	12	0.9872	NA	NA	NA	1.2	29	0.9446	6.9	8	0.9946	16	24	0.9853
CBZ	500	6	0.9998	400	46	0.9783	20000	324	0.9670	4	161	0.9847	2400	16	0.9994	130	11	0.9980	4000	26	0.9991
CIP	2.2	13	0.8432	1.6	23	0.8432	40	75	0.8432	NA	NA	NA	22	84	0.8432	57	6	0.8432	100	19	0.8432
CLA	260000	27	0.9997	360000	9	0.9997	3000000000	155	0.9997	NA	NA	NA	600000	21	0.9997	2000000	49	0.9997	30000000	108	0.9997
CYA	199	5	0.9998	148	5	0.9998	10000	196	0.9842	11	115	0.9884	10	48	0.9718	80	12	0.9982	2100	25	0.9991
CYP	40	9	0.9992	25	33	0.9799	120	76	0.9630	90	187	0.9512	51	7	0.9998	8.9	55	0.9998	3000	174	0.9651
DEA	16.3	4	0.9997	12.5	5	0.9995	10	21	0.9927	580	14	0.9987	2.4	33	0.9632	6.8	8	0.9965	90	51	0.9742
DIA	5.3	4	0.9993	4.3	6	0.9980	3.5	19	0.9843	1000	13	0.9988	1.2	28	0.9526	3.0	8	0.9942	22	35	0.9788
DIH	600	9	0.9997	500	54	0.9794	1000	143	0.9582	70	81	0.9953	1600	10	0.9998	80	9	0.9997	11000	41	0.9989
ENA	100	24	0.9958	300	15	0.9986	1000	81	0.9706	5000000	348	0.9542	1100	13	0.9997	900	12	0.9786	60000	247	0.9399
LEV	1.1	16	0.9116	0.9	25	0.9116	60	57	0.9116	NA	NA	NA	3	39	0.9116	38	5	0.9116	66	10	0.9116
MTX	0.49	17	0.9098	1.1	37	0.8571	2.2	10	0.9662	NA	NA	NA	0.6	29	0.8181	7.2	14	0.9953	30	66	0.9655
SIM	72	5	0.9998	65	4	0.9999	300	30	0.9965	NA	NA	NA	6	42	0.9647	25	9	0.9972	200	169	0.9505
SMX	24	8	0.9795	14	9	0.9795	220	30	0.9795	400	29	0.9795	4	29	0.9795	21	7	0.9795	1200	20	0.9795
TRI	0.53	10	0.9092	0.8	22	0.9092	18	25	0.9092	20	105	0.9092	1.8	32	0.9092	7.8	8	0.9092	29	9	0.9092

<sup>a</sup> Elution of ATZ, AZI, CAF, CIP, LEV, CLA, LEV, MTX and SIM was not possible with MeOH on the Hypercarb column.

### 5.3.2 Development of a method for the analysis of PPCPs and pesticides in drinking and surface waters

On the basis of the results obtained for  $V_b'$ , the chromatographic method was further optimized. A suite of preliminary experiments was performed, testing several mobile phase gradients (results not shown). The optimal separation of the 17 compounds was achieved using a ternary mobile phase composed of solvents A (0.1% F.A. in H<sub>2</sub>O), B (0.1% F.A. in MeOH) and C (0.1% F.A. in ACN) and a Synergi Fusion RP analytical column (for details on the time program, see Matériel Supplémentaire, **Table 5.2**). The use of this column is justified by the fact that peak broadening could occur if the on-line SPE column is coupled with an analytical column having a different type of retention<sup>36, 40</sup>. Representative chromatograms of a 25 ng L<sup>-1</sup> standard mixture of the compounds analyzed are illustrated in **Figure 5.1** (Matériel Supplémentaire).

In previous studies<sup>22-24</sup>, important on-line SPE parameters such as sample loading flow rate, wash volume and organic modifier in the wash volume were optimized; therefore there was no need to further study their effects. Based on that, a sample load rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup> was chosen because it gave optimal results in terms of system stability and run time. Higher flow rates could be used, in particular with on-line SPE columns having larger particle sizes<sup>41</sup>. In spite of that, we observed that high flow rates sometimes affected the long-term functioning of the load pump and a higher tendency to provoke leaks. Consequently, we preferred longer run times to achieve better system stability. We did not perform any wash containing organic modifiers after the load step to avoid analyte losses (especially for the weakly retained polar compounds). Additionally, it has been shown that matrix effects can be caused by co-eluting substances<sup>41, 42</sup>, therefore a wash step containing organic modifier fails to eliminate these interferences, and it becomes unnecessary. Consequently only an aqueous wash was performed after the sample was loaded into the on-line SPE column to eliminate salts and other hydrophilic substances present in the samples.

### 5.3.3 Method validation

Validation data, determined for both drinking and surface water are presented in **Tables 5.5** and **5.6**, respectively (Matériel Supplémentaire). During the validation process, we observed that we could not obtain adequate results for four of the selected compounds (AZI, CAF, CIP and LEV), therefore they were not further analyzed. At this point we do not have a good explanation for this, however in the case of the two quinolones anti-infectives (CIP and LEV) the presence of metal cations in the samples could cause the formation of complexes<sup>43</sup>. Also we decided to add a new compound to the final analyte list, TCC for which no breakthrough study was performed but that had a strong retention in the Strata-X on-line SPE column.

For drinking water, linearity was excellent for all compounds with determination coefficients ( $R^2$ )  $\geq 0.99$  except for CYP, DHC and ENA which were  $> 0.98$ . Method intra-day precision was between 1-7% and between 4-16% for inter-day precision. Extraction recovery achieved for all target compounds was generally good ( $> 80\%$ ) except for CYC, ENA, MTX, SMX and TRI, which showed somewhat lower recoveries (64-72%). The MDL ranged from 0.4 to 3 ng L<sup>-1</sup> while MCL ranged from 1 to 6 ng L<sup>-1</sup>.

For surface water samples, an excellent linearity ( $R^2 \geq 0.99$ ) was achieved for most calibration curves except for CYP in the St. Lawrence River sample and ENA in the Des Prairies River which had a  $R^2$  of 0.9550 and 0.9711, respectively. MDL ranged from 0.6 to 6 ng L<sup>-1</sup> and the MCL from 0.9 to 14 ng L<sup>-1</sup>. Extraction recovery was between  $60 \pm 2\%$  and  $109 \pm 2\%$ . Intra-day precision was  $\leq 10\%$  except for TCC (14%), while inter-day precision was  $\leq 12\%$  except for CYC and MTX (15% for both). During our preliminary experiments, we worked using only standard additions without an IS but method precision was poor (results not shown). Therefore we decided to add an IS to reduce signal variability to acceptable values ( $<15\%$ ).

### 5.3.4 Matrix effects

A major problem for quantitative analysis using ESI is the presence of matrix effects, which are defined as the unexpected suppression or enhancement of the analyte response due to co-eluting matrix

constituents<sup>44</sup>. Our matrix effects study showed that some compounds were not subjected to matrix effects (ATZ, CLA, DEA, DIA, MTX, SIM, and TRI) while others were susceptible to signal enhancement (CBZ, CYA, CYP, DHC, and ENA) or signal suppression (SMX and TCC). Strategies to reduce matrix effects such as external calibration using matrix-matched samples, isotope dilution and standard additions have been recommended<sup>42</sup>. Standard additions are often considered a lengthy and labor-intensive method, but when working with on-line SPE systems, standard additions becomes an efficient means to correct for signal distortion caused by matrix interferences.

### 5.3.5 Improvement of limits of detection

The preconcentration of 10 mL of sample lowered MDLs by a factor of 1.7 to 20 compared to previous methods using 1 mL<sup>22-24</sup>. Four compounds (ATZ, CBZ, DEA and SIM) showed lower improvement factors (< 5) than expected, while for DIA, ENA and MTX the improvement factor was much better (> 10). We attribute this compound-dependent behavior of the MDLs to the presence of co-extracted substances during the load step which may differentially affect the signal variability of each analyte. In spite of this, the MDLs were in the low ng L<sup>-1</sup> range which allows the detection of trace amounts of the selected contaminants in drinking and surface water. Also, the low MCL values achieved reduce the probability of false positives. These detection limits are of the same magnitude or lower than other on-line<sup>19,20</sup> or off-line SPE methods<sup>45,46</sup> used for the analysis of PPCPs and pesticides reporting detection limits in the 0.1-20 ng L<sup>-1</sup> range.

### 5.3.6 Analysis of drinking and surface water samples

To demonstrate the applicability of the developed method, drinking water and surface water samples from the region of Montreal, Canada, were analyzed. Results are summarized in **Table 5.8**. The targeted *s*-triazine herbicides and their transformation products were the most frequently detected compounds (**Figure 5.2 and Figure 5.3**). In drinking water, their concentration ranged from 2.0 ± 0.1 for CYA to 331 ± 9 ngL<sup>-1</sup> for DEA. In surface water, ATZ and DEA, were detected in the three surface water samples. The highest concentration detected in surface water was 479 ng L<sup>-1</sup> for DEA, in the St. Lawrence River. ATZ and its transformation products are among the most frequently detected organic

contaminants in surface, ground and drinking water samples <sup>47, 48</sup>. This can be explained by its intense application in agricultural fields in US and Canada <sup>49, 50</sup>.

The only PPCP detected in the surface water that we sampled was CBZ, with a concentration range of  $6.0 \pm 0.5$  to  $11 \pm 1$  ng L<sup>-1</sup>. These levels were generally similar or lower to those previously reported in Canadian surface waters <sup>49, 51</sup>. Studies have shown that among the different pharmaceutical compounds detected in the environment, CBZ, an anti-convulsion drug used mainly for the treatment of epilepsy, is one of the most frequently detected compound in surface waters <sup>52, 53</sup>. The absence of other targeted PPCPs may be influenced by the choice of sampling sites, which were not located close to wastewater plants discharges. However, the MDLs and MCLs achieved are sufficiently low to detect and confirm the presence of the targeted PPCPs in surface waters affected by effluent dispersion plumes <sup>54</sup>.

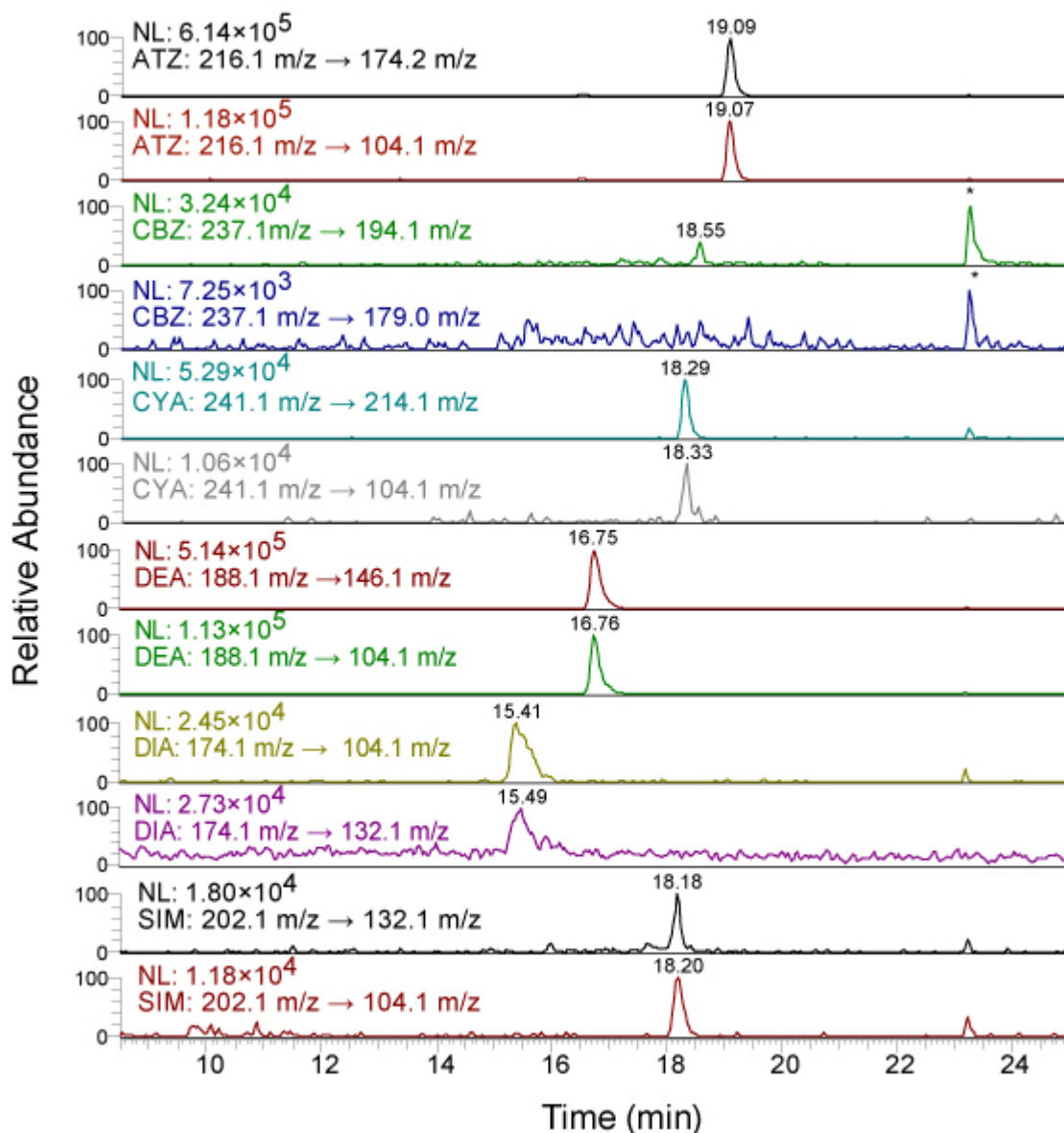
**Table 5.8**-Analysis of drinking and surface water samples of the region of Montréal. All values are in nanograms-per-liter (ng L<sup>-1</sup>)

