

# **THESE**

Présentée à

**L'UNIVERSITE DE POITIERS**

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE D'INGENIEURS DE POITIERS

ECOLE DOCTORALE : SCIENCES POUR L'ENVIRONNEMENT GAY LUSSAC

Pour l'obtention du Grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS**

(Diplôme National - Arrêté du 7 août 2006)

**Spécialité : CHIMIE ET MICROBIOLOGIE DE L'EAU**

par :

**Manal Soufan**

\*\*\*\*\*

**OXYDATION PAR LE CHLORE DE COMPOSES PHARMACEUTIQUES**

\*\*\*\*\*

Soutenance prévue le 13 décembre 2011, devant la Commission d'Examen

*Présidente du jury*

M<sup>me</sup> Sylvie RABOUAN

*Rapporteurs*

M. Hubert DEBELLEFONTAINE  
M. Dominique WOLBERT

*Examineurs*

M. Urs VON GUNTEN

*Directeurs de Thèse*

M. Bernard LEGUBE  
M<sup>me</sup> Marie DEBORDE

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie de l'Eau et de l'Environnement (CNRS UMR 6008) de l'Ecole Supérieure d'Ingénieur de Poitiers avec le soutien financier du Ministère Syrien de la Recherche et de l'éducation ainsi que EAU DE PARIS.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Bernard LEGUBE, le directeur de cette thèse, pour m'avoir fait confiance en m'accueillant au sein de son équipe, puis pour m'avoir guidé, encouragé et conseillé.*

*Mes remerciements vont également à Mme Marie DEBORDE, pour son aide, sa gentillesse, ses précieux conseils et son soutien tout au long de ces années. Je lui suis infiniment reconnaissante de son investissement dans ma vie professionnelle et personnelle. Je ne sais comment exprimer ma gratitude à Mme Marie DEBORDE autrement qu'en lui promettant d'agir comme elle avec des étudiants dans ma situation lorsque l'occasion se présentera.*

*Un grand merci à Madame Sylvie RABOUAN, Professeur à la faculté de Pharmacie de Poitiers, de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse ainsi que pour le précieux soutien qu'elle m'a témoigné durant le Master recherche.*

*Je tiens à remercier Monsieur Hubert DEBELLEFONTAINE, Professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées à Toulouse, et Monsieur Dominique WÖLBERT, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Rennes, pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur, ainsi que Monsieur Urs VON GUNTEN, Docteur au Department for Water Resources and Drinking Water (EAWAG) de Dübendorf, pour avoir accepté d'être examinateur et de ce travail et d'avoir participé au jury de thèse par visioconférence.*

*Je tiens également à remercier l'ensemble des permanents du laboratoire pour leur disponibilité et leur gentillesse ainsi que tous les étudiants que j'ai rencontrés au cours de ces années, pour les moments qu'on a partagé. J'ai également une pensée pour Pascale PIERRE-EUGENE qui m'a aidé au cours de mon travail de recherches à la faculté de Pharmacie de Poitiers.*

*Je n'oublie pas mes amis syriens, qui m'ont toujours soutenu durant les moments difficiles et ont partagé les bons moments. Leurs présence m'a permis d'atténuer le manque de mon pays. Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à Walid TOUARI pour sa présence et pour son soutien depuis mon arrivée en France.*

*J'adresse mon infinie reconnaissance à toute ma famille, ma mère, mon frère et mes sœurs sans qui je n'aurais pas trouvé le courage de continuer et de finaliser mon projet professionnel.*

*J'exprime toute ma gratitude à mon mari pour son soutien, sa présence et sa patience qui m'ont permis d'avancer, il m'a été d'une aide précieuse. Je veux offrir ce mémoire de thèse à mes enfants Anas et Adam qui ont partagé le stress de la fin de thèse avec moi.*

*A mon père*

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## **CHAPITRE I: BIBLIOGRAPHIE**

<b>I- PRODUITS PHARMACEUTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUEUX.....</b>	<b>3</b>
<b>I.1- Origine de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques.....</b>	<b>4</b>
<b>I.2- Principaux produits pharmaceutiques retrouvés dans les eaux.....</b>	<b>6</b>
<b>I.3- Risque potentiel dû à la présence de composés pharmaceutiques dans les eaux.....</b>	<b>9</b>
<b>I.4- Devenir des composés pharmaceutiques dans l'environnement.....</b>	<b>11</b>
<b>II- PRODUITS PHARMACEUTIQUES ETUDIES.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1- Propriétés physico-chimiques.....</b>	<b>14</b>
<b>II.2- Consommation et utilisation.....</b>	<b>15</b>
<b>II.3- Devenir au sein des stations d'épuration et présence dans l'environnement.....</b>	<b>16</b>
<b>II.4- Toxicité et risque potentiel due à leur présence dans l'eau.....</b>	<b>18</b>
<b>III- DESINFECTION DE L'EAU.....</b>	<b>20</b>
<b>III.1- La chloration ...</b>	<b>21</b>
III.1.1- Généralités sur le chlore.....	21
III.1.2- Réactivité du chlore vis-à-vis des polluants chimiques.....	24
III.1.3- Oxydation par le chlore des produits pharmaceutiques étudiés.....	29
III.1.3.1- Paracétamol.....	29
III.1.3.2- Diclofénac.....	31
III.1.3.3- Carbamazépine.....	33
<b>III.2- Autres procédés de désinfection: l'ozonation.....</b>	<b>34</b>
III.2.1- Oxydation par l'ozone du paracétamol.....	36
III.2.2- Oxydation par l'ozone du diclofénac.....	37
III.2.2- Oxydation par l'ozone de la carbamazépine.....	40
<b>III.3- Conclusion.....</b>	<b>42</b>

## **CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES**

<b>I- REACTIFS ET SOLUTIONS.....</b>	<b>43</b>
<b>II- NETTOYAGE DE LA VERRERIE.....</b>	<b>43</b>
<b>III-PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>44</b>
<b>III.1-Etude cinétique.....</b>	<b>44</b>
<b>III.2- Etude des sous-produits.....</b>	<b>44</b>
<b>IV- METHODES ANALYTIQUES.....</b>	<b>45</b>
<b>IV.1- Dosage du chlore.....</b>	<b>45</b>
IV.1.1- Dosage par iodométrie.....	45
IV.1.2- Dosage par la méthode à la diéthyl-p-phényldiamine (DPD).....	46
<b>IV.2- Dosage du paracétamol, diclofénac et carbamazépine.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.3- Identification des sous-produits de chloration.....</b>	<b>47</b>
<b>V- AUTRES METHODES D'ANALYSE.....</b>	<b>49</b>

## **CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>I- PROJET D'ARTICLE N°: 1.....</b>	<b>52</b>
<b>Aqueous chlorination of acetaminophen: kinetic study and transformation products identification</b>	
<b>I.1- Introduction.....</b>	<b>53</b>
<b>I.2- Materials and methods.....</b>	<b>55</b>
I.2.1- Standards and reagents.....	55
I.2.2- ATP chlorination experiments.....	55
I.2.3- Analytical methods.....	56
<b>I.3- Results and discussion.....</b>	<b>57</b>
I.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination.....	57
I.3.2- pH dependence profile and rate constants of elementary reactions.....	59
I.3.3- Identification of oxidation by-products.....	62
I.3.4- Proposed reaction pathways.....	66
I.3.5- Formation of major transformation products according to chlorine dose.....	66
<b>I.4- Conclusion.....</b>	<b>68</b>

<b>II- PROJET D'ARTICLE N°: 2.....</b>	<b>69</b>
<b>Aqueous chlorination of diclofenac: kinetic study and transformation products identification</b>	
<b>II.1- Introduction.....</b>	<b>70</b>
<b>II.2- Materials and methods.....</b>	<b>73</b>
II.2.1- Standards and reagents.....	73
II.2.2- Diclofenac (DCF) chlorination experiments.....	73
II.2.3- Analytical methods.....	74
<b>II.3- Results and discussion.....</b>	<b>75</b>
II.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination.....	75
II.3.2- pH dependence profile and rate constants of elementary reactions.....	77
II.3.3- Identification of oxidation by-products.....	82
II.3.4- Monitoring of transformation products formation and proposed reaction pathways.....	87
<b>II.4- Conclusion.....</b>	<b>89</b>
<b>III- PROJET D'ARTICLE N°: 3.....</b>	<b>90</b>
<b>Aqueous chlorination of carbamazepine: kinetic study and transformation product identification</b>	
<b>III.1- Introduction.....</b>	<b>91</b>
<b>III.2- Materials and methods.....</b>	<b>93</b>
III.2.1- Standards and reagents.....	93
III.2.2- CBZ chlorination experiments.....	93
III.2.3- Analytical methods.....	94
<b>III.3- Results and discussion.....</b>	<b>96</b>
III.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination.....	96
III.3.2- pH dependence profile and rate constants of the proposed elementary reactions.....	99
III.3.3- Identification of oxidation by-products.....	103
III.3.4- Monitoring of transformation products formation and proposed reaction pathways.....	108
<b>III.4- Conclusion.....</b>	<b>111</b>
<b>V- SYNTHÈSE ET DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>112</b>
<b>IV.1- Cinétiques de chloration à différents pH.....</b>	<b>112</b>
IV.1.1- Le paracétamol ou acétaminophène (ATP).....	114
IV.1.2- Le diclofénac (DCF).....	118
IV.1.3- La carbamazépine (CBZ).....	121
<b>IV.2- Sous-produits de chloration et schémas réactionnels.....</b>	<b>131</b>
IV.2.1- Le paracétamol ou acétaminophène (ATP).....	131

IV.2.2- Le diclofénac (DCF).....	133
IV.2.3- La carbamazépine (CBZ).....	135
<b>IV.3- Application à la désinfection des eaux.....</b>	<b>136</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>142</b>

---

## **Introduction**

---

## **INTRODUCTION**

La préoccupation mondiale concernant la présence de composés pharmaceutiques dans l'eau a considérablement augmenté ces dernières années. Dans de nombreuses ressources en eau, en effet, une grande variété de composés pharmaceutiques, tels que des antibiotiques, des analgésiques, des anti-inflammatoires, des agents de contraste ou des antiépileptiques, a récemment été mise en évidence.

Les composés pharmaceutiques retrouvés dans l'environnement proviennent principalement de l'élimination de ces molécules et leurs métabolites par les hommes ou les animaux sous traitement thérapeutique. Leurs concentrations dans les eaux, variables d'un site à l'autre mais également d'un composé à l'autre, sont généralement faibles. Cependant, des concentrations non négligeables de ces composés, de quelques nano-grammes par litre à quelques centaines de microgrammes par litre ont parfois été observées.

Les risques potentiels dus à la présence de telles substances dans les eaux sont mal connus et l'effet cumulatif (de type « cocktail ») de cette pollution sur la santé humaine et l'environnement reste encore difficile à évaluer. Ainsi des travaux d'étude et de recherche sont nécessaires pour mieux connaître les dangers et caractériser les expositions.

Concernant l'Homme, la production d'eau potable à partir d'eaux polluées, pourrait constituer une voie d'exposition à de tels polluants. En matière de Santé Publique, une évaluation du devenir des composés pharmaceutiques au cours de la filière de traitement des eaux est donc essentielle, notamment pour les professionnels de l'eau.

Dans ce contexte, l'objectif des travaux entrepris au laboratoire sur ce thème a été d'évaluer le devenir de polluants émergents de type pharmaceutique, lors des étapes de chloration des eaux destinées à la consommation humaine.

En effet, bien que cette étape ne soit généralement pas utilisée pour oxyder spécifiquement les micropolluants organiques, la chloration est une étape de désinfection fréquemment utilisée en France au cours de la filière de traitement des eaux. Ainsi, lorsque

ces composés sont présents dans les eaux, cette étape est susceptible de les dégrader générant de nombreux sous-produits potentiellement toxiques pour l'Homme.

Dans cette étude, trois composés pharmaceutiques d'usage très répandu (le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine) choisis parmi les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement, ont été sélectionnés.

Dans un premier temps, de façon à évaluer leur dégradation au cours des étapes de chloration des eaux, pour chaque composé, une étude cinétique de réaction à différents pH a été menée. Dans un second temps, une identification des sous-produits de dégradation par le chlore a été réalisée.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré aux rappels bibliographiques. Il présente des généralités sur les composés pharmaceutiques, la chloration, ainsi que les connaissances actuelles concernant l'oxydation par le chlore des différents composés étudiés. De même dans ce chapitre, en raison de sa fréquence d'utilisation (notamment au sein des filières de traitement des eaux en France) et des expériences d'ozonation initialement prévus dans le cadre de ce travail, une synthèse des données bibliographiques portant sur l'ozonation des composés étudiés est réalisée. Le second chapitre consiste en une description des protocoles de manipulation et des techniques analytiques utilisées. Enfin, dans le dernier chapitre, les résultats obtenus sont rapportés sous formes d'articles, rédigés en anglais, suivis par une discussion générale en français et d'une conclusion.

---

## **Chapitre I: Bibliographie**

---

---

## CHAPITRE I: BIBLIOGRAPHIE

---

<b>I- PRODUITS PHARMACEUTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUEUX.....</b>	<b>3</b>
<b>I.1- Origine de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques.....</b>	<b>4</b>
<b>I.2- Principaux produits pharmaceutiques retrouvés dans les eaux.....</b>	<b>6</b>
<b>I.3- Risque potentiel dû à la présence de composés pharmaceutiques dans les eaux.....</b>	<b>9</b>
<b>I.4- Devenir des composés pharmaceutiques dans l'environnement.....</b>	<b>11</b>
<b>II- PRODUITS PHARMACEUTIQUES ETUDIES.....</b>	<b>14</b>
<b>II.1- Propriétés physico-chimiques.....</b>	<b>14</b>
<b>II.2- Consommation et utilisation.....</b>	<b>15</b>
<b>II.3- Devenir au sein des stations d'épuration et présence dans l'environnement.....</b>	<b>16</b>
<b>II.4- Toxicité et risque potentiel due à leur présence dans l'eau.....</b>	<b>18</b>
<b>III- DESINFECTION DE L'EAU.....</b>	<b>20</b>
<b>III.1- La chloration .....</b>	<b>21</b>
III.1.1- Généralités sur le chlore.....	21
III.1.2- Réactivité du chlore vis-à-vis des polluants chimiques.....	24
III.1.3- Oxydation par le chlore des produits pharmaceutiques étudiés.....	29
III.1.3.1- Le paracétamol.....	29
III.1.3.2- Le diclofénac.....	31
III.1.3.3- La carbamazépine.....	33
<b>III.2- Autres procédés de désinfection: l'ozonation.....</b>	<b>34</b>
III.2.1- Oxydation par l'ozone du paracétamol.....	36
III.2.2- Oxydation par l'ozone du diclofénac.....	37
III.2.2- Oxydation par l'ozone de la carbamazépine.....	40
<b>III.3- Conclusion.....</b>	<b>42</b>

## I- PRODUITS PHARMACEUTIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT AQUEUX

Les micropolluants dans l'environnement aquatique sont un problème majeur tant pour la population humaine, utilisatrice des ressources en eau, que pour les écosystèmes aquatiques.

Parmi les micropolluants émergents, les produits pharmaceutiques ont attiré l'attention depuis plusieurs années. Ce sont des substances actives qui peuvent rester longtemps dans l'eau. De plus, de nombreuses recherches montrent que différentes classes pharmaceutiques, telles que des antibiotiques, des analgésiques, des anti-inflammatoires, des agents de contraste ou des antiépileptiques, sont contenues dans les eaux (eaux usées, eaux traitées, eaux de surface, etc.) en France et dans d'autres pays comme les Etats-Unis, le Canada, le Brésil, l'Allemagne, l'Italie, l'Angleterre, l'Espagne, la Grèce, la Suisse, les Pays-Bas, le Danemark, l'Autriche et la Croatie (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Ternes *et al.*, 1998; Stumpf *et al.*, 1999; Zuccato *et al.*, 2000; Zwiener et Frimmel, 2000; Heberer, 2002; Kolpin *et al.*, 2002; Boyd *et al.*, 2003; Wiegel *et al.*, 2004; Boyd *et al.*, 2005; Paffoni *et al.*, 2006).

Les produits pharmaceutiques sont principalement retrouvés dans les eaux usées suite à leur excrétion métabolique par l'homme et les animaux, notamment *via* les effluents hospitaliers ou les effluents agricoles (médicaments vétérinaires). De plus, les composés pharmaceutiques assimilés par l'homme et les animaux peuvent se dégrader au sein des organismes vivants, et les produits de dégradation issus de la métabolisation, également excrétés dans les urines ou les fèces, peuvent aussi être considérés comme micropolluants. Les stations d'épuration, bien qu'elles se soient significativement améliorées sur le plan technique ces dernières années, n'ont pas été conçues pour éliminer la totalité des molécules pharmaceutiques. Par exemple, même si le paracétamol y est dégradé à plus de 90 %, on en retrouve des traces dans les eaux usées remises en circulation, puis dans les eaux de surface (Kolpin *et al.*, 2002). Certains composés, comme le diclofénac (un anti-inflammatoire) ou la carbamazépine (un antiépileptique), ne se dégradent quasiment pas (Ternes, 1998; Heberer, 2002). Ces résidus de produits pharmaceutiques, rejetés dans les eaux de surface, peuvent donc présenter un risque environnemental non négligeable, de même que leurs métabolites ou sous-produits de dégradation, parfois plus dangereux que le produit d'origine (par exemple:

Henschel *et al.*, 1997). Un effet aigu de ces molécules est peu probable, car elles n'existent qu'en faibles concentrations dans le milieu et la majorité de ces composés n'est pas censée exercer des effets toxiques aigus, du moins chez les mammifères. Mais ils sont conçus pour agir sur des processus métaboliques, dont certains peuvent avoir des conséquences à long terme sur l'homéostasie et les fonctions physiologiques des organismes. De même, des effets additifs, antagonistes ou synergiques peuvent être envisagés lorsque les composés sont associés en mélange, ce qui est le cas actuellement.

## **I.1- Origine de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques**

De nombreuses études démontrent que la plupart des eaux de surfaces étudiées est polluée par les produits pharmaceutiques. De même, la présence de ces produits est avérée dans les eaux de surface, les eaux souterraines et résiduaires, les boues des stations d'épuration utilisées en épandage agricole et même dans l'eau potable. Ce phénomène proviendrait principalement des eaux usées remises en circulation par les stations d'épuration, au sein desquelles qu'une élimination partielle des résidus des produits pharmaceutiques et des phénomènes de déconjugaisons des métabolites médicamenteux inactifs en molécules initiales actives ont été observés.

Les principales sources de pollution des eaux par les produits pharmaceutiques, peuvent être, selon le rapport de l'Académie Nationale de Pharmacie (2008), distinguées en deux types: les sources diffuses issues principalement des excréctions humaines et animales, et représentant la plus grande partie des médicaments rejetés dans l'environnement, et les sources ponctuelles qui sont à l'origine d'émissions beaucoup plus concentrées mais limitées sur le plan géographique. On retrouve, parmi les sources diffuses:

- le stockage et l'élimination inappropriés des médicaments périmés ou inutilisés (Zuccato *et al.*, 2000),

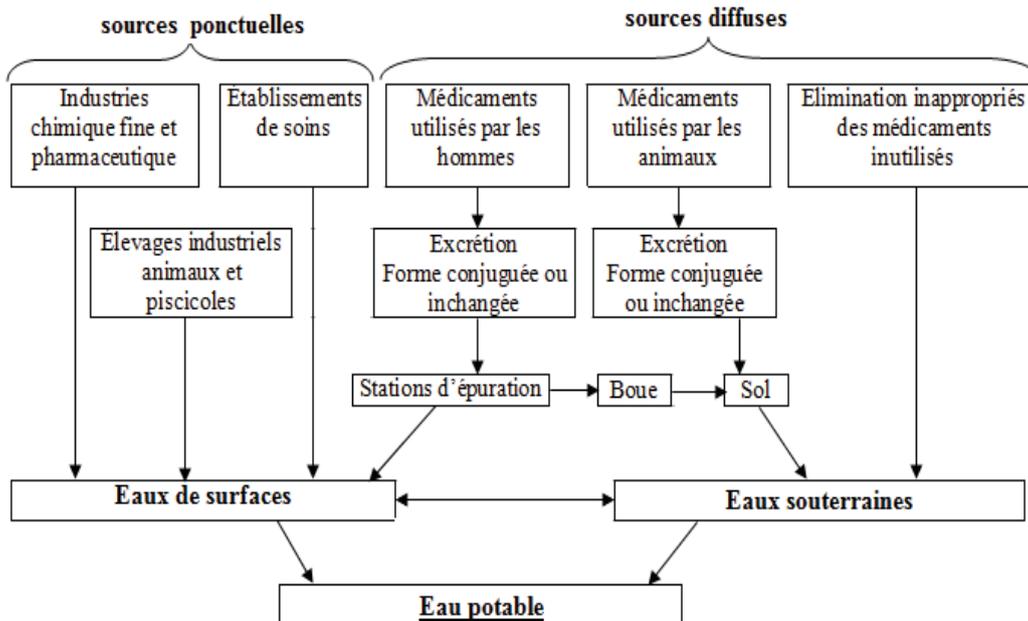
- l'excrétion métabolique par la voie urinaire ou digestive, des médicaments consommés par les hommes et les animaux (Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Zuccato *et al.*, 2000),

et parmi, les sources ponctuelles:

- le rejet direct des médicaments (et des produits chimiques utilisés au cours de la fabrication des médicaments) dans les eaux résiduaires des industries pharmaceutiques et chimiques fines (Zuccato *et al.*, 2000),

- l'élimination directe ou indirecte des agents pharmaceutiques utilisés dans les établissements de soins (laboratoires, hôpitaux, etc.),
- la dispersion directe des médicaments vétérinaires dans l'environnement en aquaculture ou lors de traitement des animaux d'élevage, ou la dispersion indirecte en cas d'épandage des lisiers et des purins dans les sols destinés à l'agriculture,
- la dispersion directe des molécules thérapeutiques sous formes de compléments alimentaires versées directement dans les bassins de pisciculture (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

La Figure I.1 résume, ces principales voies de pollution des eaux par les produits pharmaceutiques.



**Figure I.1:** Sources de la micropollution aqueuse par les produits pharmaceutiques  
(inspiré de la thèse de BONNIN Cécile, 2006)

Parmi ces sources de micropollution, l'excrétion métabolique constitue la cause principale de pollution des eaux. En effet, même si l'élimination de médicaments sous forme inchangée ou sous forme de métabolites actifs est minoritaire, celle sous forme de métabolites conjugués ou très peu modifiés pouvant être ultérieurement hydrolysés dans l'environnement pour redonner la molécule initiale rentre en compte dans la pollution. Ils constituent par conséquent, une source indirecte de libération de médicaments dans l'environnement

(Bendz *et al.*, 2005).

