

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES SCIENCES DE LA MER ET DE
L'AMENAGEMENT DU LITTORAL



MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Pollution Marine et Ecotoxicologie

Présenté par : **HAMADOUCHE Selma**

Thème :

Mise au point et optimisation d'une méthode d'analyse de l'Ibuprofène présent
dans l'eau

Soutenu devant le jury suivant :

- | | | |
|-----------------------------|----------------|----------------------|
| Pr. SEMROUD Rachid | : Président | (ENSSMAL) |
| Pr. BOUSSAHEL Rachdi | : Promoteur | (Professeur associé) |
| Pr. LOUANCHI Ferial | : Examinatrice | (ENSSMAL) |
| Pr. HAMDY Boualem | : Examineur | (ENSSMAL) |

Promotion : (2011)



Remerciements

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à :

-Monsieur BOUSSAHEL Rachdi Encadreur de ce mémoire de Magister pour avoir proposé un sujet d'actualité et de m'avoir guidé en me prodiguant de précieux conseils tout au long de la réalisation et de la rédaction de ce travail.

-Monsieur SEMROUD Rachid, Professeur à l'Ecole Nationale des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL). Merci d'avoir accepté la présidence du jury, cela est un grand honneur pour moi.

-Monsieur HAMDJ Boualem, Professeur à l'Ecole Nationale des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL) et Responsable de la Post-Graduation « pollution marine et écotoxicologie ». Merci d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

-Madame LOUANCHI Ferial, Professeur à l'Ecole Nationale des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL). Merci d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

J'adresse ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères à Madame MOUSSAOUI enseignante à l'Ecole Nationale Polytechnique qui a mis à ma disposition les moyens du laboratoire pour l'identification et la quantification par HPLC.

Mes remerciements vont également aux ingénieurs et techniciens de L'ENSSMAL : Mekki, Youcef, Iddalia, Fariza et Djamel.

Mes chers Parents ;

Merci pour tous les sacrifices que vous avez consentis à mon égard afin que je puisse mener à bien ces études. Vous avez su m'inculquer le sens du devoir, de la responsabilité, de l'honneur et de l'humilité. Je ne pourrais jamais vous rendre ce que vous avez fait pour moi, mais j'espère seulement que vous trouverez dans ce modeste travail, un réel motif de satisfaction.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES SCIENCES DE LA MER ET DE
L'AMENAGEMENT DU LITTORAL



MEMOIRE DE MAGISTER

Option : Pollution Marine et Ecotoxicologie

Présenté par : **HAMADOUCHE Selma**

Thème :

Mise au point et optimisation d'une méthode d'analyse de l'Ibuprofène présent
dans l'eau

Soutenu devant le jury suivant :

- | | | |
|-----------------------------|----------------|----------------------|
| Pr. SEMROUD Rachid | : Président | (ENSSMAL) |
| Pr. BOUSSAHEL Rachdi | : Promoteur | (Professeur associé) |
| Pr. LOUANCHI Ferial | : Examinatrice | (ENSSMAL) |
| Pr. HAMDY Boualem | : Examineur | (ENSSMAL) |

Promotion : (2011)



Sommaire

SOMMAIRE

<i>Introduction</i>	1
Chapitre I : Généralités	
<i>I. Médicament dans l'environnement : Source et Origine</i>	3
<i>I-1 médicament à usage humain</i>	3
<i>I.2 Médicament à usages vétérinaires</i>	3
<i>II. Résidus de médicament dans l'environnement</i>	5
<i>II.1. Résidus dans les effluents</i>	5
<i>II.2. Résidus dans les eaux de surface</i>	6
<i>II.3. Les résidus dans les sédiments et les boues d'épuration</i>	6
<i>II.4. Absorption par les plantes</i>	6
<i>III. Devenir des médicaments dans l'environnement</i>	7
<i>IV. Les dangers des résidus pharmaceutiques</i>	7
<i>IV.1 Aspect toxicologique</i>	7
<i>IV.2 Risque écotoxicologique</i>	8
<i>IV.2.1 Effets sur les humains</i>	9
<i>IV.2.2 Effets sur les organismes aquatiques</i>	9
<i>V. Méthode d'analyse des résidus de produits pharmaceutiques</i>	9
<i>V.1. Les principales étapes d'analyses des résidus pharmaceutiques</i>	11
<i>V.1.1. Le prélèvement et la conservation de l'échantillon</i>	11
<i>V.1.2. Le prétraitement de l'échantillon</i>	11
<i>V.1.2.2. Filtration de l'échantillon</i>	11
<i>V.1.2.2. L'extraction et la concentration</i>	11
<i>V.1.2.3. La purification</i>	12
<i>V.1.3. La séparation, La détection et La Quantification</i>	12
<i>V.1.4. La confirmation</i>	12
<i>VI. L'extraction en phase solide (SPE)</i>	13
<i>VI.1. Principe de la méthode</i>	13

VI.2. Les cartouches	14
VI.3. Automatisation	15
VI.4. Choix de l'adsorbant SPE	15
VI.5. Avantage de la SPE	16
VI. L'Ibuprofène	16
VI.1. Devenir de l'Ibuprofène dans l'eau	16
VI.2. Devenir dans les sols et les sédiments	18
VI.3. Devenir dans les biotes	18
VII. Toxicités chez des organismes	20
VII.4.1. Toxicité Létales	20
VII.4.2. Toxicité sublétale	20

Chapitre II

I. Matériels et méthode	22
I.1. Matériels et produits	22
I.2. Protocole expérimental	23
I.2.1. Préparation des solutions étalons	23
I.2.2. Prélèvement et conservation	23
I.2.3. Extraction de l'Ibuprofène présent dans l'eau	24
II.4. Analyse chromatographique	26
II.5. Calcul et expression des résultats	26

Chapitre III

I. Résultats et discussion	29
I.1 Validation de la méthode d'analyse de l'ibuprofène par HPLC	29
I.1.1. Limite de linéarité	30
I.1.2. Fidélité	31
I.1.3. Discussion	32
I.2. Extraction de l'ibuprofène présent dans l'eau	33
I.2.1. Extraction liquide - liquide de l'ibuprofène présent dans l'eau	33
I.2.2. Extraction en phase solide de l'ibuprofène présent dans l'eau	34
I.2.2.1. Influence du solvant d'élution	35
I.2.2.2. Influence du niveau de dopage	35

<i>I.3. Discussion</i>	36
<i>1.4. Application à des eaux réelles</i>	37
<i>Conclusion</i>	39
<i>Liste des tableaux</i>	41
<i>Liste des figures</i>	42
<i>Références bibliographiques</i>	43

Liste des acronymes, des symboles et des sigles

CE_{50, 100} Concentration avec effet sur 50 ou 100 % des individus testés

CEC Capacité d'échange cationique

CI Concentration inhibitrice

CL₅₀ Concentration létale causant la mortalité de 50 % des individus testés

CMEO Concentration minimale avec effet observé

CSEO Concentration sans effet observé

K_{oc} Coefficient de partage carbone organique-eau

K_d Coefficient d'adsorption sol-eau

K_{ow} Coefficient de partage octanol-eau

ELL Extraction liquide liquide

pH Potentiel hydrogène

pK_a Constante de dissociation acide-base

SPE Extraction en Phase Solide

Step: station d'épuration

USEPA United States Environmental Protection Agency

Introduction

Introduction

Les médicaments jouent un rôle prépondérant dans l'amélioration de la qualité et de l'espérance de vie des populations. Chaque année, des milliers de tonnes de produits pharmaceutiques sont utilisés en médecine humaine et vétérinaire pour traiter des symptômes, des maladies, des infections bactériennes, du stress ainsi que pour prévenir des grossesses et stimuler la croissance d'élevages agricoles et aquacoles. Cette utilisation à grande échelle n'a pas été sans conséquence car des études ont mis en évidence la présence de plus de 80 produits pharmaceutiques dans les eaux usées (**Pepin, 2006**). Plusieurs d'entre eux sont aujourd'hui retrouvés dans les différents compartiments de l'environnement : dans les effluents d'eau, dans les eaux souterraines à la sortie des stations d'épurations, dans les boues activées, dans les sédiments, dans les barrages, dans les eaux des rivières et les nappes phréatiques et même dans l'eau potable; car les stations d'épuration ne sont pas suffisamment équipées pour les éliminer (**Stülten et al., 2008**). Il s'agit en particulier de médicaments anticancéreux, d'antibiotiques, d'hormones féminisantes, d'antidépresseurs, antiépileptiques, et analgésiques. Certaines de ces substances se retrouvent dans l'eau potable car elles sont mal éliminées par les unités de traitement avant distribution de l'eau de boisson dans le réseau public. Il n'y a pas d'étude à ce jour associant spécifiquement la présence de ces contaminants à des maladies humaines. Toutefois, plusieurs de ces contaminants ont un effet biologique avéré sur les poissons notamment au niveau hormonal (féminisation principalement mais aussi des effets cancérigènes et d'affaiblissement du système immunitaire). Bien que la concentration dans l'eau potable de chaque médicament pris individuellement soit extrêmement faible, les mélanges de substances multiples pourraient être néfastes pour des personnes fragiles comme le fœtus, les enfants en bas âge, mais aussi les personnes immunosensibles (**Gielen et al., 2008**).

Depuis quelques années, l'impact des résidus de médicaments sur l'environnement est devenu un sujet d'intérêt public. Auparavant, leur devenir dans l'environnement a été relativement peu étudié, d'une part, les priorités ont été orientées sur d'autres micropolluants aux effets dévastateurs, tels que les pesticides ; d'autre part, les méthodes de chimie analytique n'étaient pas encore performantes pour détecter ce type de polluants. Une autre difficulté majeure est que des milliers de composés pharmaceutiques sont enregistrés dans le monde et que leur marché change chaque année.

Ils peuvent donc présenter un risque environnemental non négligeable si l'on considère les quantités potentiellement apportées au milieu aquatique et le fait qu'elles aient été fabriquées pour être biologiquement actives. C'est même une inquiétude en raison de leur toxicité directe et de leurs effets cumulatifs ou synergiques probables avec d'autres micropolluants. Certains médicaments ont des effets biologiques sur des organismes non cibles, un exemple classique étant celui de certaines hormones synthétiques sur les poissons (**Hilton, 2003 ; Kolpin, 2002**).

Une enquête effectuée au niveau des officines pharmaceutiques de la région algéroise nous a permis de collecter des informations intéressantes sur la consommation des médicaments dans notre pays. Ainsi, nous avons appris que les antalgiques sont les produits les plus consommés suivis par les antibiotiques, les anti-inflammatoires et les médicaments destinés aux maladies chroniques tels que le diabète, l'hypertension.

L'objectif de ce travail est de mettre au point une méthode d'analyses des résidus d'un médicament, l'ibuprofène, un produit analgésique et anti-inflammatoire non stéroïdien largement utilisé en médecine humaine dans notre pays.

Compte-tenu de sa présence à l'état de traces, une étape d'extraction - concentration est obligatoire avant son dosage. Deux méthodes ont été choisies, l'extraction liquide - liquide (ELL), et l'extraction en phase solide (SPE). L'identification et la quantification sont réalisées par chromatographie en phase liquide de haute performance (HPLC) avec un détecteur à barrettes de diodes.

Dans le premier chapitre, nous exposons des rappels bibliographiques sur les résidus des médicaments et leurs impacts sur l'environnement, sur le médicament-objet de cette étude (l'ibuprofène) ainsi que les techniques d'analyse les plus utilisées.

Le deuxième chapitre contient la présentation du matériel et des méthodes utilisés.

Dans le troisième chapitre, l'étude expérimentale est présentée en trois parties avec :

- Une validation de la technique chromatographique utilisée : l'HPLC avec barrettes diodes.
- une évaluation des deux méthodes d'extraction choisies : l'extraction liquide -liquide et l'extraction en phase solide.
- une application des méthodes optimisées sur des échantillons réels d'eau.

Généralités

I. Médicaments dans l'environnement : Sources et Origines

Les produits pharmaceutiques sont des contaminants très répandus dans l'environnement. Les médicaments à usage humain ou vétérinaire, sont les principales sources de contamination. Ils peuvent être excrétés sous forme de la molécule mère et / ou de ses métabolites dans l'urine et les fèces et continuellement déversés dans les eaux usées domestiques. La conception de la majorité des stations d'épuration ne permet pas leur élimination totale, ils se retrouveront indéniablement dans l'environnement en général et dans les milieux aquatiques en particulier. Le sort des résidus médicamenteux dans l'environnement dépend de leurs propriétés chimiques.

I.1. Médicament à usage humain

Lorsqu'un médicament est administré à un être humain, 50% à 90% de sa structure chimique de base est excrétée sans aucun changement. Le reste est excrété sous forme de métabolites, c'est-à-dire des sous-produits chimiques résultant de l'interaction du corps humain ou animal avec le médicament. Le taux d'excrétion de médicaments partiellement métabolisés varie avec la constitution physique des patients, la posologie et le mode d'administration. Le caractère lipophile de certains médicaments leur confère la capacité de passer à travers les membranes cellulaires et agir ainsi à l'intérieur de la cellule. Il permet également, une fois excrétés et rejetés dans le milieu naturel, de pénétrer dans la chaîne alimentaire (**Montague., 1998**).

