

## Recherche de dérivés conjugués de médicaments dans l'eau de surface et en cours de potabilisation Search for Conjugated Drug Metabolites in Surface Water and During Drinking Water Treatment

Léa Bazus, Nicolas Cimetiere, Laurent Legentil, Guy Randon and Dominique Wolbert

Volume 28, Number 1, 2015

URI: <https://id.erudit.org/iderudit/1030003ar>

DOI: <https://doi.org/10.7202/1030003ar>

[See table of contents](#)

Publisher(s)

Université du Québec - INRS-Eau, Terre et Environnement (INRS-ETE)

ISSN

1718-8598 (digital)

[Explore this journal](#)

Cite this article

Bazus, L., Cimetiere, N., Legentil, L., Randon, G. & Wolbert, D. (2015). Recherche de dérivés conjugués de médicaments dans l'eau de surface et en cours de potabilisation. *Revue des sciences de l'eau / Journal of Water Science*, 28(1), 19–25. <https://doi.org/10.7202/1030003ar>

Article abstract

Pharmaceuticals for human or veterinary use are found, by various means, in aquatic environments and particularly in drinking water treatment plants. Pharmaceuticals are partially metabolized after ingestion (the percentage depends on the parent drug and falls between 1 and 99%), and consequently pharmaceuticals can be found in drinking water at concentrations ranging from the  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  to hundreds of  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Different types of metabolites exist, among them conjugates that can represent up to 90% of the released metabolites of a pharmaceutical. The present work describes the development of an analytical method using "on-line Solid Phase Extraction" (SPE) - high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the determination and quantification of the active substances and their conjugates in surface waters and during drinking water treatment. These conjugates may be subjected to a deconjugation during treatment, resulting in the release of the parent pharmaceutical. Hence, it is necessary to focus on these molecules and in particular on the glucuronide conjugates. As all standards are not commercially available, a new synthetic route in an aqueous medium has been explored. Analyses are performed on the input and output of drinking water treatment plants to determine the concentrations of parent drugs and their conjugates. The obtained limits of detection and quantification are in the order of 1 to 10  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

# RECHERCHE DE DÉRIVÉS CONJUGUÉS DE MÉDICAMENTS DANS L'EAU DE SURFACE ET EN COURS DE POTABILISATION

*Search for conjugated drug metabolites in surface water and during drinking water treatment*

---

Léa BAZUS<sup>1,2\*</sup>, Nicolas CIMETIERE<sup>1,2</sup>, Laurent LEGENTIL<sup>1,2</sup>, Gny RANDON<sup>3</sup>, Dominique WOLBERT<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, CNRS, UMR 6226, Avenue du Général Leclerc, CS 50837, 35708 Rennes Cedex 7, France

<sup>2</sup>Université Européenne de Bretagne, 5, Boulevard Laënnec, 35000 Rennes, France.

<sup>3</sup>VEOLIA EAU, Direction Technique Région Centre Ouest, 8, Allée Adolphe Bobierre, TSA 12007, 35020 Rennes, Cedex 9, France.

Reçu le 25 novembre 2014, accepté le 16 janvier 2015

---

## RÉSUMÉ

Les médicaments à usage humain ou vétérinaire se retrouvent, par différents moyens, dans les milieux aquatiques et notamment dans les filières de potabilisation des eaux. Les médicaments sont en partie métabolisés après ingestion (le pourcentage dépend du principe actif et est compris entre 1 et 99 %). Des médicaments se retrouvent alors dans les eaux destinées à la consommation humaine avec des concentrations allant du ng/L à la centaine de ng/L. Différents types de métabolites existent, et parmi eux les dérivés conjugués. Ils peuvent représenter 90 % des métabolites d'un principe actif. Le travail présenté ici décrit le développement d'une méthode analytique par « Solid Phase Extraction » (SPE) en ligne – chromatographie liquide haute performance – spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour la détermination et la quantification de principes actifs et leurs dérivés conjugués dans les eaux de surface et en cours de potabilisation. Ces dérivés conjugués sont susceptibles de subir une déconjugaison lors des traitements de potabilisation conduisant au relargage du principe actif. C'est pourquoi il est nécessaire de s'intéresser à ces molécules et en particulier les conjugués glucuronides. Comme tous les standards ne se sont pas disponibles dans le

commerce, une nouvelle voie de synthèse en milieu aqueux a été explorée. Des analyses sont effectuées en entrée et sortie de filière de potabilisation d'eau afin de déterminer les concentrations présentes en principes actifs et leurs dérivés conjugués. Les limites de détection et de quantification obtenues sont de l'ordre du ng/L ou la dizaine de ng/L.