Pour un certain nombre de produits pharmaceutiques, le rejet dans l'environnement s'effectue *via* les stations d'épuration. Dans de nombreux sites en effet, les produits pharmaceutiques ont été détectés dans les effluents d'eaux usées traitées à des concentrations de l'ordre de quelques nano-grammes par litre à quelques centaines de microgrammes par litre. L'élimination de nombreux de ces produits au cours de traitement des eaux usées est donc incomplète. Au sein des stations d'épuration, en plus de l'adsorption possible sur les boues et les sédiments, la principale étape d'élimination des polluants organiques pharmaceutiques semble être la biodégradation (Joss *et al.*, 2006). Toutefois, comme les produits pharmaceutiques peuvent posséder des propriétés physicochimiques très différentes, d'autres voies d'élimination (volatilisation, photo-transformation, ...) peuvent être observées dans les stations d'épuration. Les concentrations des composés pharmaceutiques dans l'eau de sortie de stations d'épuration dépendent donc des concentrations en entrée et des technologies utilisées dans ces stations.

## **I.2- Principaux produits pharmaceutiques retrouvés dans les eaux**

De nombreuses classes pharmaceutiques telles que des antibiotiques, des analgésiques, des anti-inflammatoires, des normolipémiants, des antihypertenseurs, des  $\beta$ -bloquants, des agents de contraste ou des antiépileptiques sont retrouvées dans les eaux.

D'une manière générale, les concentrations en produits pharmaceutiques retrouvées dans l'environnement varient d'un composé à l'autre, mais également d'un site à l'autre. Les concentrations rapportées dans les effluents de stations d'épuration ou dans l'eau de surface vont de quelques nano-grammes par litre à quelques centaines de microgrammes par litre (tableau I.1). Les différences régionales d'utilisation des médicaments ainsi que la biodégradabilité des produits pharmaceutiques et de leurs métabolites pourraient expliquer ces différences de concentrations retrouvées dans l'environnement (Halling-Sorensen *et al.*, 1998).

Le tableau I.1 classe, en fonction de leur activité thérapeutique, les groupes de produits pharmaceutiques qui sont les plus communément retrouvés dans les eaux.

**Tableau I.1:** Exemples de concentrations de composés pharmaceutiques en **ng/L**, dans les eaux (eaux usées traitées, eaux de surface et eaux potables)

Produit pharmaceutique (exemples de spécialité pharmaceutique)*	Concentration dans l'eau usée traitée (ng/L)	Concentration dans l'eau de surface (ng/L)	Concentration dans l'eau potable (ng/L)	Pays
<b>Des antibiotiques</b>				
Tétracycline [cycline] (Amphocline®)	66,0 [a]			France
		110,0 [b]		États-Unis
	69,0 [c]			Chine
Chlortétracycline [cycline] (Aureomycine®)	56,0 [a]			France
		690,0 [b]		États-Unis
Oxytétracycline [cycline] (Posicycline®)	63,0 [a]			France
		340,0 [b]		États-Unis
	492,0 [c]			Chine
Lincomycine [macrolide] (Lincocine®)		730,0 [b]		États-Unis
		249,0 [d]		Italie
Roxithromycine [macrolide] (Claramid®)	50,0 [a]	3,0 [a]		France
		180,0 [b]		États-Unis
Spiramycine [macrolide] (Rovamycine®)	50,0 [a]	4,0 [a]		France
Sulfaméthoxazole [sulfonamide] (Bactrim®)	205,0 [a]	21,0 [a] 544,0 [e]		France
		1900,0 [b]		États-Unis
	370,0 [f]			Espagne
Triméthoprième [pyrimidique] (Bactrim®)	72,0 [a]	3,0 [a]		France
		710,0 [b]		États-Unis
	99,0 [f]			Espagne
<b>Des analgésiques et anti-inflammatoires</b>				
Paracétamol (Doliprane®)	11308,9 [g] 71,0 [h]	72,3 [g]	210,1 [g]	France
	180,0 [k]	10000,0 [b]		États-Unis
Kétoprofène (Profenid®)	1080,6 [g] 36,0 [h]	39,0 [a] 14,5 [g]	3,0 [g]	France
	539,0 [f]			Espagne
			8,0 [i]	Finlande

Ibuprofène (Nurofen <sup>®</sup> )	600,0 [a] 219,0 [g]	25,0 [a] 4,5 [g]	0,6 [g]	France
	60,0 [k]	1000,0 [b]		États-Unis
	653,0 [f]	2700,0 [j]		Espagne
		92,0 [l]		Italie
			3,0 [m]	Allemand
			8,5 [i]	Finlande
Indométacine (Indocid <sup>®</sup> )	59,0 [f]			Espagne
Diclofénac (Voltarene <sup>®</sup> )	486,4 [g]	61,0 [a] 33,2 [g]	2,5 [g]	France
	431,0[f]			Espagne
			6,0 [m] 35,0[n]	Allemagne
Naproxène (Apranax <sup>®</sup> )	289,1 [g]	35,0 [a] 9,1 [g]	0,2 [g]	France
	80,0 [k]			États-Unis
	2208,0[f]			Espagne
Acide salicylique (Algipan <sup>®</sup> )	102,0 [i]			France
	40,0 [j]			Allemagne
<b>Des normolipémiants</b>				
Gemfibrozil (Lipur <sup>®</sup> )	17,2 [g]	2,3 [g]	nd [g]	France
	650,0 [k]	790,0 [b]		États-Unis
	5233,0[f]			Espagne
			70,0 [o]	Canada
Bézafibrate (Befizal <sup>®</sup> )	840,0 [a]	48,0 [a]		France
	280,0 [f]			Espagne
		57,0 [d]		Italie
<b>Des antihypertenseurs et <math>\beta</math>-bloquants</b>				
Métoprolol (Seloken <sup>®</sup> )	100,0 [a]	10,0 [a]		France
		140,0 [p]		Allemagne
	38,0 [f]			Espagne
	2,0 [c]			Chine
Propranolol (Avlocardyl <sup>®</sup> )	190,0 [a]	12,0 [a]		France
	57,0[q]			Espagne
Aténolol (Tenormine <sup>®</sup> )	570,0 [a]	36,0 [a]		France
	2438,0 [f]			Espagne
		241,0 [d]		Italie

Des antiépileptiques				
Carbamazépine (Tegretol <sup>®</sup> )	293,4 [g] 33,0 [i]	80,0 [a] 56,3 [g]	43,2 [g]	France
	207,0 [r] 390,0 [k]		258,0 [m]	États-Unis
		1075,0 [j]		Allemand
	173,0 [f]			Espagne
			24,0 [o]	Canada
Phénobarbital (Gardenal <sup>®</sup> )		15,0 [r]		Japon
Primidone (Mysoline <sup>®</sup> )	95,0 [r]			États-Unis
		635,0 [s]	40,0 [n]	Allemand

\* d'après Dorosz, 1999, nd: non détecté, [a] Paffoni *et al.*, 2006, [b] Kolpin *et al.*, 2002, [c] Shao *et al.*, 2009, [d] Calamari *et al.*, 2003, [e] Tamtam *et al.*, 2008, [f] Rosal *et al.*, 2010, [g] Togola et Budzinski, 2008, [h] Rapport ANSES, 2011, [i] Vieno *et al.*, 2005, cité par Mompelat *et al.*, 2009, [j] Heberer, 2002, [k] Yu et Wu, 2011, [l] Zaccato *et al.*, 2000, [m] Jones *et al.*, 2005, [n] Heberer *et al.*, 2004, cité par Mompelat *et al.*, 2009, [o] Tauber, 2003, cité par Mompelat *et al.*, 2009, [p] Wiegel *et al.*, 2004, [q] Stackelberg *et al.*, 2007, cité par Mompelat *et al.*, 2009, [r] Guo et Krasner, 2009, [s] Heberer *et al.*, 2001.

### I.3- Risque potentiel dû à la présence de composés pharmaceutiques dans les eaux

Au cours des dernières années, les composés pharmaceutiques sont considérés comme des contaminants de l'environnement. Ces composés synthétiques, créés pour avoir un effet biologique thérapeutique, sont consommés en quantités très importantes. Différents protocoles d'analyse ont permis d'effectuer un bilan de la contamination de différents systèmes aquatiques. Ils ont avéré une réelle contamination du milieu aquatique par ces composés, ce, quel que soit le système étudié. Ces travaux démontrent clairement que le compartiment dissous est le plus contaminé mais également que les phases particulaire et sédimentaire peuvent jouer un rôle non négligeable dans la distribution de ces composés dans l'environnement aquatique (par exemple: Budzinski et Togola, 2006; Hernando *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009).

Les risques potentiels liés à la présence de faibles concentrations de composés pharmaceutiques dans l'environnement sont très mal connus. De même, les risques possibles dus à la présence de telles substances en mélange sont actuellement sous le débat.

Toutefois, plusieurs études ont révélé des cas de féminisation de certains poissons dans les eaux douces et les milieux marins (par exemple: Sumpter et Johnson, 2005 cité par Schlenk, 2008). Ces phénomènes de perturbation du système endocrinien pourraient provenir de l'exposition de certains poissons à des hormones de synthèse féminines ou d'autres composés d'origine industrielle ou agricole présents dans les milieux (Schlenk, 2008). Ils comprennent des phénomènes d'induction de vitellogénine (VTG), et/ou de synthèse de protéines chorioniques chez des animaux mâles ou immatures, ainsi que des modifications pathologiques au sein des organes de reproduction (comme les testicules, les ovules) ou la réduction de la motilité ou du nombre de spermatozoïdes (Lye *et al.*, 1997, 1998 et 1999). Par exemple, en Australie, une réduction de la taille du gonopode de Mosquitofish mâles, exposés à des effluents d'eaux usées, a été observée (Batty et Lim, 1999). De même, aux Etats-Unis, des cas d'intersexualité caractérisés par des phénomènes de testis-ova ont été relevés chez des Esturgeons, exposés à des composés organochlorés (Harshbarger *et al.*, 2000).

De plus, l'exposition des bactéries à des résidus d'antibiotiques pourraient générer l'apparition de phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques. En effet, des bactéries résistantes aux antibiotiques ont été détectées dans plusieurs sources d'eaux usées et eaux usées traitées. Par exemple, Alcaide et Garay (1984), ont étudié la résistance à plusieurs antibiotiques (tétracycline, ampicilline, chloramphénicol, streptomycine, kanamycine et amoxicilline) de 865 espèces de *salmonelle*, isolées à partir de différentes sources d'eau. Ces auteurs ont montré dans leur travail que, 12,7 % des bactéries étaient résistantes à un ou plusieurs composés. Parmi ces bactéries, 63,4 % étaient multi-résistantes. De même, dans une autre étude, effectuée par Guardabassi *et al.*, (1999), une augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les eaux usées prélevées d'amont en aval d'un point de rejet d'usine de fabrication de produits pharmaceutiques a été mise en évidence (Guardabassi *et al.*, 1999).

Concernant le risque humain d'exposition aux substances pharmaceutiques par la consommation des eaux de boisson, l'Académie Nationale de Pharmacie, (2008), a déclaré que dans l'état actuel des connaissances, cette exposition à de faibles concentrations, inférieures à la dizaine de nano-grammes par litre, ne présente pas de risque direct (Joyeux, 2006). Cette estimation se fait néanmoins, d'une part, en prenant en compte l'effet individuel des substances, (négligeant la présence des mélanges de composés de la même famille thérapeutique et de modes d'action semblables ou des substances de modes d'action très

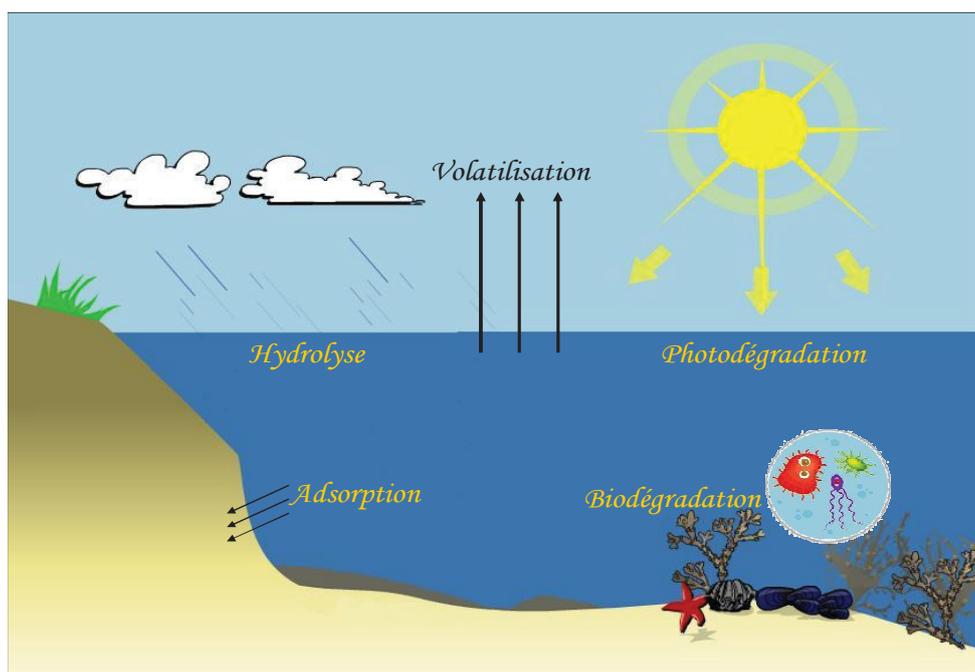
différents, mais tous susceptibles d'interaction), et d'autre part, sur la base de tests d'écotoxicité très limités effectués sur certains animaux aquatiques pour les autorisations de mise sur le marché des médicaments par les entreprises pharmaceutiques (toxicité aiguë). Aucune donnée n'est disponible concernant les effets de faibles doses à long terme (toxicité chronique). De plus, dans le cas des antibiotiques, une nocivité indirecte pour l'homme *via* l'apparition de phénomènes de résistances bactériennes à certains antibiotiques est envisageable. Dans ce dernier cas, ce n'est pas l'action directe des résidus pharmaceutiques dans l'eau sur l'homme qui est mise en question, mais la sélection possible par ces traces de micropolluants de bactéries résistantes. Ces bactéries résistantes susceptibles de se transmettre à l'homme *via* l'eau ou l'alimentation, peuvent coloniser le tube digestif des individus et générer des infections résistantes à l'antibiothérapie (Moubarek *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1999).

#### **I.4- Devenir des composés pharmaceutiques dans l'environnement**

La persistance d'une substance dans l'environnement est sous l'influence d'un grand nombre de facteurs dont ses propriétés intrinsèques (propriétés physiques, chimiques et dégradabilité) ainsi que les caractères éco-systémiques (nature, concentration des populations microbiennes et des matières dissoutes et en suspension, température, degré d'ensoleillement, etc.).

En général, les principaux mécanismes d'élimination physique dans les écosystèmes aquatiques (Figure I.2) sont respectivement:

- la volatilisation,
- l'adsorption sur les solides en suspension et les sédiments,
- la dégradation ou la transformation chimique et photochimique,
- l'absorption et la transformation par les micro-organismes.



**Figure I.2:** Principaux mécanismes d'élimination physico-chimique des micropolluants dans les écosystèmes aquatiques

Concernant les produits pharmaceutiques, les informations sur leur devenir dans l'environnement sont limitées (Kolpin *et al.*, 2002; Moldovan, 2006).

Le ruissellement et le lessivage sont des processus qui contribuent à l'introduction et la distribution des produits pharmaceutiques et leurs sous-produits de dégradation dans l'environnement. Suite à des phénomènes de volatilisation, une diffusion sur de grandes distances de tels composés peut être observée. En effet, après leur émission dans l'atmosphère, les composés volatils absorbés par les eaux de pluie peuvent contaminer les autres compartiments environnementaux.

La transformation abiotique des produits pharmaceutiques dans les eaux de surface ou les eaux usées peut se faire par hydrolyse et/ou par photolyse. Toutefois, comme les produits pharmaceutiques sont généralement résistants à l'hydrolyse, cette réaction peut être considérée comme négligeable pour la plupart des médicaments présents dans les eaux de surfaces. La photolyse directe ou indirecte est donc la voie essentielle de la transformation abiotique des produits pharmaceutiques. La photolyse directe de ces produits est liée à leur capacité d'absorption de la lumière solaire, tandis que la photolyse indirecte s'effectue sous l'action d'espèces fortement oxydantes (radicaux hydroxyles et oxygène singulet), générées

par action du rayonnement solaires sur les photo-sensibilisateurs naturels, comme les acides humiques ou les nitrates. A ce jour, de nombreuses recherches se sont intéressées à la photolyse des composés pharmaceutiques (par exemple: Lam *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2009).

Enfin, une transformation biotique des composés pharmaceutiques par les microorganismes de l'environnement peut également être observée (Kummerer *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2006). Ce phénomène est dû à l'action des micro-organismes vivants présents dans les milieux naturels (les sols, les sédiments et les eaux), qui par leurs systèmes enzymatiques, peut provoquer une transformation chimique des micropolluants. En conséquence, une réduction partielle ou totale des composés indésirables présents dans les milieux peut être effectuée grâce à cette action biologique.

## II- PRODUITS PHARMACEUTIQUES ETUDIÉS

Trois composés pharmaceutiques aromatiques azotés ont été retenus pour cette étude. Ces composés, très couramment détectés dans les milieux aquatiques, englobent un analgésique (le paracétamol (ATP)), un anti-inflammatoire (le diclofénac (DCF)) et un anticonvulsivant (la carbamazépine (CBZ)).

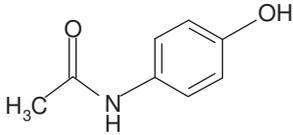
Dans cette partie, nous présenterons les données concernant:

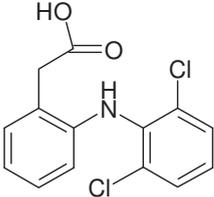
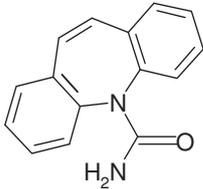
- les propriétés physico-chimiques de ces composés,
- leur consommation et leur utilisation,
- leur devenir au sein des stations d'épuration,
- leur toxicité et leur risque potentiel pour l'environnement.

### II.1- Propriétés physico-chimiques

Le tableau I.2 résume les principales propriétés physico-chimiques des composés pharmaceutiques choisis pour cette étude. D'un point de vue chimique, tous ces composés englobent un ou plusieurs cycles aromatiques sur lesquels sont fixés divers groupements fonctionnels azotés, phénoliques, ou acides.

**Tableau I.2:** Propriétés physico-chimiques des composés pharmaceutiques étudiés

Composé pharmaceutique étudié	Structure Chimique
<p><b><u>Paracétamol (ATP)</u></b>            (N-(4-hydroxyphényl) acétamide)            Très soluble dans l'eau (14 g.L<sup>-1</sup> à 20 °C)  <i>Formule brute:</i> C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>2</sub>  <i>Masse molaire:</i> 151,20 g.mol<sup>-1</sup>  <i>pKa</i> = 9,5  <i>Log Kow</i> = 0,46 (Jones <i>et al.</i>, 2002; Khan et Ongerth, 2002, cités par Beausse, 2004)</p>	

<p><b><u>Diclofénac (DCF)</u></b>            Acide (2-[(2,6-dichlorophényl) amino] benzène acétique soluble dans l'eau (<math>2,37 \cdot 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}</math> à <math>25 \text{ °C}</math>)  <i>Formule brute:</i> <math>\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{NO}_2</math>  <i>Masse molaire:</i> <math>296,14 \text{ g.mol}^{-1}</math>  <i>pKa</i> = 4,2  <i>Log Kow</i> = 0,70 et 4,51 (Jones <i>et al.</i>, 2002; Beausse, 2004)</p>	
<p><b><u>Carbamazépine (CBZ)</u></b>            (5H-Dibenzo[b,f]azépine-5carboxamide)            Insoluble dans l'eau  <i>Formule brute:</i> <math>\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}</math>  <i>Masse molaire:</i> <math>236,27 \text{ g.mol}^{-1}</math>  <i>Log Kow</i> = 2,25 et 2,45 (Jones <i>et al.</i>, 2002; Khan et Ongerth, 2002, cités par Beausse, 2004)</p>	

## II.2- Consommation et utilisation

Selon l'Académie Nationale de Pharmacie (2008), la France est le quatrième consommateur mondial de médicaments, après les États Unis, le Japon et l'Allemagne. Le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine sont parmi les composés pharmaceutiques les plus utilisés dans les pays industrialisés.

En 1998, les consommations annuelles de paracétamol et de carbamazépine, en France, ont été estimées respectivement à 2294 tonnes et 38 tonnes (Janex *et al.*, 2002, cités par Beausse, 2004). De même en 1998, une autre étude a montré une consommation annuelle de diclofénac et de carbamazépine, en France de l'ordre de 14,9 et 35,2 tonnes respectivement (Metcalf *et al.*, 2004, cités par Alder *et al.*, 2006).

Le paracétamol (ou acétaminophène) est la dénomination commune d'un médicament d'usage très répandu, qui a une activité analgésique et antipyrétique d'intensité comparable à celle de l'aspirine. Contrairement à l'aspirine, cette molécule n'a en revanche pratiquement pas d'effet sur l'inflammation. En France, le paracétamol est utilisé sous forme de comprimés,

suppositoires, sirops et sachets. Il entre dans la composition de très nombreuses spécialités pharmaceutiques telles que par exemple le Doliprane<sup>®</sup>, l'Effergal<sup>®</sup> et le Dafalgan<sup>®</sup> (Dorosz, 1999).

Le diclofénac est un anti-inflammatoire non stéroïdien, il existe en France sous forme de comprimés, granulés, suppositoires, collyres, gels et emplâtres. Il est contenu dans plusieurs spécialités dont le Voltarene<sup>®</sup>, l'Artotec<sup>®</sup>, le Xenid<sup>®</sup>, le Flector<sup>®</sup> et le Voldal<sup>®</sup> (Dorosz, 1999).

La carbamazépine est une molécule à activité anticonvulsivante et antinévralgique (antiépileptique) utilisée en France sous forme de comprimés et suspensions buvables. Plusieurs spécialités pharmaceutiques telles que le Tegreto<sup>®</sup> contiennent de la carbamazépine (Dorosz, 1999).

### **II.3- Devenir au sein des stations d'épuration et présence dans l'environnement**

Le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine sont fréquemment détectés dans les milieux aquatiques à des teneurs diverses.

Collecté dans les eaux usées, le paracétamol semble bien se dégrader dans les stations d'épuration et est rarement retrouvé dans les effluents. Selon une étude réalisée en Allemagne (1998), par Ternes, un pourcentage d'élimination de plus de 98 % a en effet été reporté (Ternes, 1998). De même, dans une étude réalisée en Espagne par Rosal *et al.*, (2010), aucune trace de paracétamol n'a été détectée en sortie de station d'épuration alors que des concentrations moyennes dans l'eau en entrée de l'ordre de 23 µg.L<sup>-1</sup> avaient été observées. Dans cette étude, une élimination totale au sein de station d'épuration a donc été considérée pour ce composé (Rosal *et al.*, 2010). Cependant, dans certains sites, des concentrations à l'état de traces ont été reportées dans les effluents de station d'épuration. En France, par exemple, des concentrations de l'ordre de 0,1 à 11,3 µg.L<sup>-1</sup> ont été rapportées par Togola et Budzinski, (2008).