I.2. Médicaments à usages vétérinaires

Le médicament vétérinaire concerne à la fois les animaux de compagnie et les animaux de rente, dans un but curatif, préventif ou zootechnique. Les principes actifs contenus dans les médicaments vétérinaires sont, pour leur grande majorité, également disponibles sur le marché du médicament humain ou des produits phytosanitaires : antibiotiques, antiparasitaires, médicaments régulateurs des grandes fonctions, utilisés de manière préventive ("growth promoter") ou curative pour le bétail en élevage intensif ou extensif, pour les volailles ainsi qu'en aquaculture, sous forme d'additifs à la nourriture. Certains auteurs rapportent que la majorité des antibiotiques administrés en aquaculture atteignent le milieu via la nourriture non consommée et les fèces, qui sédimentent et s'accumulent rapidement sous les systèmes de stockage des animaux (**Halling-Sorensen et al., 1998 ; Boxall., 2004 ; Babi'c et al., 2006**). A la

différence du médicament humain, les résidus de médicaments vétérinaires se retrouvent directement dans l'environnement, sans passer par l'étape des stations d'épuration ou des fosses septiques. Dans le cas de l'élevage hors sol cependant, le stockage des déjections animales peut permettre une certaine dégradation des résidus de médicaments avant qu'ils n'atteignent l'environnement.

Tableau 1: Taux d'excrétion humaine et animale de quelques médicaments (Pépin, 2006).

Médicaments		Taux d'excrétion	Références
Ibuprofène		1-8 % (h)	Ternes, 1998 ; Jjemba, 2002
		10 % (h)	Calamari et al., 2003 ; Zuccato et al., 2005
		15 % (h)	Wiegel et al., 2004
Tétracyclines	Tétracycline	80-90 % (h)	Hirsch et al., 1999
		> 70 % (h)	Jjemba, 2006
	Oxytétracycline	> 80 % (h)	Jjemba, 2002
		20 % (ag)	
		70-80 % (aq)	Delépée et al., 2004 et Rigos et al., 2004
	Chlorotétracycline	> 70 % (h)	Jjemba, 2002
		17-75 % (ag)	
		70-80 % (ag)	Délépée et al., 2004 et Rigos et al., 2004
Hormones oestrogènes	17 β -Oestradiol	60-96 % (h)	Huschek et al., 2004
		90% (ag)	Riis et Suresh, 1976
	17 α -Éthinyl oestradiol	70-80 % (h)	Okkerman et Groshart, 2001 in Pepin, 2006
		50-60 % (h)	Jjemba, 2006
		85 % (h)	Huschek et al., 2004

(h) humaine (ag) élevages agricoles (aq) élevages aquacoles

II. Résidus de médicaments dans l'environnement

La présence des résidus de médicaments ainsi que leurs métabolites dans l'environnement est en croissance. Elle a été signalée dans plusieurs études dans les milieux aquatiques. Ils ont été détectés dans les effluents de station d'épuration (STEP), dans les petites criques, les rivières (Ternes, 1998), les lacs, les eaux souterraines ou de mer (Zuccato et al., 2006 ; Poiger, 2001 in Hernando et al., 2006).

Certains médicaments aux propriétés acides et qui ont un $\log K_{oc}$ élevé, présentent une affinité pour les boues et les sols. Par exemple, les médicaments, tels que gemfibrocil ou les oestrogènes qui sont des composés hydrophobes et sont de faible volatilité, leur sorption sur le sol ou sédiments a un facteur important dans la réduction de leurs concentration dans les phases aqueuses (Hernando et al., 2006).

II.1. Résidus dans les effluents

Parmi la grande variété de résidus de médicaments signalés, les antibiotiques, les agents de régulation des lipides, anti inflammatoires, les β -bloquants, et des contraceptifs sont les plus fréquents. Les niveaux de concentration communément trouvés sont en ng.l^{-1} ou $\mu\text{g.l}^{-1}$; les concentrations les plus élevées sont celles des régulateurs lipidiques, qui se situent entre 110 et 2353 ng.l^{-1} . Des stéroïdes à des niveaux de concentrations inférieurs au ng.l^{-1} ont été détectés. Toutefois, en dépit du faible niveau de concentration, il est bien admis que les estrogènes peuvent induire des effets chroniques graves, tels que la perturbation du système endocrinien.

Les agents régulateur lipidique, analgésiques / groupe anti-inflammatoire sont un groupe thérapeutique avec une large consommation humaine, en raison de leur commune utilisation pour traiter l'inflammation, la douleur et la fièvre. Les concentrations détectées de l'ibuprofène, du naproxène, du kétoprofène ou de l'acide méfénamique, étaient généralement comprises entre 273 et 2134 ng.l^{-1} (Hernando et al., 2006).

La présence des antibiotiques dans les effluents des STEP a été également signalée dans plusieurs études. Les Sulfamides (sulfaméthoxazole), les macrolides (érythromycine, roxithromycine), les fluoroquinolones, ont été détectés à des niveaux variant entre 128 et 886 ng.l^{-1} (Hernando et al., 2006).

Les B-lactamines (y compris les pénicillines, céphalosporines carbapénèmes, monobactams), ont été aussi détectés à de faibles niveaux de concentration (**Kümmerer, 2009**).

II.2. Résidus dans les eaux de surface

De nombreuses études ont été menées pour montrer que les médicaments et leurs métabolites sont largement présents dans les eaux de surface. L'occurrence des β -Bloquants a été signalée à des niveau allant du ng.l^{-1} au $\mu\text{g.l}^{-1}$ (**Daughton et Ternes, 1999**).

Parmi les groupes des analgésiques et d'anti-inflammatoires, le diclofénac et l'ibuprofène sont les composés qui ont été le plus détectés à des niveaux de concentration élevés, généralement dans une fourchette de 68-266 ng.l^{-1} . D'autre part, la présence de la carbamazépine dans les eaux de surface (à une concentration moyenne approximativement de 460 ng.l^{-1}), peut être associée à la très faible efficacité de son élimination dans les stations d'épuration (**Hernando et al., 2006**).

II.3. Les résidus dans les sédiments et les boues d'épuration

Dans les sédiments, la plupart des résidus de médicaments retrouvés concernent les oestrogènes et les antibiotiques. Compte-tenu de leur relative faible polarité, en particulier pour les œstrogènes, leur adsorption sur les sédiments semble être un processus cumulatif. Les hormones stéroïdes généralement trouvées sont le 17 éthinyl estradiol, le diéthylstilbestrol et diéthylstilbestrol acétate. Ils ont été identifiés à un faible niveau de concentration (de l'ordre du ng.kg^{-1}) (**Hernando et al., 2006**). Certains antibiotiques à usage humain et vétérinaire en raison de leurs propriétés lipophiles, sont aussi présents dans les sédiments.

En pisciculture intensive, les infections sont traitées avec des agents antimicrobiens directement dans l'eau. Il en résulte de fortes concentrations d'antibiotiques dans les deux compartiments eau et sédiments adjacents des exploitations piscicoles (**Kümmerer, 2009**).

II.4. Absorption par les plantes

Les analyses des sols ont montré que, pour certaines substances médicamenteuses, les résidus mesurables sont susceptibles de rester dans les sols pendant au moins quelques mois après l'application d'effluents contenant ces composés. Certains antibiotiques sont absorbés par les légumes tels que les racines de carotte (tubercules), feuilles de laitue. Les cultures de maïs (*Zea mays L*), l'oignon vert (*Allium cepa L*), et le chou (*Brassica L. oleracea capitata*) absorbent la

chlortétracycline mais pas la tylosine. De faibles concentrations de chlortétracycline et de sulfaméthazine ont été signalées dans les tissus végétaux ($2-17\mu\text{g.kg}^{-1}$ poids frais), mais ces concentrations augmentent avec les quantités d'antibiotiques présents dans le fumier (**Kümmerer, 2009**).

III. Devenir des médicaments dans l'environnement

Des traces des produits pharmaceutiques ont été trouvées dans les milieux aquatiques. Certains sont dégradés naturellement par hydrolyse (**Kuehne et al., 2000**), ou par biodégradation, tandis que d'autres ont le potentiel d'être adsorbés et éliminés avec les boues (**Morrall et al., 2004, Bao et al., 2009**). D'autres composés médicamenteux persistent dans le système aqueux et sont ubiquistes (les antibiotiques, les antalgiques, anti inflammatoires non stéroïdien (AINS), les tranquillisants, les hormones, les β -bloquants, les radioéléments). Ils ont été retrouvés dans les rivières, les lacs, et les réservoir d'eau (**Golet et al., 2002**).

Les données sur les processus de dégradation dans les eaux de surface continentales sont très limitées, voire inexistantes. D'autant plus que si le comportement de sorption des molécules non ioniques peut en grande partie être expliqué par des phénomènes de liaisons hydrophobes, d'autres facteurs doivent être considérés pour évaluer le comportement des médicaments hydrophiles et ionisables. L'influence de facteurs comme la température, le pH, la salinité et le carbone organique dissous, la densité microbienne n'a pas fait l'objet de travaux approfondis (**Golet et al., 2002**).

La probabilité pour qu'un produit pharmaceutique ainsi que ses produits de dégradation atteignent les réseaux de distribution d'eau potable va dépendre de plusieurs facteurs dont principalement les quantités émises (consommation, excrétion), leur élimination dans les stations de traitement des eaux usées, leur mobilité et leur persistance dans l'environnement et leur taux d'élimination au cours des procédés de potabilisation de l'eau.

IV. Les dangers des résidus pharmaceutiques

IV.1. Aspect toxicologique

Les médicaments humains ou vétérinaires se caractérisent par des mécanismes d'action biologiques spécifiques et variés, susceptibles d'être actifs non seulement sur leur cible initiale

mais également, de manière directe ou indirecte, sur l'ensemble des organismes vivants, et en conséquence d'engendrer des réponses biologiques à tous les niveaux de l'organisation biologique (cellule, individu, population).

Les effets sont très variables et connus lors de la mise sur le marché des médicaments mais les doses rencontrées et les effets des mélanges sont particulièrement difficiles à évaluer qu'ils soient directs ou indirects via notamment la chaîne alimentaire (**Carina et al., 2006**).

En général, la littérature montre que la plupart des médicaments, dès lors de leur détection, sont dans la gamme du ng.l^{-1} ou $\mu\text{g.l}^{-1}$. Cette gamme de concentration n'induit pas des risques écologiques, mais à long terme ces faibles concentrations vont s'accumuler et se combiner à d'autres résidus induisant des additifs ou des effets synergétiques. Dans ce sens, il y a un nombre croissant de demande d'information sur la toxicité potentielle des résidus de médicaments. Cependant, il y a un manque de données concernant leurs effets sur les organismes terrestres et aquatiques.

Selon la directive 93/67/CEE de l'Union Européenne, les données de toxicité sont interprétées en fonction des classes de substance par la mesure de la concentration effective (valeur LC_{50} : limite de concentration ou CE_{50} : induisant des effets sur 50% d'une population d'une espèce) dans un régime avec des classes de différents risques. Une $\text{CE}_{50} < 1 \text{ mg.l}^{-1}$ entraînerait la classification "très toxique pour les organismes aquatiques"; de 1 à 10 mg.l^{-1} "toxiques" et de 10 à 100 mg.l^{-1} "nocif pour les organismes aquatiques". Les substances ayant une $\text{CE}_{50} > 100 \text{ mg.l}^{-1}$ ne seront pas classées (**Hernando et al., 2006**).

A des teneurs plus faibles que celles occasionnant des toxicités létales, divers médicaments peuvent aussi altérer le comportement ou la productivité biologique des organismes exposés. La subléthalité est décrite par la concentration minimale avec effet observé (CMEO), la concentration inhibitrice sur 50 % des individus testés (CI_{50}) et les concentrations avec effets sur 50 ou 100 % des individus testés ($\text{CE}_{50,100}$) (**Coillie, 2005**).

IV.2. Risque écotoxicologique

L'estimation du risque écotoxicologique que représente une substance tient compte des dangers écotoxiques ainsi que de la fréquence et du niveau d'exposition des biotes et des organismes à

cette substance. Cette estimation peut être faite selon différentes approches en fonction de la disponibilité des données et des modes d'évaluation des expositions (**Coillie, 2005**).

Les études in-vivo et in-vitro suggèrent que les faibles concentrations signalées dans l'environnement prise séparément ou en combinaisons ont des effets écotoxicologiques néfastes sur les écosystèmes (**Zuccato et al., 2006**).

IV.2.1. Effets sur les humains

Au niveau humain, aucun effet notable des résidus des médicaments dans l'environnement n'a été démontré à l'heure actuelle. Les taux de médicaments dans les eaux de surfaces sont très inférieurs à ceux qui pourraient poser un risque sur la santé humaine (**Boxall, 2004**).