**Mots-clés :** *Médicaments, dérivés conjugués, SPE-LC-MS/MS, eau de surface, eau en cours de potabilisation*

## ABSTRACT

Pharmaceuticals for human or veterinary use are found, by various means, in aquatic environments and particularly in drinking water treatment plants. Pharmaceuticals are partially metabolized after ingestion (the percentage depends on the parent drug and falls between 1 and 99%), and consequently pharmaceuticals can be found in drinking water at concentrations ranging from the ng·L<sup>-1</sup> to hundreds of ng·L<sup>-1</sup>. Different types of metabolites exist, among them conjugates

that can represent up to 90% of the released metabolites of a pharmaceutical. The present work describes the development of an analytical method using "on-line Solid Phase Extraction" (SPE) - high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the determination and quantification of the active substances and their conjugates in surface waters and during drinking water treatment. These conjugates may be subjected to a deconjugation during treatment, resulting in the release of the parent pharmaceutical. Hence, it is necessary to focus on these molecules and in particular on the glucuronide conjugates. As all standards are not commercially available, a new synthetic route in an aqueous medium has been explored. Analyses are performed on the input and output of drinking water treatment plants to determine the concentrations of parent drugs and their conjugates. The obtained limits of detection and quantification are in the order of 1 to 10 ng·L<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Pharmaceuticals, conjugated metabolite, SPE-LC-MS/MS, surface water, drinking water treatment*

## 1. INTRODUCTION

La forte consommation de médicaments à usage humain ou vétérinaire conduit inévitablement à leur présence dans les milieux aquatiques et par la suite dans les filières de production d'eau destinée à la consommation humaine (MIEGE *et al.*, 2009). En effet, après l'ingestion par les patients, les médicaments sont excrétés soit en l'état, soit en partie métabolisés, puis se retrouvent dans le milieu environnemental via les réseaux d'assainissement. Le taux de métabolisation, la nature des métabolites et les performances d'élimination des stations d'épuration envers ces composés sont très variables et dépendent du principe actif (COLLODO *et al.*, 2014).

Différents types de métabolites existent, et parmi eux les dérivés conjugués. Même si ces composés peuvent représenter 90 % des métabolites d'une molécule mère (Vidal 2013), la présence et le devenir de ces dérivés dans les eaux en cours de potabilisation ne sont que peu étudiés. À l'inverse, d'autres formes de métabolites résultant d'une modification irréversible de la molécule, les dérivés conjugués, peuvent subir une déconjugaison lors des traitements de potabilisation libérant à nouveau le principe actif. C'est pourquoi il est nécessaire de s'intéresser à ces molécules et en particulier les conjugués glucuronides. Des développements analytiques ont déjà été menés pour certaines de ces molécules dans le plasma ou les urines (TONOLI *et al.*, 2012 ; WANG *et al.*, 2012). Pour notre étude, une liste de dérivés conjugués a été établie en fonction du pourcentage de métabolisation de la molécule mère et des probabilités d'occurrence dans les eaux. Cette liste est constituée des sept médicaments et leurs dérivés glucuronides

associés (oxazepam, paracétamol, ibuprofène, kétoprofène, diclofenac, gemfibrozil, acide salicylique). Afin de permettre leurs quantifications, certains standards non disponibles commercialement ont dû être synthétisés. Une nouvelle voie de synthèse en milieu aqueux a été explorée. Cette communication ne présente les résultats que pour deux d'entre eux, l'oxazepam et le paracétamol.

Les méthodes analytiques utilisées pour la quantification des médicaments dans les eaux sont souvent réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, LC-MS/MS (CASTIGLIONI *et al.*, 2005 ; GROS *et al.*, 2012). La technique de SPE « on-line » est de plus en plus utilisée pour ces études (IDDER *et al.*, 2013; LOPEZ-SERNA *et al.*, 2010).