Contrairement au paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine semblent relativement plus stables au cours du traitement des eaux usées. En effet, des faibles pourcentages de dégradation de 69 % et 7 % pour le diclofénac et la carbamazépine ont été

observés au sein d'une station d'épuration en Allemagne (Ternes, 1998). De même, Rosal *et al.*, (2010), ont rapporté dans leur étude portant sur la persistance des composés pharmaceutiques au cours de traitement de l'eau, des concentrations moyennes en sortie de station d'épuration de l'ordre de  $0,22 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le diclofénac et  $0,12 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la carbamazépine, pour des concentrations moyennes en entrée de  $0,23$  et  $0,13 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Rosal *et al.*, 2010). Pour ces composés, des faibles taux de dégradation de l'ordre de 5 et 9,5 % ont été rapportés. Ces faibles taux d'élimination pourraient s'expliquer par leurs faibles taux de biodégradation et d'adsorption sur les boues et les sédiments (Joss *et al.*, 2006; Ternes *et al.*, 2004). Dans de nombreux sites, la présence de tels composés en sortie de station d'épuration a donc été mise en évidence. Par exemple, en France, des concentrations maximales de l'ordre de  $0,486 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour le diclofénac et  $0,293 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la carbamazépine ont été observées (Togola et Budzinski, 2008).

Ainsi, les composés pharmaceutiques étudiés ne sont pas complètement éliminés dans les stations d'épuration et peuvent être rejetés dans les eaux de surface par leurs effluents. En addition de leur introduction directe dans l'environnement (Figure I.1), bien évidemment, des phénomènes de dilution et de transformations biotique et abiotique de ces molécules peuvent être observés après leur rejet dans les eaux de surface. Parmi ces phénomènes, la photodégradation serait très variable d'une molécule à l'autre comme l'ont montré Andreozzi *et al.* (2003): par exemple, le temps de demi-vie de la carbamazépine par photodégradation en hiver serait de 100 jours tandis que celui du diclofénac serait de cinq jours seulement.

Au sein des eaux de surface, pour l'ensemble des composés étudiés, des concentrations plus faibles de l'ordre de  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ont donc été mises en évidence. En France, dans la Seine, des concentrations de l'ordre de  $1 \text{ ng.L}^{-1}$  pour le diclofénac et de l'ordre de  $80 \text{ ng.L}^{-1}$  pour la carbamazépine ont été rapportées par Paffoni *et al.* (2006). Plus récemment, Togola et Budzinski (2008) ont rapporté une contamination de l'eau de surface de l'Hérault à des teneurs de l'ordre de 72, 33 et  $56 \text{ ng.L}^{-1}$  pour le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine (Togola et Budzinski, 2008).

## II.4- Toxicité et risque potentiel due à leur présence dans l'eau

De nombreuses études toxicologiques du paracétamol sur différents taxons (algues, poissons, bactéries) ont été effectuées à ce jour (Santos *et al.*, 2010). Henschel *et al.*, (1997), ont déterminé une  $CE_{50}$  (Concentration Efficace à 50 %) de  $650 \text{ mg.L}^{-1}$  sur *V.fischeri* après 30 minutes de contact avec les bactéries. L'espèce la plus sensible serait *D.magna* pour laquelle des valeurs de  $CE_{50}$  de l'ordre de 30 à  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  ont été rapportées (Santos *et al.*, 2010). Pour ce composé, une valeur de PNEC (Predicted No Effect Concentration) de  $9,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  a été estimée (Santos *et al.*, 2010). A notre connaissance, aucun lien de cause à effet entre la présence de paracétamol dans une eau et un effet nocif sur les composantes environnementales n'a été retrouvé.

Selon Hernando *et al.*, (2006), sur la base des valeurs de  $CE_{50}$  reportées dans la littérature, les anti-inflammatoires non stéroïdiens, comme le diclofénac, pourraient être considérés comme très toxiques pour les bactéries ( $CE_{50} < 1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) et toxique pour les invertébrés et les algues ( $CE_{50} = 1-10 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Pour ce composé cependant, de grandes différences de valeurs de  $CE_{50}$  d'une espèce à l'autre au sein d'un même groupe taxonomique ont pu être observées, (e.g.  $CE_{50}$  allant de 2 à  $224 \text{ mg.L}^{-1}$  sur les invertébrés). Pour ce composé, Oaks *et al.*, (2004), ont décrit le déclin des vautours à col blanc du Pakistan et deux autres espèces par défaillance rénale suite à leur consommation de carcasses d'animaux contenant des résidus du diclofénac (Oaks *et al.*, 2004). Selon Carlsson *et al.*, (2006), en raison des altérations du foie et des reins qu'il peut générer chez la truite arc en ciel et de son accumulation possible dans certains organes (muscles, foie, reins), ce composé pourrait être considéré comme dangereux pour l'environnement aquatique (Carlsson *et al.*, 2006).

Concernant la carbamazépine, ce composé présenterait une forte capacité de bioconcentration au sein des organismes vivants (Jones *et al.*, 2002). Sur la base des  $CE_{50}$  données dans la littérature et rassemblées par Hernando *et al.*, (2006), ce composé pourrait être considéré comme très toxique ( $CE_{50} < 1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) pour les algues, les bactéries et les invertébrés étudiés. Il serait en revanche non toxique ( $CE_{50} > 100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) pour la plupart des poissons testés.

Concernant l'homme, l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence de ces composés dans l'eau potable est particulièrement complexe, notamment en raison des faibles

concentrations généralement retrouvées de l'ordre du ng/L et largement inférieures à celles utilisées dans le cadre thérapeutique (de l'ordre du mg/L). Toutefois, des incertitudes demeurent quant à l'impact à long terme d'une exposition chronique à de faibles doses, notamment pour les mélanges ou «cocktails» (composés initiaux et sous-produits) potentiellement présents dans l'eau potable.

### III- DESINFECTION DE L'EAU

Lors de la production de l'eau potable, l'eau brute utilisée subit divers traitements physiques, chimiques, physico-chimiques et parfois biologiques avant d'être distribuée. Le traitement classique et complet d'une eau en vue de la potabiliser s'effectue généralement en plusieurs étapes dont certaines ne sont pas nécessaires aux eaux les plus propres:

- la pré-oxydation (facultative)
- la clarification
- la désinfection

Lorsque ces traitements ne suffisent pas, ce qui est de plus en plus souvent le cas compte tenu de la présence de quantités croissantes de certains polluants comme les nitrates et les pesticides, certains traitements spécifiques, dits traitements (ou étapes) de finition, sont appliqués comme:

- l'adsorption sur charbon actif, souvent précédée d'une ozonation
- la dénitrification ou la dénitrification biologique,
- la filtration sur membrane.

La désinfection permet d'éliminer les micro-organismes pathogènes. L'étape primordiale de désinfection est très souvent réalisée par l'ozone voire par irradiation UV ou encore par filtration sur membrane. Cette étape de désinfection fait très souvent partie des traitements de finition. Avant la distribution de l'eau dans le réseau, une seconde (parfois unique) étape de désinfection est nécessaire. Dans ce cas, c'est majoritairement le chlore et ses dérivées qui sont utilisés. On peut citer aussi le dioxyde de chlore (ClO<sub>2</sub>), voire la monochloramine pour certains pays. A ce niveau, il est important que ce traitement persiste tout au long du réseau afin qu'aucun germe ne puisse se développer dans les canalisations où l'eau peut séjourner plusieurs jours (Legube *et al.*, 1996).

Dans cette partie, une attention particulière est portée à la chloration. Pour cela, après quelques rappels portant sur le chlore et sa réactivité, les connaissances actuelles concernant l'oxydation par ce procédé des composés étudiés sont présentées.

Concernant les autres étapes de désinfection des eaux, en raison de sa fréquence d'utilisation (notamment au sein des filières de traitement des eaux en France) et des

expériences d'ozonation des composés étudiés initialement envisagées dans le cadre de ce travail, seule l'ozonation sera présentée.

### III.1- La chloration

#### III.1.1-Généralités sur le chlore

En solution, le dichlore  $\text{Cl}_2$  gazeux se dismute en acide hypochloreux ( $\text{HOCl}$ ), ion chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et proton ( $\text{H}^+$ ) selon l'équilibre d'hydrolyse suivant:



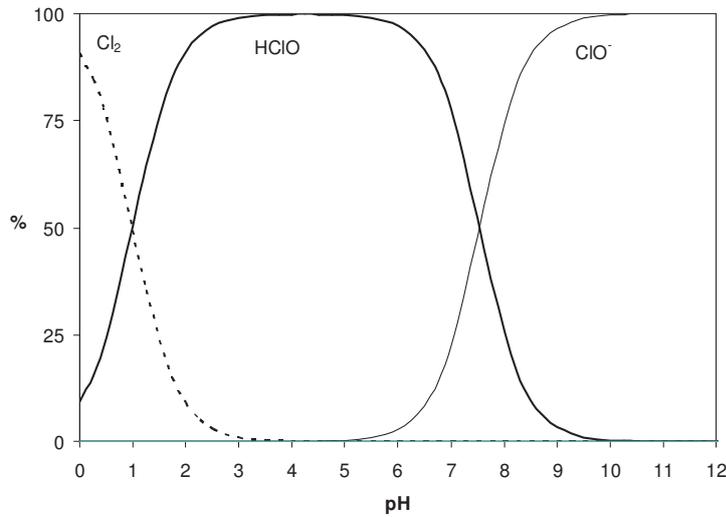
La valeur de la constante d'équilibre  $K_{\text{Cl}_2}$  de cette réaction est généralement annoncée comme variant de  $1,3 \cdot 10^{-4}$  à  $5,1 \cdot 10^{-4}$  pour des températures comprises entre 0 et 25 °C (Wang et Margerum, 1994). Pour des eaux contenant une faible concentration en chlorures, on peut considérer que l'hydrolyse est pratiquement totale pour un pH supérieur à 4.

L'acide hypochloreux résultant de cette hydrolyse est un acide faible qui se dissocie partiellement dans l'eau selon l'équilibre acide-base suivant:



La valeur de la constante d'acidité  $K_{\text{aHOCl}}$  rapportées dans la littérature varie de  $1,5 \cdot 10^{-8}$  ( $\text{p}K_{\text{HOCl},0^\circ\text{C}} = 7,82$ ) à  $2,9 \cdot 10^{-8}$  ( $\text{p}K_{\text{HOCl},25^\circ\text{C}} = 7,54$ ) entre 0 et 25 °C (Morris, 1966).

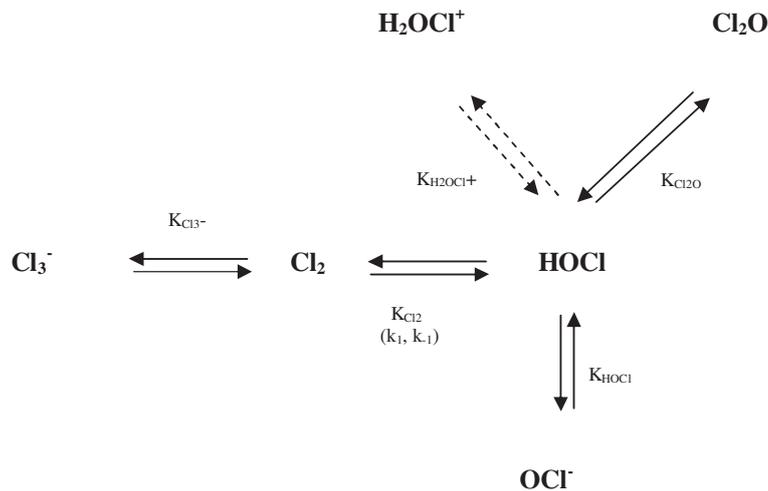
Ainsi, les espèces les plus représentatives résultant de la dissociation du chlore moléculaire dans l'eau sont l'acide hypochloreux et l'ion hypochlorite dont les concentrations relatives dans le milieu varient avec le pH (Figure I.3).



**Figure I.3:** Distribution des principales formes du chlore en solution en fonction du pH (déterminée à partir des équilibres 1 et 2, à 25 °C et pour  $[Cl^-] = 5.10^{-3} M$ )

A côté de ces espèces majoritaires, d'autres espèces intermédiaires du chlore sont susceptibles de se former. C'est le cas notamment de l'ion trichlorure ( $Cl_3^-$ ), de l'hémioxyde de chlore ( $Cl_2O$ ) ou de l'espèce  $H_2OCl^+$  principalement formé à  $pH < 4$  (Arotzky et Symons, 1962), et dont l'existence a été récemment soumise à controverse (Cherney *et al.*, 2006).

La Figure I.4 représente les espèces majoritaires et les espèces intermédiaires du chlore.



**Figure I.4:** Equilibre du chlore en solution aqueuse (d'après Doré, 1989)

Les proportions respectives de ces produits halogénés dépendent de la température, du pH et parfois de la concentration en halogénure. Les concentrations en solution de certaines

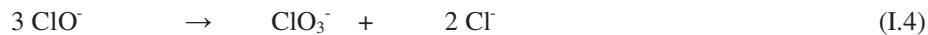
espèces ( $\text{H}_2\text{OCl}^+$ ,  $\text{Cl}_2\text{O}$ ,  $\text{Cl}_3^-$ ) sont généralement très faibles (Zimmermann et Strong, 1957; Reinhard et Stumm, 1980).

Le tableau suivant représente les constantes d'équilibre pour les différents équilibres connus de chlore en solution à 25 °C.

**Tableau I.3:** Constantes d'équilibre du chlore en solution aqueuse à 25 °C

Equations	Constantes d'équilibre (25°C)	Références
$\text{HOCl} \rightleftharpoons \text{ClO}^- + \text{H}^+$	$K_{\text{HOCl}} = 2,9 \cdot 10^{-8}$	(Morris, 1966)
$\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HOCl} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$	$K_{\text{Cl}_2} = 5,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}^2$ ( $k_1 = 22,3 \text{ s}^{-1}$ , $k_{-1} = 4,3 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )	(Wang et Margerum, 1994)
$\text{H}_2\text{OCl}^+ \rightleftharpoons \text{HOCl} + \text{H}^+$	$K_{\text{H}_2\text{OCl}^+} = 10^{+3} \cdot 10^{+4}$	(Arotsky et Symons, 1962)
$2 \text{HOCl} \rightleftharpoons \text{Cl}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	$K_{\text{Cl}_2\text{O}} = 8,7 \cdot 10^{-3}$	(Reinhard et Stumm, 1980)
$\text{Cl}_2 + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{Cl}_3^-$	$K_{\text{Cl}_3^-} = 0,191$	(Zimmermann et Strong, 1957)

Enfin, en solution, l'ion hypochlorite peut s'auto-décomposer en ions chlorite  $\text{ClO}_2^-$  et chlorate  $\text{ClO}_3^-$  selon les réactions suivantes:



Ces dernières réactions, très lentes, sont négligeables dans les conditions normales de chloration (Lewin et Avrohami, 1955). Cependant, dans les solutions d'hypochlorite concentrées, elles peuvent être plus importantes et les concentrations en chlorites et chlorates augmentent avec l'âge de la solution. Des solutions «fraîchement» préparées sont alors nécessaires pour négliger la présence de ces espèces chlorées.

### III.1.2- Réactivité du chlore vis-à-vis des polluants chimiques

Le chlore, bien qu'étant utilisé prioritairement pour la désinfection des eaux, aura également une action oxydante dans l'eau sur de nombreux composés minéraux ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Br}^-$ , ...) et organiques (dont les matières organiques naturelles avec lesquelles il formera des composés organochlorés compte tenu du caractère électrophile de l'atome de chlore). En solution, la réactivité du chlore avec les polluants chimiques dépend de sa spéciation et donc du pH. Parmi les différentes espèces du chlore en solution, l'acide hypochloreux est généralement la forme réactive majoritaire dans les conditions de traitement des eaux (Morris, 1978). Pour la plupart des réactions de chloration, si B est un composé organique ou minéral, la réaction élémentaire suivante peut donc être proposée (Deborde et von Gunten, 2008):



En milieu acide, des réactions élémentaires supplémentaires telles que la réaction de HOCl catalysée par les ions  $\text{H}^+$  ou la réaction de  $\text{Cl}_2$  avec B ont parfois été proposées (Kumar et Margerum, 1987; Nagy *et al.*, 1988; Rebenne *et al.*, 1996; Gallard et von Gunten, 2002; Deborde *et al.*, 2004; Gallard *et al.*, 2004; Pinkston et Sedlak, 2004; Dodd et Huang, 2007).



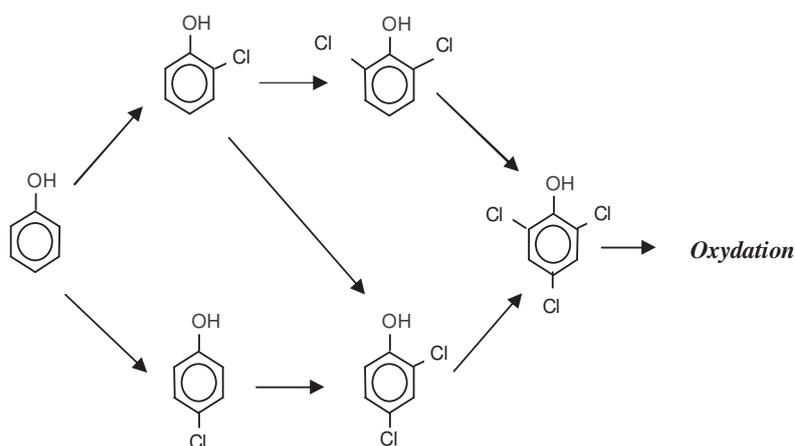
La réaction de HOCl catalysée par les ions  $\text{H}^+$  a parfois été associée à la réaction de  $\text{H}_2\text{OCl}^+$  (Rebenne *et al.*, 1996; Gallard et von Gunten, 2002; Deborde *et al.*, 2004; Gallard *et al.*, 2004).

Pour la plupart des réactions de chloration avec les composés organiques ou minéraux, la cinétique d'oxydation a été montrée comme étant une cinétique d'ordre 2 (Deborde et von Gunten, 2008). D'un point de vue réactionnel, l'acide hypochloreux (HOCl) présente un pouvoir oxydant ( $E^\circ = 1,494 \text{ V}$ ) et sa structure moléculaire est caractérisée par la polarisation de la liaison Cl-O dans le sens  $\text{Cl}^{\delta+} \rightarrow \text{O}^{\delta-}$ . Trois principaux modes d'action de ce composé sur les molécules organiques sont donc envisageables:

- des réactions d'oxydation sur les fonctions réductrices,
- des réactions d'addition sur les liaisons insaturées,
- des réactions de substitution électrophile sur les sites nucléophiles (Doré, 1989).

- et, plus rarement des réactions par attaque nucléophile.

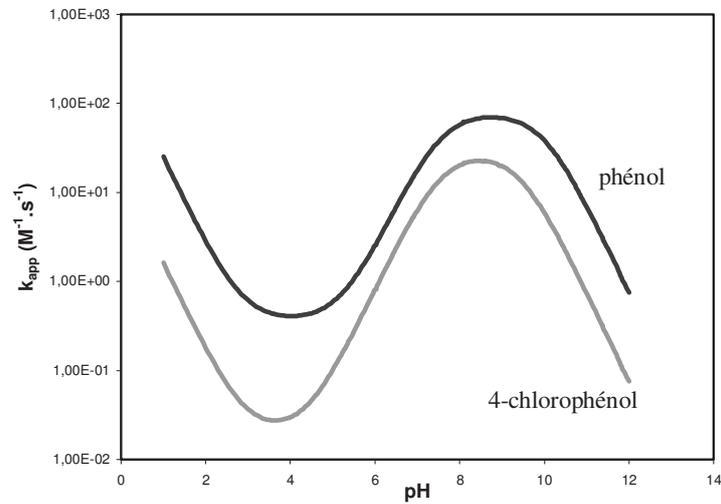
► Pour les composés aromatiques, en plus des réactions spécifiques de certaines fonctions greffées sur les cycles, les réactions les plus caractéristiques de la chloration sont les réactions de substitution électrophile. Ainsi, l'action du chlore sur les composés phénoliques se fait très majoritairement par réaction de substitution électrophile en position 2, 4 et 6 du noyau aromatique. Tout d'abord, le phénol est chloré en position 2 et 4. Puis, le 2-chlorophénol est chloré pour former du 2,4- ou 2,6-dichlorophénol alors que le 4-chlorophénol produit du 2,4-dichlorophénol. Enfin, l'ensemble des composés chlorés ainsi obtenus forme du 2,4,6-trichlorophénol qui, à son tour, pourra réagir avec le chlore pour former des composés d'oxydation non phénoliques (De La Mare, 1974; Burttschell *et al.*, 1959) (Figure I.5).



**Figure I.5:** Chloration du phénol (Burttschell *et al.*, 1959)

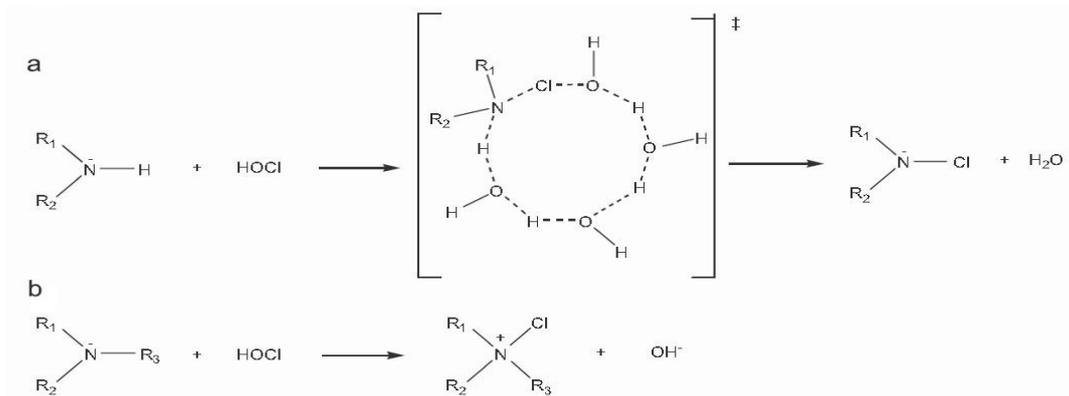
D'un point de vue cinétique, la nature et la forme du substituant du noyau aromatique influent sur la vitesse de réaction. Les composés phénoliques ayant des propriétés acido-basiques, leur réactivité vis-à-vis du chlore est donc dépendante du pH. Pour les phénols et les résorcinols, les cinétiques de chloration des composés phénoliques initiaux et des sous-produits chlorés ont été étudiées par de nombreux auteurs (parmi lesquels on peut citer, pour les premiers Lee et Morris, 1962, De laet *et al.*, 1982, et plus récemment, Rebenne *et al.*, 1996 et Gallard et Von Gunten, 2002). Ces travaux ont montré, pour chaque composé, une réaction d'ordre 2, ordre 1 par rapport au chlore et ordre 1 par rapport au composé organique, ainsi que des constantes apparentes de vitesse dépendantes du pH, avec un minimum à pH acide ( $4 < \text{pH} < 6$ ) et un maximum pour des valeurs de pH comprises entre 7 et 10 (Figure I.6).