IV.2.2. Effets sur les organismes aquatiques

Certains de ces composés ont des effets graves sur les organismes, comme des modifications de la croissance, de la reproduction ou du comportement. Les principaux organismes aquatiques atteints sont les mollusques, les crustacés, les amphibiens et les poissons (**KNAPPE Projet, 2008**).

V. Méthode d'analyse des résidus de produits pharmaceutiques

Le dosage des produits pharmaceutiques n'est pas une chose aisée car plusieurs molécules caractérisées par des propriétés physico-chimiques très différentes sont à rechercher dans diverses matrices (eau, sédiment, végétaux, tissus d'organismes vivants). La quantification de toutes ces substances par une seule méthode est impossible. A ceci s'ajoute le coût élevé des analyses, les exigences du dosage de trace ($\mu\text{g.l}^{-1}$ au ng.l^{-1}) et les performances analytiques en terme de limite de quantification de répétabilité et de limite de détection (**Cun, 2004**).

Les différentes techniques d'analyse des résidus pharmaceutiques les plus citées dans la littérature sont schématisées dans la figure 1 :

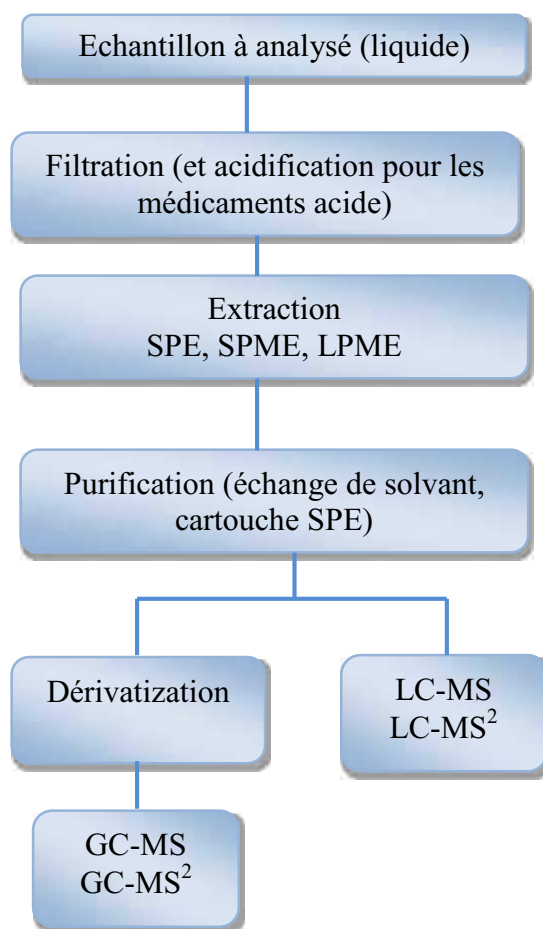


Figure 1 : procédure typique d'analyse des médicaments dans des matrices aqueuses (**Fatta et al., 2007**)

Les résidus pharmaceutiques font partie des composés complexes ; les techniques analytiques avancées (HPLC, CPG, GC-MS, GC-MS-MS, LC-MS, LC-MS- MS) sont les plus couramment utilisées pour l'analyse de ces composés pour les avantages suivants (**Kostopoulou and Nikolao., 2008**):

- Ils fournissent des informations sur la présence et la structure des différents composés.
- la séparation et la détection des composés ayant la même masse moléculaire avec des produits ioniques différents sont possibles.

Bien que les méthodes d'analyse soient multiples, les laboratoires de recherche doivent s'appuyer soit sur des méthodes normalisées, ou sur des méthodes alternatives « internes » validées (**CEAEQ, 2002**).

V.1. Les principales étapes d'analyses des résidus pharmaceutiques

La procédure d'analyse des résidus pharmaceutiques se déroule généralement en quatre étapes :

V.1.1 Le prélèvement et la conservation de l'échantillon

Le prélèvement doit être effectué dans des bouteilles en verre ambré préalablement nettoyées et préparées respectivement avec du détergent, de l'eau distillée, du solvant adéquat puis rincer trois fois avec l'échantillon à analyser et enfin prélever une quantité suffisante.

L'échantillon doit être mis à l'abri de la lumière et doit être conservé dans le réfrigérateur à une température inférieure à 4°C jusqu'à ce qu'il soit traité (Peng et al., 2006) .

V.1.2. Le prétraitement de l'échantillon

La procédure de préparation de l'échantillon est la plus importante étape pour l'analyse des composés organiques dans les matrices environnementales ; car cette étape joue un rôle fondamental et qui peut influencer sur les résultats d'analyse (par exemple : contamination de l'échantillon ou interférence avec des impuretés) (Kostopoulou and Nikolao., 2008).

V.1.2.1. Filtration des échantillons

C'est la première étape de la préparation de l'échantillon, filtration d'un volume approprié (usuellement ≤ 500 mL) à travers des filtres en verre pour se débarrasser des matières en suspension afin d'éviter la contamination de l'extraction (Kostopoulou and Nikolao., 2008).

V.1.2.2. L'extraction et la concentration

Cette étape est indispensable pour permettre la détection des faibles concentrations de polluants par une injection de solution aqueuse dans une colonne chromatographique. Les techniques les plus utilisées sont l'extraction en phase solide (SPE), la microextraction en phase solide (SPME), extraction sur soxhlet, extraction micro-ondes assistés, extraction ultrasonique assisté, extraction à vapeur et l'extraction liquide-liquide (LLE).

V.1.2.3. La purification

C'est une étape délicate mais nécessaire pour les échantillons complexes ; car elle permet la purification et l'élimination des molécules interférentes tout en évitant des pertes des substances recherchées.

V.1.3. La séparation, la détection et la quantification

C'est l'étape de l'analyse chromatographique ; cette technique peut se subdiviser en trois catégories :

- Techniques séparatives « off line » qui regroupent la chromatographie gazeuse et liquide couplée à différents détecteurs notamment le détecteur à capteur d'électron, le détecteur à azote et phosphore et la spectrométrie de masse, le détecteur UV visible et à barrettes de diodes.
- Techniques séparatives « on line » représentées par les méthodes automatiques : la connexion des appareils d'extraction « (SPE) aux instruments de séparation-détection ont été à la base des méthodes d'analyse automatisées.
- Techniques de détection rapide de balayage «screening analysis » : ce sont des méthodes rapides, réputées par leur facilité et leur faible coût, les tests rapides sont parmi les méthodes les plus intéressantes. Chaque méthode à test rapide se compose de deux étapes principales ; déroulement d'une réaction chimique colorée, suivie d'une évaluation par un système spécifique (Munoz-Olivia, 2004).

V.1.4. La confirmation

Les méthodes d'analyses se développent de plus en plus dans le domaine d'analyses des résidus de produits pharmaceutiques dans un but d'améliorer la précision et la sensibilité. Les instruments d'analyses les plus couramment utilisés pour la confirmation est la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) qui présentent l'avantage de fournir des informations

structurales, d'où la détermination possible des composés inconnus (**Kostopoulou and Nikolao., 2008**).

VI. L'extraction en phase solide (SPE)

VI.1. Principe de la méthode

C'est une méthode par laquelle un analyte d'intérêt est concentré ou séparé d'une matrice complexe sur une phase stationnaire d'adsorbant. Le composé recherché est piégé sur l'adsorbant et sa récupération se fait par l'ajout d'un solvant adéquat. La matrice interférente, non retenue, est efficacement éliminée. En conséquence, l'analyte peut être analysé dans la meilleure gamme de sensibilités possible de la technique analytique.

Le principe de la SPE est basé sur la distribution de l'analyte entre deux phases l'une solide (adsorbant) l'autre mobile (échantillon, éluant). Elle peut être assimilée à un simple processus chromatographique (**Di'az-Cruz et al., 2008**). Cette distribution est caractérisée pour chaque analyte par le coefficient de partage 'K' défini par la relation suivante :

$$K = C_s/C_m \quad (1)$$

Avec :

C_s : la concentration de l'analyte à l'équilibre dans la phase solide.

C_m : la concentration de l'analyte à l'équilibre dans la phase mobile.

Un facteur de 'K' maximal lors de l'adsorption veut dire une rétention qualitative et quantitative donc une récupération quantitative minimisée au moment de l'élution. La rétention d'analytes par la phase adsorbante dépend des interactions mises en jeu. Elles peuvent être classées en trois groupes (**Caude et Jardy, 1994**) :

- Le premier groupe correspond aux interactions apolaires qui sont caractérisées par les liaisons de Van der Waals ou forces dipolaires. Ces interactions permettent de séparer des molécules à caractère non-polaire sur des supports apolaires. Ces interactions seront facilitées en présence d'un solvant (matrice) relativement polaire : l'eau est le solvant le plus utilisé dans cette catégorie.
- Le second groupe englobe les forces dues aux liaisons d'hydrogène. Ce sont des interactions polaires caractérisées par des liaisons hydrogène, dipôle-dipôle, dipôle induit/dipôle. Ces interactions permettent de séparer des molécules dites polaires sur un

support disposant lui aussi d'un groupement polaire. Ces interactions seront favorisées par un solvant (matrice) non polaire.

- Les interactions ioniques ou électrostatiques ont lieu entre un soluté chargé (ionique) et une phase solide portant des charges opposées à celles du soluté. Deux cas d'échanges peuvent se présenter : cationique (entre charges positives) et anionique (entre charges négatives). Ces interactions sont fortement dépendantes du pH. Ces interactions sont généralement sujettes à des cinétiques relativement longues.

VI.2. Les cartouches

Ce sont des colonnes d'extractions (en polypropylène ou en verre) qui sont généralement constituées de trois parties : (1) d'un réservoir permettant l'introduction de l'échantillon à analyser, (2) du support solide permettant l'extraction (rétention) proprement dite du ou des solutés à extraire, (3) d'un embout facilitant l'adaptation de la colonne à une unité de filtration.

Le support peut être :

- Solide (extractant) est confiné entre deux frittés (supérieur et inférieur) de porosité contrôlée qui sont en polyéthylène.
- Ou bien en superposition de plusieurs disques



Figure 2: les deux différentes cartouches à droite le solide adsorbant à gauche la superposition de disques (www.scpscience.com)

Il y'a deux modes de SPE possible : « off line » et « on line », dans le premier cas la concentration est séparée du système chromatographique, les cartouches peuvent être manipulées simultanément par le biais d'un manifold (3 et 4). Dans le second cas la procédure d'extraction est intégrée dans le système chromatographique.



Figure 3 : Manifold à cartouche



Figure 4 : MICROLAB 4200 SPE (Hamilton) et Auto trace (www.scpscience.com)

VI.4. Choix de l'adsorbant SPE

Quel que soit l'échantillon à purifier (qu'il soit issu de l'environnement, du domaine pharmaceutique, du domaine cosmétique, de l'agrochimie, ...etc.), il est fondamental de choisir l'adsorbant d'extraction sur phase solide de façon précise. Le choix de cet adsorbant permettra de définir une sélectivité spécifique aux composés d'intérêt ainsi qu'une capacité de charge suffisante à l'entière adsorption de ceux-ci. Plusieurs familles d'adsorbant sont utilisées : les silices, les polymères, les argiles. Elles possèdent des caractéristiques très différentes. Le choix dépend beaucoup de la nature de la matrice. Les adsorbants riches en eau sont recommandés au traitement de matrices liquide riches en eau. Les adsorbants polaires sont indiqués pour l'extraction de matrices organiques (**Mélinda et Perrin, 2008**).

VI.5. Avantages de la SPE

Cette technique d'extraction présente quelques avantages notables par rapport à l'extraction liquide-liquide :

- Rapidité (pas de longues agitations et séparation des phases)
- Sélectivité (un choix large des phases stationnaires et des solvants)
- Économie (faible consommation de solvants)
- Reproductibilité (aucune émulsion à éliminer)
- Enrichissement de traces (même en présence de grands volumes d'échantillons)
- Peut être couplé en ligne avec une séparation chromatographique

VII. L'Ibuprofène

Nous avons choisi de travailler sur l'ibuprofène l'acide alpha-méthyl-4-(2-méthylpropyl) benzénéthanoïque car c'est un produit en vogue selon les pharmaciens consultés lors de notre enquête. Il est de plus en plus utilisé à la place de produits classiques tels que l'acide acétylsalicylatique (l'aspirine), c'est un produit analgésique et anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé en médecine humaine pour fluidiser le sang et pour traiter des maux de tête, des douleurs musculaires et menstruelles douloureuses, la fièvre et l'arthrite. L'action de ce médicament provoque l'inhibition de la cyclo-oxygénase et de la synthèse des prostaglandines; ces deux produits de l'organisme humain qui sont responsables de la douleur et de l'inflammation (**Biam, 2001 in Pepin, 2006**). L'Ibuprofène entre également dans la composition de nombreuses préparations pharmaceutiques en vente libre (**CPO, 2006 in Pepin, 2006**).