Compound	Drinking water					Surface water				
	MDL	MCL	Sample A	Sample B	Sample C	MDL	MCL	St. Lawrence River	Des Prairies River	Mille-Îles River
ATZ	0.7	1	15.0 ± 0.4	28.0 ± 0.2	21.0 ± 0.3	0.6	0.9	48 ± 3	2.0 ± 0.8	2.0 ± 0.4
CBZ	0.7	3	< MCL	5.6 ± 0.4	< MCL	1	4	11 ± 1	6.0 ± 0.5	10 ± 1
CLA	2	2	< MDL	< MDL	< MDL	6	6	< MDL	< MDL	< MDL
CYA	0.8	1	2.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1	2.0 ± 0.2	0.8	2	4.0 ± 0.5	< MCL	< MCL
CYP	1	NA	< MDL	< MDL	< MDL	1	NA	< MDL	< MDL	< MDL
DEA	3	5	278 ± 13	331 ± 9	317 ± 10	3	5	479 ± 4	20 ± 4	19 ± 1
DHC	1	5	< MDL	< MDL	< MDL	1	NA	< MDL	< MDL	< MDL
DIA	0.4	NA	8.9 ± 0.5	11.0 ± 0.4	8 ± 1	1	5	12 ± 1	1.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2
ENA	1	NA	< MDL	< MDL	< MDL	1	NA	< MDL	< MDL	< MDL
MTX	1	NA	< MDL	< MDL	< MDL	2	NA	< MDL	< MDL	< MDL
SIM	2	3	7.0 ± 0.4	16 ± 3	13 ± 2	2	2	22 ± 4	4 ± 1	4 ± 1
SMX	1	2	< MDL	< MDL	< MDL	3	14	< MCL	< MDL	< MDL
TCC	3	5	< MDL	< MDL	< MDL	6	10	< MDL	< MDL	< MDL
TRI	3	6	< MDL	< MDL	< MDL	2	3	< MDL	< MDL	< MDL

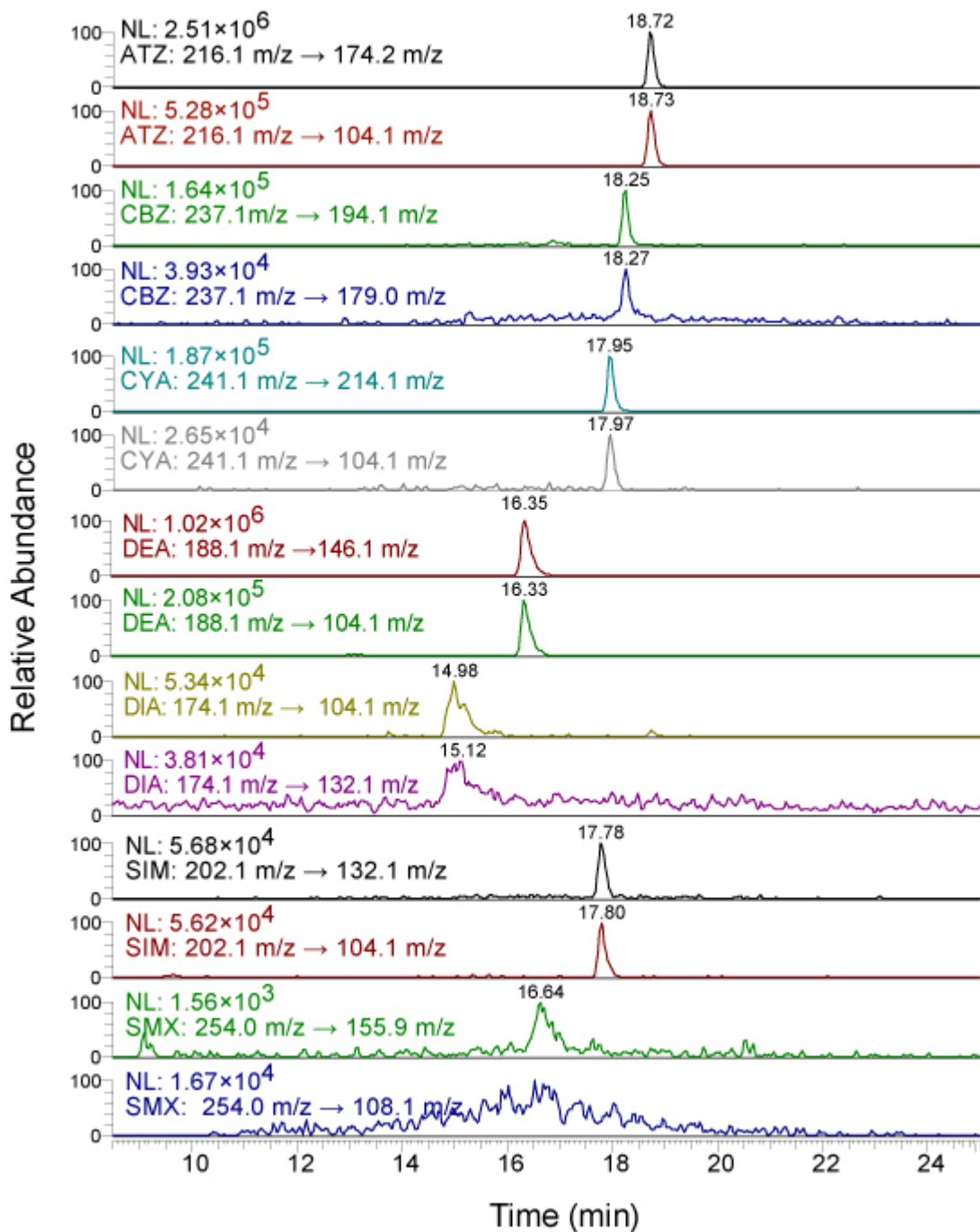
<sup>a</sup> for drinking water samples, ion ratios (SRM#2/SRM#1) were lower than maximum permitted tolerance for relative ion intensities according to European Union Commission Decision 2002/657/EC (8) except for DIA in Sample A, therefore it was labelled as "<MCL".

<sup>b</sup> For surface water samples, ion ratios were lower than maximum permitted tolerance levels, except for SIM in the Mille Illes River, therefore it was labelled as "<MCL".





**Figure 5.2**-LC-MS/MS Chromatograms in the SRM mode of the detected compounds in the drinking water sample A (not spiked). The presence of CBZ could not be confirmed because the signal of the SRM #2 was lower than the MCL. Peaks due to matrix components having the same SRM as the analyte are indicated by asterisks (\*).

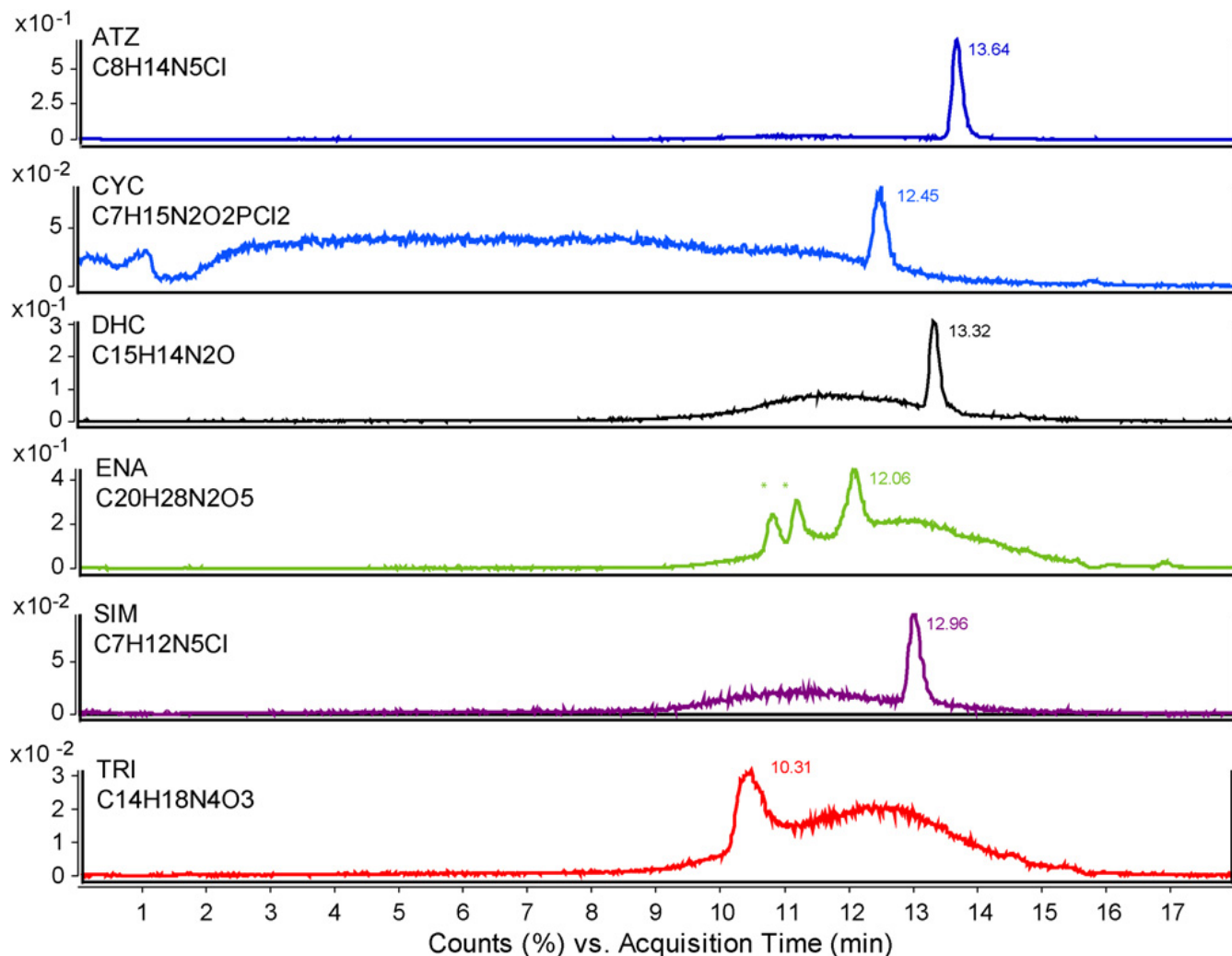


**Figure 5.3-** LC-MS/MS chromatograms in the SRM mode of the detected compounds in the St. Lawrence River sample (not spiked). The presence of SMX could not be confirmed because the signal of the SRM #2 was lower than the MCL

### 5.3.7 Alternative methods of confirmation

As seen on **Table 5.4** an intense second SRM could not be found for 4 compounds (CYP, DHC, ENA and MTX). Thus, their confirmation is not possible with SRM#2. In order to solve this limitation, we explored the potential of liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (LC-TOFMS) and the data-dependent RER scan in a triple quadrupole using the same environmental samples.

With accurate mass measurements, it is possible to increase the certainty of the presence of a compound based on its molecular formula which helps to avoid false positives. Only six of the 14 target compounds were possible to detect by LC-TOFMS (**Figure 5.4**), while using spiked surface water at the 50 ngL<sup>-1</sup> level. The measured masses obtained for each compound were compared with the theoretical ones and errors were < 1.2 mmu. These results suggest that PPCPs and pesticides confirmation by LC-TOFMS in environmental samples using our method is rather limited, due to the low concentrations (1-10 ng L<sup>-1</sup>) normally present in surface waters. To achieve a significant response, we would need to preconcentrate a much higher sample volume. Therefore, to be efficiently applied with our method, trace organic pollutants should occur at higher concentration levels, roughly 20-200 ng L<sup>-1</sup>.

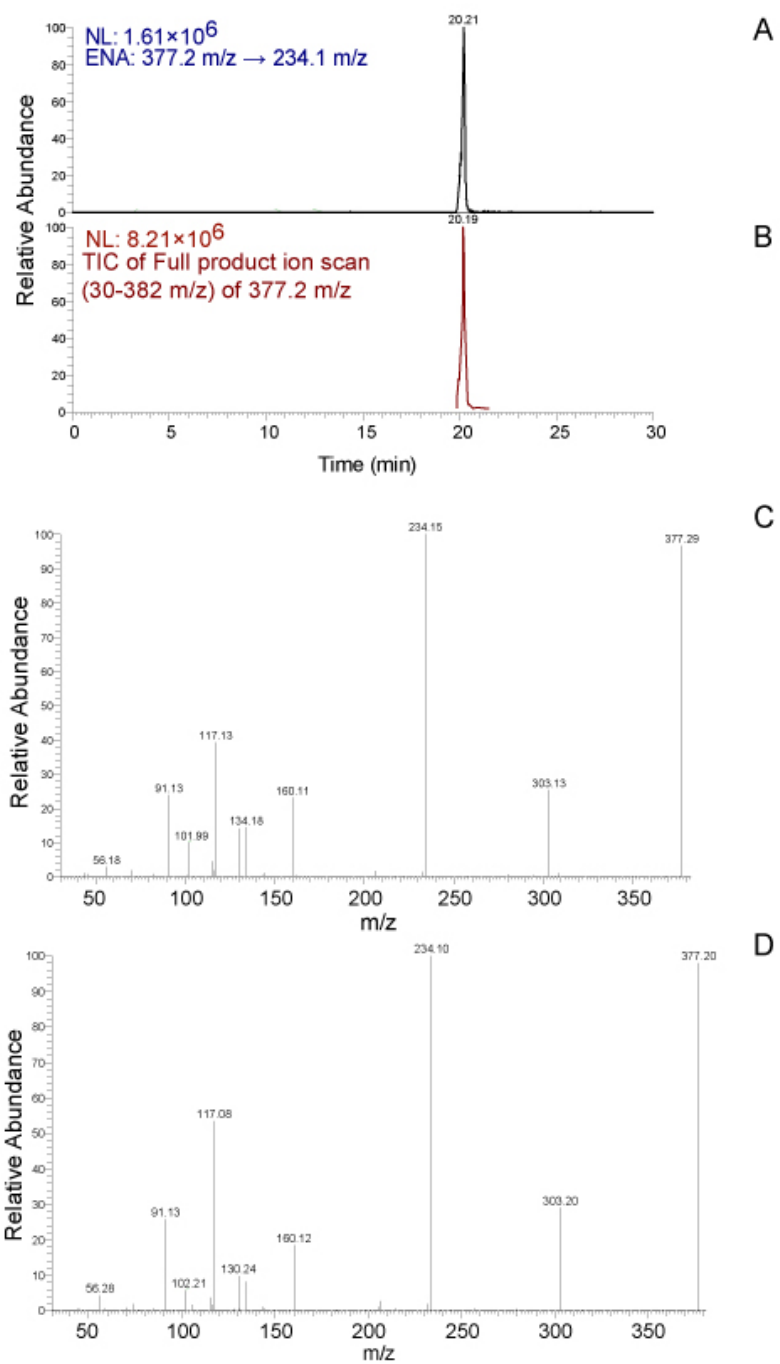


**Figure 5.4**-LC-MSTOF extracted ion chromatogram of the Des Prairie River sample spiked at the 50 ng L-1 level. Retention times are different to those obtained by the online SPE setup because of differences on the experimental setups. Peaks due to matrix components having accurate masses close to the analyte are indicated by asterisks (\*).

LC-MSTOF analysis of a non-spiked St. Lawrence River sample (**Figure 5.6**, matériel supplémentaire), allowed additional confirmation of the presence of ATZ and DEA. A screening study using a homemade database of 60 common surface water contaminants with the “Find compounds by formula” feature on the Agilent MassHunter software (version B.02.00) also revealed the possible presence of *N,N*-Diethyl-*m*-toluamide (DEET) with a mass error of 0.2 mmu. The presence of this compound was further investigated using LC-MS/MS with the SRM transition  $192\ m/z \rightarrow 119\ m/z$ <sup>55</sup> and we obtained an intense peak at an equivalent retention time to LC-MSTOF (results not shown). Because a standard of this substance was not available, we cannot be certain of the presence of this compound. Nevertheless, these results show the potential of on-line preconcentration of large-volume

injections coupled to LC-MS/MS and LC-TOFMS for the screening of other environmental contaminants.