Dans le cas du phénol et du 4-chlorophénol, à pH 7, des constantes de l'ordre de 6-18  $M^{-1}.s^{-1}$  sont observées (Gallard et Von Gunten, 2002; Deborde et Von Gunten, 2008).



**Figure I.6:** Variation de la constante apparente  $k_{app}$  en fonction du pH pour la réaction de chloration du phénol et 4-chlorophénol (Gallard et Von Gunten, 2002)

► Dans le cas des composés aminés aliphatiques, une réaction rapide avec le chlore aboutissant à la formation de chloramine a généralement été rapportée. Cette réaction proviendrait d'une attaque électrophile initiale du chlore sur l'atome d'azote (Abia *et al.*, 1998) de la fonction amine (Figure I.7). Selon certains auteurs, des mécanismes de réaction différents suivant si l'amine est primaire, secondaire ou tertiaire seraient alors observés (Abia *et al.*, 1998).

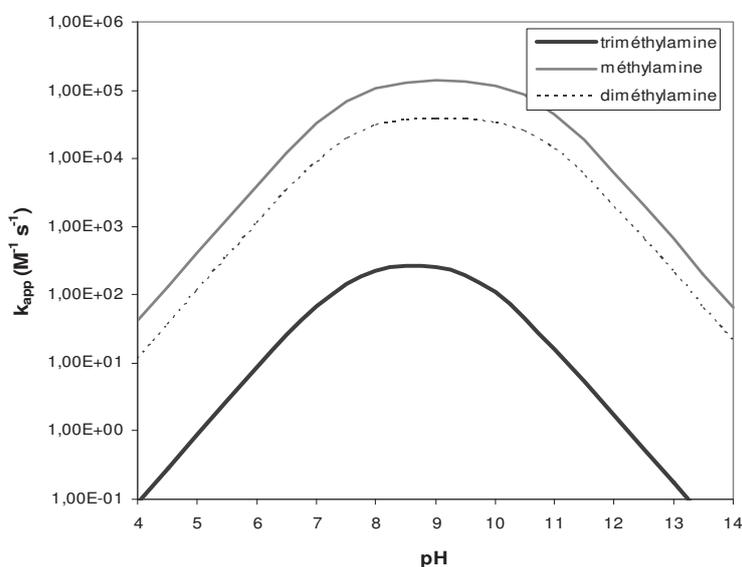


**Figure I.7:** Mécanisme de chloration des composés aminés aliphatiques (Abia *et al.*, 1998)

(a) amine primaire (avec  $R_2 = H$ ) et secondaire, (b) amine tertiaire

Dans le cas des amines tertiaires, un intermédiaire chlorammonium a été observé (Ellis et Soper, 1954). D'un point de vue cinétique, pour ce type de composé, la nature et la forme du ou des substituant(s) influent sur la vitesse de réaction. Les composés aminés possédant des propriétés acido-basiques, leur réactivité vis-à-vis du chlore dépend du pH (les constantes apparentes de vitesse étant généralement maximales à pH 7–10) (Figure I.8).

Dans le cas de la méthylamine ou de la diméthylamine, à pH 7 des constantes de l'ordre de  $10^3$  à  $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ont été rapportées (Deborde et Von Gunten, 2008), alors qu'une constante de l'ordre de  $7 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a été calculée pour la triméthylamine par Abia *et al.*, 1998.



**Figure I.8:** Variation de la constante apparente  $k_{app}$  en fonction du pH pour la réaction de chloration de la méthylamine, de la diméthylamine et de la triméthylamine (Deborde et Von Gunten, 2008; Abia *et al.*, 1998)

Comme pour les amines, la chloration des amides pourrait générer une réaction de chloramination suite à l'attaque électrophile par  $\text{Cl}^+$  sur l'atome d'azote de la fonction amide. Toutefois, en raison du caractère électro-attracteur de la fonction carbonyle, une faible réactivité du chlore avec les fonctions amides est généralement observée (Morris, 1967; Pattison et Davies, 2001). Différents mécanismes et réactions élémentaires ont été suggérés dans la littérature pour la chloration de tels composés. Ainsi,

(i) Selon Thomm et Wayman (1969) et Prütz (1999),  $\text{ClO}^-$  serait la principale forme active du chlore en milieu alcalin avec les fonctions amides. Ce mécanisme réactionnel



### III.1.3- Oxydation par le chlore des produits pharmaceutiques étudiés

#### III.1.3.1- Paracétamol

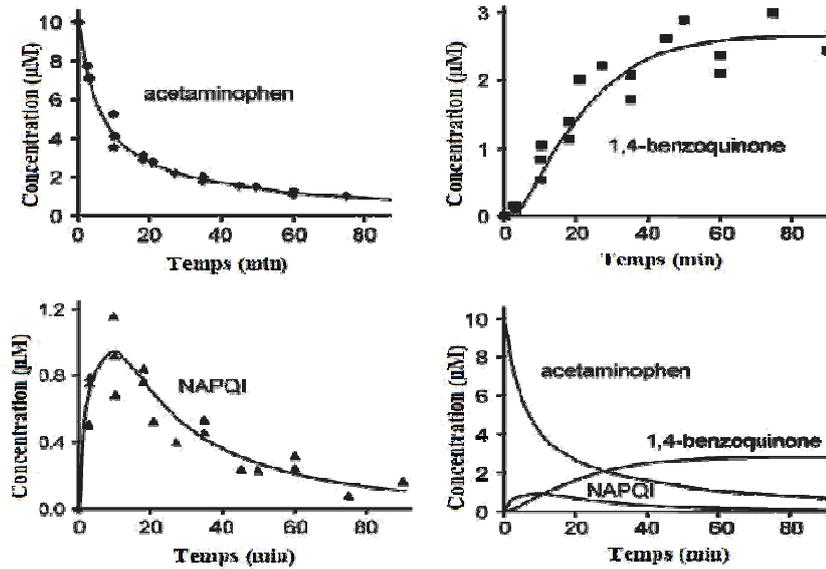
Plusieurs études récentes ont montré une dégradation possible du paracétamol, au cours des étapes de chloration de l'eau (Pinkston et Sedlak, 2004; Glassmeyer et Shoemaker, 2005; Westerhoff *et al.*, 2005; Bedner et Maccrehan, 2006; Gibs *et al.*, 2007; Xagorarakis *et al.*, 2008).

Dans le travail de Pinkston et Sedlak (2004), une étude cinétique à différentes valeurs de pH comprises entre 5 et 10 a été effectuée. A partir des résultats obtenus, en tenant compte de la spéciation des éléments en solution (formes protonée « phénol » et déprotonée « phénolate » du paracétamol)  $pK_a = 9,5$ , deux réactions élémentaires ont été proposées pour expliquer la réaction globale de chloration du paracétamol entre pH 5 et 10.



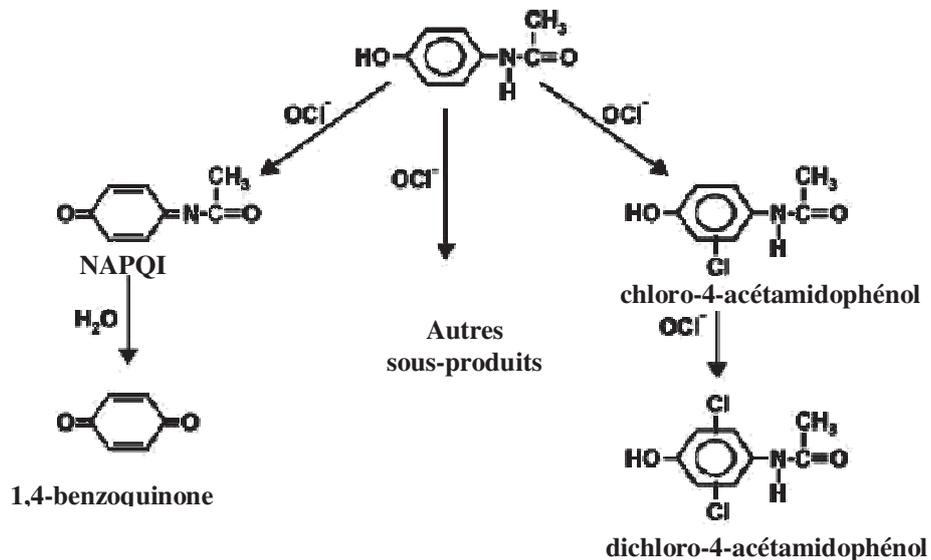
Pour ces deux réactions, les valeurs de  $k_1$  et  $k_2$  obtenues sont  $3,1 \cdot 10^0$  et  $7,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement. Selon les auteurs, le fait que  $k_2$  soit beaucoup plus important que  $k_1$  est compatible avec la fonction phénolate du paracétamol qui a un caractère électrodonneur plus important que la fonction phénol.

Bedner et Maccrehan (2006) ont également étudié la réaction du chlore sur le paracétamol. Leur étude a été effectuée à pH 7 et 23°C, pendant 90 min, en présence d'un excès de chlore (de telle sorte que le rapport de la concentration en chlore sur la concentration en paracétamol soit égal à 5,7 ou 57). Ces auteurs ont mis en évidence pour une concentration en chlore de 57  $\mu\text{M}$  et des concentrations en paracétamol de 1 et 10  $\mu\text{M}$ , après une heure de chloration, une dégradation importante du paracétamol conduisant à onze sous-produits détectables. L'identification de quatre d'entre eux a été effectuée et a montré la formation de deux molécules chlorées (chloro-4-acétamidophénol et dichloro-4-acétamidophénol), et deux autres produits toxiques (1,4-benzoquinone et *N*,acetyl, *p*-benzoquinone imine (NAPQI)). Pour ces deux derniers sous-produits, les auteurs ont suivi, à pH 7, leur évolution au cours de la dégradation du paracétamol par le chlore (Figure I.10). Dans le cas de la 1,4-benzoquinone, une grande stabilité de ce composé à la chloration a été observée.



**Figure I.10:** Evolution des sous-produits de la chloration de paracétamol, (d'après Bedner et Maccrehan, 2006)

Pour l'ensemble des sous-produits identifiés, selon les auteurs, différentes voies de formation *via* des mécanismes d'oxydation générale, de chloration des noyaux aromatiques (Figure I.11) ou des mécanismes radicalaires sont proposées.



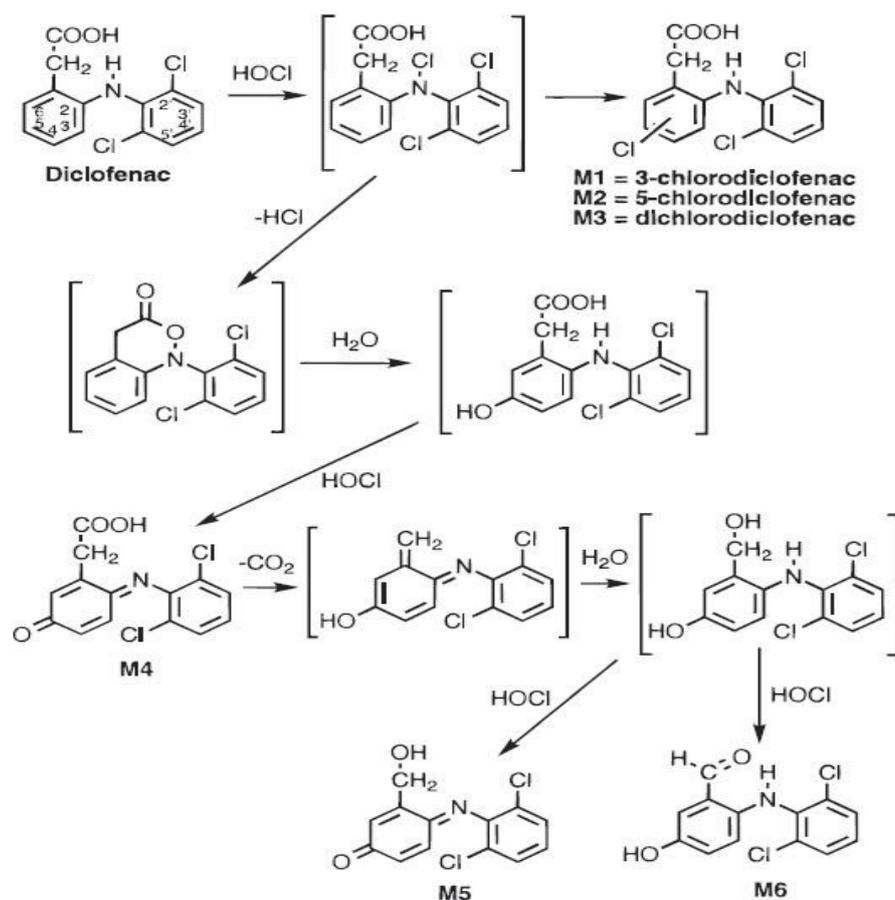
**Figure I.11:** Mécanisme de réaction du paracétamol avec le chlore (d'après Bedner et Maccrehan, 2006)

Dans cette étude, il a été montré que l'ajout de sulfite ou thiosulfate de sodium pour stopper la réaction du chlore, pouvait réduire les deux produits, *N*,acétyl, *p*-benzoquinone imine (NAPQI) et 1,4-benzoquinone, en paracétamol et 1,4-hydroquinone, respectivement.

L'étude de Xagorarakis *et al.*, (2008), confirme la formation de 1,4-benzoquinone au cours de la chloration de paracétamol. Dans ce travail, les auteurs ont suivi la dégradation de paracétamol, et la formation de 1,4-benzoquinone à pH 6,0, 7,5 et 9,0 à 22 °C, pour différents rapport molaire (chlore/ paracétamol). Il a été montré dans cette étude que, la vitesse de dégradation du paracétamol augmente quand le pH augmente. De plus, pour toutes les valeurs de pH, la dégradation du paracétamol est plus importante quand le rapport molaire est plus élevé. Concernant la formation de 1,4-benzoquinone, selon les auteurs, la formation de ce sous-produit toxique serait la plus importante pour un rapport molaire d'environ 1000 à pH 6 (68% du paracétamol initial après 30 minutes de chloration).

### **III.1.3.2- Diclofénac**

Miyamoto *et al.*, (1997), ont étudié l'oxydation du diclofénac par différents procédés d'oxydation. Concernant la réaction du diclofénac avec le chlore, ils ont montré que cette réaction est relativement lente, et les principaux sous-produits d'oxydation ont été identifiés. Il faut noter que dans ce travail, pour récupérer de plus grandes quantités de sous-produits, le diclofénac a été dissous dans le méthanol, et mis en présence de concentrations équimolaires de HOCl (concentrations de 1 mM à 10 mM) pendant 30 min. Les sous-produits obtenus ont alors été purifiés par CLHP et analysés par MS/MS et RMN. Afin d'essayer d'identifier les intermédiaires le plus tôt possible au cours de la réaction, un système de flux a été utilisé dans lequel le diclofénac et HOCl ont été mélangés et les sous-produits ont été directement introduits dans le spectromètre de masse. Dans ces conditions, plusieurs sous-produits d'oxydation ont été identifiés (M1, M2, M3, M4, M5, M6) (Figure I.12). A côté de ces sous-produits, d'autres sous-produits ont été observés sur le chromatogramme. Certains d'entre eux semblent être instables. D'autres se dégradent probablement dû à l'excès de HOCl provoquant une oxydation supplémentaire des composés identifiés. Dans ce travail, un mécanisme de réaction du diclofénac avec le chlore a été proposé (Figure I.12).



**Figure I.12:** Mécanisme proposé pour la réaction du diclofénac avec le chlore (Miyamoto *et al.*, 1997) Les intermédiaires proposés entre parenthèses n'ont pas été observés au cours de cette étude

Pour le diclofénac, une autre étude mécanistique de la chloration a été publiée en 2010 (Quintana *et al.*, 2010). Dans ce travail, les auteurs ont étudié l'influence de différentes concentrations en chlore et en bromure sur la cinétique de la réaction du diclofénac avec le chlore à pH 5,7, 7 et 8,3. Des valeurs de demi-vie du diclofénac de l'ordre de 325,2 min et de 72,6 min en absence de bromure pour des concentrations en chlore de 1 mg.L<sup>-1</sup> et de 10 mg.L<sup>-1</sup> respectivement ont été rapportées à pH 7. Pour des faibles concentrations en chlore, il a été montré dans cette étude que la présence de bromure pouvait accélérer la vitesse de la réaction. En absence de bromure, deux sous-produits de chloration dont le chloro-diclofénac et un autre composé correspondant au chloro-diclofénac décarboxylé, ont été mis en évidence (Figure I.13). Aucun mécanisme de la formation de ces sous-produits n'a été proposé.



**Figure I.13:** Structures proposés pour les sous-produits de réaction du diclofénac avec le chlore  
(Quintana *et al.*, 2010)

### III.1.3.3- Carbamazépine

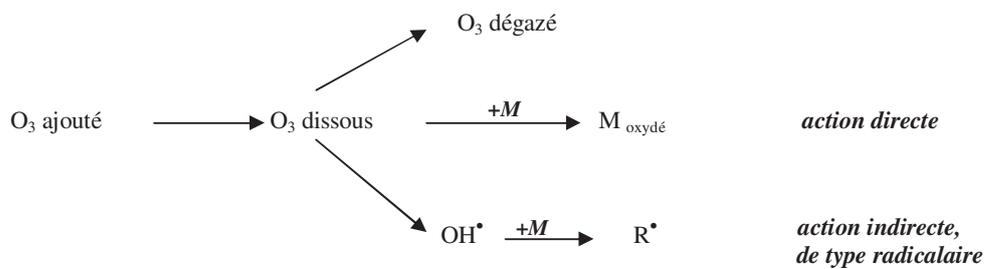
Plusieurs études ont montré la grande persistance de la carbamazépine au cours de la filière de traitement de l'eau (Ternes, 1998; Moldovan, 2006; Mompelat *et al.*, 2008). Aucune étude cinétique ou mécanistique de la réaction du chlore avec la carbamazépine n'a cependant été détaillée à ce jour.

## II.2- Autres procédés de désinfection: l'ozonation

Dans cette partie, en raison de sa fréquence d'utilisation (notamment au sein des filières de traitement des eaux en France) et des expériences d'ozonation des composés pharmaceutiques étudiés initialement prévus dans le cadre de ce travail de thèse, une attention supplémentaire est portée à l'ozonation. Quelques exemples d'études concernant la réaction de l'ozone sur le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine sont présentés.

L'ozone est un gaz qu'il est nécessaire de dissoudre dans l'eau. Une fois dissous, l'ozone réagit avec les solutés:

- soit par réactions directes de la forme moléculaire de l'ozone,
- soit par réactions indirectes, de type radicalaire, mettant en jeu principalement les radicaux hydroxyles (Figure I.14).



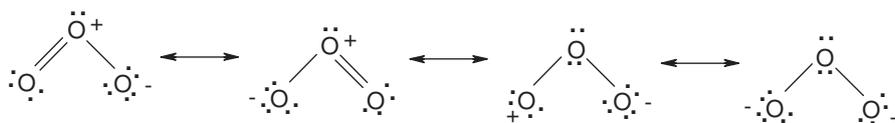
**Figure I.14:** Différentes voies de réaction de l'ozone transféré en solution aqueuse (Hoigné et Bader, 1983)

De par son fort potentiel standard d'oxydo-réduction (Weast, 1980-1981), l'ozone est un excellent désinfectant (même vis-à-vis des micro-organismes les plus résistants).



Il constitue également un oxydant pour de nombreux composés minéraux ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{ClO}_2^-$ , ...) et organiques (matières organiques naturelles et micropolluants organiques) avec des constantes de vitesse parfois très élevées, surtout en milieu neutre et basique (Hoigné et Bader, 1983; Hoigné *et al.*, 1985).

La molécule d'ozone, composée de trois atomes d'oxygène, est un hybride de quatre formes mésomères de résonance (Figure I.15).



**Figure I.15:** Différentes formes de résonances de la molécule d' $O_3$  (Bailey, 1972)

D'un point de vue réactionnel, elle présente donc trois comportements différents:

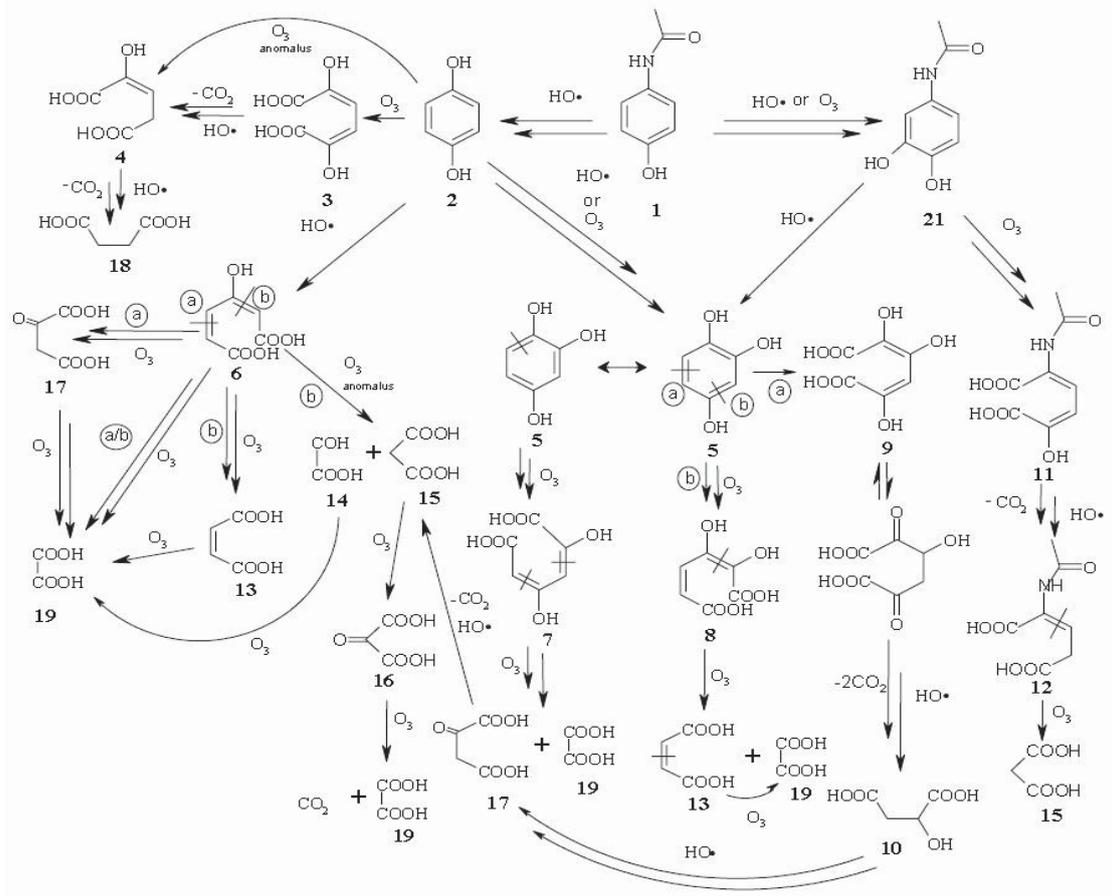
- un dipôle actif engendrant des réactions de cyclo-addition 1,3 dipolaire
- un agent électrophile;
- et, plus rarement, un agent nucléophile.