VII.1. Devenir de l'ibuprofène dans l'eau

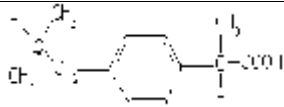
L'ibuprofène se caractérise par une faible solubilité dans l'eau (21 mg.l⁻¹) et un coefficient de partage octanol-eau élevé (log K_{oe} = 3,94). Les substances hydrophobes ont généralement une affinité pour les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau (**Pepin, 2006**). L'ibuprofène fait partie de la famille des acides carboxyliques et possède une constante pK_a de 4,91, ce qui explique sa présence sous forme d'ions négativement chargés dans les eaux aux pH supérieurs à 5. Malgré son potentiel d'adsorption sur les particules solides (K_d de 453,79), la propriété acide de l'ibuprofène limite grandement son adsorption aux MES dans les eaux

naturelles ; par contre, l'efficacité de ce mécanisme augmente avec l'acidité du milieu (**Fent et al., 2006**).

L'adsorption joue un rôle mineur dans l'élimination de l'ibuprofène dans les eaux naturelles. Plusieurs études ont montré que la biodégradation aérobie et anaérobie par des microorganismes constitue le principal processus d'élimination de cette substance dans le milieu aquatique. Ces études ont également montré que les processus abiotiques de dégradation (photodégradation, photolyse, hydrolyse, etc.) contribuaient peu à l'élimination de l'ibuprofène dans la colonne d'eau (**Ternes, 1998; Fent et al., 2006**).

La demi-vie de l'ibuprofène dans l'eau varie en fonction des conditions du milieu. Les études menées à ce sujet rapportent des demi-vies de un jour (**Pépin, 2006**), de 15 à 20 jours (**Halling-Sorensen et al., 1998**) et de 50 jours (**Pépin, 2006**). La variabilité du pH, de l'oxygène dissous et des matières en suspension sont à l'origine de ces disparités.

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques de l'ibuprofène (**Pépin, 2006**)

Caractéristiques physico-chimiques	Ibuprofène
Poids mol. (g.mole ⁻¹)	206,28
Formule chimique	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Structure chimique	
Solubilité (mg.L ⁻¹ à 25°C)	21
Kd (l/kg)	453,79
log K _{oc}	3,94
log K _{ow}	2,6
pK _a (20°C)	4,91
Tension de vapeur (Pa)	2,48 X 10 ⁻²
Constante de la loi de Henry (atm.m ³ .mole ⁻¹)	1,5 X 10 ⁻⁷
Masse volumique (g.cm ⁻³)	0,2 à 0,6
Masse molaire (g.mol ⁻¹)	206,2808
T° ébullition (°C)	76

VII.2. Devenir dans les sols et les sédiments

Dans les sols et les sédiments, l'ibuprofène est caractérisé par une faible mobilité puisque sa valeur $\log K_{ce}$ est de 2,6 (tableau 2). Une telle valeur implique que cette substance est adsorbée aux particules solides (colloïdes argileux, silts (sable fin) et matières organiques) et qu'elle est peu sujette à migrer dans le sol. Les mécanismes généraux de migration des substances dans les sols sont la percolation, le ruissellement et le lessivage. Dans les sédiments, l'ibuprofène a tendance à être adsorbé aux particules et à être peu mobile **(Pépin, 2006)**.

L'ibuprofène est beaucoup plus propice à migrer dans les sols acides (pH inférieurs à 4) que dans les sols neutres ou basiques. Les concentrations en matières organiques et en argiles influencent aussi le degré d'adsorption de l'ibuprofène aux particules de sol **(Pépin, 2006)**.

Le principal mécanisme d'élimination de l'ibuprofène dans les sols et les sédiments est la biodégradation par les microorganismes **(Boxall et al., 2004)**.

VII.3. Devenir dans les biotes

Peu d'études ont été réalisées au sujet du devenir et de la bioaccumulation de l'ibuprofène dans les différents biotes. Les facteurs de bioconcentration (FBC) d'une substance peuvent être estimés en fonction des coefficients de partage octanol-eau. Une valeur $\log K_{oc}$ inférieure à 5 ou un facteur de bioconcentration inférieur à 5000 indiquent qu'il y a peu de risque d'accumulation dans la chaîne alimentaire. Une faible valeur de ce coefficient indique qu'une substance a peu d'affinité avec les lipides, qu'elle pénètre difficilement dans les organismes et qu'elle se bioaccumule peu dans la chaîne alimentaire.

Un facteur de bioconcentration de 3,162 pour l'ibuprofène indique que cette substance a une faible tendance à se bioconcentrer dans les biotes ou à se bioamplifier dans la chaîne alimentaire **(Pépin, 2006)**.

Le tableau 3 indique les différents effets de l'ibuprofène chez divers organismes.

Tableau 3 : Effets toxique de l'ibuprofène chez divers organismes (Pépin, 2006)

Médicaments	Organismes testés	Toxicités	Durées des tests	Effets observés	Références
Ibuprofène	<i>Trichphyton rubrum</i> <i>Microsporium fulva</i>	CMEO = 5 – 10 mg.l ⁻¹ CMEO = 10-40 mg.l ⁻¹	Non Spécifiées	Inhibition de la croissance	Halling-Sorensen et al., 1998
	<i>Straphylococcus aureus</i>	CMEO = 40-80 mg.l ⁻¹			
	<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ = 9,06 mg.l ⁻¹ CSEO = 3 mg.l ⁻¹ CE ₅₀ = 4,3 mg.l ⁻¹ CL ₅₀ = 38 mg.l ⁻¹			
	<i>Lepomis macrochirus</i>	CL ₅₀ = 173 mg.l ⁻¹ CSEO = 10 mg.l ⁻¹	96 heures	Mortalité Mortalité Inhibition de la croissance	Halling-Sorensen et al., 1998
	<i>Mysidopsis bahia</i>	CL ₅₀ = 2,55 mg.l ⁻¹	96 heures	Mortalité	Halling et al., 1998 ; USEPA, 2000
	<i>Skeletonema costatum</i>	CE ₅₀ = 7,1 mg.l ⁻¹	96 heures	Inhibition de la croissance	Halling-Sorensen et al., 1998
	<i>Vibrio fisheri</i>	CE ₅₀ = 12,3 mg.l ⁻¹	5 minutes	Inhibition de la Bioluminescence	
	<i>Gammarus pulex</i>	CMEO = 10 ng.l ⁻¹	1,5 heure	Réduction de l'activité	De Lange et al., 2006
	<i>Synechocystis sp.</i>	CMEO = 1 µg.l ⁻¹	5 jours	Stimulation de la croissance	Pomati et al., 2004
	<i>Lemma minor</i>	CMEO = 1 µg.l ⁻¹ CE ₅₀ = 4,01 mg.l ⁻¹	5 jours 7 jours	Inhibition de la croissance	

VII.4. Toxicités chez des organismes

VII.4.1. Toxicité Létales

Les données concernant la létalité de l'ibuprofène chez les organismes aquatiques et terrestres demeurent fragmentaires. Selon les données disponibles, la crevette mysidé (*Mysidopsis bahia*) est l'espèce aquatique la plus sensible à l'ibuprofène; une CL_{50} de 2,55 mg.l⁻¹ a été déterminée pour cette espèce à la suite d'une exposition à l'ibuprofène pendant 96 heures (**USEPA, 2000 in Pépin, 2006**). Lorsque la puce d'eau (*Daphnia magna*) et le crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) sont exposés à l'ibuprofène pendant 48 heures et 96 heures respectivement, les CL_{50} de ce médicament correspondent à 38 et 173 mg.l⁻¹ (**Halling-Sorensen, 1998 ; Han et al., 2006**).

La seule espèce terrestre pour laquelle une concentration létale d'ibuprofène a été mesurée est un vers de terre non spécifié; la CL_{50} de cette substance est de 3 566 mg/kg de sol lors d'une exposition de 14 jours (**Pépin, 2006**).

VII.4.2. toxicité sublétales

Selon les références bibliographiques consultées, le gammare (*Gammarus pulex*) est l'espèce aquatique la plus sensible; une CMEO de 10 ng.l⁻¹ en ibuprofène réduit l'activité biologique de cette espèce à la suite d'une exposition pendant 1,5 heure (**De Lange et al., 2006**). Des CMEO de 1 µg.l⁻¹ en ibuprofène pour la lentille mineure (*Lemma minor*) et la cyanobactérie *Synechocystis* sp. exposées pendant 5 jours à ce médicament ont été mesurées par certains auteurs. Une stimulation de la croissance a alors été observée chez la cyanobactérie alors que l'effet inverse est survenu chez la lentille d'eau (**Pomati et al., 2004**). D'autres effets toxiques ont été mesurés chez diverses espèces aquatiques testées avec l'ibuprofène; ils apparaissent à des concentrations d'ibuprofène supérieures à 4 mg.l⁻¹ (**Pépin, 2006**).

Aucune mesure de toxicité sublétales chez des organismes terrestres n'a été trouvée dans la littérature consultée.

Tableau 4 : Concentrations environnementales de l'Ibuprofène mesurées dans les milieux aquatiques (Pepin, 2006).

Localisations	Concentrations dans l'environnement		
	Minimales	Moyennes	Maximales
Eaux de surface			
Fleuve Rhin	6 ng.l ⁻¹	---	41 ng.l ⁻¹
Rivières non spécifiées	17 ng.l ⁻¹	---	139 ng.l ⁻¹
Rivière Détroit (Canada)	---	141 ng.l ⁻¹	790 ng.l ⁻¹
Eau de surface (Allemagne)	0,05 µg.l ⁻¹	---	0,53 µg.l ⁻¹
Eau de surface (Italie)	1 µg.l ⁻¹	---	92,4 ng.l ⁻¹
Eau de surface (États-Unis)	< 0,018 µg.l ⁻¹	---	0,45 µg.l ⁻¹
Eau de surface (Espagne)	---	---	2,7 µg.l ⁻¹
Fleuve Elbe (Allemagne)	30 ng.l ⁻¹	---	146 ng.l ⁻¹
Eau de surface (Royaume-Uni)	< 0,02 µg.l ⁻¹	0,432 µg.l ⁻¹	1,55 µg.l ⁻¹
Estuaires (Royaume-Uni)	< 8 ng.l ⁻¹	---	928 ng.l ⁻¹
Effluents municipaux			
Canada	0,3 µg.l ⁻¹	4 µg.l ⁻¹	24,6 µg.l ⁻¹
Allemagne	0,05 µg.l ⁻¹	---	3,4 µg.l ⁻¹
Espagne	0,87 µg.l ⁻¹	24,6 µg.l ⁻¹	85 µg.l ⁻¹
Suède	0,05 µg.l ⁻¹	---	7,11 µg.l ⁻¹
Royaume-Uni	<0,02 µg.l ⁻¹	4,2 µg.l ⁻¹	27,3 µg.l ⁻¹
Effluent d'hôpital			
Suède	0,01 µg.l ⁻¹	---	116,3 µg.l ⁻¹
Eau souterraine			
Allemagne	0,2 µg.l ⁻¹		
Lixiviat (site d'enfouissement)	20,7 µg.l ⁻¹		

Materiels et méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel et produits

■ Chromatographie liquide à haute performance de marque (Waters) composée de :

- une pompe 600 pump
- un détecteur à barrettes de diodes (PADWATERS 2996)
- un dégazeur in line dagasser AF
- une boucle d'injection Rhéodyne de 20 μ l
- Le logiciel d'acquisition de données Empower Pro (Empower Software)
- Une colonne : NUCLEOSIL 5 C₁₈, L=250 mm, di=4,6 mm (SUPELCO).
- Microseringues en verre (Hamilton)

■ **Manifold d'extraction en phase solide (SPE) 12 positions de chez Merck doté de :**

- Un manomètre et une vanne permettant de réguler la pression négative (vide) durant la procédure.
- Un ensemble de rack ajustable, placé dans le bassin lors de l'élution et qui sert à porter les récipients destinés à recueillir l'éluat.
- Une unité de séchage ; à placer au dessus des cartouches par l'intermédiaire d'adaptateurs, et à connecter à une source d'air pour assurer le séchage de l'adsorbant.
- Des colonnes en verre 8 ml réutilisables.

■ **Phase adsorbante Lichrolut EN**

à base de copolymères formés d'éthylvinylbenzène – divinylbenzène, elle a une surface spécifique d'environ 1200 m².g⁻¹, une taille de particules de l'ordre de 40-120 μ m (Stajnbaher et Zupancic-kralj , 2003) , un volume des pores de 0,75 μ l.g⁻¹, et une taille de pores de 29Å (Puig et Barcelo, 1996). Sa structure microporeuse lui confère une grande capacité d'adsorption pour les composés à faible masse moléculaire (Junker-Buchheit et Witzenbacher, 1996). Sa grande surface spécifique convient à l'analyse de traces. Présentant des sites d'interaction polaires et apolaires, elle s'adapte bien au traitement de mélange de polluants apolaires. Grâce à sa stabilité vis-à-vis du pH, elle peut être utilisée sous des conditions de pH extrême (1-13).

■ **Matériels complémentaires**

- Bain marie
- Dispositif de filtration
- Verrerie courante de laboratoire
- Microseringues en verre (Hamilton)

- Papier filtre 0,45 μm (Sartorius)
- Pompe à vide électrique (Millipore)
- Distillateur : 2001/4 (GFL)
- Balance de précision 0,001g de marque (KERN)
- Méthanol qualité HPLC (Merck)
- Acétonitrile qualité HPLC (Merck)
- Hexane qualité HPLC (Merck)
- Chloroforme qualité HPLC (Merck)
- Acétate d'éthyle qualité HPLC (Merck)
- Standard pur de l'Ibuprofène (Sigma Aldrich).