Une méthode d'extraction et une technique analytique performante, « on line SPE »-LC-MS/MS, a été développée pour quantifier ces principes actifs et métabolites glucuronides dans les eaux de surface et en cours de potabilisation. Cette étude devra à terme pouvoir évaluer les performances des filières pour l'élimination des formes conjuguées et le risque de libération de principes actifs dans les eaux destinées à la consommation humaine.

## 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 2.1 Produits chimiques et solvants

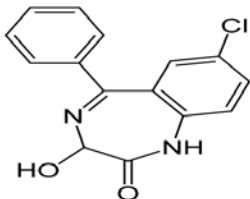
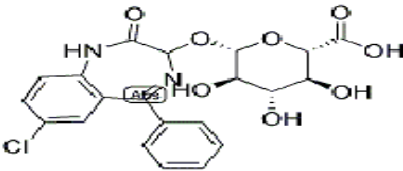
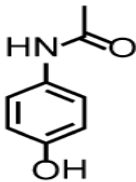
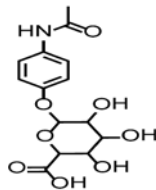
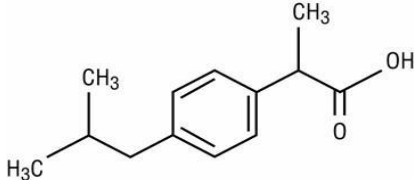
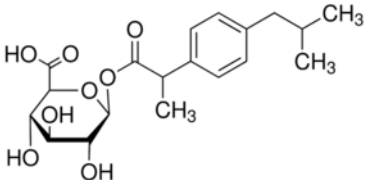
Les principes actifs et les deux métabolites glucuronides disponibles ont été achetés chez Sigma-Aldrich (France) sous forme de poudre. Le **tableau 1** montre leurs formules développées. Des solutions mères ont été réalisées à 500 mg/L pour chaque composé dans du méthanol et stockées à -20 °C.

Les solvants utilisés pour la partie SPE et LC sont les suivants : l'eau Ultra-Pure (EUP) est produite par un système ElgaPureLab (18.2 MW.cm). L'acétonitrile (ACN), avec le cas échéant 0.1 % d'acide formique (AF), et du méthanol pour LC-MS de marque JT Baker.

### 2.2 SPE "on-line"-LC-MS/MS

Le système analytique consiste en un système SPE « on-line » développé par Waters et constitué d'un passeur d'échantillon 2777, d'une pompe quaternaire (Acquity BSM) et de deux colonnes Oasis HLB dont le fonctionnement en parallèle est assuré par deux vannes Everflow six positions (Waters). La partie chromatographie liquide haute performance (Acquity, Waters) est équipée d'une pompe binaire, d'une

**Tableau 1. Formules développées des molécules d'intérêt et leurs conjugués glucuronides**  
**Table 1. Structural formulas of the pharmaceuticals and their glucuronide conjugates**

Classe de molécules	Molécules mères	Dérivés glucuronides
Neuroleptique	<p>Oxazepam</p> 	<p>Oxazepam-glucuronide</p> 
NSAID	<p>Paracétamol</p> 	<p>Paracetamol-glucuronide</p> 
	<p>Ibuprofène</p> 	<p>Ibuprofène-acyl-β-D-glucuronide</p> 

colonne en phase inverse de chez Waters (Acquity C18 BEH, 100 mm x 2.1 mm ID, 17 μm) et thermostatée à 45 °C.

Le spectromètre de masse (Quattro Premier ; Micromass) est réglé avec les conditions suivantes : gaz de cône (N<sub>2</sub>, 50 L/h, 120 °C), gaz de désolvatation (N<sub>2</sub>, 750 L/h, 350 °C), gaz de collision (Ar, 0.1 mL/min), tension du capillaire (3 000 V). La source d'ionisation du spectromètre de masse est un Electrospray (ESI) qui est utilisé en mode positif ou négatif en fonction des composés pharmaceutiques. Pour nos analyses, le spectromètre de masse est utilisé en mode « multiple reaction monitoring » (MRM), l'ion parent à étudier est sélectionné dans le premier quadripôle puis fragmenté dans le second qui sert de cellule de collision. Le ou les ions fils sont ensuite isolés par le troisième quadripôle avant d'être détectés par un photomultiplicateur. Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion parent et de l'ion fils ainsi qu'une très grande sensibilité.

### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Synthèse des dérivés glucuronides

Pour les essais de synthèse, deux molécules mères ont été choisies : le paracétamol et l'ibuprofène. Pour la synthèse de leurs dérivés conjugués, deux voies d'accès majeures sont pour le moment développées afin d'accéder aux paracetamol-β-D-glucopyranosiduronate et ibuprofen-β-D-glucopyranosiduronates. La première repose sur la glucuronylation du paracétamol à partir du trichloroacétimidoyl de glucuronide catalysée par un acide de Lewis. L'autre réside dans l'attaque nucléophile de la fonction acide de l'ibuprofène sur le bromure de glucuronyle afin d'introduire le lien 1β-acyle glucuronide. Concernant cette dernière synthèse, une nouvelle stratégie en milieu aqueux sera explorée. L'objectif sera i) l'acylation de l'acide glucuronique

à l'aide d'un bio-catalyseur (lipase) ii) le couplage en milieu aqueux du glucuronate sur l'ibuprofène. L'objectif commun de ces approches est l'économie d'atome et la minimisation des solvants organiques. Les formules développées des principes actifs et de leurs conjugués sont représentées.

### 3.2 Analyses en SPE "on-line"-LC-MS/MS

Dans un premier temps, pour détecter et quantifier le paracétamol, l'oxazepam et leurs dérivés glucuronides, un gradient d'élution a été choisi partant à 90 % d'EUP et 10 % ACN pour arriver à 90 % ACN et 10 % EUP. Le temps d'analyse est de 8,5 minutes pour la partie SPE et de sept minutes pour la partie séparation chromatographique.

Pour la partie détection, les transitions ion parent-ion fils de chaque composé ont été déterminées en réalisant des infusions. Cela consiste à faire passer directement dans le spectromètre de masse une solution mère d'un composé cible à 5 mg/L. Cela permet de déterminer le mode d'ionisation (positif ou négatif) et les transitions ion parent-ion fils pour la détection et la quantification. Pour la plupart des composés, deux transitions ont été choisies, une pour la quantification (la plus intense) et une pour la confirmation. La [figure 1](#) montre les chromatogrammes correspondant au paracétamol, l'oxazepam et leurs conjugués respectifs. Pour ces deux molécules, nous avons pu déterminer les limites de détection et de quantification dans l'EUP, elles sont respectivement comprises entre 2 et 5 ng/L et entre 10 et 20 ng/L respectivement.

Des études préliminaires (CIMETIÈRE *et al.*, 2013) ont montré que la prise en compte des effets de matrice est cruciale pour obtenir un résultat représentatif, ainsi la stratégie adoptée pour la quantification de nos molécules cibles est basée sur la méthode des ajouts dosés.

### 3.3. Analyses dans les eaux naturelles

Des prélèvements en entrée et sortie de six filières de production d'eau potable ont été réalisés en mai, juin et juillet 2014. De plus, le suivi de ces molécules a été réalisé après chaque étape de traitement d'une filière en juin 2014. Les moyennes des concentrations trouvées en entrée et sortie des six filières sont notées dans le [tableau 2](#). Seul l'oxazepam-glucuronide n'est pas détecté dans les eaux de surface ou destinées à la consommation humaine. Le paracétamol-glucuronide et le paracétamol sont présents en entrée et sortie des six filières avec des moyennes de concentration élevées. On constate qu'en entrée de filières les concentrations en paracétamol glucuronide sont cinq fois plus élevées que celles du paracétamol : la moyenne des concentrations en entrée de filières est de l'ordre de 90 ng/L pour le paracétamol