L'ozone réagit sélectivement avec les solutés; les vitesses de réaction dépendent fortement des groupements fonctionnels ainsi que de la protonation des molécules subissant l'attaque (cas de l'attaque électrophile) (Bailey, 1972).

### III.2.1- Oxydation par l'ozone du paracétamol

Concernant l'ozonation du paracétamol, Andreozzi *et al.*, (2003b), ont obtenu, à partir d'expériences réalisées à différents pH, les constantes d'ozonation pour la forme neutre de type phénol ( $k_{ATP} = 1,41.10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) et pour la forme dissociée ( $k_{ATP^-} = 9,91.10^8 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ) du paracétamol. A partir de ces deux constantes, une constante d'ozonation du paracétamol de l'ordre de  $6,51.10^6 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  est donc attendue à pH 7,2. Dans ce travail, la réactivité des radicaux  $\text{OH}^\bullet$  a également été étudiée. A pH 5,5, une constante cinétique de  $2,2.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  a été déterminée.

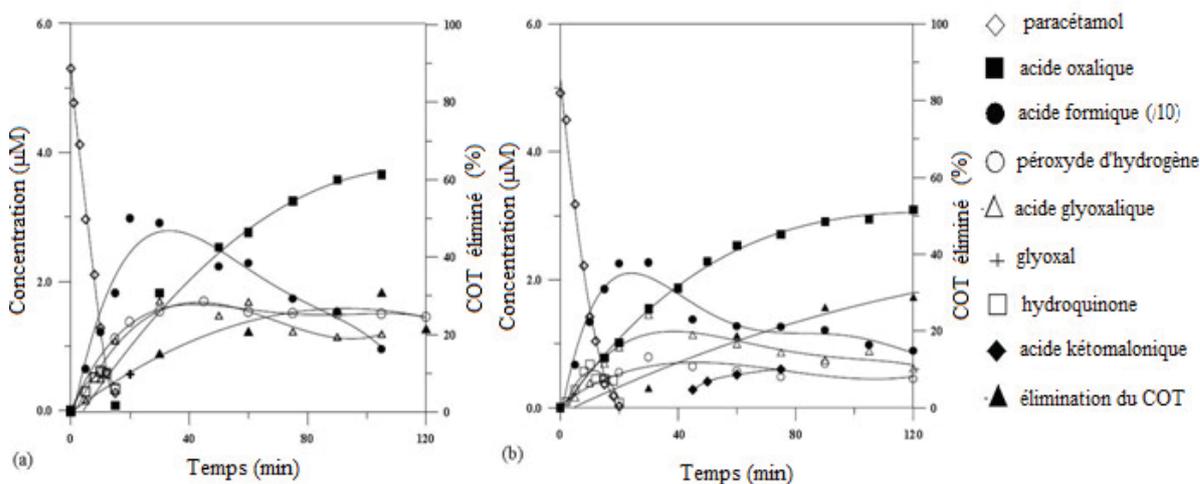
Andreozzi *et al.*, (2003b), ont proposé un mécanisme de dégradation du paracétamol par l'ozone (Figure I.16).



**Figure I.16:** Mécanisme de réaction du paracétamol avec l'ozone (Andreozzi *et al.*, 2003b)

Au cours de l'ozonation du paracétamol, Andreozzi *et al.*, (2003b), ont identifié certains des sous-produits du schéma réactionnel par GC-MS.

Pour les pH 2 et 7, les auteurs ont également suivi l'évolution de certains sous-produits au cours de l'ozonation ainsi que l'élimination du COT (Figure I.17). Dans les conditions expérimentales étudiées, 30 % d'élimination du COT et la persistance de plusieurs sous-produits après deux heures d'ozonation ont été observés.

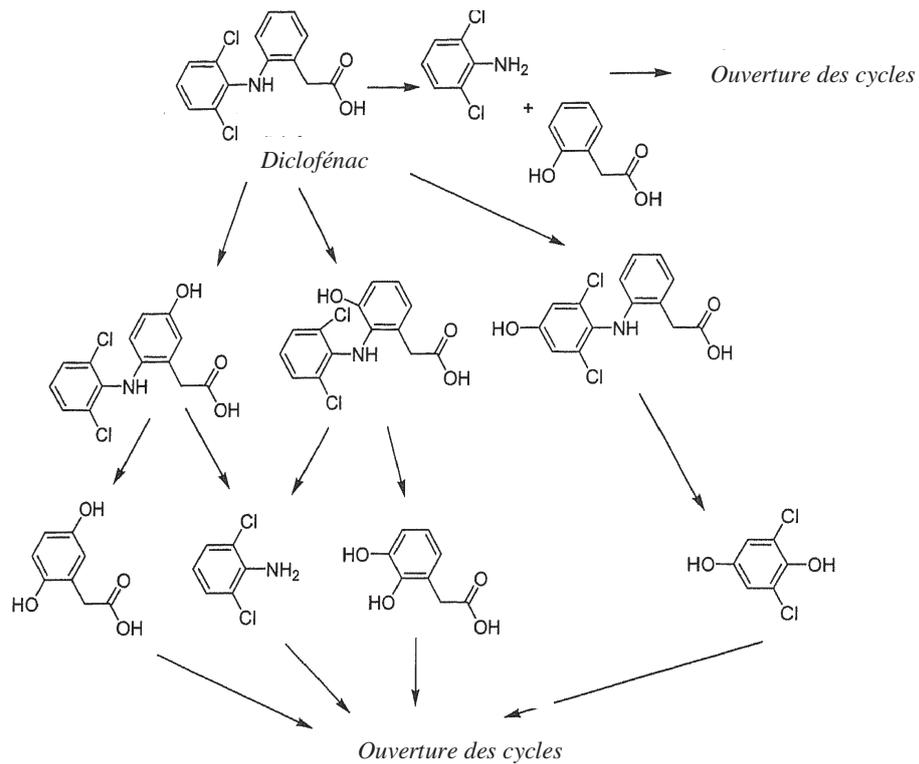


**Figure I.17:** Ozonation de paracétamol et des intermédiaires de réactions ( $[Paracétamol]_0 = 5,3 \cdot 10^{-3} M$ , pH 2 (a) et pH 7 (b) (Andreozzi *et al.*, 2003b))

### III.2.2- Oxydation par l'ozone du diclofénac

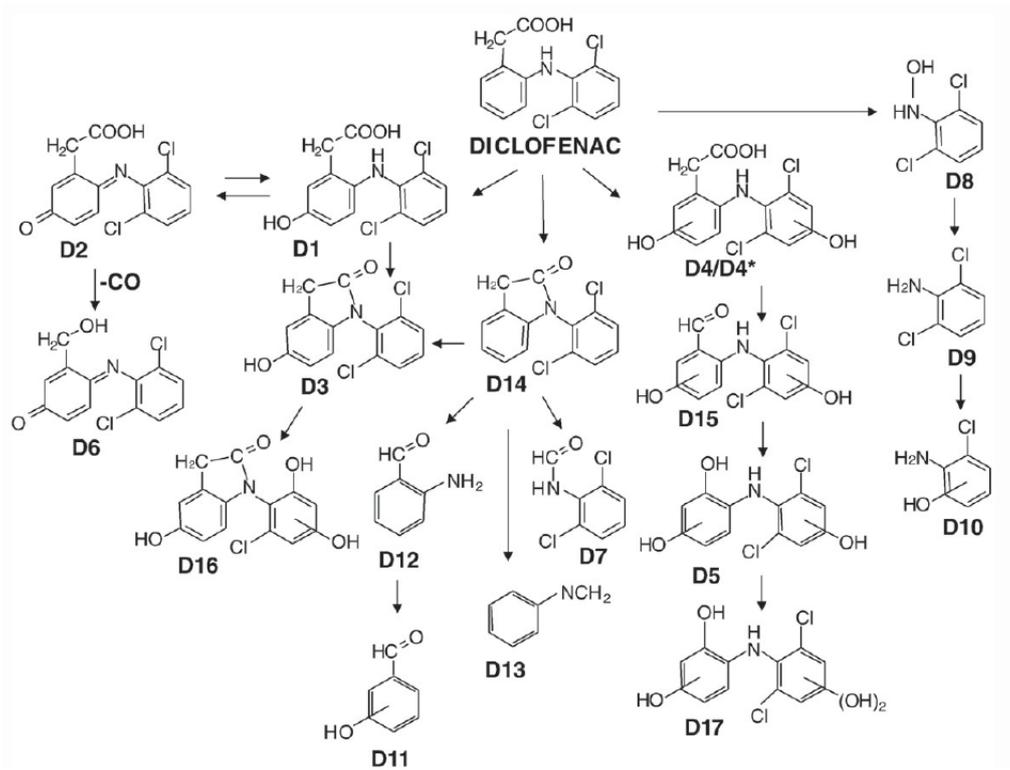
En ce qui concerne le diclofénac, Huber *et al.*, (2003), ont rapporté à 20 °C et pH 7, une dégradation rapide de ce composé par l'ozone avec une constante cinétique apparente de second ordre de  $1 \cdot 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ . Dans ce travail, la réaction des radicaux  $OH^\bullet$  a également été étudiée. A pH 7, une constante de  $7,5 \cdot 10^9 M^{-1} \cdot s^{-1}$  a été reportée.

Pour ce même composé, à pH 5 - 6 et 25°C, de plus faibles constantes cinétiques d'ozonation de l'ordre de  $1,76 \cdot 10^4$  à  $1,84 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$  ont été estimées par Vogna *et al.* (2004). D'un point de vue réactionnel, de nombreux sous-produits de dégradation au cours de l'ozonation du diclofénac ont été mis en évidence (Vogna *et al.*, 2004). Des mécanismes d'hydroxylation des noyaux aromatiques et/ou de clivage de la liaison diphenylamine, suivis d'une ouverture des cycles aromatiques ont été proposés, selon la Figure I.18 (Vogna *et al.*, 2004).



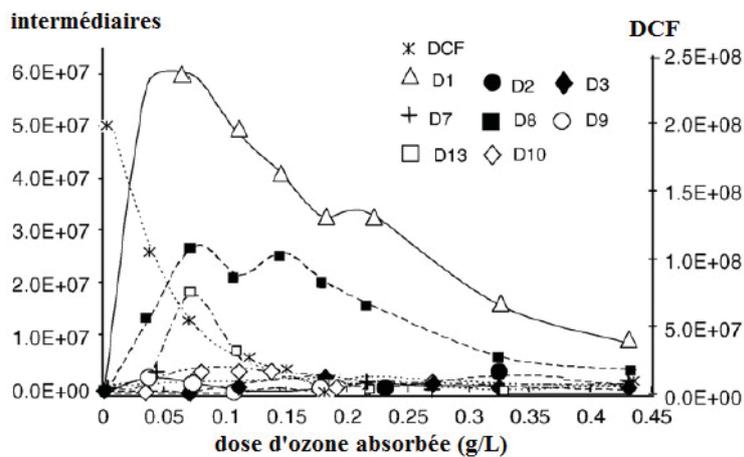
**Figure I.18:** Mécanisme de réaction proposé au cours de l'ozonation du diclofénac  
(d'après Vogna *et al.*, 2004)

De la même manière, les résultats expérimentaux de Coelho *et al.* (2009), ont montré que l'ozone est très efficace pour l'élimination du diclofénac. Une dégradation de plus de 99% du diclofénac (à partir d'une concentration initiale de 0,68 mM) a été atteinte après 30 min d'ozonation (correspondant à une dose d'ozone absorbé de 0,22 g.L<sup>-1</sup>, soit 4,58 mM). Cependant, seulement 24% du diclofénac a été minéralisé après 1 h d'ozonation. Ces auteurs ont rapporté, à 20 °C et pH 5, 6 et 7, des constantes cinétiques apparentes de second ordre de 7,94.10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>, 1,32.10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> et 1,19.10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup> respectivement. Le diclofénac est donc beaucoup plus réactif avec l'ozone à pH 6 et 7 qu'à pH 5. Selon cette étude, de nombreux sous-produits de dégradation au cours de l'ozonation du diclofénac, ont également été mis en évidence par LC-MS. Un mécanisme réactionnel a été proposé (Figure I.19).



**Figure I.19:** Mécanisme réactionnel proposé pour l'ozonation du diclofénac (Coelho et al., 2009)

De même, dans ce travail, un suivi de l'évolution des principaux intermédiaires générés par la dégradation du diclofénac au cours de l'ozonation, a été effectuée pendant une heure (Figure I.20). Selon les auteurs, les principaux intermédiaires formés lors de l'ozonation seraient 2-[2,6-dichlorophényl) amino]-5-hydroxyphénylacétique (D1) et le 2,6-dichloro-4-hydroxybenzenamine (D8).

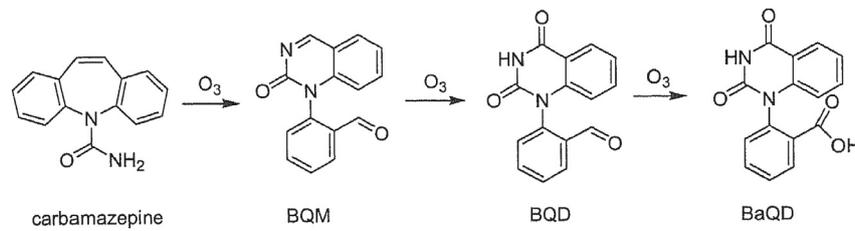


**Figure I.20:** Evolution des principaux intermédiaires lors de l'ozonation du diclofénac (Coelho et al., 2009)

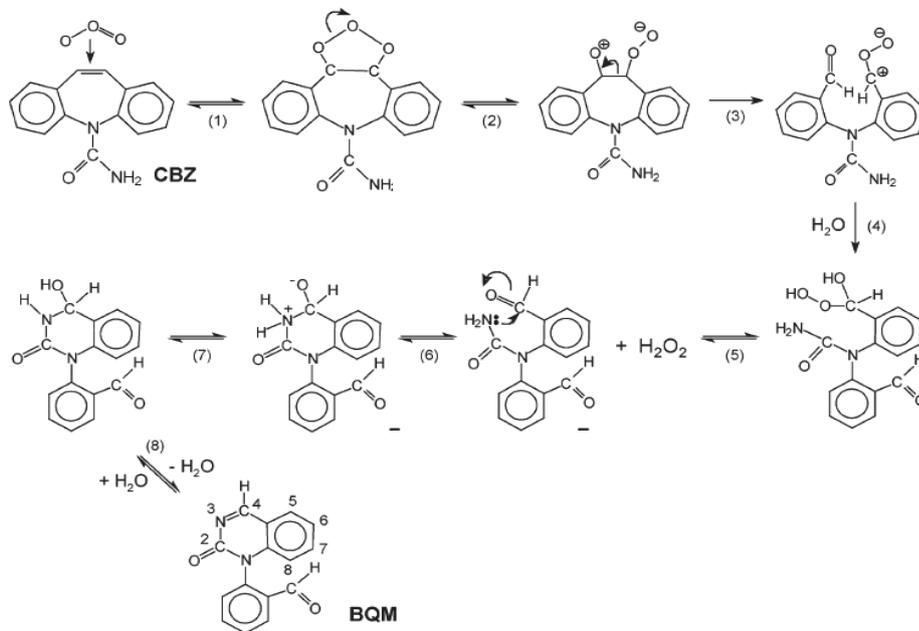
### III.2.3- Oxydation par l’ozone de la carbamazépine

Concernant la carbamazépine, une constante cinétique d’ozonation de  $7.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  a été rapportée à pH 7 et  $20^\circ\text{C}$  (Huber *et al.*, 2003). Pour ce même pH, une constante cinétique de  $8,8.10^9 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$  a également été rapportée pour la réaction des radicaux  $\text{OH}^\bullet$  avec ce composé (Huber *et al.*, 2003).

Trois sous-produits de dégradation de la carbamazépine ont été identifiés par McDowell *et al.*, (2005): 1-(2-benzaldehyde)-4-hydro-(1H,3H)-quinazoline-2-one (BQM), 1-(2-benzaldehyde)-(1H,3H)-quinazoline-2,4-dione (BQD) et 1-(2-benzoic acid)-(1H,3H)-quinazoline-2,4-dione (BaQD). Selon ces auteurs, les schémas réactionnels d’ozonation montrés dans les Figures I.21 et I.22 suivantes pourraient être proposés.

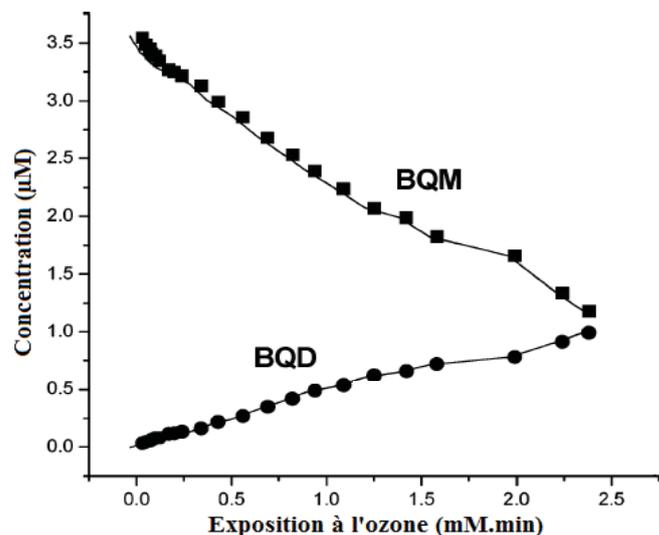


**Figure I.21:** Mécanisme de réaction de l’ozone avec la carbamazépine (McDowell *et al.*, 2005)



**Figure I.22:** Mécanisme de formation de BQM au cours de l’ozonation de la carbamazépine proposé par McDowell *et al.*, 2005

Dans ce travail, les auteurs ont également suivi l'évolution de ces sous-produits au cours de l'ozonation (Figure I.23).



**Figure I.23:** Evolutions de BQM, BQD et BaQD au cours de l'ozonation de la carbamazépine suivies par McDowell et al., 2005. Aucune concentration de BaQD n'a pu être déterminée.

Au cours de l'ozonation, ils ont montré que BQM et BQD réagissaient lentement avec l'ozone (avec des constantes cinétiques à pH 6 de l'ordre de 7 et 1  $M^{-1}.s^{-1}$ ), mais rapidement avec les radicaux  $OH^{\bullet}$  (avec des constantes cinétiques de l'ordre de  $6,8.10^9$  et  $5,1.10^9 M^{-1}.s^{-1}$  respectivement (pH 8)). Concernant le troisième sous-produit BaQD, aucune constante cinétique n'a été déterminée, car il n'était pas possible de l'isoler en quantités appréciables. De plus, aucune forme commerciale n'était disponible. Cependant, sur la base de la valeur  $k_{O_3}$  déterminée pour BQD, la réaction de l'ozone avec BaQD devrait être assez faible ( $< 1 M^{-1}.s^{-1}$ ).

### III.3- Conclusion

Les composés pharmaceutiques, étudiés au cours de ce travail, sont plus ou moins dégradables par le chlore et par l'ozone.

Pour le paracétamol, une dégradation importante a été montrée par différentes études, au cours de la chloration. Pour des concentrations en chlore de 10 mg et un pH 7, un temps de demi-vie de ce composé de 5,2 ou 7,2 minutes a été rapporté (Pinkston et Sedlak, 2004; Bedner et Maccrehan, 2006). De plus, la réaction du paracétamol avec l'ozone a été détaillée par Andreozzi *et al.*, (2003b). Dans cette étude, une constante d'ozonation du paracétamol de l'ordre de  $6,51 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a été reportée à pH 7,2. La réaction du paracétamol avec l'ozone est donc plus rapide que celle-ci avec le chlore.

Concernant la chloration du diclofénac, Miyamoto *et al.*, (1997), ont montré que cette réaction est relativement lente. Des valeurs de temps de demi-vie du diclofénac de l'ordre de 325,2 min et de 72,6 min pour des concentrations en chlore de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  et de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivement ont été rapportées à pH 7 (Quintana *et al.*, 2010). D'autre part, une dégradation rapide de ce composé par l'ozone a été montrée par Huber *et al.*, (2003), avec une constante cinétique apparente de second ordre de l'ordre de  $1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . De même, une constante cinétique apparente de second ordre de l'ordre de  $1,19 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a été rapportée, à 20 °C et pH 7 par Coelho *et al.*, (2009).

Plusieurs études ont rapporté une grande persistance de la carbamazépine à la chloration (Ternes, 1998; Moldovan, 2006; Mompelat *et al.*, 2008). Cependant, aucune étude cinétique ou mécanistique de cette réaction n'a été détaillée. Contrairement à la chloration, Huber *et al.*, (2003) ont montré que la carbamazépine réagit rapidement avec l'ozone avec une constante cinétique d'ozonation de  $7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  à pH 7 et 20°C (Huber *et al.*, 2003).

Concernant l'identification des sous-produits, de nombreux sous-produits de dégradation par l'ozone ont été rapportés et identifiés, alors que beaucoup moins de sous-produits de chloration ont été identifiés.

---

## **Matériel et Méthodes**

---

---

## CHAPITRE 2: MATERIEL ET METHODES

---

<b>I- REACTIFS ET SOLUTIONS.....</b>	<b>43</b>
<b>II- NETTOYAGE DE LA VERRERIE.....</b>	<b>43</b>
<b>III-PROTOCOLES EXPERIMENTAUX.....</b>	<b>44</b>
<b>III.1-Etude cinétique.....</b>	<b>44</b>
<b>III.2- Etude des sous-produits.....</b>	<b>44</b>
<b>IV- METHODES ANALYTIQUES.....</b>	<b>45</b>
<b>IV.1- Dosage du chlore.....</b>	<b>45</b>
IV.1.1- Dosage par iodométrie.....	45
IV.1.2- Dosage par la méthode à la diéthyl-p-phényldiamine (DPD).....	46
<b>IV.2- Dosage du paracétamol, diclofénac et carbamazépine.....</b>	<b>47</b>
<b>IV.3- Identification des sous-produits de chloration.....</b>	<b>47</b>
<b>V- AUTRES METHODES D'ANALYSE.....</b>	<b>49</b>

## I- REACTIFS ET SOLUTIONS

L'eau utilisée pour la préparation des solutions est purifiée par un système MilliQ de Millipore. Elle présente une résistivité de 18 M $\Omega$ .cm et une teneur en carbone organique dissous inférieure à 0,1 mg.L<sup>-1</sup>. Malgré les traces probables de matières organiques, cette eau a été appelée eau ultra-pure.

Tous les réactifs employés au cours de cette étude ont été directement utilisés sans purification préalable.