I.2. Protocole expérimental

I.2.1. Préparation des solutions étalons

La solution mère à une concentration de 1g.L^{-1} est préparée par dissolution du standard pur dans du méthanol de qualité HPLC (à conserver à 4°C pour une durée limitée de 6 mois). Les solutions de travail s'obtiennent par une simple dilution de la solution mère.

I.2.2. Prélèvement et conservation

Les échantillons d'eau ont été prélevés au niveau de la station de traitement des eaux usées de Tipaza et au niveau de l'exutoire d'un hôpital. Ils ont été prélevés dans des récipients préalablement nettoyés avec un détergent et rincés abondamment à l'eau de robinet, puis à l'eau distillée. Transportés à température ambiante, ils ont été conservés à 4°C à l'abri de la lumière pendant une durée courte inférieure à 15 jours. Ils ont été filtrés sur du papier filtre de $0,45\mu\text{m}$ par simple gravité, avant de subir l'opération d'extraction. Quelques caractéristiques physico-chimiques de ces eaux sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Quelques caractéristiques physico–chimiques des eaux échantillons d'eau analysées (E1 : affluent STEP, E2 : Effluent STEP) (Station d'épuration de Tipaza)

paramètres	E ₁	E ₂
Ph	7,81	7,76
T(°C)	20,4°	21 ,1°
O ₂ dissous [mg.L ⁻¹]	4,38	5,44
Conductivité [µs.L ⁻¹]	1839,00	1634,00
MES [mg.L ⁻¹]	108,30	4,64
MVS [mg.L ⁻¹]	60,40	2,59
DBO ₅ [mg.L ⁻¹]	270,00	2,00
DCO [mg.L ⁻¹]	340,00	39,40
NO ₃ - [mg.L ⁻¹]	7,30	2,20
NO ₂ - [mg.L ⁻¹]	0 ,013	0,052
PO ₄ ⁻ [mg.L ⁻¹]	9,00	7,70
NH ⁴⁺ [mg.L ⁻¹]	18,75	1,50

I.2.3. Extraction de l'Ibuprofène présent dans l'eau

Dans cette étude, nous avons testé les capacités de deux méthodes d'extraction de l'ibuprofène dans l'eau ; une liquide – liquide et une autre en phase solide.

- Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide - liquide est la plus classique des méthodes d'extraction des molécules organiques présentes dans l'eau. Elle est basée sur le partage du composé organique entre la phase aqueuse et un solvant organique non miscible à l'eau. Le rendement de cette opération dépend de l'affinité du composé pour le solvant organique.

Le protocole expérimental utilisé est le suivant : un volume de 500 ml d'eau auquel dopé par une quantité connue du médicament sont extraits par une fois 50 ml puis deux fois 25 ml du solvant organique choisi, après avoir agité chaque fois pendant 20 minutes sur un agitateur mécanique réglé à une vitesse de 55 oscillations par minutes, puis dégazé. Les phases organiques sont récupérées dans des erlenmeyers et évaporées sous flux doux d'air à 28 °C dans un bain marie jusqu'à un volume final de 0,5 ml. Un aliquote de 20 µl de ce dernier est

injecté dans l'HPLC dans les conditions opératoires citées ci-dessous. Quatre solvants organiques ont été testés : l'hexane, le chloroforme, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle.

- Extraction en Phase Solide (SPE)

L'extraction en phase solide est une méthode de préparation des échantillons qui s'adapte bien au traitement des échantillons d'eau. Les traces de produits organiques sont piégées sur une phase adsorbante contenue dans une petite cartouche à travers laquelle on fait passer un certain volume d'eau. Elles sont ensuite récupérées par élution avec un petit volume de solvant organique. L'un des grands avantages de cette méthode est la consommation très faible de solvants organiques.

Nous avons utilisé un système Manifold d'extraction en phase solide (SPE) 12 positions de chez Merck décrit précédemment (Figure 5). Avec des cartouches en verre de 8 ml contenant une quantité bien définie d'adsorbant Lichrolut EN.

La SPE se déroule en quatre étapes :

- Conditionnement des cartouches

Les cartouches sont conditionnées par passage d'une série de solvants dans la phase adsorbante. Ceci est nécessaire afin d'éliminer toutes les impuretés et d'activer les sites d'adsorption avant le passage de l'échantillon d'eau.

- Chargement de l'échantillon

Les échantillons sont chargés dans l'appareil grâce à des pompes et à un réseau de tubulures, à un débit fixé. Les échantillons passent à travers les cartouches et aboutissent dans une cuve de récupération. Ceux trop chargés en matières en suspension sont d'abord filtrés sur filtres de porosité 0,45 µm avant leur passage, afin de ne pas colmater le système de tubulures.

- Lavage de la cartouche

L'objectif de cette étape est de ne retenir que les composés à extraire et à éliminer les composés indésirables retenus lors du passage des échantillons. Les cartouches doivent être rincées avec le même solvant que celui dans lequel étaient dilués les analytes ou à défaut un autre solvant qui ne les éluera pas.

- Elution

La cartouche est tout d'abord mise en contact avec le solvant afin de détacher les composés adsorbés par la phase de polymères. Les composés indésirables restent fixés sur le polymère. Une fois les composés détachés, l'élution peut commencer. Les analytes élués sont collectés dans des tubes de 10 ml.

Pour l'extraction en phase solide de l'ibuprofène présent dans l'eau, nous avons opté pour une méthode déjà mise au point pour des pesticides organochlorés (le 2,4 et 4,4-DDT) sur le

même dispositif SPE (**Soumani, 2007**), en essayant de varier le solvant d'éluion. Le protocole préconisé est le suivant :

- Cartouche de 200 mg de phase adsorbante Lichrolut EN ;
- Conditionnement avec 10 ml de méthanol à 10 ml.min⁻¹ ;
- Lavage avec 10 ml d'eau ultra pure à 10 ml.min⁻¹ ;
- Chargement de 500 µl d'échantillon à 20 ml.min⁻¹ ;
- Lavage avec 10 ml d'eau ultra pure à 10 ml.min⁻¹ ;
- Séchage avec un flux moyen d'air pendant 25 minutes ;
- Elution en deux étapes :
 - Imprégnation avec 15 ml de méthanol et collecte de la fraction,
 - Application de 10 ml de méthanol à 2 ml.min⁻¹

Le volume de 25 µl de l'éluât récupéré est évaporé sous un faible flux d'air dans un bain marie à 28 °C jusqu'à un volume final de 0,5ml. Un aliquote de 20 µl de ce dernier est injecté dans l'HPLC dans les conditions opératoires citées ci - dessous. En l'absence d'eau ultra pure, nous avons utilisé de l'eau distillée.

I.3. Analyse chromatographique

La séparation des molécules s'effectue sur une colonne analytique à température ambiante par injection d'un volume de 20 µl de l'extrait final. La phase mobile est constituée d'un mélange acétonitrile /eau (95/5, V/V) dégazée avant utilisation à un débit de 1 ml.min⁻¹. La détection s'opère dans le domaine de l'UV à la longueur d'onde 210 nm qui correspond au maximum d'absorption de la molécule étudiée. L'identification de cette dernière se réfère à son temps de rétention et son spectre UV. La méthode des injections comparées (étalonnage externe) et la détermination de la surface du pic chromatographique sont utilisées pour la quantification des résidus de cette molécule.

II.5. Calcul et expression des résultats

A chaque variable, un lot de 5 échantillons est préparé. Pour chaque lot d'échantillons analysés un blanc est réalisé, il correspond à l'analyse d'un volume d'eau non dopée égal à celui de l'échantillon avec la même procédure. Le blanc permet de détecter et d'estimer les pics interférents. La performance de la méthode se réfère au recouvrement ainsi qu'à l'écart - type obtenu. La quantité dosée est exprimée en µg.l⁻¹ d'ibuprofène d'après l'équation suivante :

$$C_e = \frac{A_x x C_{IS} V_f}{A_{IS} V_I} \quad (2)$$

Avec :

C_e : concentration des molécules d'ibuprofène contenues dans l'échantillon ($\mu\text{g.l}^{-1}$);

A_x : hauteur (ou surface) du pic du composé recherché dans l'échantillon;

C_{IS} : concentration du composé dans l'étalon ($\mu\text{g.l}^{-1}$);

A_{IS} : hauteur (ou surface) du pic du composé dans l'étalon ;

V_I : volume de l'échantillon (ml);

V_f : volume de l'extrait final après concentration (ml).

- Le recouvrement : Le recouvrement est calculé pour chaque paramètre testé. Il représente le degré du rapprochement de la valeur obtenue après l'analyse à la valeur réelle connue. L'écart type est obtenu par rapport à 5 échantillons (n=5) :

$$\text{Recouvrement (\%)} = \frac{\text{réponse après extraction}}{\text{réponse d'un standard pur}} \quad (3)$$



Figure 5 : photo du dispositif SPE utilisé ; pompe électrique (1), réservoir de déchet (2), le manomètre (3), cartouche (4), adaptateur (5), unité de séchage (6), vanne de contrôle du flux d'air (7)

Résultats et discussions

I. Résultats et discussion

Nous avons partagé notre travail en trois étapes :

- validation de la méthode analytique ;
- extraction de la molécule par les deux méthodes choisies: extraction liquide-liquide et extraction en phase solide;
- application de la méthode optimale choisie à des échantillons d'eaux réelles.

I.1. Validation de la méthode d'analyse de l'ibuprofène par HPLC

Le dosage de la molécule de l'ibuprofène dans la présente étude a été réalisé par HPLC grâce à une méthode déjà mise au point au Laboratoire de Sciences et Techniques de l'Environnement de l'ENSP. Une phase de validation est nécessaire avant son utilisation pour évaluer correctement les performances de la méthode d'extraction a été nécessaire car elle n'est pas normalisée. Cette dernière a été faite selon un protocole inspiré du protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie du Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec (**CEAEQ. 2002**) en déterminant les paramètres suivants : la limite de détection de la méthode (LDM), la limite de quantification de la méthode (LQM), la limite de linéarité (LL), la fidélité (réplicabilité, répétabilité, reproductibilité et justesse).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (4)$$

$$S(n) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - x_i)^2}{n - 1}} \quad (5)$$

$$LDM= 3.S \quad (6)$$

x: moyenne arithmétique d'une série de mesures ; x

xi : mesures individuelles ;

n : nombre de mesure ;

S : écart type d'une série de mesure

L'établissement d'une limite de détection est validé par le calcul du ratio de conformité (Rc). D'après le présent protocole de validation, il faut que Rc soit situé entre 4 et 10. Dans le cas contraire, il faut recommencer la procédure d'établissement de la LDM avec un échantillon qui a une concentration plus haute ou plus basse, selon les besoins. La formule de calcul de Rc est la suivante :

$$R_c = \frac{\bar{x}}{LDM_{calculée}} = \frac{\bar{x}}{3s} \quad (7)$$

La limite de quantification est la plus petite grandeur d'un analyte à examiner dans un échantillon pouvant être quantitativement déterminée avec une fiabilité définie. C'est la concentration équivalente à 10 fois l'écart type obtenu lors de l'établissement de la LDM. Les résultats d'analyses d'échantillons inférieurs à la LQM doivent être interprétés en considérant que l'incertitude associée à la mesure est plus grande:

$$LQM = 10.s \quad (8)$$

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 6 et montrent bien que le choix de la LID était judicieux car le Rc est compris entre 4 et 10.

Tableau 6 : paramètres de validation de la méthode analytique

<i>X (mg.L⁻¹)</i>	<i>S</i>	<i>LDM (mg.L⁻¹)</i>	<i>Rc</i>	<i>LQM (mg.L⁻¹)</i>
<i>0,15</i>	<i>0,02</i>	<i>0,06</i>	<i>7,5</i>	<i>0,2</i>

I.1.1. Limite de linéarité

Le domaine de linéarité est l'étendue de concentration des étalons entre la LQM et la limite de linéarité (LL) qui n'est autre que le plus haut niveau fiable de mesure et utilisable pour la

quantification. Pour respecter le critère de la limite de linéarité, le coefficient de corrélation (R^2) doit être supérieur à 0,995.

Dans la présente étude, nous avons préparé dix solutions étalons de concentrations comprises entre la LQM et 120 mg.l⁻¹. Les concentrations supérieures à cette dernière valeur ont été évitées afin de ne pas saturer la colonne. Pour chaque point, l'injection a été répétée trois fois. Les résultats obtenus (figure 6) ; traités par le logiciel Excel de Microsoft, montrent bien que le domaine de travail choisi répond au critère fixé par la méthode de validation.