et de 530 ng/L pour son conjugué. En sortie de filières, le rapport entre les concentrations des deux molécules varie : les concentrations en paracétamol sont de l'ordre de 30 ng/L et de 100 ng/L pour son conjugué. Une des filières permet une élimination complète du paracétamol-glucuronide. Il faudra, dans la suite de l'étude, regarder plus précisément quelles sont les différentes étapes traitements utilisées dans chaque filière et leurs efficacités. Pour le moment seule une filière a été suivie. Celle-ci possède cinq étapes de traitement : Décantation, Réacteur CAP, Filtre à sable, Ultrafiltration et Chloration. Dans cette filière, une eau de surface subit une décantation avant d'être mélangée à de l'eau provenant de captages avec un taux de 50 %, pour ensuite poursuivre son parcours dans la filière. La [Figure 2](#) montre l'évolution des concentrations de nos quatre molécules cibles dans l'eau en cours de potabilisation. Nous constatons la présence de trois molécules sur quatre en entrée de filière. La concentration en paracétamol-glucuronide est élevée : 605 ng/L. En sortie de filière, le paracétamol et son conjugué sont présents avec des concentrations respectivement de 50 ng/L et 190 ng/L. Le [tableau 3](#) donne l'efficacité d'élimination des procédés présents dans cette filière. Le réacteur CAP est le procédé le plus efficace dans cette filière pour l'élimination de nos molécules avec des pourcentages d'élimination allant jusqu'à 95 % pour l'oxazepam.

## CONCLUSION

Les premiers résultats montrent que la technique analytique SPE « on-line »-LC-MS/MS permet d'analyser et de quantifier aussi bien les principes actifs que leurs conjugués glucuronides. Les temps d'analyse sont de 8,5 min pour la partie SPE et de 7 min pour la partie chromatographique, soit 16 min. Les limites de détection et de quantification obtenues pour le paracétamol, l'oxazepam et leurs conjugués sont comprises entre 2 et 5 ng/L et entre 10 et 20 ng/L respectivement. Les premières analyses réalisées montrent la présence de molécules cibles dans les eaux de surface et les eaux destinées à la consommation humaine de six filières de potabilisation d'eau. Seul l'oxazepam-glucuronide n'est pas retrouvé dans nos échantillons. Le suivi des concentrations en molécules cible dans l'eau en cours de potabilisation dans une des filières montre que, dans cette filière, le réacteur CAP est le procédé le plus efficace. Cependant, les rendements d'élimination ne sont que d'environ 35 % pour le paracétamol et son conjugué. Les campagnes de mesures en entrée et sortie de filières et les prélèvements de l'eau en cours de potabilisation sur chaque filière de notre étude vont se poursuivre pour obtenir plus de données pour déterminer les efficacités des procédés de traitement pour l'élimination de principes actifs et de ces métabolites. Cinq autres médicaments et leurs dérivés glucuronides vont être ajoutés au protocole pour élargir la gamme des principes actifs.