In addition to accurate mass measurements for analyte confirmation, product ion mass spectra were collected using the RER scan in a triple quadrupole. These mass spectra provided additional structural information on the compounds analyzed and were used to confirm their presence by comparing them with the mass spectra of standard solutions. **Figure 5.5** shows the RER product ion mass spectrum of ENA collected during the analytical run for a spiked sample ( $100 \text{ ng L}^{-1}$ ). This figure also shows that when the signal generated by the ENA SRM transition exceeds the threshold value set in the acquisition method, a product ion scan of the precursor is triggered (**Figure 5.5 B, C**). As opposed to static product ion scan mass spectra which uses a single collision value, RER-generated product ion mass spectra shows high abundances across the whole scan range (**Figure 5.5-C**). This results from the dynamic collision energy used, which is increased while the second quadrupole scans the lower mass range. As it can be observed, the ENA RER mass spectrum obtained using our method (**Figure 5.5-C**) is almost identical to the one acquired by infusion of a pure standard (**Figure 5-D**). This allows us to confirm the presence of ENA using the product ion spectrum. Other compounds that could be confirmed by the data-dependent RER scan were DEA and CLA (results not shown) and SIM (**Figure 5.7**, Matériel Supplémentaire) in the Des Prairies River sample spiked at the  $25 \text{ ng L}^{-1}$  level. This figure shows that the RER technique works well in surface water at environmentally relevant concentrations. Nonetheless, the performance of this technique is hindered by the presence of co-eluting compounds having similar  $m/z$  ratios as the precursor ion. The presence of such species results in a “dirty” product ion mass spectra containing fragments belonging to interfering precursors. Therefore it is essential to have an excellent chromatography to take full advantage of this technique.



**Figure 5.5**-LC-MS/MS chromatograms and mass spectra of ENA. (A) SRM transition of ENA. (B) TIC of the RER scan. (C) ENA mass spectrum generated by the RER scan of a 0.1 % F.A in H<sub>2</sub>O sample spiked at the 100 ngL<sup>-1</sup> level. (D) ENA mass spectrum of a standard solution spiked at the 1 mg L<sup>-1</sup> level.

## 5.4 Conclusion

The multi-residue analytical method developed, based on SPE–LC–MS/MS allowed the simultaneous extraction of 14 multiple-class PPCPs and pesticides in a single extraction step, with minimal sample preparation. This method is a reliable, sensitive and robust tool that could be used for routine analysis of multiple organic trace contaminants in drinking and surface water. After breakthrough volume estimations, recoveries using the Strata-X on-line SPE column were generally > 70%. The preconcentration of 10 mL-samples allowed to improvement of the MDLs, which were in the low nanogram-per-liter range (0.6-6 ng L<sup>-1</sup>) for both surface and drinking water samples. The application of LC–MS/MS operating in SRM mode, with a second SRM transition monitored for each compound provided a good means of confirmation. Other tools of confirmation such as the data-dependent RER scan and TOFMS were found to be successful in some cases but not sensitive or selective enough for confirmatory purposes during routine analysis. The presented method also showed potential for its application to screening studies.

## 5.5 References

- (1) Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Thurman, E. M.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Buxton, H. T. *Environmental Science & Technology* **2002**, *36*, 1202-1211.
- (2) Siemens, J.; Huschek, G.; Siebe, C.; Kaupenjohann, M. *Water Research* **2008**, *42*, 2124-2134.
- (3) Comoretto, L.; Chiron, S. *Science of the Total Environment* **2005**, *349*, 201-210.
- (4) Ternes, T. A. *Water Research* **1998**, *32*, 3245-3260.
- (5) Daughton, C. G.; Ternes, T. A. *Environmental Health Perspectives* **1999**, *107*, 907-938.
- (6) Segura, P. A.; François, M.; Gagnon, C.; Sauvé, S. *Environmental Health Perspectives* **2009**, *117*, 675-684.
- (7) Pomati, F.; Orlandi, C.; Clerici, M.; Luciani, F.; Zuccato, E. *Toxicological Sciences* **2008**, *102*, 129-137.
- (8) Commission of the European Communities *Official Journal of the European Communities* **2002**, *L221*, 8-36.
- (9) Hernández, F.; Ibañez, M.; Sancho, J. V.; Pozo, S. J. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 4349-4357.
- (10) Ibañez, M.; Sancho, J.; Hernández, F.; McMillan, D.; Rao, R. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 481-489.
- (11) Bobeldijk, I.; Vissers, J.; Kearney, G.; Major, H.; Van Leerdam, J. *Journal of Chromatography, A* **2001**, *929*, 63-74.
- (12) Martínez Bueno, M.; Agüera, A.; Hernando, M. D.; Gómez, M. J.; Fernández-Alba, A. R. *Journal of Chromatography, A* **2009**, *1216*, 5995-6002.
- (13) Hao, C.; Zhao, X.; Yang, P. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26*, 569-580.
- (14) Lee, H.-B.; Peart, T. E.; Svoboda, M. L. *Journal of Chromatography, A* **2005**, *1094*, 122-129.
- (15) Pichon, V. *Journal of Chromatography, A* **2000**, *885*, 195-215.
- (16) Jordan, L. In *Solid-Phase Extraction*; Simpson, N. J. K., Ed.; Marcel Dekker: New York, NY, 2000.



- (17) Rodriguez-Mozaz, S.; López de Alda, M. J.; Barceló, D. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 6998-7006.
- (18) Salvador, A.; Moretton, C.; Píram, A.; Faure, R. *Journal of Chromatography, A* **2007**, *1145*, 102-109.
- (19) Stoob, K.; Singer, H. P.; Goetz, C. W.; Ruff, M.; Mueller, S. R. *Journal of Chromatography, A* **2005**, *1097*, 138-147.
- (20) Pozo, O. J.; Guerrero, C.; Sancho, J. V.; Ibañez, M.; Pitarch, E.; Hogendoorn, E.; Hernández, F. *Journal of Chromatography, A* **2006**, *1103*, 83-93.
- (21) Choi, K.-J.; Kim, S.-G.; Kim, C.-W.; Kim, S.-H. *Chemosphere* **2007**, *66*, 977-984.
- (22) Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauvé, S. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *604*, 147-157.
- (23) Viglino, L.; Aboufadel, K.; Mahvelat, A. D.; Prévost, M.; Sauvé, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2008**, *10*, 482-489.
- (24) Garcia-Ac, A.; Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauvé, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2009**, *11*, 830-838.
- (25) Segura, P. A.; Garcia-Ac, A.; Lajeunesse, A.; Ghosh, D.; Gagnon, C.; Sauvé, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2007**, *9*, 307-313.
- (26) Hennion, M.-C. *Journal of Chromatography, A* **1999**, *856*, 3-54.
- (27) Rimmer, C. A.; Simmons, C. R.; Dorsey, J. G. *Journal of Chromatography, A* **2002**, *965*, 219-232.
- (28) Jandera, P.; Colin, H.; Guiochon, G. *Analytical Chemistry* **1982**, *54*, 435-441.
- (29) Beck, J.; Yamaguchi, M.; Saito, K. In *Thermo Scientific Application Note #378*: San José, CA, 2006.
- (30) Koal, T.; Asperger, A.; Efer, J.; Engewald, W. *Chromatographia* **2003**, *57*, 93-101.
- (31) Glaser, J. A.; Foerst, D. L.; McKee, G. D.; Quave, S. A.; Budde, W. L. *Environmental Science & Technology* **1981**, *15*, 1426-1435.
- (32) Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec, 2002.
- (33) Werkhoven-Goewie, C. E.; Brinkman, U. A. T.; Frei, R. W. *Analytical Chemistry* **1981**, *53*, 2072-2080.
- (34) Poole, C. F.; Poole, S. K. *Journal of Chromatography, A* **2002**, *965*, 263-299.
- (35) Jandera, P.; Kubát, J. *Journal of Chromatography* **1990**, *500*, 281-299.
- (36) Soriano, J. M.; Jimenez, B.; Redondo, M. J.; Moltó, J. C. *Journal of Chromatography, A* **1998**, *822*, 67-73.
- (37) Thermo Electron *Method Development Guide for Hypercarb Columns*; Thermo Electron: Bellefonte, PA, 2004.

- (38) Barceló, D.; Hennion, M.-C. *Analytica Chimica Acta* **1995**, *318*, 1-41.
- (39) Pocurull, E.; Marcé, R. M.; Borrull, F. *Chromatographia* **1995**, *41*, 521-526.
- (40) Oliferova, L. A.; Statkus, M. A.; Tsisin, G. I.; Wang, J.; Zolotov, Y. A. *Journal of Analytical Chemistry* **2006**, *61*, 416-441.
- (41) Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauvé, S. *Chromatographia* **2009**, *70*, 239-245.
- (42) Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T. *Journal of Chromatography, A* **2005**, *1067*, 153-160.
- (43) Gu, C.; Karthikeyan, K. G. *Environmental Science & Technology* **2005**, *39*, 9166-9173.
- (44) Schuhmacher, J.; Zimmer, D.; Tesche, F.; Pickard, V. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 1950-1957.
- (45) Ternes, T. A. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry* **2001**, *20*, 419-434.
- (46) Vanderford, B. J.; Pearson, R. A.; Rexing, D. J.; Snyder, S. A. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 6265-6274.
- (47) Squillace, P.; Scott, J.; Moran, M.; Nolan, B.; Kolpin, D. *Environmental Science & Technology* **2002**, *36*, 1923-1930.
- (48) Battaglin, W.; Hay, L. *Environmental Science & Technology* **1996**, *30*, 889-896.
- (49) Hua, W. Y.; Bennett, E. R.; Maio, X. S.; Metcalfe, C. D.; Letcher, R. J. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2006**, *25*, 2356-2365.
- (50) Poissant, L.; Beauvais, C.; Lafrance, P.; Deblois, C. *Science of the Total Environment* **2008**, *404*, 182-195.
- (51) Yargeau, V.; Lopata, A.; Metcalfe, C. *Water Quality Research Journal of Canada* **2007**, *42*, 231-239.
- (52) Miao, X. S.; Metcalfe, C. D. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3731-3738.
- (53) Benotti, M.; Trenholm, R.; Vanderford, B.; Holady, J.; Stanford, B.; Snyder, S. *Environmental Science & Technology* **2009**, *43*, 597-603.
- (54) Focazio, M. J.; Kolpin, D. W.; Barnes, K. K.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Zaugg, S. D.; Barber, L. B.; Thurman, M. E. *Science of the Total Environment* **2008**, *402*, 201-216.
- (55) Rodil, R.; Quintana, J.; López-Mahía, P.; Muniategui-Lorenzo, S.; Prada-Rodríguez, D. *Journal of Chromatography, A* **2009**, *1216*, 2958-2969.

## **Matériel Supplémentaire**

**Tableau 5.1-** Columns tested for breakthrough of seventeen selected organic contaminants.

<b>Column</b>	<b>Manufacturer</b>	<b>Length (mm)</b>	<b>I.D. (mm)</b>	<b>Particle size (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Pore size (<math>\text{\AA}</math>)</b>	<b>Material</b>	<b>pH range</b>
Strata C <sub>8</sub>	Phenomenex	20	2	NA	NA	Octyl-bonded silica (endcapped)	NA
Strata C <sub>18</sub>	Phenomenex	20	2	NA	NA	Octadecyl-bonded silica (endcapped)	NA
Cyclone	Thermo Fisher Scientific	50	1	60	100	Styrene-Divinylbenzene copolymer bead	1-13
Hypercarb	Thermo Fisher Scientific	20	2.1	7	250	Porus graphitic carbon	0-14
Hypersil Gold	Thermo Fisher Scientific	20	2.1	12	175	Alkyl-bonded silica (endcapped)	1-11
Hypersil Gold PFP	Thermo Fisher Scientific	20	2.1	12	175	Perfluorophenyl-bonded silica (endcapped)	2-8
Strata-X	Phenomenex	20	2	25	85	Styrene-Divinylbenzene copolymer surface modified)	1-14

**Tableau 5.2-**Load and analytical pumps program.

Time (min)	Load Pump		Analytical Pump			Divert valve position
	Solvent A	Flow rate	Solvent B	Solvent C	Flow rate	
	(%)	( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	(%)	(%)	( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	
0.0	100	200	2.5	2.5	200	Load
0.5	100	1500	↓	↓	↓	Elution
8.5	100	1500	↓	↓	↓	
9.5	100	200	↓	↓	↓	Elution
10.5	↓	↓	2.5	2.5	↓	
18.5	↓	↓	47.5	47.5	↓	
20.5	↓	↓	47.5	47.5	↓	
21.0	↓	↓	10	89	↓	
24.5	↓	↓	20	89	↓	
25.0	↓	↓	2.5	2.5	↓	Elution
26.5	100	200	2.5	2.5	200	

**Tableau 5.3**-LC-TOF-MS pump program.

<b>Time (min)</b>	<b>Pump</b>	
	Solvent B (%)	Flow rate ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )
0.0	5	200
2.0	5	↓
10.0	95	
16.0	95	
16.5	5	200

**Tableau 5.4-** SRM transitions parameters

Compound	Skimmer offset (V)	Tube Lens (V)	SRM #1 (Quantification)			SRM #2 (Confirmation)		
			Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)
ATZ	0	80	216.1	174.2	15	216.1	104.1	27
CBZ	0	86	237.1	194.1	20	237.1	179.0	35
CLA	5	123	748.5	158.0	28	748.5	590.3	17
CYA	0	80	241.1	214.1	19	241.1	104.1	27
CYC	0	97	261.0	140.1	24	NA	NA	NA
DEA	0	70	188.1	146.1	17	188.1	104.1	27
DIA	0	80	174.1	104.1	23	174.1	132.1	15
DHC	0	91	239.1	194.1	23	NA	NA	NA
ENA	0	92	377.2	234.1	16	NA	NA	NA
MTX	0	122	455.1	308.1	19	NA	NA	NA
SIM	0	78	202.1	132.1	22	202.1	104.1	27
SMX	5	82	254.1	155.9	16	254.1	108.1	24
TCC	0	86	315.0	127.0	35	315.0	162.0	19
TRI	5	91	291.1	230.0	91	291.1	123.1	31

**Tableau 5.5-** Method validation parameters for the analysis of drinking water.

<b>Compound</b>	<b>R<sup>2</sup> <sup>a</sup></b>	<b>MDL (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>MCL (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Intra-day precision <sup>b</sup> (% R.S.D.)</b>	<b>Inter-day precision <sup>c</sup> (% R.S.D.)</b>	<b>Recovery <sup>d</sup> (%)</b>
ATZ	0.9997	0.7	1	2	5	84 ± 3
CBZ	0.9994	0.7	3	3	8	105 ± 3
CLA	0.9971	2	2	6	7	91 ± 3
CYA	0.9993	0.8	1	1	4	93 ± 2
CYC	0.9890	1	NA	5	6	70 ± 4
DEA	0.9991	3	5	2	11	92 ± 3
DIA	0.9988	1	5	3	5	88 ± 2
DHC	0.9872	0.4	NA	4	4	86 ± 6
ENA	0.9890	1	NA	7	7	71 ± 6
MTX	0.9914	1	NA	5	8	69 ± 5
SIM	0.9986	2	3	4	10	92 ± 7
SMX	0.9999	1	2	7	12	72 ± 7
TCC	0.990	3	5	6	16	103 ± 6
TRI	0.9996	3	6	3	5	64 ± 5

<sup>a</sup> Equation and coefficient of determination for the calibration curve using SRM#1 <sup>b</sup> Relative standard deviation of samples ( $n=4$ ) spiked for a final concentration of 5 ng L<sup>-1</sup> the same day in 0.1 % F.A., in H<sub>2</sub>O <sup>c</sup> Relative standard deviation of samples ( $n=4$ ) spiked for a final concentration of 5 ng L<sup>-1</sup> on 3 different days ( $N=12$ ) in 0.1 % F.A., in H<sub>2</sub>O, except for CLA (2 days,  $N=8$ ). <sup>d</sup> Sample spiked for a final concentration of 20 ng L<sup>-1</sup> ( $n=4$ ).