Concernant les produits pharmaceutiques, fournis par Acros Organics ou par la société Sigma-Aldrich avec une pureté  $\geq 98$  %, les solutions mères à 10<sup>-3</sup> M des composés solubles dans l'eau, comme le paracétamol et le diclofénac, ont été préparées par simple dissolution des produits commercialisés. Pour le composé le moins soluble, la carbamazépine, la solution mère à 10<sup>-4</sup> M a été préparée par dissolution primaire du produit commercialisé dans le méthanol, puis dilution dans l'eau (5 % méthanol). Toutes les solutions préparées des produits étudiés n'ont jamais été conservées plus de deux semaines. Pour le paracétamol, en raison de sa moins grande stabilité en solution aqueuse, une préparation des solutions le jour de la manipulation a été réalisée.

Pour la chloration, des solutions mères de chlore à 20 ou 100 mM ont été utilisées. Ces solutions ont été obtenues par dilution de la solution commerciale d'hypochlorite de sodium (fournie par Acros Organics contenant 13,0 % (m/v) de chlore actif) dans l'eau MilliQ. Elles ont été conservées deux semaines au maximum. Toutefois, avant chaque utilisation, un dosage iodométrie a été effectué.

## II- NETTOYAGE DE LA VERRERIE

Toute la verrerie utilisée dans cette étude a été au préalable rincée à l'eau de robinet, puis à l'eau osmosée (résistivité supérieure à 5 M $\Omega$ .cm et COD inférieur à 100  $\mu$ g.L<sup>-1</sup>), et à l'eau purifiée MilliQ<sup>®</sup>. De même, lorsque cela était possible, la verrerie utilisée a été au préalable calcinée au four à 500 °C pendant 5 heures.

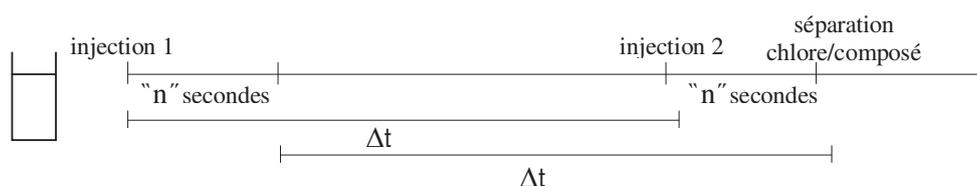
### III-PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

#### III.1-Etude cinétique

Toutes les expériences de chloration ont été effectuées à partir de solutions préparées dans l'eau ultra-pure (MilliQ), dans un réacteur fermé consistant en un flacon en verre ambré d'un litre, thermostaté ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et pour différentes valeurs de pH comprises entre 5 et 11.

Les conditions expérimentales et les modes opératoires employées au cours des manipulations, pour chaque composé, ont été détaillés dans les projets d'articles présentés dans le chapitre suivant.

Dans ces protocoles expérimentaux, en raison de la possible interférence de l'emploi de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ou du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  sur la cinétique de réaction (e.g. par réduction éventuelle de sous-produits en composé parent ou réaction possible de la ou des chloramines formées), quelques expériences de chloration ont été réalisées en injectant les prélèvements effectués directement en CLHP, sans ajout préalable de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ou  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Dans ces conditions, l'arrêt de la réaction de chloration est attendu au cours de l'analyse CLHP. En supposant que la séparation chlore/composé étudié (i.e. arrêt de la réaction) au cours de l'analyse, se fasse toujours "n" secondes après l'injection de l'échantillon dans le système de chromatographie, l'intervalle de temps entre deux injections successives d'un même échantillon chloré, correspond alors à l'intervalle de temps de chloration supplémentaire de l'échantillon, selon le schéma suivant.



avec:  $\Delta t$  = l'intervalle de temps entre deux injections d'un même échantillon chloré en CLHP  
 = l'intervalle de temps de chloration supplémentaire de l'échantillon

#### III.2- Etude des sous-produits

L'identification et le suivi des sous-produits de chloration du paracétamol, du diclofénac et de la carbamazépine ont été réalisés à trois valeurs différentes de pH (5, 7 et 9).

Les conditions expérimentales et les modes opératoires concernant chaque composé ont été détaillés dans les projets d'articles présentés dans le chapitre suivant.

## IV- METHODES ANALYTIQUES

### IV.1- Dosage du chlore

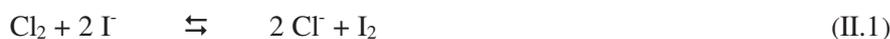
Deux méthodes de dosage du chlore ont été employées suivant les concentrations des solutions à doser: le dosage par iodométrie ou le dosage par la méthode à la diéthyl-p-phényldiamine (DPD)

#### IV.1.1- Dosage par iodométrie

Cette méthode (Standards Methods, 1995) a été employée pour effectuer le dosage du chlore total des solutions chlorées les plus concentrées (i.e. solution commerciale d'hypochlorite de sodium et solution mère de chlore à (20-100 mM)).

Elle consiste:

- à réduire le chlore total d'un volume  $V_{\text{chlore.tot}}$  de solution à doser en présence d'un excès d'iodure de potassium (réaction II.1)



Cette étape s'effectue en milieu acide. Elle entraîne l'oxydation des iodures (incolore) en iode (jaune).

- à doser ensuite l'iode formé par une solution de thiosulfate de sodium (réaction II.2) jusqu'à réduction de la totalité de l'iode formé (jaune) en iodure (incolore)



D'un point de vue pratique, dans un erlenmeyer contenant 100 mL d'eau ultra-pure, 5 mL d'acide acétique et environ 1 g d'iodure de potassium, un volume  $V_{\text{chlore.tot}}$  de solution à doser est tout d'abord ajouté. L'iode libéré est ensuite titré en retour par une solution de thiosulfate de sodium à 0,01 M en présence de thiodène.

Ainsi, la concentration en chlore total peut être calculée par la relation suivante:

$$[\text{Chlore}]_{\text{tot}} \text{ ( en mol L}^{-1} \text{ )} = \frac{[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}] V_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}}}{2 V_{\text{Chlore.tot}}} \quad (\text{II.3})$$

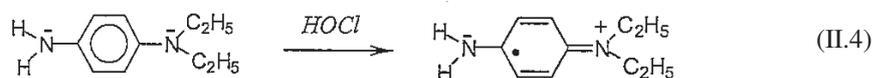
avec  $[S_2O_3^{2-}]$ , le titre de la solution de thiosulfate de sodium (en mol.L<sup>-1</sup>)

$V_{S_2O_3^{2-}}$ , le volume de thiosulfate de sodium versé (en mL)

$V_{\text{chlore,tot}}$ , le volume de solution à doser (en mL).

#### IV.1.2- Dosage par la méthode à la diéthyl-p-phényldiamine (DPD)

Cette méthode, rapide, a été employée pour effectuer le dosage du chlore libre du milieu réactionnel des expériences de chloration. Elle repose sur l'oxydation par le chlore, en milieu neutre, de la diéthyl-p-phényldiamine en radical semi-quinonique rouge ( $\lambda = 510$  et  $550$  nm) (Rodier *et al.*, 2009).



La réaction obtenue est instantanée. Ainsi, pour chaque dosage, après mise en contact des réactifs (250  $\mu\text{L}$  de tampon pH 6 et 250  $\mu\text{L}$  de DPD) et de l'échantillon (5 mL), la lecture de l'absorbance a directement été réalisée en cuve de 1 cm à l'aide d'un spectrophotomètre UV – visible 320 SAFAS.

Pour chaque échantillon, la concentration en chlore libre a été déterminée à partir de la loi de Beer Lambert (réaction II.5).

$$A = \varepsilon l C \quad \text{(II.5)}$$

avec: A, l'absorbance obtenue à 510 nm

l, la largeur de la cuve employée (1 cm)

C, la concentration en chlore libre (mol.L<sup>-1</sup>)

$\varepsilon$ , le coefficient d'extinction molaire déterminé expérimentalement par étalonnage ( $\varepsilon = 14\,871 \pm 1\,096 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )

Dans ces conditions, le domaine de linéarité de la méthode s'étend jusqu'à 40  $\mu\text{M}$ , la limite de détection étant de 0,5  $\mu\text{M}$ .

## IV.2- Dosage du paracétamol, diclofénac et carbamazépine

Tous les composés pharmaceutiques étudiés, le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine, ont été analysés directement sans extraction préalable sur un ensemble chromatographique Waters<sup>®</sup> constitué:

- d'un passeur d'échantillons (Waters<sup>®</sup> 717 plus),
- d'une pompe Waters<sup>®</sup> 1525,
- et d'un détecteur d'absorption UV-visible ultra sensible Waters<sup>®</sup> 2487.

Les conditions analytiques employées pour chaque composé ont été détaillées dans les projets d'articles du chapitre suivant. De même, les compositions des phases mobiles et les longueurs d'onde de détection en UV-visible utilisées au cours de cette étude sont résumés dans le tableau II.1.

**Tableau II.1:** Conditions analytiques mises en œuvre lors de l'analyse des produits pharmaceutiques étudiés en CLHP/UV

Composé analysé	Composition (v/v) de la phase mobile méthanol / eau (% d'acidification)	Longueur d'onde de détection (Absorption UV)
<b>Le paracétamol</b>	10 / 90 (0,1 % acide formique)	$\lambda_{\text{abs}} = 242 \text{ nm}$
<b>Le diclofénac</b>	75 / 25 (0,1 % acide formique)	$\lambda_{\text{abs}} = 274 \text{ nm}$
<b>La carbamazépine</b>	45 / 55 (non acidifiée)	$\lambda_{\text{abs}} = 284 \text{ nm}$

## IV.3- Identification des sous-produits de chloration

L'identification des intermédiaires réactionnels de chloration a été réalisée à partir d'analyses effectuées par CLHP couplée à un détecteur d'absorption UV-visible et un détecteur de spectrométrie de masse (CLHP/UV/MS) sur un appareillage comprenant :

- une partie chromatographie, elle-même composée d'une pompe quaternaire basse pression, d'un four à colonne thermostaté à 25 °C et d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes,
- un spectromètre de masse à piège ionique (DECA XP-Thermo).

Les conditions de séparation chromatographique ont été détaillées pour chaque composé dans le chapitre suivant. Les compositions des phases mobiles et les colonnes utilisées pour identifier les sous-produits de dégradation sont résumées dans le tableau II.2

**Tableau II.2:** Gradients d'élution et colonnes employés pour l'analyse CLHP/ UV / MS des sous-produits de dégradation

Sous-produits analysés	Composition (v/v) de la phase mobile méthanol / eau (0,1% acide acétique)	Colonne utilisée
sous-produits de chloration du paracétamol	10 / 90 pendant 20 min	Kromasil C <sub>18</sub> (3,2 x 250 mm, 5 µm)
	Puis de 10 / 90 à 100 / 0 après 45 min (gradient linéaire)	
	Puis de 100 / 0 à 10 / 90 après 5 min (gradient linéaire)	
	enfin 10 / 90 pendant 10 min	
sous-produits de chloration du diclofénac	50 / 50 pendant 5 min	Kromasil C <sub>18</sub> (3,2 x 250 mm, 5 µm)
	Puis de 50 / 50 à 70 / 30 après 30 min (gradient linéaire)	
	puis 70 / 30 pendant 50 min	
	Puis de 70 / 30 à 50 / 50 après 5 min (gradient linéaire)	
	enfin 50 / 50 pendant 15 min	
sous-produits de chloration de la carbamazépine	45 / 55 (isocratique)	Supelcosil C <sub>18</sub> (3 x 250 mm, 5 µm)

Pour tous les composés étudiés, la détection par spectrométrie de masse a été précédée d'une ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) en modes positif et/ou négatif. Cette technique consiste en la production d'ions dans un courant de gaz vecteur, généralement N<sub>2</sub>, à la pression atmosphérique.

Dans ces conditions, la majorité des spectres enregistrés en mode positif donne accès aux ions pseudo-moléculaires relatifs à [M+H]<sup>+</sup> et/ou [M+Na]<sup>+</sup> qui permettent de déterminer la masse du composé. En mode négatif, l'ion [M-H]<sup>-</sup> est le plus souvent formé. De même, des adduits peuvent être formés par réaction avec l'eau et/ou le solvant.

Comme le montre le tableau II.3, différents paramètres de la source d'ionisation APCI ont été utilisés suivant les composés analysés.

**Tableau II.3:** Conditions d'ionisation de la source employées pour les analyses en spectrométrie de masse

Conditions d'ionisation de la source	paracétamol	diclofénac	carbamazépine
Température du capillaire de transfert des ions	250 °C	250 °C	250 °C
Température de la chambre de vaporisation	450 °C	450 °C	450 °C
Débit du gaz de nébulisation (N <sub>2</sub> ) (ua)	32	35	25
Tension sur aiguille corona	5 µA	5 µA	5 µA

Pour les analyses MS/MS, les conditions de fragmentation dans le piège ionique employées sont résumées pour chaque composé dans le tableau II.4:

**Tableau II.4:** Conditions de fragmentation dans le piège ionique employées pour les analyses MS/MS

conditions de fragmentation dans le piège ionique	paracétamol	diclofénac	carbamazépine
Energie de collision normalisée	37 %	37 %	35 %
Q d'activation	0,25	0,25	0,25
Temps d'activation	30 ms	30 ms	30 ms

## V- AUTRES METHODES D'ANALYSE

Parmi les autres méthodes d'analyse utilisées, les mesures d'absorbance dans le domaine UV-visible ont été réalisées avec un spectromètre d'absorption UV-visible 320 de SAFAS et les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'une électrode combinée reliée à un pH-mètre MeterLab PHM 210. Dans ce second cas, un étalonnage quotidien du pH-mètre par des solutions standards à pH 4, 7 et 10 a été réalisé.

---

## **Résultats et Discussion**

---

---

## CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSION

---

<b>I- PROJET D'ARTICLE N°: 1.....</b>	<b>52</b>
<b>Aqueous chlorination of acetaminophen: kinetic study and transformation products identification</b>	
<b>I.1- Introduction.....</b>	<b>53</b>
<b>I.2- Materials and methods.....</b>	<b>55</b>
I.2.1- Standards and reagents.....	55
I.2.2- ATP chlorination experiments.....	55
I.2.3- Analytical methods.....	56
<b>I.3- Results and discussion.....</b>	<b>57</b>
I.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination.....	57
I.3.2- pH dependence profile and rate constants of elementary reactions.....	59
I.3.3- Identification of oxidation by-products.....	62
I.3.4- Proposed reaction pathways.....	66
I.3.5- Formation of major transformation products according to chlorine dose.....	66
<b>I.4- Conclusion.....</b>	<b>68</b>
<b>II- PROJET D'ARTICLE N°: 2.....</b>	<b>69</b>
<b>Aqueous chlorination of diclofenac: kinetic study and transformation products identification</b>	
<b>II.1- Introduction.....</b>	<b>70</b>
<b>II.2- Materials and methods.....</b>	<b>73</b>
II.2.1- Standards and reagents.....	73
II.2.2- Diclofenac (DCF) chlorination experiments.....	73
II.2.3- Analytical methods.....	74
<b>II.3- Results and discussion.....</b>	<b>75</b>
II.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination.....	75
II.3.2- pH dependence profile and rate constants of elementary reactions.....	77
II.3.3- Identification of oxidation by-products.....	82
II.3.4- Monitoring of transformation products formation and proposed reaction pathways.....	87
<b>II.4- Conclusion.....</b>	<b>89</b>

<b>III- PROJET D'ARTICLE N°: 3.....</b>	<b>90</b>
<b>Aqueous chlorination of carbamazepine: kinetic study and transformation product identification</b>	
<b>III.1- Introduction.....</b>	<b>91</b>
<b>III.2- Materials and methods.....</b>	<b>93</b>
III.2.1- Standards and reagents.....	93
III.2.2- CBZ chlorination experiments.....	93
III.2.3- Analytical methods.....	94
<b>III.3- Results and discussion.....</b>	<b>96</b>
III.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination.....	96
III.3.2- pH dependence profile and rate constants of the proposed elementary reactions.....	99
III.3.3- Identification of oxidation by-products.....	103
III.3.4- Monitoring of transformation products formation and proposed reaction pathways....	108
<b>III.4- Conclusion.....</b>	<b>111</b>
<b>V- SYNTHÈSE ET DISCUSSION GÉNÉRALE.....</b>	<b>112</b>
<b>IV.1- Cinétiques de chloration à différents pH.....</b>	<b>112</b>
IV.1.1- Le paracétamol ou acétaminophène (ATP).....	114
IV.1.2- Le diclofénac (DCF).....	118
IV.1.3- La carbamazépine (CBZ).....	121
<b>IV.2- Sous-produits de chloration et schémas réactionnels.....</b>	<b>131</b>
IV.2.1- Le paracétamol ou acétaminophène (ATP).....	131
IV.2.2- Le diclofénac (DCF).....	133
IV.2.3- La carbamazépine (CBZ).....	135
<b>IV.3- Application à la désinfection des eaux.....</b>	<b>136</b>

Dans le cadre de ce travail, une étude cinétique et mécanistique a été réalisée pour l'ensemble des composés étudiés (le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine). Dans cette partie, les résultats obtenus, concernant chaque composé, sont présentés sous forme d'articles, rédigés en anglais, suivis par une discussion générale en français.

Chaque article, est constitué de deux parties essentielles:

- Une partie cinétique.
- Une partie identification des sous-produits de chloration.

Pour chaque composé (donc pour chaque article), l'étude cinétique de la réaction est réalisée à  $20 \pm 2$  °C et à différentes valeurs de pH selon la méthode de dégénérescence d'ordre. Cette méthode, facile à mettre en œuvre, est fréquemment employée pour la détermination de constantes inférieures à  $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Elle consiste à faire réagir (oxyder ou réduire) un composé M, dont on cherche la constante cinétique de réaction vis-à-vis d'un réactif R (oxydant ou réducteur), en présence d'un excès de réactif R, de telle sorte que la variation de la concentration en R puisse être considérée négligeable par rapport à celle en M pendant toute la durée de l'expérience.

Dans ces conditions la réaction globale produite s'écrit:



En supposant que la vitesse de décomposition de M réponde à une loi cinétique d'ordre n par rapport de la concentration en réactif R, la relation suivante peut alors être écrite:

$$v = -\frac{d[\text{M}]}{dt} = k_{\text{app}} [\text{M}] [\text{R}]^n \quad (\text{III.2})$$

ou, comme  $[\text{R}] = [\text{R}]_0$ ,

$$v = -\frac{d[\text{M}]}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{M}] \quad (\text{III.3})$$

soit encore,

$$\ln \frac{[\text{M}]_t}{[\text{M}]_0} = -k_{\text{obs}} t \quad (\text{III.4})$$

avec  $k_{\text{app}} = k_{\text{obs}} / [\text{R}]^n \quad (\text{III.5})$

et  $k_{\text{app}}$ : constante cinétique apparente de l'ordre n+1 (déterminée pour un pH donné)

$k_{\text{obs}}$ : constante de pseudo-premier ordre

La constante  $k_{obs}$  est déterminée graphiquement. Connaissant la concentration en R du milieu réactionnel, l'ordre partiel par rapport au chlore total et la constante apparente ( $k_{app}$ ) peuvent alors être calculés.

Pour chaque composé, à partir de la spéciation des différents éléments en solution et en tenant compte de la variation des constantes de vitesse en fonction du pH, les réactions élémentaires de chloration sont ensuite proposées et leur constante cinétique associée sont déterminées.

Enfin, dans une dernière partie, l'étude d'identification des sous-produits de chloration est réalisée pour chaque composé par des analyses chromatographiques (CLHP/UV, CLHP/SM et CLHP/SM/SM). Leur stabilité au cours de la chloration est évaluée à trois valeurs différentes de pH (5, 7 et 9), et les schémas réactionnels impliqués sont discutés.

## I- PROJET D'ARTICLE N°: 1

### **Aqueous chlorination of acetaminophen: kinetic study and transformation products identification**

#### **ABSTRACT**

In this study, kinetic and mechanistic aspects of the reaction of chlorine with acetaminophen (ATP) were investigated. In the first part, the reaction of chlorine with ATP was performed over time in the presence of an excess of total chlorine, and for different values of pH (between 5 and 10) at  $20 \pm 2$  °C. Under these conditions, a second-order reaction (first-order relative to ATP concentration and first-order relative to free chlorine concentration) was observed, and the apparent rate constants were determined. To explain the observed pH-dependence of the apparent rate constants, elementary reactions (i.e. reactions of hypochlorous acid (HOCl) with neutral and ionized forms of ATP) were proposed and the intrinsic constants of each of them were calculated. Under these conditions, a good correlation with experimental data was obtained by considering the reaction of HOCl with neutral and ionized forms of ATP. Intrinsic rate constants about  $1.1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for the reaction (HOCl + ATP) and  $5.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  for (HOCl + ATP<sup>-</sup>) were obtained. From these results, at pH 7, a rate constant about  $13.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  can be expected. For a total chlorine concentration of  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , a half-life time about 61 min can be calculated. In the second part of this study, identification of degradation products formed during chlorination of ATP was undertaken from LC-MS and MS/MS analysis. Under our experimental conditions, several transformation products have been observed during the chlorination of ATP. As previously described in the case of chlorination of other organic compounds, mono-chloro and di-chloro ATP, in addition to hydroquinone and benzoquinone were observed as transformation-products. Moreover, several oligomeric transformation products were observed.

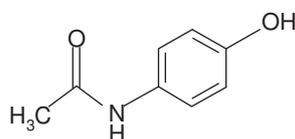
#### **KEY WORDS**

Pharmaceutical, acetaminophen, chlorination, kinetic, transformation products, LC-MS.

## I.1- Introduction

A large variety of pharmaceuticals compounds (e.g. antibiotic, analgesic, anti-inflammatory, antiepileptic, hypnotic,...) have been detected in the surface, ground and drinking waters of numerous countries all over the world (Ternes, 1998; Jones et al., 2001; Sacher et al., 2001; Heberer, 2002). This aquatic contamination is the result of an annual use of thousands tons of these substances to treat illnesses or to face stress of modern life.

Acetaminophen or paracetamol, (Figure 1) is commonly used drug, which has an analgesic and antipyretic activity.



(N-(4-hydroxyphenyl) acetamide)

**Figure 1:** Chemical structure of acetaminophen (ATP)

The consumption of acetaminophen in France was estimated of about  $2.2 \cdot 10^3$  tones yearly in 1998 (Beausse, 2004). In the same year, it was estimated that  $3.2 \cdot 10^9$  tablets of acetaminophen were consumed in the UK alone (Bessemers and Vermeulen, 2001). Similarly in 2002,  $3.6 \cdot 10^3$  tones of this compound was produced in USA (Bedner and Maccrehan, 2006).

Most of pharmaceuticals are believed to reach the aquatic environment *via* sewage effluent. Therefore, due to its large and widespread use, a particular attention on acetaminophen removal during the waste-water treatment has to be done.