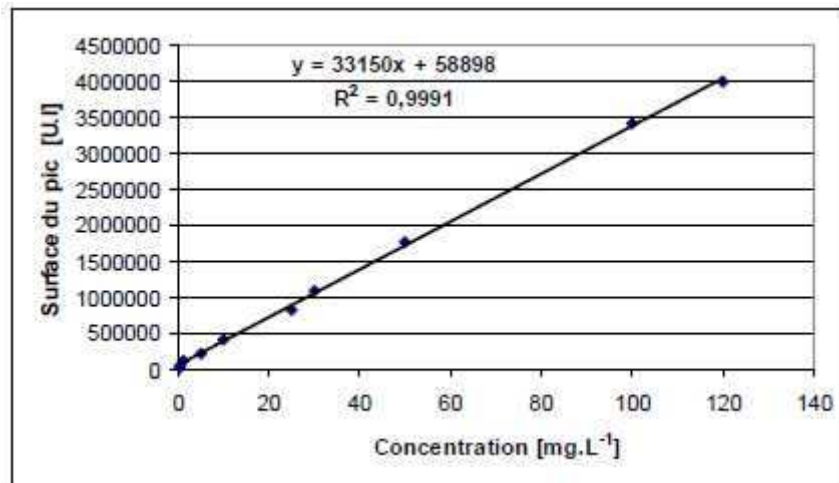


Figure 6 : Domaine de linéarité obtenu pour l'ibuprofène

I.1.2. Fidélité

La fidélité à un niveau donné correspond à l'étroitesse de l'accord entre les résultats obtenus en appliquant le procédé expérimental à plusieurs reprises dans des conditions déterminées. Nous avons choisi une valeur à l'intérieur du domaine de linéarité (0,10mg.L⁻¹) que nous avons analysé 10 fois en respectant les conditions spécifiées à l'égard de la réplicabilité (même analyste, même appareil, même jour) et la répétabilité (au moins l'un des éléments est différent, dans notre cas le jour). Les valeurs respectives de ces deux paramètres sont calculées grâce aux formules suivantes :

$$\text{Réplicabilité} = \frac{t_{(0,975;n-1)} \cdot S_1}{\sqrt{n}} \quad (9)$$

$$\text{Répétabilité} = \frac{t_{(0,975;n-1)} \cdot S_2}{\sqrt{n}} \quad (10)$$

Où :

S1 : écart type d'une série de mesures se référant à la réplicabilité

S2 : écart type d'une série de mesures se référant à la répétabilité

$t(0,975 ; n-1)$: valeur tabulée de la loi t de Student à (n -1) degré de liberté et à un niveau de signification α de 0,05 (test bilatéral) et qui est égale à 2,262 pour n-1=9.

Ces deux dernières valeurs permettent de calculer l'intervalle de confiance (IC) :

$$IC = x \pm \frac{t_{(0,975;n-1)} \cdot S}{\sqrt{n}} \quad (11)$$

et aussi le coefficient de variation (CV) :

$$CV = 100 \cdot \frac{S}{x} \quad (12)$$

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 7. Le coefficient de variation (CV) obtenu est inférieur à 12% et dénote une bonne précision de la méthode d'analyse.

Tableau 7 : test de fidélité de l'appareil HPLC utilisé

Réplicabilité	Répétabilité	IC mg.L ⁻¹	CV (%)
0,12	0,13	0,095- 0,135	11,83

Nous n'avons pas pu, faute de moyens, déterminer les deux autres paramètres à savoir la reproductibilité (analyste différent, appareil différent) et la justesse (accord avec une valeur certifiée par un organisme reconnu).

I.1.3. Discussion

La validation de la méthode a nécessité beaucoup de temps mais reste indispensable pour évaluer correctement une méthode d'extraction et de purification des résidus de l'ibuprofène dans l'eau. Le temps de rétention du pic chromatographique de cette molécule dans les conditions analytiques choisies est de 2,9 minutes, ce qui permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons par jour. Un chromatogramme d'une solution contenant 10 mg.L⁻¹ et le spectre d'adsorption correspondant sont présentés dans la figure 7.

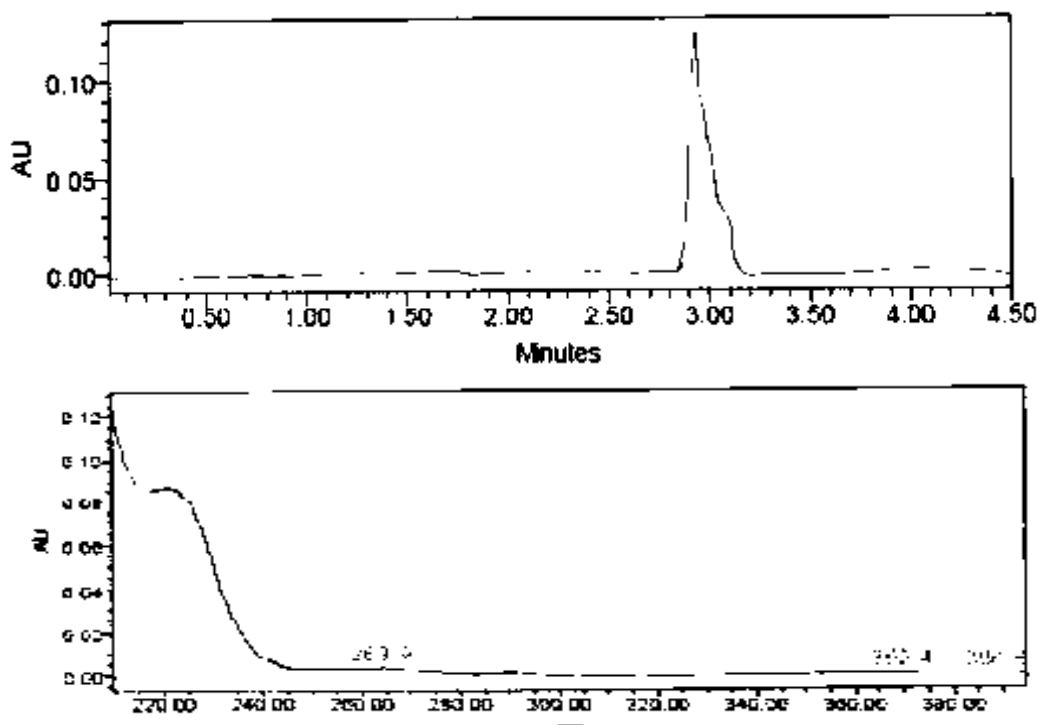


Figure 7 : chromatogramme et spectre d'absorption dans l'UV d'une solution de 10mg.l⁻¹ d'Ibuprofène

I.2. Extraction de l'ibuprofène présent dans l'eau

Dans notre étude nous avons testé deux méthodes d'extraction, l'une simple ne nécessitant aucun matériel spécifique (l'extraction liquide-liquide) et l'autre plus sophistiquée (l'extraction en phase solide).

I.2.1. Extraction liquide – liquide de l'ibuprofène présent dans l'eau

Pour l'extraction liquide - liquide de l'ibuprofène présent dans l'eau, nous avons testé quatre solvants disponibles dans notre laboratoire: l'hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le chloroforme. Pour chaque solvant, nous avons dopé 6 échantillons à un niveau de 100µg.L⁻¹ d'ibuprofène en plus de deux blancs. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8.

Ces derniers montrent bien que seul le taux de recouvrement de l'hexane dépasse les 70% avec un CV de 22,37%. La figure 8 montre les chromatogrammes types obtenus avec un échantillon d'eau distillée et un autre dopé.

Tableau 8: Taux de recouvrement de l'ibuprofène et coefficients de variation obtenus par la méthode d'extraction liquide – liquide à un niveau de $100 \mu\text{g.l}^{-1}$

	<i>Recouvrement (%)</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Hexane</i>	73,25	22,37
<i>Dichlorométhane</i>	42,58	26,14
<i>Chloroforme</i>	35,45	24,87
<i>Acétate d'éthyle</i>	26,15	31,44

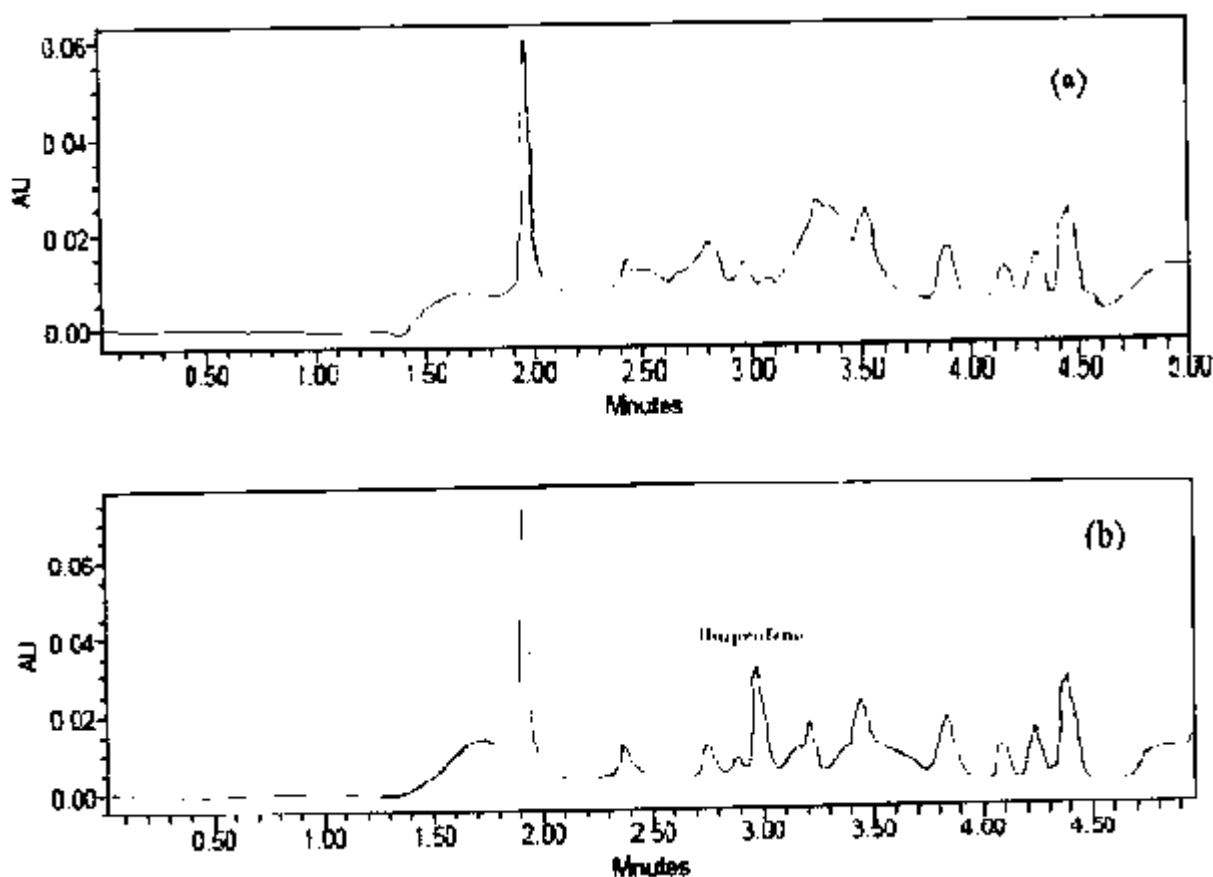


Figure 8 : chromatogramme- type obtenus après l'extraction liquide-liquide avec de l'hexane de 500ml d'eau distillée (a) et dopée à $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'ibuprofène (b)

I.2.2. Extraction en phase solide de l'ibuprofène présent dans l'eau

Pour l'extraction en phase solide de l'ibuprofène présent dans l'eau, nous avons testé trois solvants d'éluion (le méthanol, l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle). D'autre part, nous avons évalué les capacités d'extraction de cette méthode à trois niveaux de dopage (25 , 50 et $100 \mu\text{g.l}^{-1}$). Pour chaque expérience, 5 échantillons dopés et 2 blancs ont été analysés.

I.2.2.1. Influence du solvant d'éluion

L'influence des solvants utilisés est exprimée par le recouvrement de ce dernier qui est représenté dans le tableau 9. Les résultats obtenus montrent que le taux de recouvrement de l'ibuprofène élué par le méthanol dépasse largement les 70% (avec un CV inférieur à 20%) et que l'acétate d'éthyle ne convient pas du tout à l'extraction de cette molécule.