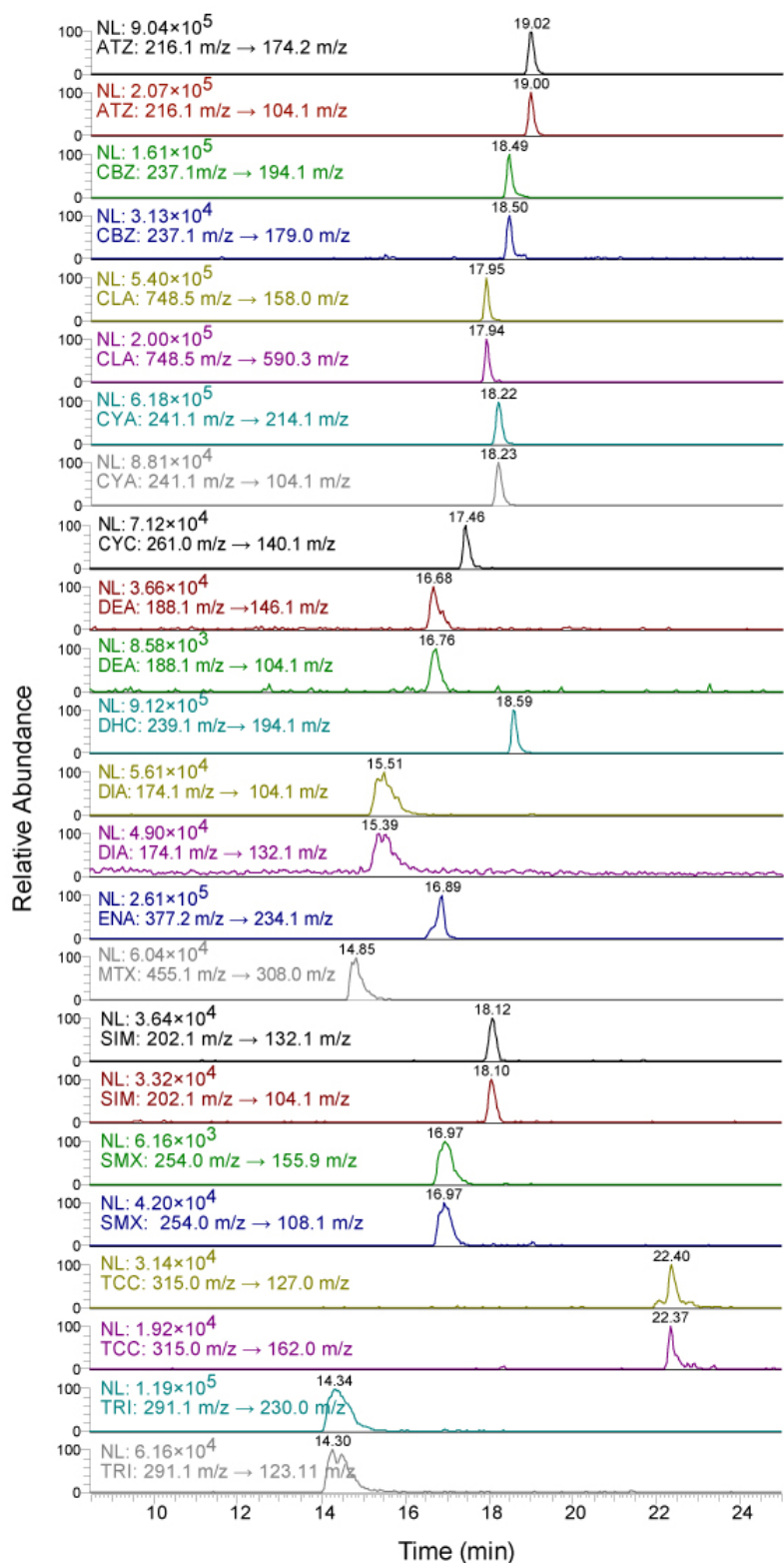


**Tableau 5.6.-Method validation parameters for the analysis of surface water**

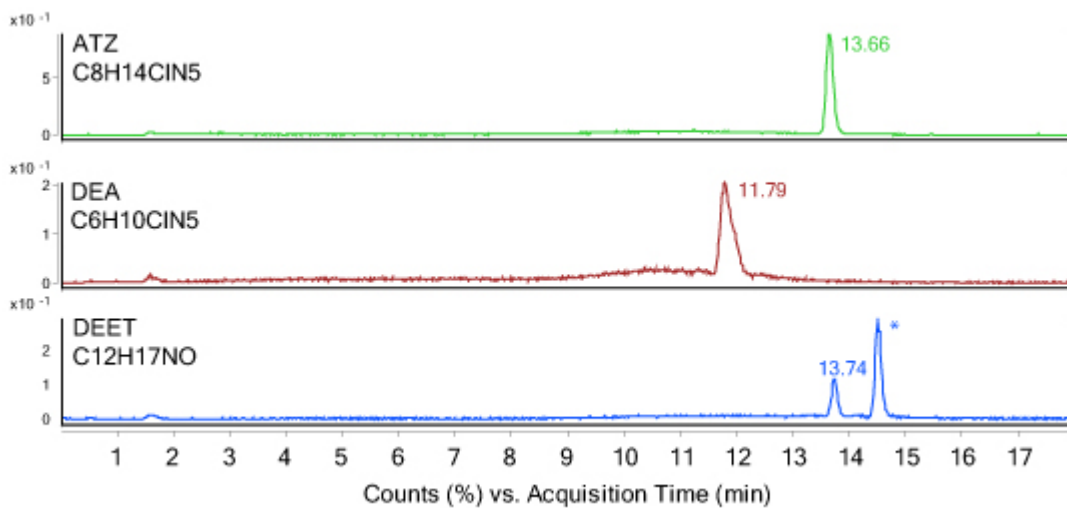
Compound	$r^2$ <sup>a</sup>	$r^2$ <sup>b</sup>	$r^2$ <sup>c</sup>	MDL (ng L <sup>-1</sup> )	MCL (ng L <sup>-1</sup> )	Intra-day precision <sup>d</sup> (% RSD)	Inter-day precision <sup>e</sup> (% RSD)	Recovery <sup>f</sup> (%)	Matrix effects <sup>g</sup> (%)
ATZ	0.9999	0.9999	0.9999	0.6	0.9	2	4	101 ± 3	105 ± 3
CBZ	0.9999	0.9999	0.9999	1	4	3	4	103 ± 2	111 ± 3
CLA	0.9938	0.9939	0.9931	6	6	7	6	67 ± 3	104 ± 7
CYA	0.9999	0.9995	0.9994	0.8	2	2	6	89 ± 3	116 ± 4
CYC	0.9550	0.9977	0.9937	1	NA	5	15	61 ± 7	120 ± 5
DEA	0.9983	0.9980	0.9992	3	5	4	9	82 ± 1	96 ± 5
DHC	0.9910	0.9993	0.9958	1	NA	6	6	71 ± 2	133 ± 3
DIA	0.9998	0.9983	0.9991	1	5	2	6	109 ± 2	102 ± 2
ENA	0.9963	0.9711	0.9940	1	NA	4	7	60 ± 2	169 ± 3
MTX	0.9944	0.9927	0.9906	2	NA	9	15	67 ± 6	105 ± 7
SIM	0.9976	0.9987	0.9967	2	2	3	9	102 ± 5	104 ± 11
SMX	0.9989	0.9963	0.9948	3	14	10	9	66 ± 7	81 ± 9
TCC	0.9991	0.9947	0.9973	6	10	14	12	92 ± 5	80 ± 4
TRI	0.9982	0.9992	0.9990	2	3	6	9	63 ± 3	103 ± 7

<sup>a</sup> Coefficient of determination of the standard additions calibration curve for the Saint-Lawrence River sample.

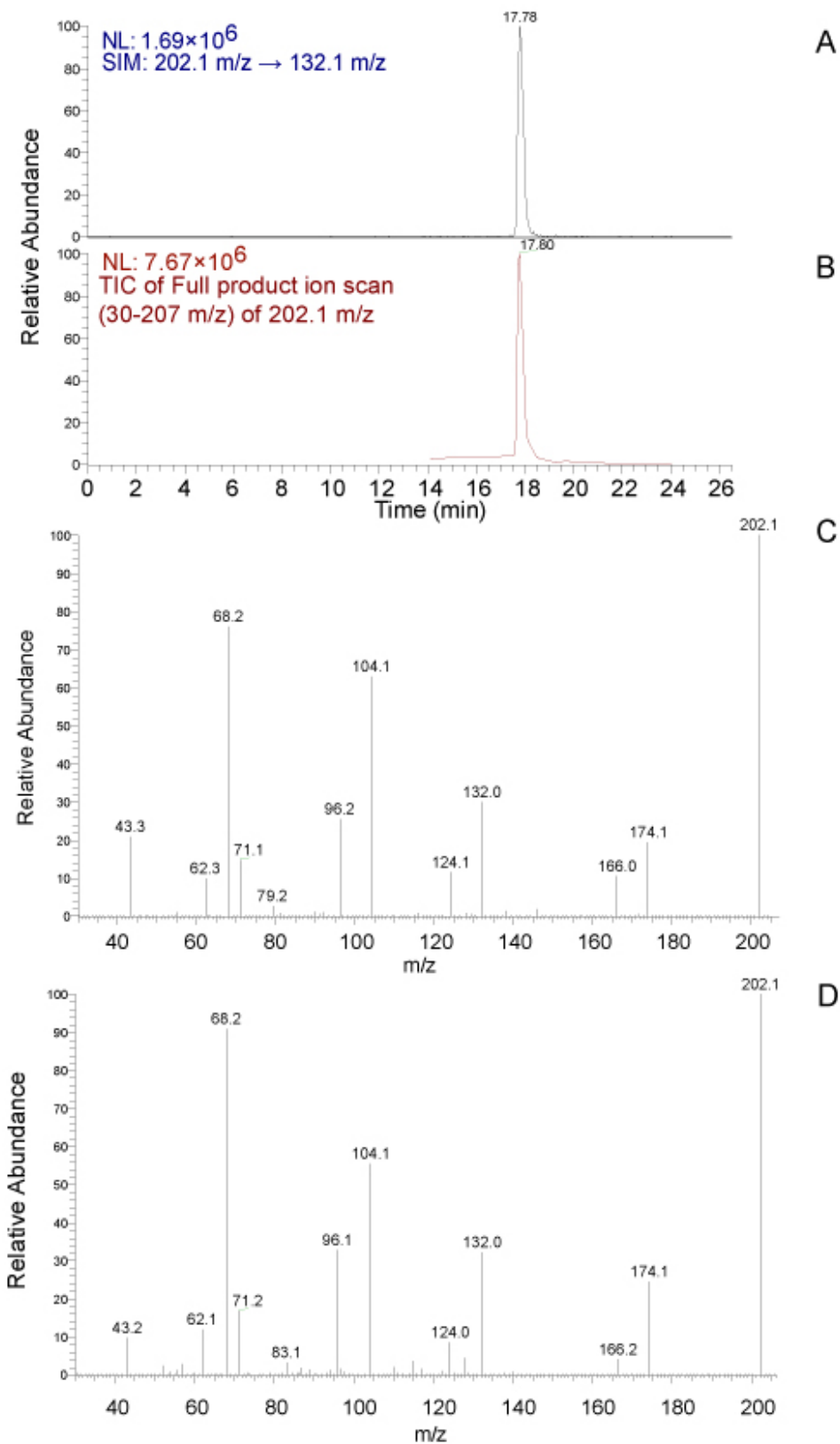
<sup>b</sup> Des Prairies River sample <sup>c</sup> Milles-Îles River sample. <sup>d</sup> Relative standard deviation of analytes in the Des Prairies River sample ( $n=4$ ) spiked for a final concentration of 5 ng L<sup>-1</sup> the same day. <sup>e</sup> Relative standard deviation of analytes in the Des Prairies River sample ( $n=4$ ) spiked for a final concentration of 5 ng L<sup>-1</sup> on 3 different days ( $n=12$ ). <sup>f</sup> Sample spiked for a final concentration of 25 ngL<sup>-1</sup> ( $n=4$ ). <sup>g</sup> Calculated comparing signal intensities of St. Lawrence River and 0.1 % F.A. in H<sub>2</sub>O samples spiked for a final concentration of 20 ngL<sup>-1</sup> ( $n=4$ ).



**Figure 5.1**-LC-MS/MS chromatograms in SRM mode of the target compounds spiked at the  $25 \text{ ng L}^{-1}$  level in 0.1 % F.A. in  $\text{H}_2\text{O}$



**Figure 5.6.** -LC-TOFMS extracted ion chromatogram of the St. Lawrence River sample (not spiked). Retention times are different to those obtained by the online SPE setup because of differences in the experimental setups. The mass accuracy window was 100 ppm.



**Figure 5.7.**-LC-MS/MS chromatograms and mass spectra of SIM. (A) SRM transition of SIM. (B) TIC of the RER scan. (C) SIM mass spectrum generated by the RER scan of a Des Prairies River sample spiked at the  $25 \text{ ngL}^{-1}$  level. (D) ENA mass spectrum of a standard solution spiked at the  $1 \text{ mg L}^{-1}$  level.