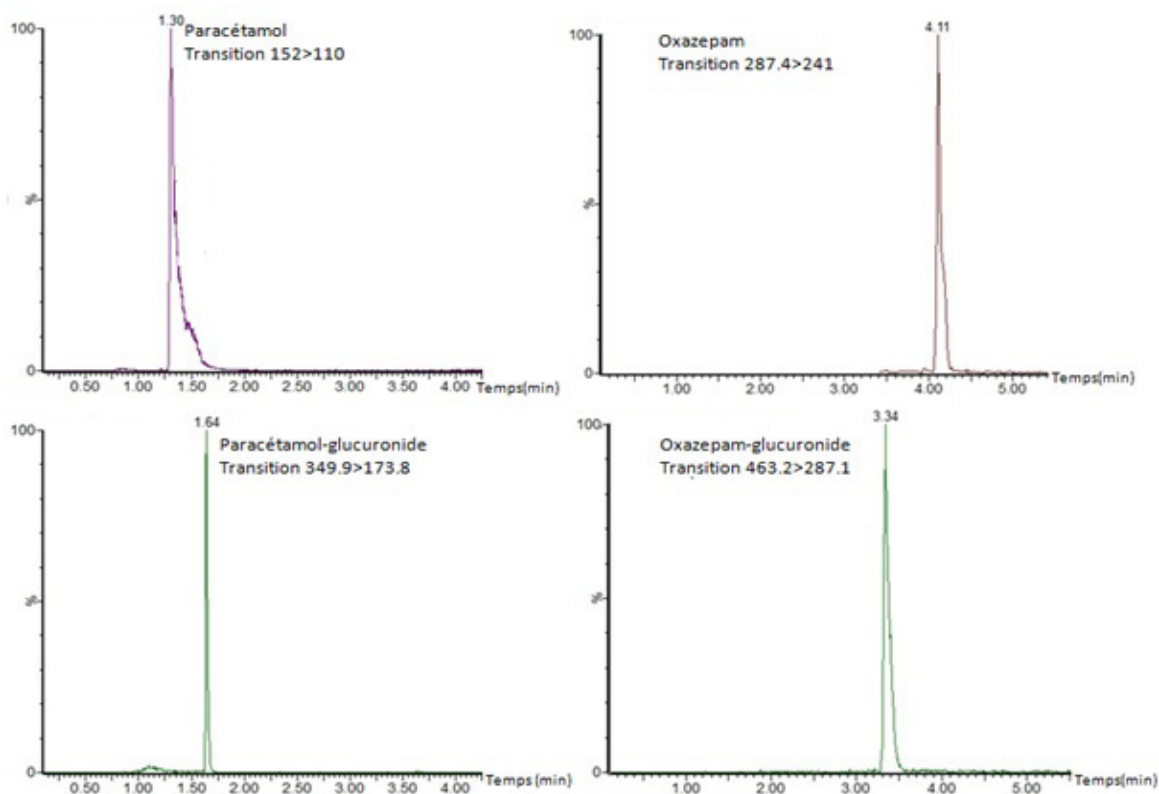


Figure 1. Chromatogrammes du paracétamol, de l'oxazepam et leurs conjugués glucuronides  
*Chromatograms of acetaminophen, oxazepam and their conjugated metabolites*

Tableau 2. Moyennes des concentrations en ng/L en paracétamol, oxazepam et leurs conjugués quantifiés en entrée et sortie de filières

Table 2. *Averages concentrations in ng/L of paracetamol, oxazepam and their conjugates in the input and output of drinking water treatment plants*

		Moyennes des concentrations par filière (ng/L)			
		Paracétamol	Paracétamol glucuronide	Oxazepam	Oxazepam glucuronide
Filière 1	entrée	77	336	37	<LOD
	Sortie	41	103	4	<LOD
Filière 2	entrée	141	601	41	<LOD
	Sortie	24	92	<LOD	<LOD
Filière 3	entrée	85	519	7	<LOD
	Sortie	29	100	<LOD	<LOD
Filière 4	entrée	70	322	<LOD	<LOD
	Sortie	39	100	<LOD	<LOD
Filière 5	entrée	96	484	<LOD	<LOD
	Sortie	11	<LOD	<LOD	<LOD
Filière 6	entrée	70	495	4	<LOD
	Sortie	33	102	<LOD	<LOD