Tableau 9 : l'influence du solvant d'éluion sur le taux de recouvrement de l'ibuprofène et coefficients de variation obtenus par la méthode d'extraction en phase solide à un niveau de 100µg.l⁻¹

	<i>Recouvrement en (%)</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Méthanol</i>	97,22	12,29
<i>Acétonitrile</i>	48,83	11,78
<i>Acétate d'éthyle</i>	-	-

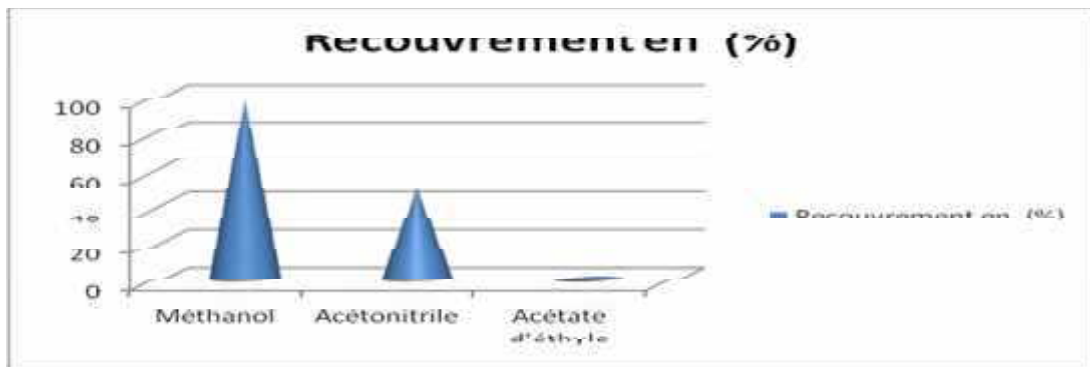


Figure 9: influence du solvant d'éluion

I.2.2.2. Influence du niveau de dopage

En utilisant le méthanol comme solvant d'éluion, nous avons étudié l'influence du niveau de dopage sur le taux de recouvrement de l'ibuprofène par extraction en phase solide. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 10. Ils montrent des recouvrements supérieurs à 90%, et des CV inférieur à 20% pour les trois niveaux de dopage. Des chromatogrammes obtenus sont présentés dans la figure 10.

Tableau 10 : l'influence du niveau de dopage sur le taux de recouvrement de l'ibuprofène et coefficients de variation obtenus par la méthode d'extraction en phase solide.

Niveau de dopage [$\mu\text{g.l}^{-1}$]	Recouvrement en (%)	CV (%)
100	97,22	12,29
50	94,15	14,64
25	92,58	15,87

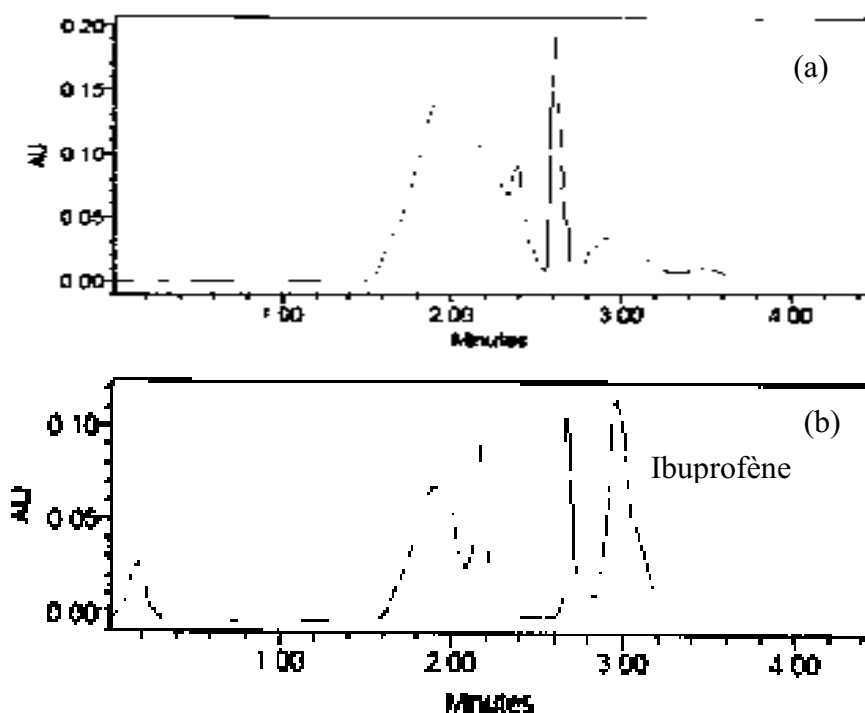


Figure 10 : chromatogramme – types obtenus après l'extraction en phase solide de 500 ml d'eau distillée (a) et dopée à $25 \mu\text{g.l}^{-1}$ d'ibuprofène (b).

I.3. Discussion

Les résultats obtenus par la méthode d'extraction liquide-liquide ont montré que seul l'hexane donnait des recouvrements acceptables. Ce solvant apolaire convient pour l'extraction de la majorité des molécules hydrophobes comme l'ibuprofène. Il est par ailleurs le solvant indiqué dans la méthode officielle de l'Union Européenne pour l'analyse des pesticides organochlorés. Malheureusement les coefficients des variations obtenus dépassant les 20% sont pénalisants. L'obtention d'un bon CV dans ce cas là nécessite un savoir faire et une grande expérience du manipulateur.

Pour l'extraction en phase solide, les très bons résultats obtenus avec le méthanol sont dus à sa force éluotrope très élevée qui permet de décrocher la molécule hydrophobe l'ibuprofène de la phase stationnaire contrairement aux deux autres solvants testés. L'automatisation de la manipulation a permis d'obtenir des CV largement inférieurs à 20% dénotant une bonne précision de la méthode. La méthode d'extraction en phase solide est indéniablement meilleure que l'extraction liquide-liquide car en plus des bons rendements obtenus, elle consomme beaucoup moins de solvant (35 ml de méthanol au lieu de 100 ml d'hexane) et prend moins de temps (plus d'une heure pour l'extraction liquide-liquide contre 30 minutes pour l'extraction en phase solide).

I.4. Application à des eaux réelles

La méthode d'extraction en phase solide optimale obtenue a été appliquée à des échantillons d'eau réels prélevés au niveau d'une station d'épuration, d'un exutoire d'un hôpital et d'un robinet d'eau potable. L'étude a été menée sur un lot d'échantillons d'un volume de 500 ml d'eau de ces eaux filtrées afin d'éviter le colmatage de la cartouche de la phase adsorbante.

Des exemples de chromatogrammes de ces analyses sont exposés dans la figure 11.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 11.

Tableau 11: Résultats d'analyses de quelques eaux réelles.

Désignation	Ibuprofène [$\mu\text{g.l}^{-1}$]
Eau de robinet	Non détecté
Affluent STEP	28,03
Effluent STEP	Non Détecté
Effluent Hôpital	31,82

Les résultats obtenus montrent la présence de l'ibuprofène dans l'affluent de la STEP et l'effluent de l'hôpital. Nous pouvons conclure qu'au moins une partie de l'ibuprofène ne s'est pas dégradé. Son absence dans l'effluent de la STEP laisse suggérer deux suppositions ou bien la molécule s'est complètement éliminée par adsorption pendant les différentes étapes de traitement dans la station d'épuration comme suggéré par certains auteurs (**Kostopoulou et Nikolaou, 2008; Lavén et al., 2009; Santos et al., 2009**); ou s'est complètement métabolisée sous ces différentes formes possible: 2-[4-(2-hydroxy-2 méthylpropyl) phenyl]-propionic acid (hydroxyl-ibuprofen) et 2-[4-(carboxypropyl)phenyl]-propionic acid (carboxy-ibuprofen)). Dans les deux cas, la recherche de ces métabolites et de

la molécule mère dans les boues de la station d'épuration et celles des métabolites dans les eaux de rejets serait très souhaitable car ces deux produits (l'eau traitée et les boues) sont susceptibles d'être réutilisés dans l'agriculture pour l'irrigation et l'amendement des sols.

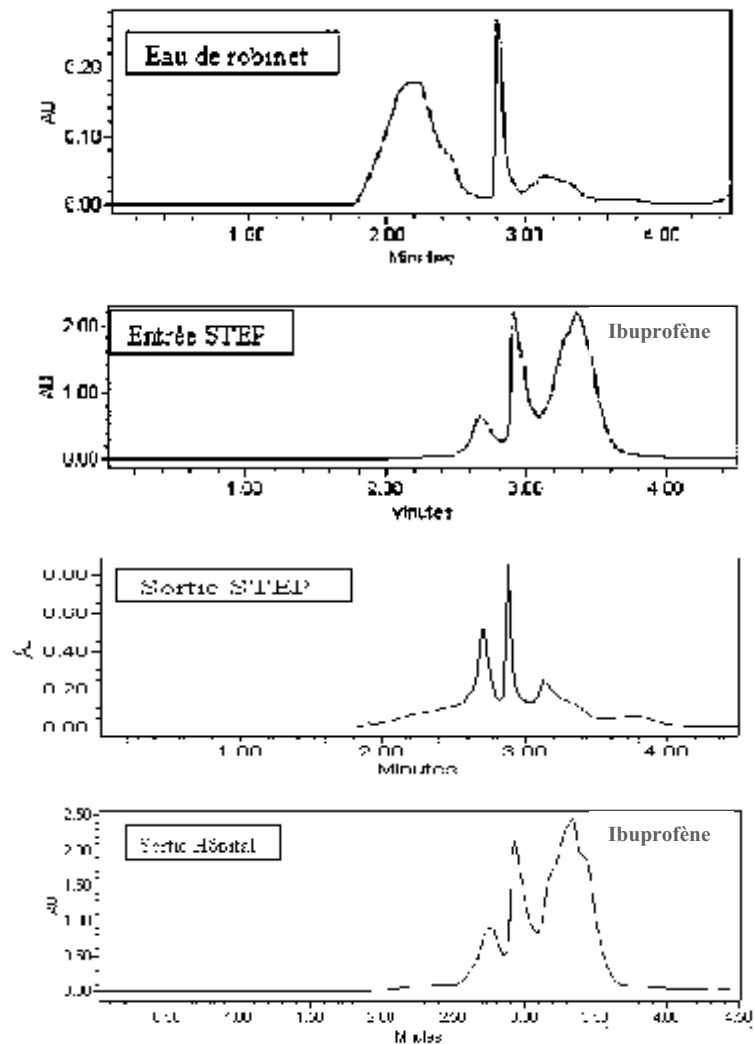


Figure 11 : Exemples de chromatogrammes d'analyse d'eaux réelles.

Conclusion

Conclusion

Les progrès réalisés dans le domaine analytique ont montré que la présence de résidus médicamenteux dans certaines ressources destinées à fournir les eaux de distribution est aujourd'hui un fait avéré. Malgré les faibles concentrations actuellement détectées, il est légitime de s'interroger sur l'impact sociétal ainsi que sur les conséquences sanitaires potentielles d'une telle présence. D'important travaux restent à mener afin de mieux caractériser les dangers et l'exposition liés à ces substances en précisant notamment leur niveau d'émission, leurs capacités de transformation dans les filières de traitement et leur impact sur les milieux. Bien que les marges d'exposition semblent, a priori, acceptables pour protéger les consommateurs, l'évaluation des risques sanitaires reste un exercice délicat et s'appuie sur des approches indirectes qui présentent des limites certaines. Il convient en particulier d'améliorer nos connaissances sur les conséquences des exposition à très faibles doses en redéfinissant au besoin l'effet cible initialement retenu dans des expérimentations classiques, de mieux appréhender les autres voies d'exposition afin d'établir la part relative de différents sources et d'approfondir les recherches sur les interactions dues à la présence d'autres composés dans le milieu hydrique.

La validation de la méthode analytique par HPLC à détecteur UV/visible a été longue et fastidieuse. Toutefois elle permet d'évaluer correctement des méthodes d'extraction choisies. Une limite de détection de l'ibuprofène de $0,06 \text{ mg.l}^{-1}$, une limite de quantification de $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$, un coefficient de variation de 11,83% et une très bonne linéarité entre $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ et 120 mg.l^{-1} , confèrent à cette méthode de bonnes capacités pour le dosage des résidus de certaines substances médicamenteuse dans les différentes eaux.

Dans la deuxième partie de notre étude, l'optimisation de deux méthodes d'extraction; l'une liquide-liquide et l'autre en phase solide de l'Ibuprofène dans l'eau a donné les résultats suivants :

- de faibles taux de recouvrement et des coefficients de variations élevées pour l'extraction liquide-liquide qui empêche l'utilisation de cette méthode pour le dosage de la molécule choisie dans l'eau
- le méthanol comme solvant d'élution a donné de meilleurs recouvrements par rapport à l'acétonitrile et l'acétate d'éthyle dans le cas de l'extraction en phase solide.
- la méthode SPE choisie a donné de très bon taux de recouvrement et ce quelque soit le niveau de dopage testé.

A l'issue de cette étude, nous pouvons dire que l'utilisation de la SPE pour l'extraction des résidus l'ibuprofène dans l'eau est plutôt avantageuse pour :

- Sa simplicité : utilisation uniquement du méthanol et de l'eau qualité HPLC, sans ajustement de pH,

- son économie: l'extraction de six échantillons ne dure que deux heures et ne consomme que 35 ml de méthanol par échantillon (contre 100 ml d'hexane pour l'extraction liquide- liquide). Même si l'absence de la molécule étudiée dans les eaux potables (au seuil de détection de la présente méthode d'analyse) est plutôt rassurante, sa présence dans les eaux d'exutoire d'un hôpital et celles arrivant dans une STEP est par contre inquiétante.

La recherche et le dosage des résidus de produits pharmaceutiques devraient être systématiques dans les eaux de rejet des STEP (et dans les boues) et ce quelque soit leur destination (réutilisation dans l'agriculture, réalimentation de la nappe phréatique...).