---

## **CHAPITRE 6: Cinétique d'oxydation de CYP et MTX par Ozone dans l'eau potable**

---

Oxidation kinetics of cyclophosphamide and methotrexate by ozone in  
drinking water

Araceli Garcia-Ac<sup>a</sup>, Romain Broséus<sup>b,\*</sup>, Simon Vincent<sup>b</sup>, Benoit Barbeau<sup>b</sup>,  
Michèle Prévost<sup>b</sup>, Sébastien Sauvé<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Succ. Centre-ville,  
Montréal, QC, Canada H3C 3J7

<sup>b</sup> NSERC Industrial Chair on Drinking Water, Civil, Geological and Mining Engineering  
Department, École Polytechnique de Montréal, CP 6079, Succ. Centre-ville, Montréal,  
QC, Canada H3C 3A7

Publié dans *Chemosphere* 79 (2010) 1056–1063

## Abstract

This study investigates the aqueous degradation by ozone of two target cytostatic drugs, cyclophosphamide and methotrexate. A column switching technique for on-line solid phase extraction (SPE) coupled to electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) was used for the simultaneous detection of the trace contaminants. Second-order kinetic rate constants for the reaction of cyclophosphamide with molecular ozone and hydroxyl radicals were determined in bench-scale experiments at pH 8.10. The molecular ozone oxidation kinetics was studied in buffered ultrapure water and compared to the oxidation kinetics in natural water from a municipal drinking water treatment plant in the province of Quebec (Canada). For cyclophosphamide, the degradation rate constant with molecular ozone in ultrapure water was low ( $k_{O_3} = 3.3 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) and the extent of oxidation was linearly correlated to the ozone exposure. The impact of water quality matrix on oxidation efficacy was not significant during direct ozone reaction ( $k_{O_3} = 2.9 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). The rate constant with hydroxyl radicals was higher at  $2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Methotrexate reacted quickly with molecular ozone at dosages typically applied in drinking water treatment ( $k_{O_3} > 3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Overall, the results showed that cytostatics reactivity with ozone was dependent of their chemical structure. Ozone was very effective against methotrexate but high oxidant concentration  $\times$  contact time (CT) values were required to completely remove cyclophosphamide from drinking water. Further studies should be conducted in order to identify the ozonation by-products and explore the impact of ozone on their degradation and toxicity.

## 6.1 Introduction

Pharmaceuticals and their degradation by-products are routinely detected in surface waters <sup>1, 2</sup> and even drinking waters <sup>3-6</sup>. A significant fraction of the pharmaceuticals released into the aquatic environment is attributed to their incomplete removal through conventional wastewater treatment <sup>7-11</sup>. Among various classes of pharmaceuticals, cytostatic chemotherapy drugs (also called antineoplastic agents) are of particular environmental concern because they are potentially carcinogenic, mutagenic and genotoxic, even at low concentrations <sup>12</sup>. Cyclophosphamide and methotrexate are widely used at high dose for the chemotherapy of various forms of cancer (bronchial, breast and ovarian cancer, lymphomas, leukemias, etc.) and at low dose for the treatment of autoimmune diseases (e.g., rheumatoid arthritis), and also as immunosuppressants after organ transplantations (e.g., bone marrow transplantations) <sup>13-15</sup>. The excretion of those unchanged parent molecules in patients appears to be around 10-20% <sup>16</sup>. According to <sup>13</sup>, these compounds may reach the aquatic environment via hospital or domestic wastewater collectors on their way to wastewater treatment plants through excretions in the urine and feces of patients under medical treatment.

Concentrations of cyclophosphamide, ifosfamide, 5-fluorouracil, anthracyclines and cancerostatic platinum compounds range from 6 ng.L<sup>-1</sup> to 145 µg.L<sup>-1</sup> in hospital wastewater effluents <sup>17-19</sup>. Cyclophosphamide, ifosfamide and methotrexate have been analyzed in untreated and treated municipal wastewater at concentrations in the ng.L<sup>-1</sup> range <sup>13, 20-23</sup>. Antineoplastic agents have also been detected in source waters receiving treated wastewater effluents ( $\leq 50$  pg.L<sup>-1</sup> to 10 ng.L<sup>-1</sup>) <sup>13, 24</sup> and occasionally in finished drinking water <sup>25</sup>.

Due to the increase in the demand for chemotherapy drugs in developed countries and their common administration in outpatient treatment departments <sup>16</sup>, the concentration of cytostatic agents in municipal wastewaters is expected to increase. Their potential

presence in surface waters points to the need to verify the efficacy of drinking water treatment processes to remove such compounds. Among biological, physical and chemical treatments, chemical oxidation using ozone treatment has demonstrated its effectiveness for a wide spectrum of organic micropollutants in both wastewater and drinking water and at various levels of experiments (bench-, pilot- and full-scale)<sup>12, 26-32</sup>. Ozone reacts with organic contaminants through either the direct reaction with molecular ozone or through the indirect reaction with free radicals (including the hydroxyl radicals OH•) produced by the decomposition of ozone. The rate of OH• formation depends on the water matrix, especially the pH, alkalinity and type and content of natural organic matter in drinking water<sup>33</sup>. Molecular ozone reacts selectively with unsaturated bonds, aromatic systems and amino groups whereas OH• radicals react much more indiscriminately.

To predict the potential removal by ozonation, it is important to determine rate constants of the reaction of micropollutants with ozone and OH• radicals. Some rate constants for direct ( $k_{O_3}$ ) and indirect ( $k_{OH}$ ) ozone oxidation have been published and can serve to predict the performance of oxidation<sup>33, 34</sup>. However, few studies have evaluated the efficacy of ozone for the oxidation of cytostatics, which vary in chemical structures and properties that will affect their ability to be oxidized. Pérez-Rey et al.<sup>35</sup> studied the degradation of 5-fluorouracil, cytarabine, azathioprine and methotrexate with ozone in water using higher concentrations ( $1.1 \cdot 10^{-3}$  M to  $2.2 \cdot 10^{-3}$  M) than those detected in surface waters. The removal of cyclophosphamide and cisplatin by ozone and advanced oxidation processes (AOP) has been investigated<sup>36-38</sup> but only pseudo first-order constants were estimated.<sup>36</sup> reported the values of the second-order rate constants of irinotecan, tamoxifen and cyclophosphamide in ultrapure water only.

The determination of the reaction rate constants in ultrapure and natural water for two commonly used cytostatics, cyclophosphamide and methotrexate, will provide important information for drinking water treatment selection and adjustment. To the best of our knowledge, this is the first paper presenting the impact of ozone oxidation on cytostatics in a natural water matrix.



## 6.2 Objectives of study

In the research project presented hereafter, three objectives were sought:

1. To determine the efficacy of ozone for the degradation of two target cytostatic drugs at bench-scale;
2. To determine the second-order rate constants for the reaction of the selected compounds with molecular ozone and OH• radicals in buffered ultrapure water;
3. To assess the impact of water quality on molecular ozone oxidation kinetics using bench-scale assays and natural water matrices representative of conventionally treated surface water.

## 6.3 Experimental section

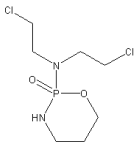
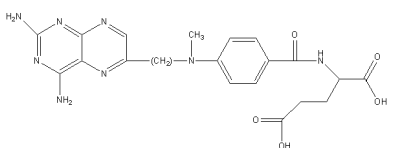
### 6.3.1 Chemicals and reagents

Cyclophosphamide and methotrexate (certified purity  $\geq 99\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Their chemical structures and their main physico-chemical properties are presented in **Table 6.1**. The pKa value of cyclophosphamide is given as a range because no exact value can be found in the literature <sup>39</sup>. Methotrexate is a weak organic dicarboxylic acid <sup>40</sup>. Both substances are hydrophilic ( $\log K_{ow} < 2$  : low sorption potential). LC-MS grade acetonitrile, water and methanol were obtained from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Acetic acid (from FisherScience, Fair Lawn, NJ, USA) was HPLC-grade reagent and formic acid 98% was purchased from Sigma-Aldrich Canada. L-Ascorbic acid (99.0%) and hydrogen peroxide, previously standardized by KMnO<sub>4</sub> titration <sup>41</sup>, were purchased from Fisher Scientific (Fair Lawn NJ). Ultrapure water (18 MΩ.cm) was produced with a Millipore™ apparatus. Phosphate buffer and *tert*-butanol.

### **6.3.2 Preparation of standards**

Stock solutions ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ) of each cytostatic compound were prepared by weighing and dissolving the corresponding pure powders in ultrapure water. Stock solutions were stored and kept at  $-15 \text{ }^{\circ}\text{C}$  before use in order to prevent microbial degradation. Mixed working solutions containing  $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$  of the compounds were prepared each time by dilution of the stock solutions in ultrapure water and were kept at  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . (final concentrations:  $0.2 \text{ M}$  and  $50 \text{ mM}$ , respectively) were prepared by dissolution of the commercial compounds in ultrapure water.

Table 6.1: Physico-chemical properties and molecular structure of target drugs

Compound	Structure	MW (g.mol <sup>-1</sup> )	pK <sub>a</sub>	log K <sub>ow</sub>
Cyclophosphamide C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P		260.02	4.5-6.5 <sup>1</sup>	0.63 <sup>1</sup>
Methotrexate C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>8</sub> O <sub>5</sub>		454.45	4.8 and 5.5 <sup>2</sup>	-1.28 <sup>3</sup>

MW: molecular weight; pK<sub>a</sub>: dissociation constant; log K<sub>ow</sub>: partition coefficient (octanol/water)

<sup>1</sup> Reference : Wang et al., 2009

<sup>2</sup> Reference : Reid et al., 1993

<sup>3</sup> Reference : Sanderson and Thomsen, 2009

### 6.3.3 Instrumentation

The on-line SPE procedure for samples and standards to be analyzed were based on the method described by <sup>20</sup>. The Environmental Quantification system (EQuan™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to carry out the analysis. Two quaternary LC pumps, an autosampler with a 1 mL-loop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) and a TSQ Quantum Mass Spectrometer equipped with an Ion Max API Source (Thermo, Waltham MA) and an electrospray ionization (ESI) multimode source using compound-specific fragments were used. Tube lens and collision energies which are compound-specific appear in **Table 6.2**. Method detection limits were 3 and 6 ng.L<sup>-1</sup> for cyclophosphamide and methotrexate, respectively.

**Table 6.2-** Collision energies, tube lens, precursor and fragment ions of the compounds of interest generated by electro-spray ionization (ESI), atmospheric pressure photoionisation (APPI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI). Cited references give explanations for the ESI conditions of the observed fragments.

Analyte	ESI		Observed precursor ion	Observed fragment and reference
	CE (V)	Tube lens		
Cyclophosphamide	23	81.1	[M+H] <sup>+</sup> m/z 261	[M – PNHO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> m/z 140 <sup>1</sup>
Methotrexate	21	101.6	[M+H] <sup>+</sup> m/z 455	[M – NHC <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (COOH) <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> m/z 308 <sup>2</sup>

<sup>1</sup> References : <sup>42-44</sup>

<sup>2</sup> Reference : <sup>42</sup>

### 6.3.4 Natural water samples

Natural filtered water samples were collected before the ozonation process from a single municipal drinking water treatment plant (DWTP) in the province of Quebec drawing water from the St-Lawrence River. This water was sampled in 10-L polypropylene

carboys that had been thoroughly washed and rinsed successively with distilled and ultrapure waters. Samples were filtered through 0.45- $\mu\text{m}$  polyethersulfone membranes and kept at 4°C prior to the ozone experiments. The filtered water had a pH of around 8.04, low turbidity ( $< 0.15$  NTU), low natural organic matter (2.55  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  dissolved organic carbon (DOC)) and moderate alkalinity (80  $\text{mg CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ).

### 6.3.5 Ozone residual and *p*CBA analysis

At bench-scale, ozone stock solution concentrations and ozone residuals in water were determined according to the standard colorimetric method 4500-O<sub>3</sub> (APHA, 1998) using indigo trisulfonate ( $\epsilon_{600\text{ nm}} = 20\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). Samples were analyzed at 600 nm with a Varian spectrophotometer (Cary 100, Victoria, Australia) in a 1-cm or 2-cm quartz cell. *Para*-chlorobenzoic acid (*p*CBA) was analyzed using a HPLC system (column characteristics: Nucleosil 100-5, RP-C18, 150 mm length, 4.6  $\mu\text{m}$  i.d., from Macherey-Nagel). The mobile phase consisted of 60% water (acidified at pH 2 with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and 40% methanol (HPLC grade). The detection of *p*CBA was made using diode array detection at 236 nm (Elite LaChrom, Hitachi). A method detection limit of 0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  was obtained.

### 6.3.6 Bench-scale ozonation experiments

Bench-scale ozone experiments were performed at  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . In all experiments, water samples were spiked with target compounds to achieve concentrations of cytostatics between 100 and 200  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  depending on the compound and the detection limit of the method of determination of the compounds.

During direct reaction with molecular ozone, ultrapure water was buffered to pH 8.10 with a phosphate buffer while the pH of the natural water was left unbuffered. *Tert*-butanol was added in buffered ultrapure water and in natural water to quench OH• radicals generated by ozone decomposition. This allowed the determination of the second-order rate constants for the reaction of molecular ozone with the target cytostatic drugs ( $k_{O_3}$ ) in buffered ultrapure and natural water, and assessing the impact of water quality on molecular ozone oxidation kinetics. Stock ozone solutions ( $50\text{-}60\text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ) were prepared by diffusing gaseous ozone, produced with an oxygen-fed generator (Ozone services, BC, CA) through a water-jacketed flask containing ultrapure water chilled at  $4^\circ\text{C}$ . The ozonation experiments were initiated by mixing aqueous ozone ( $6\text{-}15\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and solutions of cytostatic drugs ( $100\text{-}200\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Aliquots of ozone solutions were injected via a syringe into a continuously stirred 1-L glass reactor containing the water sample and equipped with a floating Teflon lid to prevent degassing. Aliquots of 4 mL were then withdrawn from the test water at regular time intervals for ozone residual analysis. For target compounds analysis, aliquots of 40 mL were withdrawn and transferred into vials containing 400  $\mu\text{L}$  of ascorbic acid ( $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) to quench the residual ozone and prevent microbial degradation<sup>32</sup>. Target compounds concentrations were analyzed for contact times from 0 - 120 min.

When required, hydrogen peroxide was dosed in buffered ultrapure water at a concentration of  $0.25\text{ mg H}_2\text{O}_2/\text{mg O}_3$  prior to the injection of ozone ( $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in order to determine the second-order rate constant for the reaction of cytostatics with OH•

radicals ( $k_{OH}$ ). This concentration was selected as it is in the optimal range to promote AOP (Acero and von Gunten, <sup>45</sup>). Experiments were also conducted with natural water free from *tert*-butanol and hydrogen peroxide in order to verify the natural promotion of OH• radicals when ozone was applied ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Ozone oxidation reaction was then a combination of direct and indirect reactions with molecular ozone and OH• radicals, respectively. In these previous experiments and after ozone injection, samples were collected for ozone residual analysis following the method previously described. Moreover, for *p*CBA analysis, a sub-sample of 2 mL was collected and analyzed using the HPLC system. Initial ozone demand was measured as the difference between the ozone dosage and the ozone residual after  $\sim 10$  s. Initial ozone demand ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) was then converted in percentage of the ozone dosage for subsequent comparison between ozone experiments.