Collected in the wastewater, a great removal of acetaminophen is usually observed. Actually, in a study conducted in Germany (1998), by Ternes, 98% of acetaminophen removal was reported (Ternes, 1998). Similarly, in a study conducted in Spain by Rosal et al. (2010), no trace of acetaminophen was detected at the outlet of sewage treatment plant, while concentrations about  $23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  were observed in the inlet water. However, in some sites, traces of acetaminophen were reported in the effluent treatment plant. For example, concentrations about 0.1 to  $11.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  were reported in France by Togola and Budzinski, (2008).

Similarly, traces of this compound were detected in surface water of several countries (Kolpin et al., 2002; Paffoni et al., 2006). Therefore, because surface water is often used as a source of drinking water, it is important to assess water treatment processes with regard to their acetaminophen removal potential.

Concerning oxidation processes, several works recently investigated chlorination and ozonation of ATP.

From these results, a rapid removal of ATP during ozonation with a second order rate constant about  $6.51 \cdot 10^6$  at pH 7.2 can be expected (Andreozzi et al., 2003b).

Moreover, several oxidation products were identified (Andreozzi et al., 2003b). Concerning chlorination, a kinetic study at different pH values between 5 and 10 was performed (Pinkston and Sedlak, 2004). From this work, a higher reactivity of HOCl with ionized form of ATP was shown. At pH 7, an apparent rate constant about  $13 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  was expected. However, in this study, sodium thiosulfate was used in order to quench chlorine reaction. According to Bedner and Maccreham (2006), this quenching method could reduce back some transformation products into ATP.

Similarly, several transformation products have been reported during ATP chlorination (Bedner and Maccreham, 2006; Xagorarakis et al., 2008). Among them, two chlorinated ATP derivatives, and two toxic compounds, such as benzoquinone and N-acetyl p-benzoquinon imine, have been identified. In the case of benzoquinone, a high stability of this compound to chlorination was observed.

In this study, the reactivity of the acetaminophen during the chlorination was investigated. In the first part, kinetic studies were conducted in pure aqueous solution and different pH levels. The reaction rate order and apparent rate constants of chlorination were determined. In the second part, a mechanistic study of acetaminophen chlorination has been done. Transformation-products were tentatively identified by LC coupled with UV diode array detector and mass spectrometer. Then, their stability in the presence of chlorine was studied.

## **I.2- Materials and methods**

### **I.2.1- Standards and reagents**

Acetaminophen (ATP) was supplied by Acros Organics, (purity > 98 %). Sodium hypochlorite solution was purchased from Acros Organics and was controlled to ensure equimolar concentrations of hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ) and chloride ( $\text{Cl}^-$ ) ions, with 13.0 % (w/v) of active chlorine. The other reagents ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , NaOH,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , phosphate, etc.) were analytical grade or better and used without further purification. Solvents were LC or LC-MS grade. All stock solutions were prepared with purified water (18 M $\Omega$  cm, DOC < 0.1 mg/L) obtained from a Milli-Q Millipore system.

### **I.2.2- ATP chlorination experiments**

Kinetic experiments were performed for 5-10 pH range, in a batch reactor thermostated at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , under pseudo first-order kinetics conditions ( $[\text{HOCl}]_T > 10 [\text{ATP}]_T$ ). The initial ATP concentration was 10  $\mu\text{M}$  and at least 120  $\mu\text{M}$  of total chlorine was added. The pH of tested aqueous solutions was adjusted by using phosphate salts (10 mM). Under these conditions, no pH variation was observed and chlorine variations were shown to be less than 20 % during experiment time. For each experiment, kinetic runs were initiated by injecting, under rapid mixing, an aliquot of chlorine stock solution. At different run times, samples of unquenched reaction solutions containing chlorine and ATP were directly injected into LC system. Under these conditions, time required for the sample to reach the chromatographic column was considered as reaction time. For each sample, remaining ATP concentration was determined.

ATP chlorination experiments for the identification of transformation products were performed at pH 5, 7 and 9 in the presence of different doses of chlorine in several reactors. The initial concentration of ATP was 100  $\mu\text{M}$  and the dose range of chlorine was from 0 to 400  $\mu\text{M}$ . After chlorination times about 24 hours, aliquots of solution were analysed by LC-UV and mass spectrometry MS. Under these conditions, it was checked that chlorine consumption was total.

### **I.2.3- Analytical methods**

During chlorination experiments, all aqueous solutions of ATP reacting mixtures were directly analysed without any sample treatment. ATP concentrations were determined by a LC-UV system equipped with an automatic Waters 717 plus auto-sampler injector, a Waters 600E pump and a Water 2487 UV-visible spectrometer. Isocratic reversed phase chromatography was optimized for ATP using a Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 x 250 mm, 5µm). A 0.1 % formic acid water-methanol (25/75 v/v) mixture was used as the mobile phase, with a flow-rate of 1 mL/min. For each sample, the injected volume was 100 µL, and UV detection at 242 nm was used.

For the identification of degradation products, samples were analysed by LC-UV and mass spectrometry analyses (LC-MS and MS/MS). A Thermo Surveyor pump and thermostated auto-sampler, equipped with Thermo Surveyor a diode array detector and a Thermo Deca XP Ion max ion trap mass spectrometer were used. The column was a Kromasil C<sub>18</sub> column (3.2 x 250 mm, 5 µm) and a 0.1 % acetic acid water-methanol mixture was used as the mobile phase with a flow-rate of 0.3 mL/min in various gradients mode. For each sample, the injected volume was 100 µL, and detection by mass spectrometry was preceded by an atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) in both positive and negative mode (mass range TIC 50-500 uma, ion transfer capillary temperature 250 °C; APCI vaporizer temperature 450°C; Sheath gas flow 32 au; Corona discharges 5 µA). The following working conditions were used for MS/MS analysis: isolation width 6 uma, activation time 30 ms, trapping radio-frequency voltage was set at 0.25 and the normalized collision energy at 37 % of the voltage amplitude applied to the end-cap electrode.

Chlorine stock solutions were standardized by iodometry (Rodier et al., 2009). In chlorination experiments, chlorine was analyzed by the N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) colorimetric method (Afnor, 1994; Rodier et al., 2009).

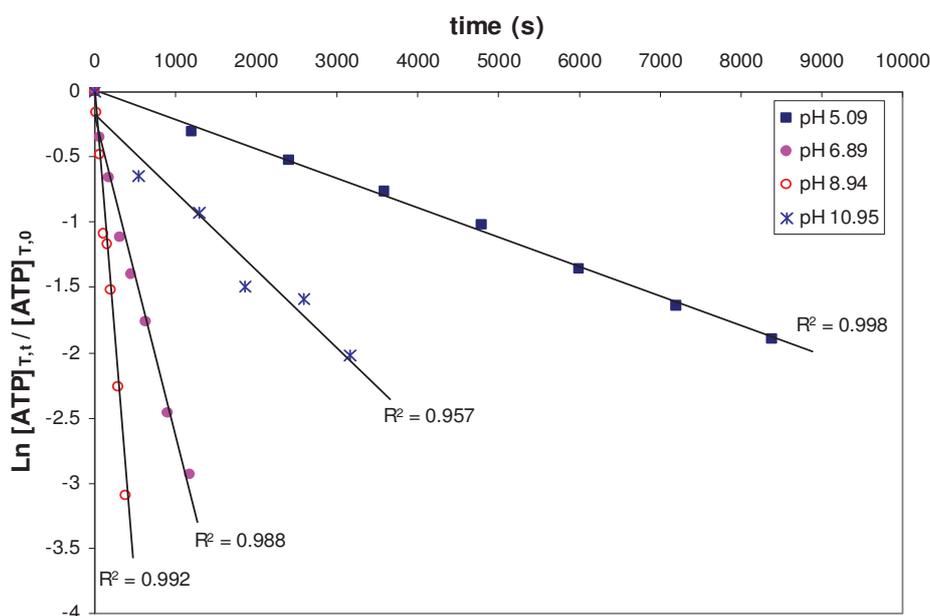
pH was measured with a Tacussel LPH330T pH-meter equipped with a Radiometer Analytical combined electrode and previously calibrated with standard pH 4, 7 and 10 buffers.

### I.3- Results and discussion

#### I.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination

Induced back reactions were previously observed when using sulfite or sodium thiosulfate as quenching method during ATP chlorination experiments (Bedner and Maccrehan, 2006). For each kinetic experiment, direct injection of each sample of unquenched reaction solution was then used in order to study ATP degradation during chlorination.

Under these conditions, in the presence of a large excess of chlorine, chlorination experiments exhibit a pseudo-first order dependence on the acetaminophen concentration as demonstrated by the linear time-course plot of  $\ln ([ATP]_{T,t} / [ATP]_{T,0})$ . Figure 2 presents an example of the pseudo-first-order kinetic plot of ATP chlorination at pH 5.09, 6.89, 8.94 and 10.95 with a total chlorine concentration of  $190 \pm 12 \mu\text{M}$ . These plots were linear ( $r^2 \geq 0.95$ ) for  $> 80 \%$  reactions. Similar correlation coefficients ( $r^2 \geq 0.95$ ) were obtained for the other experiments.



**Figure 2:** Pseudo-first-order kinetic plot of ATP chlorination at pH 5.09, 6.89, 8.94 and 10.95 with  $[\text{HOCl}]_T = 190 \pm 12 \mu\text{M}$ .

Therefore, for each experiment, ATP disappeared at a pseudo-first-order rate relative to the total concentration of ATP. The following equation can be written:

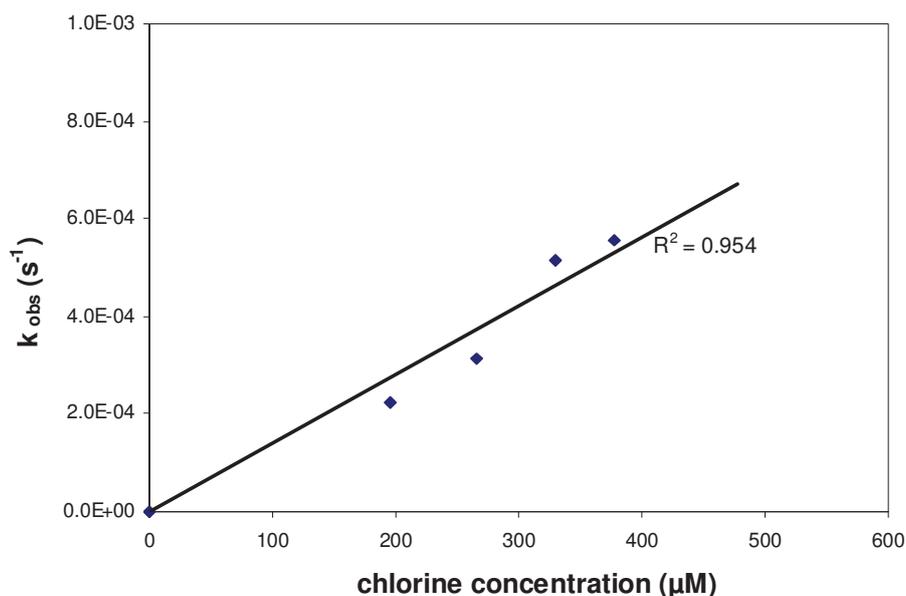
$$-\frac{d[\text{ATP}]_T}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{ATP}]_T \quad (1)$$

$$\text{or } \text{Ln} \frac{[\text{ATP}]_{T,t}}{[\text{ATP}]_{T,0}} = -k_{\text{obs}} \cdot t \quad (2)$$

with  $k_{\text{obs}}$  = pseudo-first-order kinetic constant, and  $[\text{ATP}]_T$  = total concentration of ATP.

For each experiment  $k_{\text{obs}}$  was determined from the slope of the linear time-course plot of  $\text{Ln} ([\text{ATP}]_{T,t}/[\text{ATP}]_{T,0})$ .

The reaction order relative to chlorine was then examined by varying the chlorine concentration and monitoring the disappearance of ATP. Figure 3 represents  $k_{\text{obs}}$  obtained at pH 5 for a total chlorine range of 195 to 377  $\mu\text{M}$ . This Figure illustrates that the pseudo-first-order kinetic constant is proportional to the total chlorine concentration with correlation coefficients  $r^2 > 0.95$ .



**Figure 3:**  $k_{\text{obs}}$  variation as a function of  $[\text{HOCl}]_T$  at pH  $5.11 \pm 0.4$  and  $20 \pm 2$  °C. Determination of the reaction order relative to chlorine

A first order reaction relative to chlorine concentration was thus shown. Therefore, the chlorination kinetic of acetaminophen is a second-order reaction, first-order relative to the total concentration of ATP and first-order relative to the free active chlorine concentration ( $[\text{HOCl}]_T$ ).

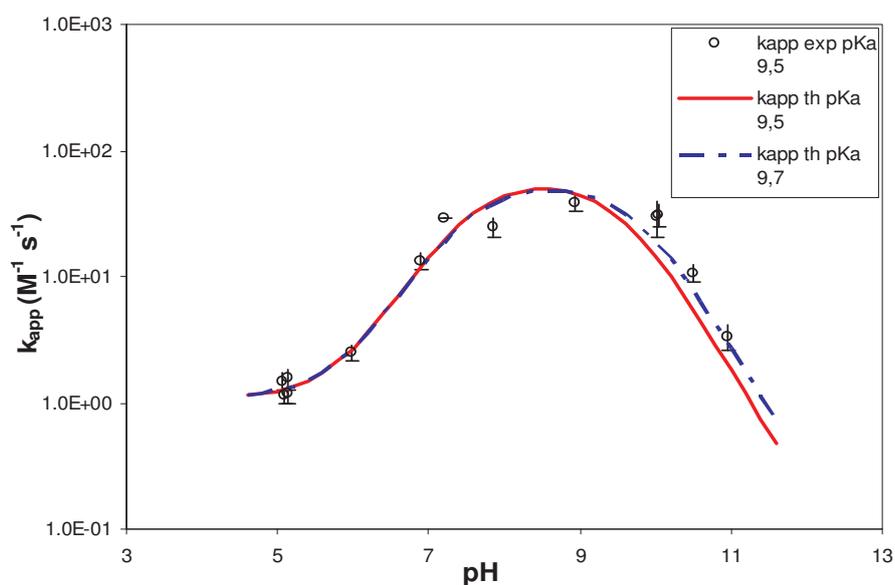
$$-\frac{d[ATP]_T}{dt} = k_{app}[HOCl]_T[ATP]_T \quad (3)$$

with  $k_{app} = k_{obs} / [HOCl]_T$  the second-order kinetic constant (4)

For each experiment, performed at pH range 5-11,  $k_{app}$  values were determined by considering the equation (4).

### I.3.2- pH dependence profile and rate constants of elementary reactions

Figure 4 presents the pH profile of the apparent second order rate constant  $k_{app}$  for ATP chlorination. This Figure also gives the standard deviations for each rate constant. These results show that the rate constants were maximal for pH 9 and minimal for pH values less than 6 and more than 10 ( $6 > \text{pH} < 10$ ).



**Figure 4:** pH-dependence of the apparent second-order rate constants for the reaction of chlorine with ATP. Symbols represent measured data and lines represent the model calculations

Similar pH dependence profiles were previously reported in the case of other phenol chlorination (Gallard and Von Gunten, 2002; Deborde et al., 2004). In the case of ATP chlorination a strong impact of phenolic ring on chlorine reactivity can then be expected. Based on these works, similarly to other phenolic compounds, the pH profile could be explained by taking into account the ionized ( $ATP^-$ ) and neutral ( $ATP$ ) species of acetaminophen (reaction 5) and the different species of chlorine for the studied pH range (reactions 6 and 7).



Under our experimental conditions, the sodium hypochlorite solution used was equimolar in chloride ion and free chlorine. Based on equilibrium constant values for the hydrolysis of  $\text{Cl}_2$  (reaction 7) and for  $[\text{HOCl}]_{\text{T}} = [\text{Cl}^-] = 400 \mu\text{M}$ , the maximum  $[\text{Cl}_2]$  was calculated to be very low at pH 5 (i.e.  $3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ ). Moreover, a first order reaction relative to chlorine concentration was shown under our experimental conditions. Consequently,  $\text{Cl}_2$  species was considered to be negligible in our experimental conditions. The concentrations of acetaminophen and free active chlorine  $[\text{HOCl}]_{\text{T}}$  were then assumed to be as follows:

$$[\text{ATP}]_{\text{T}} = [\text{ATP}] + [\text{ATP}^-] \quad (8)$$

$$[\text{HOCl}]_{\text{T}} = [\text{HOCl}] + [\text{ClO}^-] \quad (9)$$

Moreover, according to chlorine and ATP speciation, the following reactions could be suggested to explain the global chlorine reaction.



By considering these reactions, the lower reactivity of ATP with chlorine at  $\text{pH} < 6$  could be explained by the slow reaction between HOCl and neutral ATP species. In the 6-8.5 pH range, the increase in reactivity could be explained by the reaction between HOCl and ionized ATP species. Finally, the constant reactivity at 8.5-10 pH range, followed by the decrease in reactivity observed at  $\text{pH} > 10$ , could be attributed to the lower or neglected reactivity of hypochlorite ion ( $\text{ClO}^-$ ) than HOCl (Deborde and Von Gunten, 2008).

In this work, because  $\text{ClO}^-$  reactivity is usually negligible (Deborde and von Gunten, 2008), reactions 10 and 11 only were firstly considered to explain the global chlorine reaction. Thus, ATP chlorination kinetic was expressed as follows:

$$-\frac{d[\text{ATP}]_T}{dt} = k_1[\text{HOCl}][\text{ATP}] + k_2[\text{HOCl}][\text{ATP}^-] \quad (14)$$

$$\text{or } -\frac{d[\text{ATP}]_T}{dt} = (\alpha_{\text{HOCl}}\alpha_{\text{ATP}} k_1 + \alpha_{\text{HOCl}}\alpha_{\text{ATP}^-} k_2)[\text{HOCl}]_T[\text{ATP}]_T \quad (15)$$

with  $\alpha_{\text{ATP}}$  and  $\alpha_{\text{ATP}^-}$  neutral and ionized acetaminophen fractions of total acetaminophen, and  $\alpha_{\text{HOCl}}$  hypochlorous acid fraction of total chlorine.

$$-\frac{d[\text{ATP}]_T}{dt} = [\text{HOCl}]_T[\text{ATP}]_T \frac{[\text{H}^+]^2 k_1 + [\text{H}^+]\text{Ka}_{\text{ATP}} k_2}{([\text{H}^+] + \text{Ka}_{\text{HOCl}})([\text{H}^+] + \text{Ka}_{\text{ATP}})} \quad (16)$$

Considering equation (3) and in comparison with the equation (16), the following expression of  $k_{\text{app}}$  as a function of pH was written

$$k_{\text{app}} = \frac{k_1[\text{H}^+]^2 + k_2[\text{H}^+]\text{Ka}_{\text{ATP}}}{([\text{H}^+] + \text{Ka}_{\text{HOCl}})([\text{H}^+] + \text{Ka}_{\text{ATP}})} \quad (17)$$

By considering this latter equation, the intrinsic constants  $k_1$  and  $k_2$  were calculated by multiple regression of the experimental  $k_{\text{app}}$ . The regression was performed by using the Solver function in Microsoft Excel in order to minimize the quadratic deviation defined as  $\Sigma(k_{\text{app exp}} - k_{\text{app theo}})^2 / (k_{\text{app exp}})^2$  where  $k_{\text{app exp}}$  and  $k_{\text{app theo}}$  represent the experimental and theoretical apparent second-order constant  $k_{\text{app}}$ .

Table 1 shows the values of  $k_1$  (HOCl + ATP) and  $k_2$  (HOCl + ATP<sup>-</sup>). Moreover, Figure 4 represents the experimental and the modelled pH profiles obtained from these constants and equation (17). A good correlation between experimental and modelled values was obtained. However, at pH > 9, the theoretical curve is slightly shifted toward the left as compared to the experimental values. For these pH values, the total reaction was mainly controlled by the reaction between HOCl and ionized ATP according to elementary reactions previously proposed.

This shift (Figure 4) could then be explained either by uncertainty concerning ATP pKa values. Actually, a better fit could be obtained by using the pKa values of 9.7 given by Sorasuchart et al., (1999). Moreover, this shift could be explained by a non negligible ClO<sup>-</sup> reactivity.

To check the reactivity of ClO<sup>-</sup>, during ATP chlorination, other calculations to model pH profile were then undertaken by considering reactions 10, 11, 12 and 13. However, under

these conditions, the very low  $\text{ClO}^-$  reactivity was confirmed and no best fit was obtained.

**Table 1:** Second-order rate constants calculated for elementary reactions of acetaminophen with free chlorine (reactions 10 and 11) at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$

Elementary reactions	Rate constants
$\text{HOCl} + \text{ATP}$	$k_1 = 1.1 \cdot 10^0 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$\text{HOCl} + \text{ATP}^-$	$k_2 = 5.3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

### I.3.3- Identification of oxidation by-products

In addition to ATP peak, four major peaks of products (P I, P II, P III, P IV) have been observed by LC-UV and/or LC-MS analysis of chlorinated ATP solutions. Among these peaks, it is worth noting that two of them (P III and P IV) were only observed in the UV analysis. The overall UV, MS, MS/MS and  $\text{MS}^3$  characteristics corresponding to these peaks are gathered in Table 2. Due to higher response in positive mode for both ATP and transformation products, only positive APCI mode has been presented.

#### Acetaminophen ATP

The MS spectrum showed a protonated molecular ion at  $m/z$  152. In the MS/MS fragmentation spectrum of  $m/z$  152, one ion at  $m/z$  110 (-42), which could correspond to  $\text{CH}_3\text{CO}$  loss, was observed. Finally, two additional fragment ions at  $m/z$  82 (-28) and 92 (-18) were shown in  $\text{MS}^3$  fragmentation spectrum of  $m/z$  110. For these latter fragments, the first fragment could result from CO loss, and the second could result from  $\text{H}_2\text{O}$  loss.

#### Product P I: chloro-ATP

The MS spectrum showed one ion at  $m/z$  186, and an isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  188 (+2) with abundance about 35 % of molecular ion) characteristic of the presence of one chlorine atom in the chemical structure. Similarly to ATP, in the MS/MS fragmentation spectrum of the ion at  $m/z$  186, one ion at  $m/z$  144 (-42) which could come from  $\text{CH}_3\text{CO}$  loss was observed. Moreover in the  $\text{MS}^3$  fragmentation spectrum, ions at  $m/z$  109 (-35) and 108 (-36) which confirm the presence of one chlorine atom in the chemical structure was noted. Therefore, due to mass difference of +34 between molecular ion of this product and ATP, a mono-chlorinated derivative of ATP was proposed.

#### Product P II: di-chloro-ATP

The MS spectrum of this compound showed one ion at  $m/z$  220, and the isotopic distribution

(i.e. presence of an ion at  $m/z$  222 (+2) with abundance about 75 % of molecular ion) is characteristic of the presence of two chlorine atoms in the chemical structure. Similarly to ATP, the MS/MS fragmentation spectrum of ion at  $m/z$  220 gives one ion at  $m/z$  178 (-42) which could result from  $\text{CH}_3\text{CO}$  loss. Finally, ions at  $m/z$  143 (-35) and 142 (-36) are obtained from  $\text{MS}^3$  fragmentation of ion at  $m/z$  178. This latter ion could result from Cl loss. Therefore, due to mass difference of +68 between molecular ion of this product and ATP, a di-chlorinated derivative of ATP was proposed for this compound.