Liste des tableaux

Tableau 1: Taux d'excrétion humaine et animale de quelques médicaments

Tableau 2: Propriétés physico-chimiques de l'ibuprofène

Tableau 3 : Effets toxique de l'ibuprofène chez divers organismes

Tableau 4 : Concentrations environnementales de l'Ibuprofène mesurées dans les milieux aquatique et dans le sédiment

Tableau 5: Quelques caractéristiques physico – chimiques des eaux échantillons d'eau analysés

Tableau 6 : paramètres de validation de la méthode analytique

Tableau 7 : test de fidélité de l'appareil HPLC utilisé

Tableau 8 : Taux de recouvrement de l'ibuprofène et coefficients de variation obtenus par la méthode d'extraction liquide – liquide à un niveau de $100\mu\text{g.L}^{-1}$

Tableau 9 : l'influence du solvant d'élution sur le taux de recouvrement de l'ibuprofène et coefficients de variation obtenus par la méthode d'extraction en phase solide à un niveau de $100\mu\text{g.L}^{-1}$

Tableau 10 : l'influence du niveau de dopage sur le taux de recouvrement de l'ibuprofène et coefficients de variation obtenus par la méthode d'extraction en phase solide.

Tableau 11 : Résultats d'analyses de quelques eaux réelles.

Liste des figures

Figure 1 : procédure typiques d'analyse des médicaments dans des matrices aqueuses

Figure 2: les deux différentes cartouches à droite le solide adsorbant à gauche la superposition de disques

Figure 3 : Manifold à cartouche

Figure 4 : MICROLAB 4200 SPE (Hamilton) et Auto trace

Figure 5 : représentation de la structure chimique de l'ibuprofène

Figure 5 : photo du dispositif SPE utilisé

Figure 6 : Domaine de linéarité obtenu pour l'ibuprofène

Figure 7 : chromatogramme et spectre d'absorption dans l'UV d'une solution de 10mg.L^{-1} d'Ibuprofène

Figure 8 : chromatogramme- type obtenus après l'extraction liquide-liquide avec de l'hexane de 500ml d'eau distillée (a) et dopée à $100\ \mu\text{g.L}^{-1}$ d'ibuprofène (b)

Figure 9: influence du solvant d'élution

Figure 10 : chromatogramme – types obtenus après l'extraction en phase solide de 500 ml d'eau distillée (a) et dopée à $25\ \mu\text{g.L}^{-1}$ d'ibuprofène (b).

Figure 11 : Exemples de chromatogrammes d'analyse d'eaux réelles.

Liste des acronymes, des symboles et des sigles

CE_{50, 100} Concentration avec effet sur 50 ou 100 % des individus testés

CEC Capacité d'échange cationique

CI Concentration inhibitrice

CL₅₀ Concentration létale causant la mortalité de 50 % des individus testés

CMEO Concentration minimale avec effet observé

CSEO Concentration sans effet observé

K_{oc} Coefficient de partage carbone organique-eau

K_d Coefficient d'adsorption sol-eau

K_{ow} Coefficient de partage octanol-eau

LLE Extraction liquide liquide

pH Potentiel hydrogène

pK_a Constante de dissociation acide-base

SPE Extraction en Phase Solide

USEPA United States Environmental Protection Agency

BIBLIOGRAPHIE

- **Bao, YY., Zhou Q X., Wang YY.,** 2009. Adsorption characteristics of tetracycline by two soils: Assessing role of soil organic matter. *Aust. J. Soil Res* 47, 286–295.
- **Babić S., Ašperger D., Mutavdžić D., Horvat A J.M., Kaštelan-Macan M.,** 2006. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater, *Talanta* 70, 732-738.
- **Boxall A.B.A.,** 2004. The environmental side effects of medication. *European Molecular Biology Organisation reports* 5, 1110-1116.
- **Carina C., Johansson A.K., Gunnar A., Bergman K., Kuñ hler T.,** 2006. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. *Sci of the Tot Env* 364, 67–87.
- **Caude M., Jardy A.,** 1994. Chromatographie en phase liquide, techniques de l'ingénieur, *Traité Analyse et Caractérisation*, P1455, Vol. P2, 48p.
- **CEAEQ.,** 2002. Protocole pour la validation d'une méthode d'analyse en chimie, programme d'accréditation des laboratoires d'analyses environnementale, disponible sur :<http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/dr12vmc.pdf>).
- **Coillie V.R.,** 2005. Analyse de risques écotoxicologiques (ENV-789). Recueil de notes. Cours d'analyse de risques écotoxicologiques, Centre de formation universitaire en environnement, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, 292 p.
- **Cun C.,** 2004. Recherche des pesticides dans l'eau, disponible sur : <http://culturesciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie-societe-article-Recherche.htm>.
- **Daughton C.G., T. Ternes.,** 1999. Pharmaceutical and personal care product in the environment: Agents of Subtle Change? *Env Health Perspect* 107, 907-938.
- **De Lange H. J., Noordoven W., Murk A J., Lurling M., Peeters E.T.H.M.,** 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (crustacea, amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78, 209–216.
- **Di'az-Cruz S.M., Jesu' s Garcí'a-Gala'n M., Barcelo D.,** 2008. Highly sensitive simultaneous determination of sulphonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography–quadrupole linear ion trap–mass spectrometry. *J of Chroma A* 1193, 50-59.

- **Fatta D., Nikolaou A., Achilleos A., Meric S.,** 2007. Analytical methods for tracing pharmaceutical residues in water and wastewater. Trends in *Analytical Chemistry* 26, 515-533.
- **Fent, K., Weston A. A., et Caminada D.,** 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122-159.
- **Gielen G.J.H.P., Heuvel M.R.V.D.H., Clinton P.W., Greenfield L.G.,** 2009. Factors impacting on pharmaceutical leaching following sewage application to land. *Chemosphere* 74, 537-542.
- **Golet E.M., Alder A.C., Giger W.,** 2002. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland. *Env Sci & Technol* 36, 3645-3651.
- **Halling-Sorensen B., Nors Nielson S., Lanzky P. F., Ingerslev F., Holten Lutzhoft H. C., Jorgensen S. E.,** 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- **Han G. H., Hur H. G., Kim S. D.,** 2006. Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna*. *Env Toxi & Chem* 25, 265-271.
- **Hernando M.D., Mezcua M., Fernández-Alba A.R., Barceló D.,** 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334-342.
- **Hilton M., Thomas K.V.,** 2003. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J of Chroma A* 1015, 129-141.
- **Junker-Buchheit A., Witzenbacher M.,** 1996. Pesticide monitoring of drinking water with help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J of Chroma A*, 737, 67-74.
- **KNAPPE Project.,** 2008. Knowledge and Need Assessment on Pharmaceutical Products in Environmental Waters, Ecotoxicology of pharmaceuticals: making sense of the published literature, disponible sur: <http://www.knappe-eu.org/fichiers/58-D4.1%20proceedings%20of%20WP4%20workshop.pdf>.
- **Kolpin D. W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman M. E., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T.,** 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater

- contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Env.Sci.Technol* 36, 1202-1211.
- **Kostopoulou M., A Nikolaou A.**, 2008. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trend in Analy Chem* 27, 1023-1035.
 - **Kuehne M., Ihnen D., Moeller G., Agthe O.**, 2000. Stability of tetracycline in water and liquid manure. *J of Veteri Medic Seri A* 47, 379-384.
 - **Kümmerer K.**, 2009. Antibiotics in the aquatic environment -A review - Part I. *Chemosphere* 75, 417-434.
 - **Lavén M., Alsberg T., Yu Y., Adolfsson-Erici M., Sun H.**, 2009. Serial mixed-mode cation-, anion-exchange solid-phase extraction for separation of basic, neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater and analysis by highperformance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J of Chroma A* 1216, 49-62.
 - **Mélinda M., Perrin M.**, 2008. Extraction en phase solide de 22 médicaments d'intérêt en toxicologie médico-légale, *Ann Toxicol Anal* 20, 39-45.
 - **Montague P.**, 1998. Drug in the water. Rachel's Environment & Health Weekly # 614. *Environ Resear Foundat* 5p. Disponible sur internet :
< [URL:http://www.sdearthtimes.com/et1098/et1098s5.html](http://www.sdearthtimes.com/et1098/et1098s5.html)>.
 - **Morrall D., McAvoy D., Schatowitz B., Inauen J., Jacob M., Hauk, A., Eckhoff W.**, 2004. A field study of triclosan loss rates in river water (Cibolo Creek, TX), *Chemosphere* 54, 653-660.
 - **Munoz-Olivia R.**, 2004. Screening analysis: an overview of methods applied to environmental, clinical and food analysis, *Trend in Analy Chem* 23, 203-216.
 - **Peng X., Wang Z., Kuang W., Tan J., Li K.**, 2006. A preliminary study on the occurrence and behavior of sulfonamides, ofloxacin and chloramphenicol antimicrobials in wastewaters of two sewage treatment plants in Guangzhou, China., *Sci of the Total Env* 371, 314-322.

- **Pépin J.M.**, 2006. Impacts écotoxicologiques de certains médicaments dans l'environnement. Essai. 66p. Sherbrooke, Québec, Canada, disponible sur : <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1314909>.
- **Pomati F., Netting A. G., Calamari D., Neilan B. A.**, 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquat Toxi* 67, 387-396.
- **Puig D., Barcelo D.**, 1996. Comparison of different sorbent materials for on line liquide solid extraction followed by liquid chromatographic determination of priorities phenolic compound in environmental water, *J of Chroma A* 733 , 371-381.
- **Santos J.L., Aparicio I., Callejón M., Alonso E.**, 2009. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain), *J Hazard Materiels* 164, 1509-1515.
- **Soumani K.**, 2007. Mise au point et optimisation d'une méthode d'extraction en phase solide de pesticides présents dans l'eau. Mémoire de magistère. *ENSSMAL*, 51p.
- **Stajnbaher D., Zupancic-Kralj L.**, 2003. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography- mass spectrometry. *J of Chroma A* 1015, 185-198.
- **Stülten D., Zühlke S., Lamshöft M., Spiteller M.**, 2008. Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents, *Sci of Total Environ* 405, 310-316.
- **Ternes T.A.**, 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Wat Res* 32, 3245-3260.
- **www.scpscience.com**, extraction en phase solide.
- **Zuccato E., Castiglioni S., Fanelli R., Reitano G., Bagnati R., Chiabrando C., Pomati F., Rossetti C., Calamari D.**, 2006. Pharmaceuticals in the Environment in Italy: Causes, Occurrence, Effects and Control, *Environ Sci & Pollut Res* 13, 15-21.

Résumé :

Le but de cette étude est de mettre au point une méthode d'analyse des résidus d'un médicament (ibuprofène) présents dans l'eau. Deux méthodes d'extraction ont été testées: l'extraction liquide-liquide et l'extraction en phase solide en utilisant une phase polymérique adsorbante « Lichrolut EN ». Cette étape est suivie par une analyse d'identification et de quantification par HPLC- UV à barrettes diodes. L'étude a été menée sur des échantillons d'eau distillée dopée à des niveaux de 25, 50 et 100 µg.L⁻¹. La méthode optimale a été appliquée à des échantillons prélevés au niveau d'une station d'épuration d'eau usée, de l'exutoire d'un hôpital et à l'eau de robinet. Les résultats obtenus montrent bien que la SPE est une méthode de choix pour l'analyse de l'ibuprofène dans l'eau.

Mots clés : eau, résidus médicamenteux, ibuprofène, SPE, HPLC.

Abstract:

The purpose of this study is to develop a method for residue analysis of a drug (ibuprofen) in water. Two extraction methods were tested: the liquid - liquid extraction and solid phase extraction using polymeric adsorbent phase "LiChrolut EN". This step is followed by an identification and quantification analysis by HPLC-UV diode-array. The study was conducted on distilled water samples fortified at levels of 25, 50 and 100 µg.L⁻¹. The optimum method was applied to samples collected at a wastewater treatment plant, from the outfall of a hospital and water spigot. The results show that the SPE is a choice method for the ibuprofen analysis in water.

Keywords: water, drug residues, ibuprofen, SPE, HPLC

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو تطوير طريقة لتحليل بقايا دواء (إيبوبروفان) في الماء. تم اختبار طريقتين إستخراج : الإستخراج السائل السائل و مرحلة الإستخراج الصلب بإستخدام المرحلة البوليمرية الممتازة « Lichrolut EN ». ويتبع هذه الخطوة تحليلاً للتحديد وتقدير باستخدام الأشعة فوق البنفسجية ديود - الصيف بواسطة HPLC- UV. و قد أجريت هذه الدراسة على عينات من الماء المقطر بمستويات 25 ، 50 و 100 µg.L⁻¹. تم تطبيق هذه الطريقة المثلى لعينات من محطة معالجة المياه، تصريف المياه من المستشفى و لمياه الشرب، و تظهر النتائج أن الطريقة المستخدمة صالحة و وسيلة لاختيار لتحليل و معاينة الإيبوبروفان في الماء.

الكلمات البحث : المياه, بقايا الأدوية, الإيبوبروفين, HPLC, SPE .