### **6.3.7 Determination of rate constants for the reaction with molecular ozone**

The value of the rate constant with molecular ozone was determined in buffered ultrapure water at pH 8.10 and at ambient pH in natural water, in the presence of *tert*-butanol as hydroxyl radical scavenger. <sup>33</sup> reported that the kinetics of ozone reactions with organic and inorganic compounds is typically second order, i.e. first order both with ozone and the contaminant concentration. The degradation of cytostatics with molecular ozone can be described by:

$$-\frac{d[CD]}{dt} = k_{O_3}[O_3][CD] \quad (6-1)$$

where CD = target cytostatic drug and  $k_{O_3}$  = reaction rate constant with molecular ozone.

The rate constant is obtained from the integration of Eq. (6-2):

$$\ln\left(\frac{[CD]_t}{[CD]_0}\right) = -k_{O_3} \int_0^t [O_3] dt \quad (6-2)$$

where  $\int [O_3] dt$  is the time-integrated ozone concentration.

The time-integrated ozone concentration defines an ozone exposure CT (concentration x contact time). In this study, CT values ( $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were calculated using the integrated CT concept<sup>46</sup>, for which the effective CT at time  $t$  (min) is equal to the area under the decay curve at that time. CT values were calculated using the ozone concentration profiles (Eq. 3) assuming a simple first-order decay:

$$CT_{\text{effective}} = \int C(t) \cdot dt = \frac{C_o}{k'} [1 - \exp(-k' \cdot t)] \quad (6-3)$$

where  $C$ =ozone residual ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ );  $C_o$ =initial ozone residual ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) determined from the exponential fit of the relation between the ozone residual and the time (min) and  $k'$  = ozone first-order decay constant ( $\text{min}^{-1}$ ). CT values in  $\text{mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$  were converted in M.s for a subsequent comparison of reaction kinetics ( $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) with data from the literature.

### 6.3. 8 Reaction kinetics with OH• radicals

A competition kinetics method was used to determine the second-order rate constants for the reaction between the cytostatic drugs and hydroxyl radicals ( $k_{OH}$ ). The rate constants were calculated by following the concentration of an OH•-probe compound, which can indirectly provide the concentration of OH• radicals during the ozonation process following the *p*CBA method<sup>47</sup>. Final integration of data yields:



$$\ln\left(\frac{[CD]_t}{[CD]_0}\right) = -(k_{OH}R_{ct} + k_{O_3})\int_0^t [O_3]dt \quad (6-4)$$

Where  $k_{OH}$  and  $k_{O_3}$  are the second-order rate constants for the reactions of cytostatic drugs  $CD$  with  $OH\cdot$  and  $O_3$ , respectively. Ozone exposure (CT value) was calculated as described in section 3.7.

### 6.3.9 Data analysis

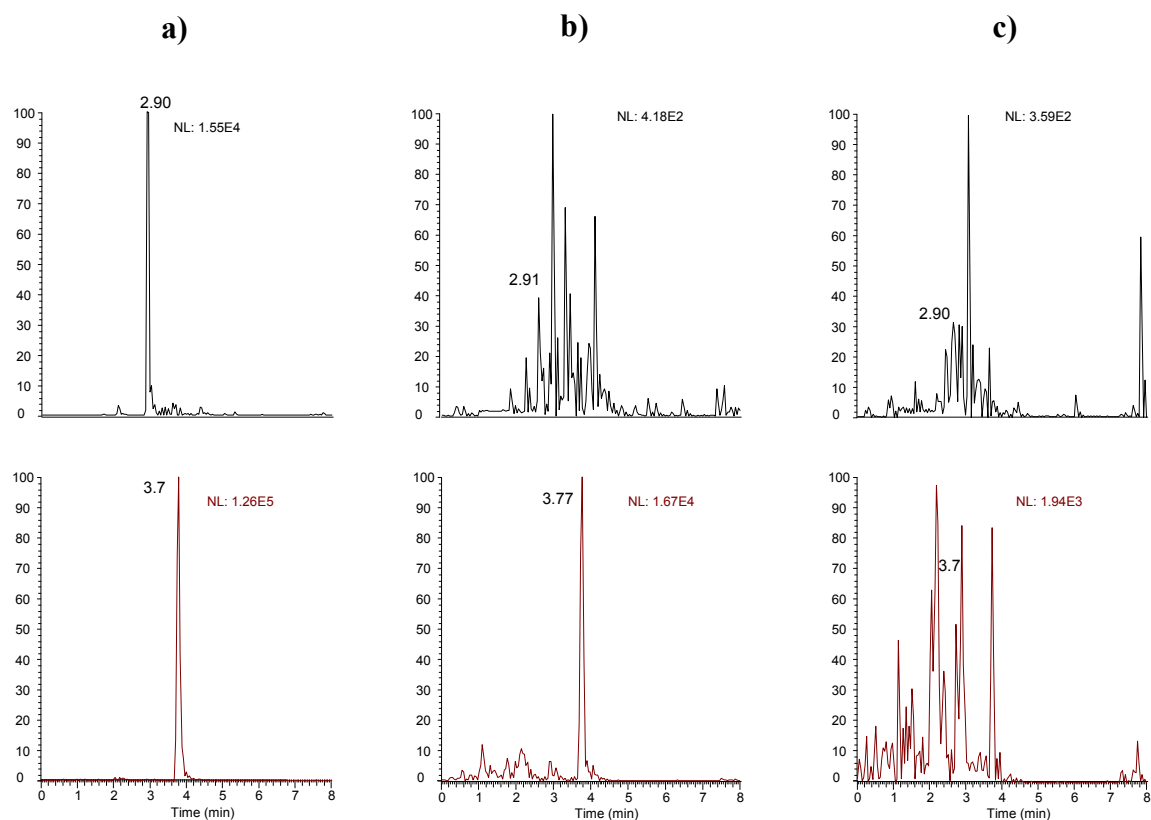
The results were analyzed using Statistica software version 7.1<sup>48</sup>. Unless otherwise mentioned, standard deviations are used to characterize the uncertainty in kinetic constants and statistical significance was set at  $p = 0.05$ .

## 6.4 Results and discussion

### 6.4.1 Analytical determination of the chemotherapy drugs

The normalized selected reaction monitoring (SRM) chromatograms for a DWTP natural water sample spiked with methotrexate and cyclophosphamide is illustrated in **Figure 6.1**. **Figure 6.1a** illustrates the good separation of both analytes in an initial solution spiked with  $200 \text{ ng.L}^{-1}$ . Since the analysis was conducted using SRM, quantification of each specified ion was not subjected to interferences from the others. After two minutes of reaction with a  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  ozone dosage, methotrexate practically disappeared (97% conversion), while for cyclophosphamide a small peak was still observed equivalent to a removal rate of 87% (**Figure 6.1b**). **Figure 6.1c** shows a chromatogram of the same sample taken at 30 minutes of reaction time. At this time, none of the two compounds were detected taking into account the detection limit of the method of determination of the compounds. From those chromatograms, methotrexate was easier to oxidize than

cyclophosphamide. To obtain accurate concentrations of the selected chemotherapy drugs, calibration curves in the range of 50 to 500 ng.L<sup>-1</sup> were established for both compounds ( $R^2 > 0.98$ , data not shown).

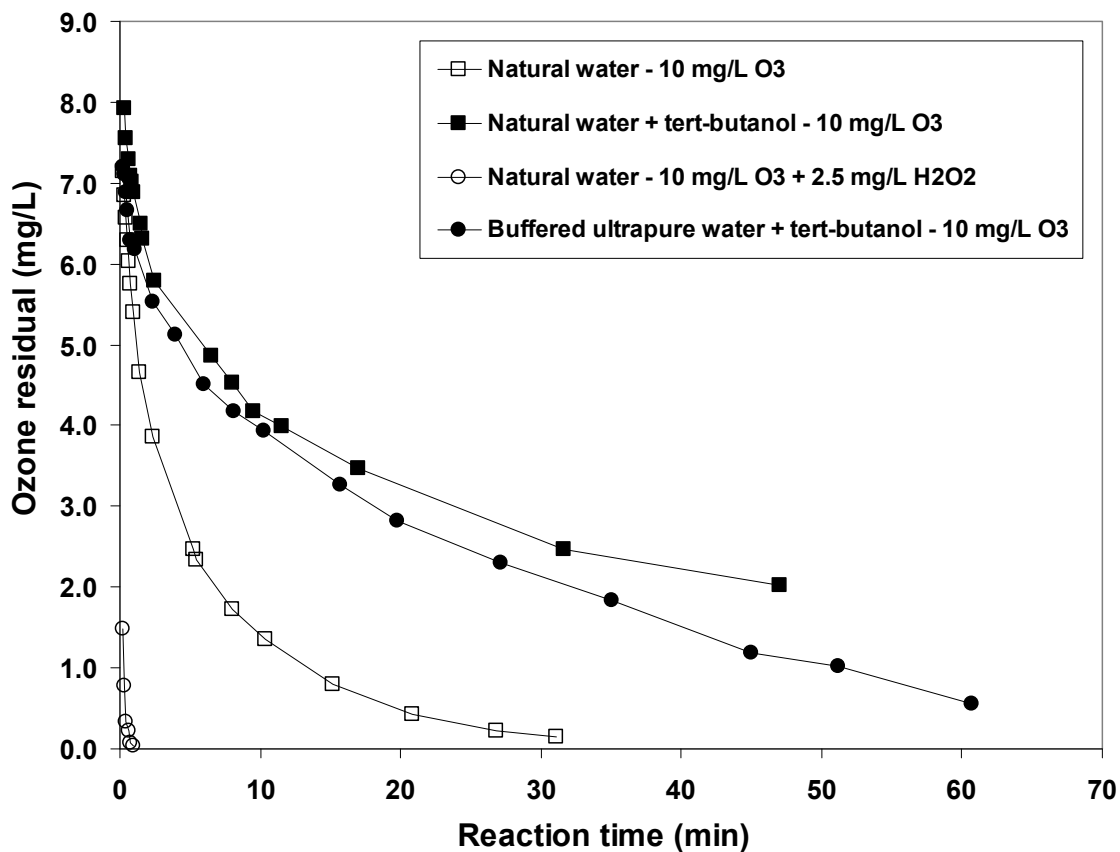


**Figure 6.1**-Chromatograms of methotrexate (upper graphs) and cyclophosphamide (lower graphs) during ozonation in natural water samples: a) Initial concentration of methotrexate and cyclophosphamide (200 ng.L<sup>-1</sup>); b) Results at 2 minutes of reaction time; c) Results at 30 minutes of reaction time (ordinate axis : relative abundance

### 6.4.2 Ozone decomposition

Examples of dissolved ozone decay curves in buffered ultrapure water (pH = 8.10) and in DWTP natural water samples are presented in Figure 6.2. Assays were performed under the following conditions: #1) natural water (10 mg O<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>), #2) natural water spiked with *tert*-butanol (10 mg O<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>), #3) natural water (10 mg O<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>) spiked with hydrogen peroxide (2.5 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) and #4) buffered ultrapure water (pH = 8.10) spiked with *tert*-butanol (10 mg O<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>). This experimental design enables the calculation of the second-order reaction rates k<sub>O<sub>3</sub></sub> and k<sub>OH</sub> in buffered ultrapure water and in natural water and the comparison of the efficacy of conventional ozonation with advanced oxidation in natural water. Ozone dosages typically used in drinking water treatment practice are lower than 1 mg O<sub>3</sub>/mg TOC <sup>49</sup>. Due to the high resistance of one of the target compounds to ozonation, high dosages were chosen in order to correctly assess second-order kinetics.

In waters spiked with *tert*-butanol, ozone was, as expected, more stable (**Figure 6.2**). Ozone stability in the natural water spiked with *tert*-butanol was slightly higher than the one in the buffered ultrapure water, which could be explained by the moderate alkalinity (80 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>) of the natural water as an additional presence of carbonate as an OH• scavenger. In natural waters free of *tert*-butanol, the impact of OH• radicals formation on ozone is clearly visible. Finally, the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.25 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mg O<sub>3</sub>) in natural water significantly accelerated ozone decomposition and no residual ozone was detected beyond 1 minute.



**Figure 6.2**-Examples of ozone residual decay for ozonation in buffered ultrapure water (pH = 8.10) and in DWTP natural water samples (pH = 8.04)

Ozone decay was modeled using a first-order kinetic ( $R^2 > 0.94$ ). During ozonation of waters spiked with *tert*-butanol, initial ozone consumption was found to be fast, followed by slower kinetics that can be fitted with first-order kinetics<sup>50</sup>. This initial rapid consumption of ozone was not observed for waters in the absence of *tert*-butanol. The initial ozone demand could have been masked by continuous autocatalytic decomposition of ozone at very high rates in the absence of a  $\text{OH}\cdot$  scavenger such as *tert*-butanol. According to Acero and von Gunten (2001), the accelerated loss of ozone in water spiked with  $\text{H}_2\text{O}_2$  could be due to the control of ozone decomposition by  $\text{HO}_2^-$  decomposition.

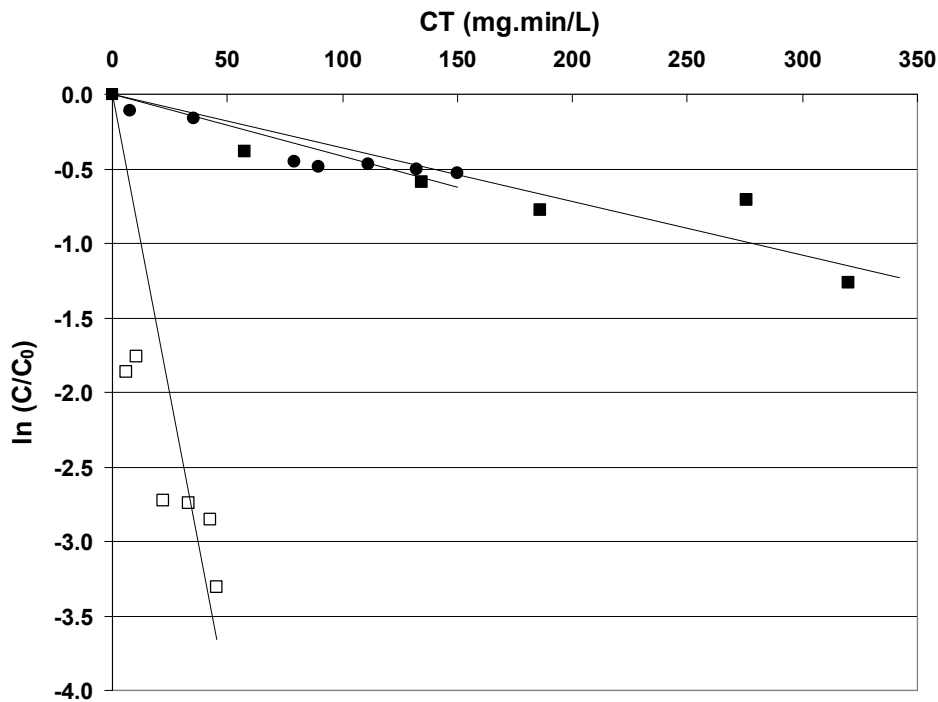
Ozone decay rates ( $k'$ ) varied over two orders of magnitude (from 0.024 to 5.15 min<sup>-1</sup>) depending on ozonation conditions. Ozone half-lives were derived from ozone decay rates. They varied from 5.5 min in natural water to 21.1 ( $\pm$  4.2) min and 26.7 ( $\pm$  3.6) min in buffered ultrapure water and in natural water both spiked with *tert*-butanol, respectively. The addition of hydrogen peroxide (0.25mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/mgO<sub>3</sub>) lowered ozone half-life to < 0.5 min. Overall, initial ozone demand varied between 33.4% and 54.4% of the ozone dosage.