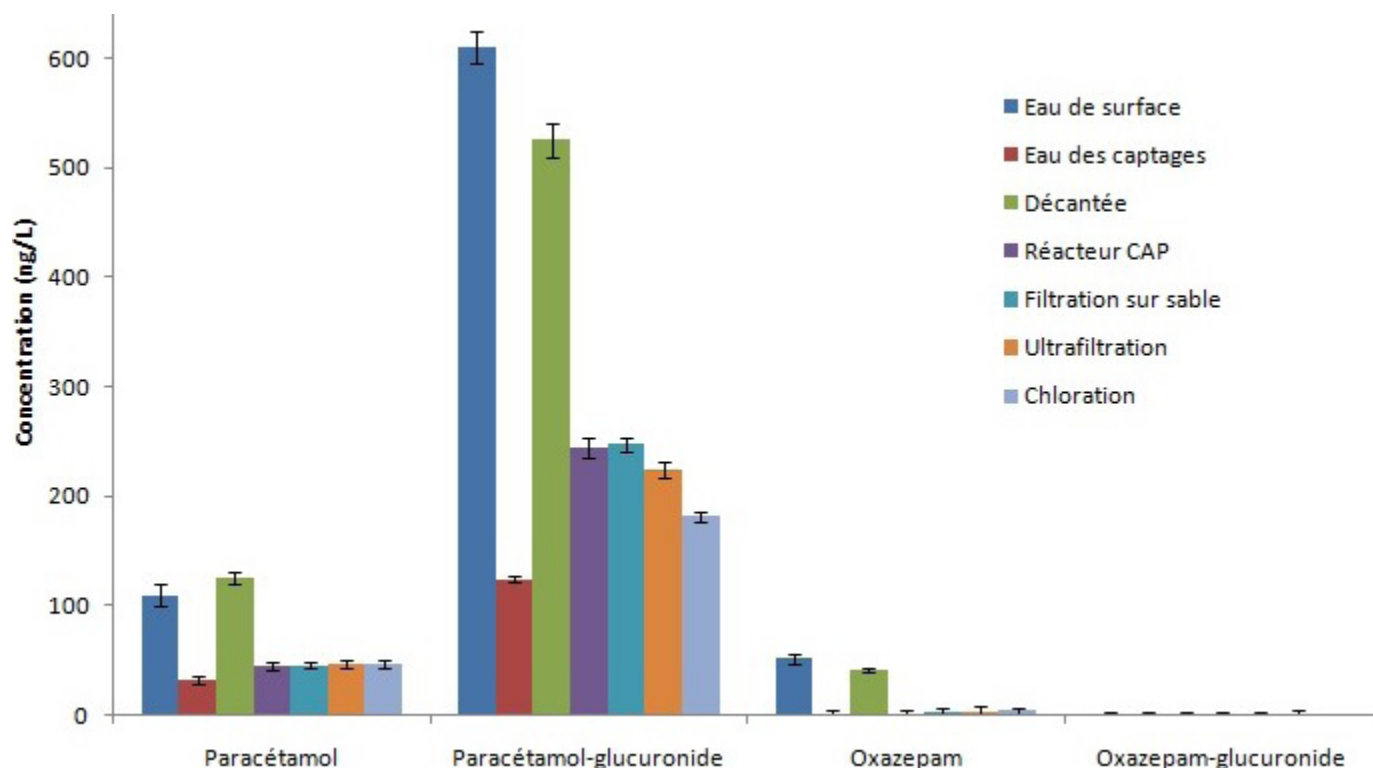


Figure 2. Concentrations en paracétamol, oxazepam et leurs conjugués après chaque traitement d'une filière de potabilisation.

*Concentrations of acetaminophen, oxazepam and their conjugated metabolites after each treatment in a drinking water treatment plant*

Tableau 3. Caractéristiques des événements pluvieux du mois d'octobre 2012.

*Table 3. Characteristics of rainfall events occurring during the month of October 2012.*

Molécules	Pourcentages d'élimination				
	Décantation	Réacteur CAP	Filtres à Sable	UltraFiltration	Chloration
Paracétamol	0	37,8	0	0	0
Paracétamol glucuronide	13,9	33,5	0	9	19,2
Oxazepam	19	95,2	100	100	100

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CASTIGLIONI, S., R. BAGNATI, D. CALAMARI, R. FANELLI et E. ZUCCATO (2005). A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A* 1092, 206-215.

CIMETIERE, N., I. SOUTREL, M. LEMASLE, A. LAPLANCHE et A. CROCQ (2013). Standard addition

method for the determination of pharmaceutical residues in drinking water by SPE-LC-MS/MS. *Environ. Technol.*, 34, 3031-3041.

COLLADO, N., S. RODRIGUEZ-MOZAZ, M. GROS, A. RUBIROLA, J. COMAS, I. RODRIGUEZ-RODA et G. BUTTIGLIERI (2014). Pharmaceuticals occurrence in a WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system. *Environ. Pollut.*, 185, 202-212.

GROS, M., S. RODRIGUEZ-MOZAZ et D. BARCELO (2012). Fast and comprehensive multi-residue analysis of a

broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1248, 104–121.

IDDER, S., L. LEY, P. MAZELLIER and H. BUDZINSKI (2013). Quantitative on-line preconcentration-liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry method for the determination of pharmaceutical compounds in water. *Anal. Chim. Acta*, 805, p.107-115.

LOPEZ-SERNA, R., S. PEREZ, A. GINEBREDA, M. PETROVIC et D. BARCELO (2010). Fully automated determination of 74 pharmaceuticals in environmental and waste waters by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 83, 410-424.

MIEGE C., J.M. CHOUBERT, L. RIBEIRO, M. EUSEBE et M. COQUERY (2009). Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environ. Pollut.*, 157, 1721–1726.

TONOLI, D., E. VAREGIO et G. HOPFGARTNER (2012). Quantification of acetaminophen and two of its metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography-low and high resolution tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 904, 42-50.

WANG, X., R. WANG, Y. ZHANG, C. LIANG, H. YE, F. CAO, Y. RAO (2012). Extending the detection window of diazepam by directly analyzing its glucuronide metabolites in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1268, 29-34.