### 6.4.3 Ozone oxidation of target compounds

Removal of cyclophosphamide as a function of ozone exposure (CT) is presented in **Figure 6.3**. In order to estimate the kinetic rate constant  $k_{O_3}$  for the reaction between molecular ozone and cyclophosphamide in buffered ultrapure water, *tert*-butanol was added as a scavenger to exclude the effects of OH• radicals formed due to the ozone decomposition. From these experiments, it was observed that the oxidation of cyclophosphamide was limited, therefore indicating a slow reaction between this compound and molecular ozone. The linear relationship yields a calculated rate constant of  $k_{O_3} = 3.3 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in buffered ultrapure water suggesting that molecular ozone alone would be ineffective in removing this drug unless very high ozone CT values are provided. Under typical water treatment conditions (i.e., pH ~ 6-8), molecular ozone reactions will play a minor role in the degradation mechanism of cyclophosphamide. Molecular ozone reaction is a selective process and cyclophosphamide does not contain unsaturated bonds and aromatic moieties but two electron-withdrawing groups (chloro-substituted double-bond) that lower reactivity of organic molecules toward ozone <sup>33</sup>.

There are no functional groups present in the cyclophosphamide molecule that would be expected to exhibit any more than minimal reactivity toward ozone.<sup>36</sup> observed similar trends but reported value of the second-order rate constant two orders of magnitude higher ( $143 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) than the rate constant calculated in this study. The applied ozone concentration was  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  at pH 7.1 with an initial drug concentration between 260 and  $1041 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$  while using a  $10 \text{ mM}$  concentration of *tert*-butanol. However, the temperature used during the experiments is unknown. The cause for such important difference in second-order rate constants remains unanswered at this time.

In natural water spiked with *tert*-butanol, the kinetic rate constant for the reaction between molecular ozone and the drug cyclophosphamide ( $2.9 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) was not statistically different than in buffered ultrapure water with *tert*-butanol (**Figure 6. 3**). Therefore, the reaction rates determined in ultrapure water can be applied to assess the behaviour of the target compound in natural waters exposed to molecular ozone. This result was previously demonstrated<sup>27, 34</sup>, where the authors studied the reaction of selected pharmaceuticals with ozone in natural waters. However, studies with chlorine showed faster cyanotoxins degradation rates in natural waters when compared with deionised water<sup>51, 52</sup>, tending to show that the reaction of oxidants and natural organic matter could produce more reactive species than chlorine alone. From the rate constants determined here, it can be predicted that the half-life of cyclophosphamide would have varied from 164 to 190 min with an ozone concentration of about  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  ( $21 \text{ }\mu\text{M}$ ).



**Figure 6.3**-Evolution of normalized cyclophosphamide concentration with CT value. Symbols: □ Natural water (10 mg O<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>); ■ Natural water spiked with *tert*-butanol (10 mg O<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>); ● Buffered ultrapure water spiked with *tert*-butanol (10 mg.L<sup>-1</sup> O<sub>3</sub>).

In natural water (without *tert*-butanol nor hydrogen peroxide), under which condition oxidation reaction is a combination of molecular ozone and OH• radicals reactions, the depletion of the drug was higher (**Figure 6.3**). However, a CT value of ~ 45 mg.min.L<sup>-1</sup> was required to remove 1.4 log (~ 96%) of cyclophosphamide. This result clearly demonstrated that ozonation only would not be sufficient to completely remove this drug. A CT value of approximately 1.0 mg.min.L<sup>-1</sup> is appropriate for primary disinfection of *Giardia* (1 log, T ≤ 1°C) and virus inactivation (~2 log, T ≤ 1°C) with ozone. Using ozone in buffered solutions and without *tert*-butanol, Venta et al. (2005) showed that only 4% and ~ 30% of cyclophosphamide was degraded in aqueous solutions after 6 minutes

of reaction time, at pH 7 and pH 9, respectively. The greater degradation at pH 9 was explained by the formation of OH• radicals by ozone decomposition.

Several studies have previously shown the effectiveness of combining ozone with hydrogen peroxide to enhance the oxidation of trace micropollutants<sup>53</sup>. In our experiments, when OH• radicals formation was promoted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> addition, the oxidation of cyclophosphamide was indeed very fast (**Figure 6.2**) in accordance with the results of<sup>38</sup>, who used 6 and 15 min of reaction time with a O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> molar concentration ratio of 3:1. However, it was not possible to calculate the second-order rate constant for the reaction of cyclophosphamide with OH• radicals in ultrapure water due to the limited number of ozone residual and *p*CBA data. Therefore, the kinetic rate constant for the reaction between OH• radicals and cyclophosphamide ( $k_{OH}$ ) was assessed using the ozonation experiments performed in natural water (without *tert*-butanol). The  $R_{ct}$  obtained, defined as the ratio between the OH•-radicals and molecular O<sub>3</sub> exposure, was  $7.5 \times 10^{-8}$  at ~20°C. The kinetic rate constant for the reaction between OH• radicals and cyclophosphamide was therefore calculated as  $2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .<sup>36</sup> These values fall well within the typical range of reported OH• rate constants, which vary between  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  and  $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ .<sup>32</sup>

Methotrexate reacted rapidly with molecular ozone ( $10 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ ) (data not shown) with removals exceeding 1.4 log. This drug was never detected in any ozonated water samples. Additional experiments were conducted by spiking  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of methotrexate and injecting ozone dosages  $\leq 2 \text{ mg O}_3\cdot\text{L}^{-1}$ . However, removals exceeded 2.0 log at  $0.80 \text{ mg}\cdot\text{min}\cdot\text{L}^{-1}$



( $k_{app} > 3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , where  $k_{app}$  is the apparent rate constant). Methotrexate contains amino groups, an aromatic ring and two N-containing aromatic rings, which are moieties known to quickly react with ozone. Because of the fast oxidation, it was not possible to determine the reaction rate constants with molecular ozone or OH• radicals using the same experimental methods applied for cyclophosphamide.<sup>35</sup> showed that ozonation was effective in removing methotrexate using an initial drug concentration varying between 454 and 1000 mg.L<sup>-1</sup> (pH 3.0 or 7.0, T = 25 ± 0.1°C) during semi-batch experiments. According to<sup>33</sup>, compounds that react rapidly with molecular ozone at dosages typically used for drinking water treatment have an oxidation kinetics with molecular ozone  $k_{O_3} > 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . A competition kinetics method is under development to confirm these preliminary data and determine the degradation rate using a reference compound. But still, given the fast kinetics, this compound represents less environmental and human health issues given its ease of removal.

Further research is necessary to examine the efficiency of drinking water treatment processes, and especially ozonation, to remove a range of relevant cytostatic drugs as well as their by-products and the toxicity of the ozonated mixture. As an example, an ozonation by-product of cisplatin was shown to be recalcitrant to reaction with molecular ozone<sup>37</sup>. Moreover, other studies showed the formation of persistent ozonation by-products of two antibiotics<sup>54</sup>.

## 6.5 Conclusion

The oxidation kinetics of cyclophosphamide with molecular ozone and OH• radicals were investigated at bench-scale. The second-order rate constant for direct ozone reaction with cyclophosphamide was determined as  $3.3 \pm 0.2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in ultrapure water buffered to pH 8.10. The impact of the natural water matrix on the efficacy was not statistically significant during direct ozone reaction ( $2.9 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Overall process performance was improved for cyclophosphamide in natural water, because of the combination of direct and indirect reactions pathways. The kinetic rate constant for reaction of cyclophosphamide with hydroxyl radicals was estimated at  $2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . In contrast, methotrexate reacted quickly with molecular ozone ( $k_{\text{app}} > 3.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). This study showed that ozone was very effective to oxidize methotrexate but high CT values would be required to remove cyclophosphamide in natural water matrix. The chemical structure and toxicity of the reaction by-products should be determined.

## 6.6 References

- (1) Heberer, T.; Dunnbier, U.; Reilich, C.; Stan, H. J. *Fresenius' Environmental Bulletin* **1997**, *6*, 438-443.
- (2) Mompelat, S.; Le Bot, B.; Thomas, O. *Environment International* **2009**, *35*, 803-814.
- (3) Benotti, M. J.; Trenholm, R. A.; Vanderford, B. J.; Holady, J. C.; Stanford, B. D.; Snyder, S. A. *Environmental Science and Technology* **2009**, *43*, 597-603.
- (4) Jones, O. A.; Lester, J. N.; Voulvoulis, N. *Trends in Biotechnology* **2005**, *23*, 163-167.
- (5) Snyder, S. A.; Wert, E.; Lei, H. D.; Westerhoff, P.; Yoon, Y. In *American Water Works Association Research Foundation (AWWARF)*: Denver, Colorado, USA, 2007.
- (6) Stackelberg, P. E.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T.; Zaugg, S. D.; Henderson, A. K.; Reissman, D. B. *Science of the Total Environment* **2004**, *329*, 99-113.
- (7) Clara, M.; Kreuzinger, N.; Strenn, B.; Gans, O.; Kroiss, H. *Water Research* **2005**, *39*, 97-106.
- (8) Daughton, C. G.; Ternes, T. A. *Environmental Health Perspectives* **1999**, *107*, 907-938.
- (9) Halling-Sorensen, B.; Nielsen, S. N.; Lanzky, P. F.; Ingerslev, F.; Lutzhoft, H. C. H.; Jorgensen, S. E. *Chemosphere* **1998**, *36*, 357-394.
- (10) Joss, A.; Andersen, H.; Ternes, T.; Richle, P. R.; Siegrist, H. *Environmental Science and Technology* **2004**, *38*, 3047-3055.
- (11) Segura, P. A.; Garcia-Ac, A.; Lajeunesse, A.; Ghosh, D.; Gagnon, C.; Sauve, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2007**, *9*, 307-313.
- (12) Ikehata, K.; Naghashkar, N. J.; Ei-Din, M. G. *Ozone-Science & Engineering* **2006**, *28*, 353-414.
- (13) Buerge, I. J.; Buser, H. R.; Poiger, T.; Muller, M. D. *Environmental Science and Technology* **2006**, *40*, 7242-7250.
- (14) Jolivet, J.; Cowan, K. H.; Curt, G. A.; Clendeninn, N. J.; Chabner, B. A. *New England Journal of Medicine* **1983**, *309*, 1094-1104.
- (15) Kuo, C. Y.; Wu, H. L.; Kou, H. S.; Chiou, S. S.; Wu, D. C.; Wu, S. M. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1014*, 93-101.
- (16) Johnson, A. C.; Jurgens, M. D.; Williams, R. J.; Kummerer, K.; Kortenkamp, A.; Sumpter, J. P. *Journal of Hydrology* **2008**, *348*, 167-175.
- (17) Kummerer, K.; Al-Ahmad, A.; Bertram, B.; Wiessler, M. *Chemosphere* **2000**, *40*, 767-773.
- (18) Lenz, K.; Hann, S.; Koellensperger, G.; Stefanka, Z.; Stinger, G.; Weissenbacher, N.; Mahnik, S. N.; Fuerhacker, M. *Science of the Total Environment* **2005**, *345*, 141-152.
- (19) Mahnik, S. N.; Lenz, K.; Weissenbacher, N.; Mader, R. M.; Fuerhacker, M. *Chemosphere* **2007**, *66*, 30-37.
- (20) Garcia-Ac, A.; Segura, P. A.; Gagnon, C.; Sauve, S. *Journal of Environmental Monitoring* **2009**, *11*, 830-838.
- (21) Kummerer, K.; StegerHartmann, T.; Meyer, M. *Water Research* **1997**, *31*, 2705-2710.

- (22) StegerHartmann, T.; Kummerer, K.; Hartmann, A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **1997**, *36*, 174-179.
- (23) Ternes, T. A.; Hirsch, R.; Mueller, J.; Haberer, K. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **1998**, *362*, 329-340.
- (24) Zuccato, E.; Calamari, D.; Natangelo, M.; Fanelli, R. *Lancet* **2000**, *355*, 1789-1790.
- (25) Aherne, G. W.; Hardcastle, A.; Nield, A. H. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1990**, *42*, 741-742.
- (26) Gagnon, C.; Lajeunesse, A.; Cejka, P.; Gagne, F.; Hausler, R. *Ozone-Science & Engineering* **2008**, *30*, 387-392.
- (27) Huber, M. M.; Gobel, A.; Joss, A.; Hermann, N.; Loffler, D.; Mc Ardell, C. S.; Ried, A.; Siegrist, H.; Ternes, T. A.; von Gunten, U. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39*, 4290-4299.
- (28) Snyder, S. A.; Wert, E. C.; Rexing, D. J.; Zegers, R. E.; Drury, D. D. *Ozone-Science & Engineering* **2006**, *28*, 445-460.
- (29) Ternes, T. A.; Meisenheimer, M.; McDowell, D.; Sacher, F.; Brauch, H. J.; Gulde, B. H.; Preuss, G.; Wilme, U.; Seibert, N. *Z. Environmental Science and Technology* **2002**, *36*, 3855-3863.
- (30) Ternes, T. A.; Stuber, J.; Herrmann, N.; McDowell, D.; Ried, A.; Kampmann, M.; Teiser, B. *Water Research* **2003**, *37*, 1976-1982.
- (31) Vieno, N. M.; Harkki, H.; Tuhkanen, T.; Kronberg, L. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 5077-5084.
- (32) Westerhoff, P.; Yoon, Y.; Snyder, S.; Wert, E. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39*, 6649-6663.
- (33) von Gunten, U. *Water Research* **2003**, *37*, 1443-1467.
- (34) Huber, M. M.; Canonica, S.; Park, G. Y.; Von Gunten, U. *Environmental Science and Technology* **2003**, *37*, 1016-1024.
- (35) Rey, R. P.; Padron, A. S.; Leon, L. G.; Pozo, M. M.; Baluja, C. *Ozone-Science & Engineering* **1999**, *21*, 69-77.
- (36) Chen, Z.; Park, G.; Herckes, P.; Westerhoff, P. *Journal of Advanced Oxidation Technologies* **2008**, *11*, 254-260.
- (37) Hernandez, C.; Ramos, Y.; Fernandez, L. A.; Ledea, O.; Bataller, M.; Veliz, E.; Besada, V.; Rosado, A. *Ozone-Science & Engineering* **2008**, *30*, 189-196.
- (38) Venta, M. B.; Castro, C. H.; Garcia, L. A. F.; Marzo, A. L.; Lorenzo, E. V.; Alvarez, C. A. *Journal of Water Supply Research and Technology-Aqua* **2005**, *54*, 403-410.
- (39) Wang, L.; Albasi, C.; Faucet-Marquis, V.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Dorandeu, C.; Marion, B.; Causserand, C. *Water Research* **2009**, *43*, 4115-4122.
- (40) Reid, T.; Yuen, A.; Catolico, M.; Carlson, R. W. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1993**, *33*, 82-84.
- (41) Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*, 6th edition ed.; W.H. Freeman & Co.: New York, 2003.
- (42) Barbieri, A.; Sabatini, L.; Indiveri, P.; Bonfiglioli, R.; Lodi, V.; Violante, F. S. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 1889-1893.

- (43) Castiglia, L.; Miraglia, N.; Pieri, M.; Genovese, G.; Simonelli, A.; Basilicata, P.; Sannolo, N.; Acampora, A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 1858-1866.
- (44) Liu, Z. F.; Chan, K. K.; Wang, J. J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 2581-2590.
- (45) Acero, J. L.; von Gunten, U. *Journal of the American Water Works Association* **2001**, *October*, 90-100.
- (46) Barbeau, B.; Desjardins, R.; Mysore, C.; Prevost, M. *Water Research* **2005**, *39*, 2024-2033.
- (47) Elovitz, M. S.; von Gunten, U. *Ozone-Science & Engineering* **1999**, *21*, 239-260.
- (48) Statistica 7.0, S., Inc., Okla., USA.
- (49) Speitel, G. E.; Symons, J. M.; Diehl, A. C.; Sorensen, H. W.; Cipparone, L. A. *Journal American Water Works Association* **1993**, *85*, 86-95.
- (50) Acero, J. L.; Von Gunten, U. *Journal American Water Works Association* **2001**, *93*, 90-100.
- (51) Daly, R. I.; Ho, L.; Brookes, J. D. *Environmental Science and Technology* **2007**, *41*, 4447-4453.
- (52) Xagorarakis, I.; Harrington, G. W.; Zulliger, K.; Zeier, B.; Krick, W.; Karner, D. A.; Standridge, J. H.; Westrick, J. *Journal of Environmental Engineering-Asce* **2006**, *132*, 818-823.
- (53) Ning, B.; Graham, N. J. D. *Journal of Environmental Engineering-Asce* **2008**, *134*, 944-953.
- (54) Radjenovic, J.; Godehardt, M.; Petrovic, M.; Hein, A.; Farre, M.; Jekel, M.; Barcelo, D. *Environmental Science and Technology* **2009**, *43*, 6808-6815.
- (55) Sanderson, H.; Thomsen, M. *Toxicology Letters* **2009**, *187*, 84-93.

---

---

## **CHAPITRE 7: Conclusions et perspectives**

---

---

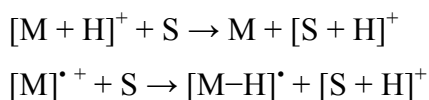
## 7.1 Conclusions

À ce jour, une stratégie efficace et durable au niveau mondial contre cette insidieuse et surtout invisible contamination des milieux aquatiques par les médicaments existe à peine. Les usines de traitement des eaux usées fonctionnent comme des barrières partielles et de grands défis demeurent. Évaluer l'impact des contaminants comme les composés pharmaceutiques dans les systèmes aquatiques est une tâche difficile nécessitant une amélioration des méthodes analytiques pour étudier la présence et la distribution de ces composés.

Ce projet rapporte le développement de méthodes analytiques pour quantifier les produits pharmaceutiques rejetés dans différents types d'eau au voisinage du fleuve Saint Laurent, tels que les eaux de surface, les eaux des effluents et l'eau du robinet. Pour ce faire nous avons développé des méthodes analytiques basées sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les deux méthodes analytiques proposées sont basées sur l'automatisation de l'extraction en phase solide, en la couplant en ligne au système de chromatographie liquide en utilisant une technique de permutation de colonnes. Cette approche est plus rapide et précise que les méthodes manuelles, puisque l'évaporation et les étapes de reconstitution sont éliminées, les erreurs de manipulation des échantillons sont donc réduites en comparativement à la méthode manuelle (*off-line*). Dans les deux méthodes proposées, la quantité d'échantillon préconcentré est minimale (1<sup>ère</sup> méthode à 1 mL et 10 mL pour la seconde), comparativement à les méthodes manuelles (> 100 mL). Avec ces volumes, les limites de détection des méthodes développées sont entre 3 et 13 ng L<sup>-1</sup>, et autour de 1 ng L<sup>-1</sup>.

Un sujet important dans l'analyse quantitative par LC-MS/MS sont les effets de matrice pouvant causer la suppression ou l'augmentation de signal. Ces effets de matrice, peuvent entraîner des erreurs importantes lors du développement des méthodes analytiques. Il a été démontré que la présence des effets de matrice peut différer entre les techniques

d'ionisation (ESI, APCI ou APPI), ou encore selon le design et la technologie utilisée par différentes sources d'ionisation. Dans la première partie de ce travail, une étude détaillée de trois sources d'ionisation API a été effectuée (**Chapitre 3**). Ces résultats ont démontré que les effets de matrice sont dépendants du mode d'ionisation (APCI, APPI ou ESI), nous avons démontré que l'APCI et l'APPI sont plus sensibles aux effets de matrice que le mode ESI. La source APPI a présenté une suppression élevée d'ions pour ENA et BEZ. Selon le principe de photoionisation, l'APPI ne devrait pas être soumis à des mécanismes d'interférence dans l'ionisation des analytes. Toutefois, la suppression d'ions pourrait se produire par transfert de proton de l'analyte ionisé à d'autres molécules présentes dans la source (tels que le solvant, les composés de la matrice ou endogènes). Si certaines des "autres molécules" ont des valeurs plus élevées d'affinité protonique, elles pourraient opérer par transfert de proton à travers deux mécanismes possibles:



Les avantages de la source ESI sur APPI et APCI sont énormes dans la détermination des composés cibles dans les eaux usées. En présence d'une matrice complexe telles que retrouvées dans les échantillons d'eaux usées, le signal d'ESI était d'environ 80% plus élevé que le signal d'APCI et APPI. ESI a montré de meilleures limites de détection, aires de pic et des ratios S/N plus favorables.

Comme on a observé dans la détection par spectrométrie de masse, le choix de la source d'ionisation est important pour obtenir la méthode la plus sensible pour la quantification. Après l'évaluation de la performance des sources et en utilisant la source d'ionisation ESI, dans le **chapitre 4**, une première méthode SPE couplée LC-MS/MS a été développée et mis en marche. Avec cette méthode, le bézafibrate et l'énalapril ont été détectés dans l'effluent ciblé de la station d'épuration de la ville de Montréal.

La procédure mise au point a permis la quantification simultanée des cinq composés cibles avec fonctionnalités et propriétés physico-chimiques différentes en utilisant



seulement 1,0 ml de l'échantillon et un temps d'analyse total de 15 min. Nous concluons que le traitement physico-chimique basé sur les processus de floculation ne permet qu'une efficacité d'abattement faible que les effluents représentent une source importante de libération de ces composés dans l'environnement. L'énalapril et le bézafibrate ont été détectés dans les eaux de surface sur un site à proximité immédiate de la décharge de la station d'épuration. Nous concluons que la très forte dilution semble être l'explication principale de la baisse des concentrations de composés présents dans les eaux de surface du fleuve Saint-Laurent.

En raison des limites de détection (effluents entre 9-20 ng L<sup>-1</sup> et 3-15 ng L<sup>-1</sup> pour l'eau MQ), la méthode proposée est bien adaptée pour un dépistage de routine des eaux usées, mais pas pour des échantillons d'eau propre. Ce résultats ont motivés le développement d'une deuxième méthode analytique plus sensible capable de détecter des traces dans les gammes de concentrations telles que celles trouvées dans les eaux naturelles et potables.

Afin d'explorer plus profondément la présence des composés pharmaceutiques dans des échantillons différents que les eaux usées, nous avons développé une deuxième méthode analytique avec un plus grand volume d'échantillon injecté de 10 mL (**chapitre 5**). L'estimation du volume de fuite  $V_b'$  a été faite pour différentes colonnes. La colonne Strata-X (copolymère de styrène-divinylbenzène) été la meilleure candidate pour la préconcentration de grands volumes d'échantillons. Avec la charge d'un volume d'échantillon supérieur dans la colonne SPE, l'amélioration des limites de détection et des effets de matrice à été un succès. La préconcentration de 10 mL d'échantillon réduit les limites de détection par un facteur de 1,7 à 20 par rapport aux méthodes précédentes en utilisant 1 ml.

Bien que la méthode de détection par spectrométrie de masse puisse être considérée comme une méthode très sélective, la présence de faux positifs demeure possible, surtout lors de l'analyse d'échantillons relativement sales. Dans ce même chapitre, nous avons utilisé d'autres outils comme alternatives de confirmation, tels que la mesure des masses exactes par TOF-MS (spectrométrie de masse à temps de vol ) et les spectres des ions

produits utilisant une pente d'énergie de collision inverse dans un spectromètre de masse à triple quadripôle (RER "data dependent scan"). L'utilisation d'un analyseur de masse TOF-MS a permis la confirmation de 6 des 14 analytes dans un échantillon dopé à 50 ng L<sup>-1</sup>. Malheureusement, la faible sensibilité de cet instrument est une limitation pour les applications dans le domaine de l'environnement. Néanmoins, ce travail a montré les possibilités qualitatives de la spectrométrie de masse à temps de vol dans l'analyse des résidus de produits pharmaceutiques dans des matrices complexes.

Les spectres de masse d'ions produits ont été aussi recueillis en utilisant le mode RER dans le triple quadripôle. Ces spectres de masse ont été utilisés pour confirmer la présence de certains composés en les comparant avec les spectres de masse de standards de référence. Cette technique fonctionne bien dans l'eau de surface à des concentrations qu'on peut observer dans l'environnement. Néanmoins, les performances de cette technique sont gênées par la présence des composés de co-élution ayant des ratios m/z similaires à l'ion précurseur.

Avec les deux méthodes analytiques développées nous avons démontré que des composés pharmaceutiques sont présents dans le milieu aquatique, mais plus d'études sont nécessaires pour évaluer leurs rejets ou caractériser leur élimination dans les eaux destinées à la réutilisation directe ou indirecte. Dans la dernière partie de cette thèse la cinétique d'oxydation de la cyclophosphamide et du méthotrexate avec l'ozone moléculaire et des radicaux OH a été étudiée à l'échelle du laboratoire dans des échantillons d'eau ultrapure et d'eau naturelle (**chapitre 6**).

La présence potentielle d'agents cytostatiques dans les eaux de surface souligne la nécessité de vérifier l'efficacité des procédés du traitement de l'eau potable pour éliminer ces composés. Parmi les traitements biologiques, physiques et chimiques, l'oxydation chimique en utilisant traitements d'ozone a démontré son efficacité pour un large spectre de micropolluants organiques. Avec les résultats de ce chapitre nous avons pu observer que l'impact de la qualité de l'eau naturelle sur l'efficacité d'oxydation n'a pas été significative au cours de la réaction directe avec l'ozone. La constante cinétique de la

réaction de la cyclophosphamide avec l'ozone moléculaire a été estimée ( $k_{O_3} = 3.3 \pm 0.2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). En revanche, le méthotrexate a réagi rapidement avec l'ozone moléculaire ( $K_{O_3} > 3,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Cette étude a montré que l'ozone est très efficace pour oxyder le méthotrexate mais qu'il présente une efficacité limitée pour l'élimination des pharmaceutiques tels que la cyclophosphamide. Des valeurs très élevées de temps de contact seraient nécessaires pour éliminer la cyclophosphamide dans les eaux naturelles de la matrice, le résultat net étant que cette approche ne serait pas praticable pour le traitement de l'eau potable à l'échelle réelle d'une usine.

## 7.2 Perspectives

Il y a plusieurs facteurs importants qui devront être étudiés dans un proche avenir pour mieux la problématique des pharmaceutiques dans l'environnement, et plus particulièrement pour les agents de chimiothérapie: 1) le manque d'information concernant l'occurrence et le devenir des pharmaceutiques, particulièrement des cytostatiques dans le milieu aquatique et les organismes aquatiques exposés, 2) l'identification des produits d'oxydation et autres sous-produits de transformations possibles lors du traitement et dans l'environnement, 3) évaluer les impacts au niveau de l'écotoxicité sur les organismes des milieux exposés et, 4) estimer les risques pour la santé humaine de l'exposition chronique à des traces d'une multitude de ces composés dans l'eau potable.

En raison de l'activité biologique des produits pharmaceutiques, il y a un risque de bioaccumulation et d'effets d'une exposition chronique dans les organismes non-cibles. Une minorité des études précédentes ont été menées sur les organismes aquatiques, et seulement quelques études ont examiné les effets potentiels des rejets de cytostatiques sur les écosystèmes. La bio-concentration des composés cibles pourrait être quantifiée chez les moules par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Les moules sont à risque élevé d'exposition à ce type de contamination, car ils vivent à l'interface eau-sédiment et ils filtrent de grands volumes d'eau, y compris les matières en suspension

et les colloïdes. La quantification de substances pharmaceutiques dans les tissus de tels organismes filtreurs pourraient montrer une bioconcentration considérable par rapport à l'eau du milieu d'exposition.

Un autre aspect important est le moyen d'élimination de ces produits pharmaceutiques. L'ozonation est une option viable pour l'élimination de plusieurs composés pharmaceutiques mais pas tous. Il faut aussi obtenir plus d'informations sur la formation des sous-produits de l'ozonation de CYP et MTX, ainsi que l'ensemble des pharmaceutiques qui seront oxydés de la même façon

Il est donc nécessaire de continuer les études de cinétique et de formation de sous-produits des médicaments cytostatiques, tels que le MTX et CYP au cours des réactions avec l'ozone et les radicaux OH. Par exemple l'ozone réagit rapidement avec le MTX, ce qui pourrait donner plusieurs produits d'ozonation. Actuellement, il n'existe pas de données disponibles sur les structures des nouveaux produits d'oxydation générés (qu'on ne saurait identifier dans la majorité des cas). Ils pourraient possiblement être élucidés à l'aide d'une combinaison de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire (RMN). Le développement d'un modèle cinétique, y compris l'ozone et les réactions des radicaux OH permettrait une meilleure estimation de la distribution des produits en fonction du temps lors de l'ozonation des eaux brutes.