#### Products P III and P IV: benzoquinone and hydroquinone

As previously stated, products P III and P IV were not detected by mass spectrometry. However, for these two compounds, comparable UV spectra to 1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone were observed. In order to confirm the chemical structure of these products, aqueous solutions of commercial 1,4-benzoquinone and 1,4-hydroquinone were then analysed under similar LC-UV/MS conditions, leading to identical retention time and UV spectra.

In addition to the previously described degradation products, three minor transformation product peaks (P V, P VI, and P VII) were also observed by mass spectrometry and UV analysis (Table 2). Due to low signal obtained in mass spectrometry, it was more difficult to propose a chemical structure. However, the mass spectra obtained for all these peaks indicated that these compounds have higher molecular weights (300, 334 and 368  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  respectively) than those previously described. Oligomeric structures resulting from secondary reactions between oxidation products of ATP could then be expected. For these compounds, MS/MS and  $\text{MS}^3$  analysis showing two successive  $\text{CH}_3\text{CO}$  loss and the probable pair mass (in agreement with the presence of two nitrogen atoms in the chemical structures) support this hypothesis.

#### Product P V: di-ATP

The MS spectrum of this compound showed a major protonated molecular ion at  $m/z$  301. In addition to this major ion, several other ions such as ion at  $m/z$  333 which probably result from solvent (methanol) addition in the ionization source are observed. In the MS/MS spectrum of  $m/z$  301, two main ions at  $m/z$  259 (-42) and 283 (-18) which could correspond to  $\text{CH}_3\text{CO}$  and  $\text{H}_2\text{O}$  loss respectively are observed. Similarly,  $\text{MS}^3$  fragmentation of  $m/z$  259 led to one major ion at  $m/z$  217 (-42) which could come from  $\text{CH}_3\text{CO}$  loss. For this product, a dimeric structure of ATP was then proposed.

Product P VI: chloro-di-ATP

A protonated molecular ion at  $m/z$  335 was observed in the MS spectrum of this product and an isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  337 (+2) with abundance about 35% of molecular ion) characteristic of the presence of one chlorine atom was shown. Similarly to product V, in addition to this major ion, several other ions such as ion at  $m/z$  367 which could correspond to solvent addition were observed. In the MS/MS fragmentation spectrum of  $m/z$  335, three fragment ions at  $m/z$  317 (-18), 293 (-42) and 257 (-78) were observed. These fragments could correspond to  $H_2O$ ,  $CH_3CO$  and successive  $CH_3CO$  and  $HCl$  loss. Finally, the  $MS^3$  fragmentation of  $m/z$  293 showed three ions at  $m/z$  275 (-18), 257 (-36) and 251 (-42) which could come from  $H_2O$ ,  $HCl$  and  $CH_3CO$  loss.

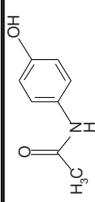
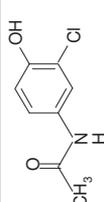
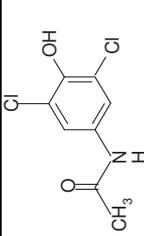
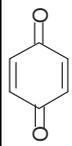
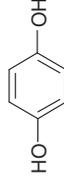
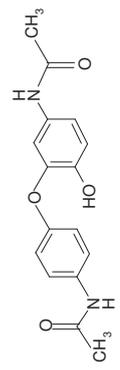
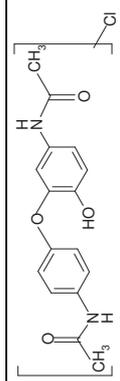
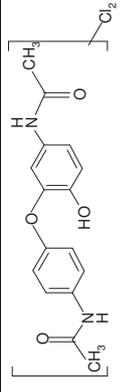
Therefore, for this compound a mono-chlorinated derivative of product V (chloro-di-ATP) was suggested.

Product P VII: di-chloro-di-ATP

For this product, a protonated molecular ion at  $m/z$  369 was observed in the MS spectrum and an isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  371 (+2) with abundance about 70% of molecular ion) characteristic of the presence of two chlorine atoms was shown. In the MS/MS fragmentation spectrum of  $m/z$  369, two fragments at  $m/z$  327 (-42) and 351 (-18) which could correspond to  $CH_3CO$  and  $H_2O$  loss were observed. The  $MS^3$  fragmentation of  $m/z$  327 gives two major ions at  $m/z$  176 (-151) and 152 (-175) which could come from ATP and di-chlorinated ATP loss.

Therefore, for this compound a di-chlorinated derivative of product P V (di-chloro-di-ATP) was proposed.

**Table 2:** UV characteristics and main fragment ions obtained from MS, MS<sup>2</sup> and MS<sup>3</sup> analyses of ATP and transformation products.

Compounds	proposed chemical structure	UV characteristics			Observed fragment ions at m/z value (relative abundance)		
		$\lambda_{max}$	MS	MS / MS	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>	
ATP		240 nm	152 (100); 154 (40)	110 (100)	82 (100); 92 (60)		
chloro-ATP (P I)		218; 246 and 286 nm	186 (100); 188 (35)	144 (100)	109 (100); 108 (80)		
di-chloro-ATP (P II)		226; 250 and 294 nm	220 (100); 222 (75)	178 (100); 180 (70)	143 (100); 142 (20)		
Benzoquinone (P III)		218 and 246 nm					
Hydroquinone (P IV)		226 and 288 nm					
di-ATP (P V)		234 and 292 nm	301 (100) 216 (40); 255 (40) 318 (20); 333 (60)	259 (100) 283 (20)	214 (30); 217 (100)		
chloro-di-ATP (P VI)		238 and 294 nm	335 (100); 337 (35) 216 (45); 232 (30); 255 (20) 352 (30); 367 (40)	293 (100) 257 (20); 317 (25)	251 (100); 257 (40); 275 (20)		
di-chloro-di-ATP (P VII)		224; 250 and 286 nm	369 (100); 371 (70) 66 (85); 97 (20); 216 (15) 291 (40); 333 (70)	327 (100) 351 (10); 358 (5)	176 (100); 152 (70); 124 (50)		

### **I.3.4- Proposed reaction pathways**

According to our results and the knowledge on chlorine reactions, three main pathways of chlorine attack can be proposed:

***(i) Either, an electrophilic substitution (H by Cl) on the aromatic ring:***

This attack of chlorine will lead to chlorinated ATP derivatives. This mechanism was illustrated by the identification of chloro-ATP (P I) and di-chloro-ATP (P II) in this study and other works (Bedner and Maccrehan, 2006).

***(ii) Or, an electrophilic substitution (H by Cl) on the nitrogen:***

This attack of chlorine generally leads to mono-chloramine, which could be unstable in the case of acetaminophen (as in many other cases), and could be rapidly hydrolyzed to give the formation of N-acetyl-p benzoquinone imine (NAPQI). This first transformation product previously observed by Bedner and Maccrehan, (2006) was not shown in this work. It could lead to benzoquinone and/or hydroquinone formation by hydrolysis mechanism.

***(iii) Or, an electrophilic substitution (H by Cl) on the methyl-ketone function:***

This later attack would lead to the formation of chloro-ketone, which in its turn could give the formation of chloroform and carboxylic acid (N-substituted carbamic acid). However, this pathway is very slow, and is then unlikely if compared with the other pathways (especially the first pathway (i)).

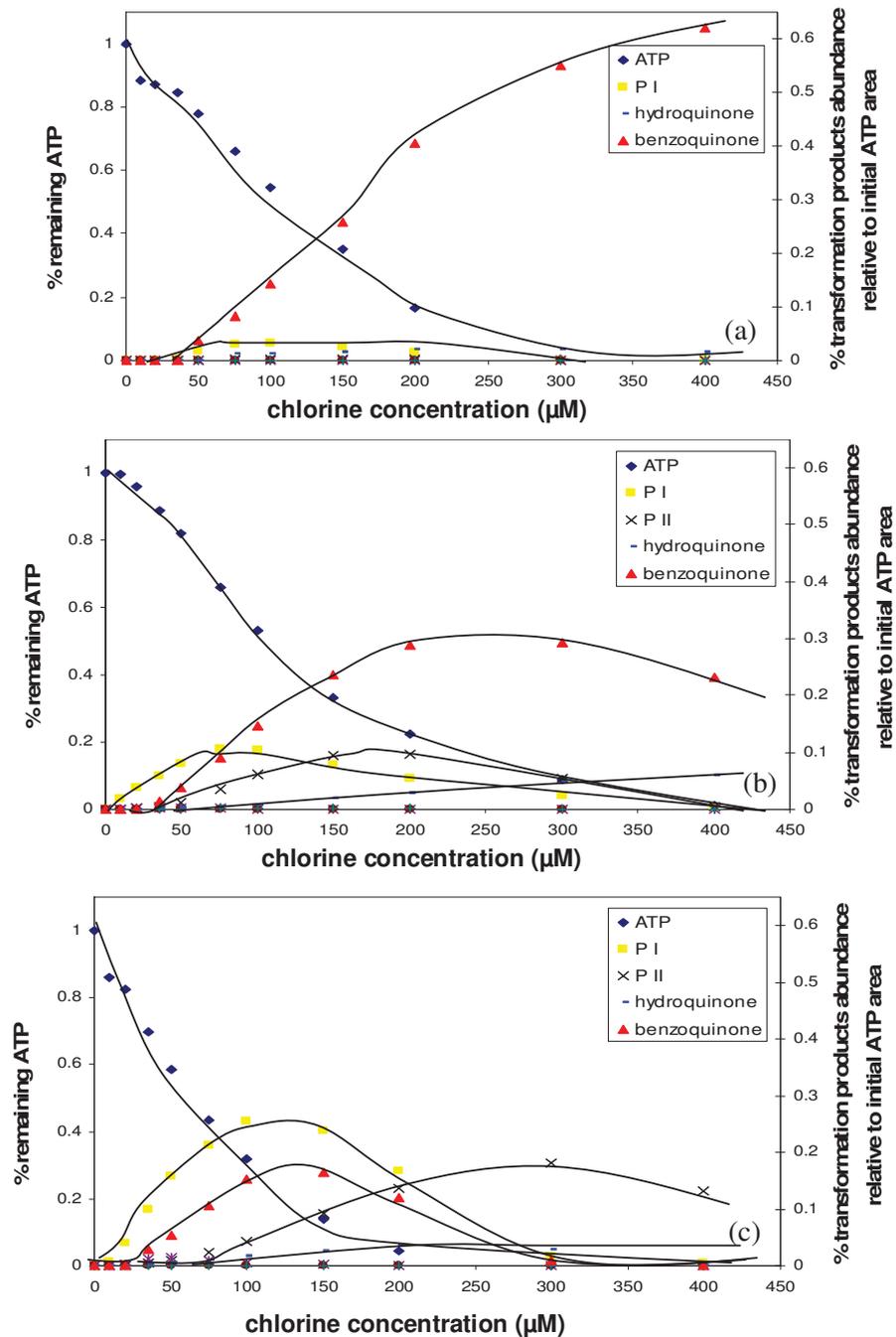
Concerning the minor compounds (P V, P VI, P VII); due to their probable oligomeric structures, secondary reactions between oxidation products of ATP could be proposed. As previously suggested during the chlorination of bisphenol A (Hu et al., 2002), reactions between phenol function and chlorinated compound leading to phenoxy derivative compound could be expected.

The formation of these later products under our experimental could be probably linked to significant concentrations used.

### **I.3.5- Formation of major transformation products according to chlorine dose**

The monitoring of the evolution of the major transformation products was performed according to different chlorine doses at pH 5, 7 and 9 (Figure 5). The comparison of by-products evolution at different pH values showed a higher formation of chloro-ATP (P I) and di-chloro-ATP (P II) at pH 9 than at pH 7 or 5. In agreement with the proposed above reaction

pathway, the product P I formation occurred before the product P II formation whatever the studied pH. For these two compounds, the observed increase in formation is followed by a decrease over chlorination dose, suggesting for these products further transformation during chlorination. Concerning benzoquinone, an accumulation in the solution, even in the presence of an excess of chlorine, was observed at pH 5, contrary to pH 7 and 9. Finally, a low formation of hydroquinone was observed irrespective of the studied pH.



**Figure 5:** Transformation products variation according to chlorine doses at (a) pH 5, (b) pH 7 and (c) pH 9

#### **I.4- Conclusion**

Acetaminophen reactivity and fate during chlorination was investigated in this study. The observed reactivity of this compound with chlorine in our experiments was in agreement with previous studies. From a kinetic point of view, a second-order reaction (first-order relative to ATP concentration and first-order relative to free chlorine concentration) with rate constant about  $13.36 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at pH 7 was shown. For a total chlorine concentration of  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , a half-life time about 61 min can then be expected. From a mechanistic point of view, several transformation products, such as chloro-ATP, di-chloro-ATP, benzoquinone and hydroquinone have been observed during chlorination of acetaminophen. Moreover, several oligomeric compounds were noted. These later products could come from secondary reactions between first oxidation products of ATP.

## II- PROJET D'ARTICLE N°: 2

### **Aqueous chlorination of diclofenac: kinetic study and transformation products identification**

#### **ABSTRACT**

Diclofenac reactivity and fate during chlorination was investigated in this work. In the first step, chlorination kinetic of diclofenac (DCF) was studied in the pH range of 4–10 at  $20 \pm 2$  °C and in the presence of an excess of total chlorine. A second-order reaction (first-order relative to DCF concentration and first-order relative to free chlorine concentration) was shown with rate constant about  $3.89 \pm 1.17 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at pH 7. The elementary reactions (i.e. reactions of HOCl with neutral and ionized forms of DCF or neutral and acid-catalyzed HOCl reaction with total DCF) were proposed and intrinsic constant of each of them were calculated. In the second step, several degradation products formed during chlorination of DCF were identified. These compounds could come from an initial chlorine electrophilic attack on aromatic ring or amine function of DCF. Some of these chlorinated derivatives seem to accumulate in solution in the presence of an excess of chlorine.

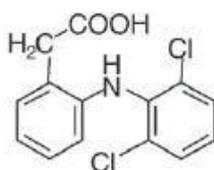
#### **KEY WORDS**

Pharmaceutical, diclofenac, chlorination, kinetic, transformation products, LC-MS.

## II.1- INTRODUCTION

In the recent years, there has been growing concerns about the presence of pharmaceuticals compounds in the aquatic environment. Actually, studies have reported a great variety of these compounds (e.g. antibiotic, analgesic, anti-inflammatory, antiepileptic, hypnotic,...) in waters of numerous countries all over the world (Halling-Sorensen et al., 1998; Ternes et al., 1998; Stumpf et al., 1999; Zuccato et al., 2000; Zwiener et al., 2000; Heberer, 2002; Wiegel et al., 2004; Boyd et al., 2005; Mompelat et al., 2008).

Diclofenac (Figure 1) is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), which is widely used even if associated with a low, but significant, incidence of hepatotoxicity and bone marrow toxicity.



**Figure 1:** Chemical structure of diclofenac (DCF)

In France, diclofenac consumption was reported about 14.9 tons a year in 1998 (Metcalf et al., 2004 cited by Alder et al., 2006). Similarly to other pharmaceuticals, added to possible emissions from production sites or surplus drugs consumption, the main source of presence of diclofenac in water is the metabolite excretion by human and animals (Halling-Sørensen et al., 1998; Zuccato et al., 2000). Collected in wastewaters, diclofenac seems to be relatively stable during classical municipal sewage system. Actually, for this compound, a percentage of removal of 69 % was observed in a sewage plant in Germany (Ternes, 1998). Similarly, in a study on the persistence of pharmaceutical compounds in water treatment (Rosal et al., 2010), an average concentration of 0.22  $\mu\text{g.L}^{-1}$  for diclofenac was observed at the outlet of sewage treatment plant while an average concentration of 0.23  $\mu\text{g.L}^{-1}$  was shown at the input of this site. For this study, a low degradation of diclofenac about 5 % was reported. This low removal could be explained by its low biodegradation and small adsorption on sludge and sediments (Ternes et al., 2004; Joss et al., 2006). Therefore in many countries, the presence of diclofenac into the effluents of sewage treatment plant has been demonstrated. In France or in Spain, for example, maximum concentrations about 0.4 -0.5  $\mu\text{g.L}^{-1}$  for diclofenac was observed (Togola and Budzinski, 2008; Rosal et al., 2010). Similarly, in aquatic environment, concentrations in the nanograms per litre to micrograms

per litre range have been usually reported (Halling-Sorensen et al., 1998; Paffoni et al., 2006; Togola et Budzinski, 2008). These concentrations are not very low. Moreover because pharmaceuticals are biologically active, it can not be excluded that these concentrations levels can not affect aquatic organisms. Actually, several studies have demonstrated the possible negative impact of the presence of traces of this compound in environment. According to Hernando et al. (2006), based on the  $EC_{50}$  values reported in the literature, anti-inflammatory drugs such as diclofenac, may be considered as very toxic to bacteria ( $EC_{50} < 1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) and toxic for invertebrates and algae ( $EC_{50} = 1 \text{ to } 10 \text{ mg.L}^{-1}$ ). However, for this compound, large differences between  $EC_{50}$  values obtained from one species to another within the same taxonomic group can be observed (e.g.  $EC_{50}$  ranging from 2 to 224  $\text{mg.L}^{-1}$  has been observed on invertebrates). For this compound, renal failure and decline of Pakistan white collar vultures and two other species were also described. These effects were linked to vulture's exposure after consumption of animal carcasses containing residues of diclofenac (Oaks et al., 2004). Finally, according to Carlsson et al. (2006), due to alterations in the liver and kidneys that diclofenac can generated in rainbow trout and its possible accumulation in certain organs (muscle, liver, kidneys), this compound could be considered as dangerous to the aquatic environment (Carlsson et al., 2006).

For drinking water, there is currently no regulatory requirement for the monitoring of pharmaceuticals in drinking water. However, in several countries, some of these compounds have been detected in drinking water with concentrations generally being in the  $\text{ng L}^{-1}$  range (Jones et al., 2003). Concerning diclofenac, in Europe, concentrations about 2.5 to 35  $\text{ng.L}^{-1}$  have been reported (Heberer et al., 2004 cited by Mompelat et al., 2008; Togola and Budzinski, 2008). Little is currently known about diclofenac fate during drinking water production (Ternes et al., 2002; Westerhoff et al., 2005). However, it was shown during ozonation step that diclofenac could be rapidly removed with apparent rate constant about  $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  at pH 7 (Huber et al., 2003). In a mechanistic point of view, numerous oxidation products have been shown (Vogna et al., 2004; Coelho et al., 2009). Similarly, some transformation products have recently be observed during chlorination (Miyamoto et al., 1997; Quintana et al., 2010). However, no complete kinetic study has been reported in literature concerning diclofenac chlorination.

The objective of this work is to assess the diclofenac reactivity and fate during chlorination steps. In a first part, kinetic studies were undertaken in pure aqueous solution and different pH

levels. The reaction rate order and apparent rate constants of chlorination were determined. In a second part, a mechanistic study of diclofenac chlorination has been done. Oxidation by-products were tentatively identified by LC coupled with UV diode array detector and mass spectrometer. The stability of these by-products in the presence of chlorine was studied.

## II.2- Materials and methods

### II.2.1- Standards and reagents

Diclofenac was supplied by Sigma, as sodium salt, with purity higher than 99 %. Sodium hypochlorite solution was purchased from Acros Organics and was controlled to ensure equimolar concentrations of hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ) and chloride ( $\text{Cl}^-$ ) ions, with 13.0 % (w/V) of active chlorine. The other reagents ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , NaOH,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , phosphate, etc.) were analytical grade or better and used without further purification. Solvents were LC or LC-MS grade. All stock solutions were prepared with purified water (18 M $\Omega$  cm, DOC < 0.1 mg/L) obtained from a Milli-Q Millipore system.

### II.2.2- Diclofenac (DCF) chlorination experiments

All kinetic experiments were performed in a batch reactor thermostated at  $20 \pm 2$  °C, under pseudo first-order kinetics conditions ( $[\text{HOCl}]_T > 10 [\text{DCF}]_T$ ). The initial DCF concentration was 10  $\mu\text{M}$  and at least 130  $\mu\text{M}$  of total chlorine was added. The pH of tested aqueous solutions (1L) was adjusted by using phosphate salts (10 mM). For each experiment, kinetic runs were initiated by injecting, under rapid mixing, an aliquot of chlorine stock solution. At constant time intervals, 3 mL of solution was withdrawn and added to vials of 4 mL containing an excess of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  to quench the residual chlorine and the oxidation reaction. Samples were then analyzed using Liquid Chromatography (LC) to determine the remaining DCF concentration. Under these conditions, no pH variation was observed and chlorine variations were shown to be less than 20 % during experiment time. To check the feasibility of using  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  as reducing agent for quenching the reaction, samples of unquenched reaction solutions containing chlorine and DCF were directly injected into LC system at different kinetic run times for several experiments performed at pH range of 4 - 10.

DCF chlorination experiments for transformation products identification were performed at pH 5, 7 and 9 in the presence of an excess of chlorine. The initial concentration of DCF was 100  $\mu\text{M}$ , and 1000  $\mu\text{M}$  of total chlorine was added. After different chlorination times, aliquots of solution were analysed by LC-UV and mass spectrometry MS.

### II.2.3- Analytical methods

All aqueous solutions of DCF reacting mixtures were directly analysed without any sample treatment. During kinetic experiments, DCF concentrations were determined by high performance liquid chromatography using an automatic Waters 717 plus auto-sampler injector and a Waters 600E pump. Isocratic reversed phase chromatography was optimized for DCF using a Kromasil C<sub>18</sub> column (4.6 x 250 mm, 5 µm). A 0.1 % formic acid water-methanol (25/75 v/v) mixture was used as the mobile phase, with a flow-rate of 1 mL/min. For each sample, the injected volume was 100 µL. Column effluent was monitored with a UV-visible spectrometer (Waters 2487) at 274 nm.

For the identification of degradation products, samples were analysed by LC-UV and mass spectrometry analyses (LC-MS and MS/MS) using a Thermo Surveyor pump and thermostated auto-sampler, equipped with a Thermo Surveyor diode array detector and a Thermo Deca XP Ion max ion trap mass spectrometer. The column was a Kromasil C<sub>18</sub> column (3.2 x 250 mm, 5 µm). A 0.1 % acetic acid water / methanol mixture was used as the mobile phase with a flow-rate of 0.3 mL/min in various gradients mode. For each sample, the injected volume was 100 µL. Mass spectrometry was performed with atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) in both positive and negative mode (mass range TIC 50-550 uma, ion transfer capillary temperature 250 °C; APCI vaporizer temperature 450°C; Sheath gas flow 35 au; Corona discharges 5 µA). MS/MS experiments were performed with the following working conditions: isolation width 6 uma, activation time 30 ms, trapping radio-frequency voltage was set at 0.25 and the normalized collision energy at 37 % of the voltage amplitude applied to the end-cap electrode.

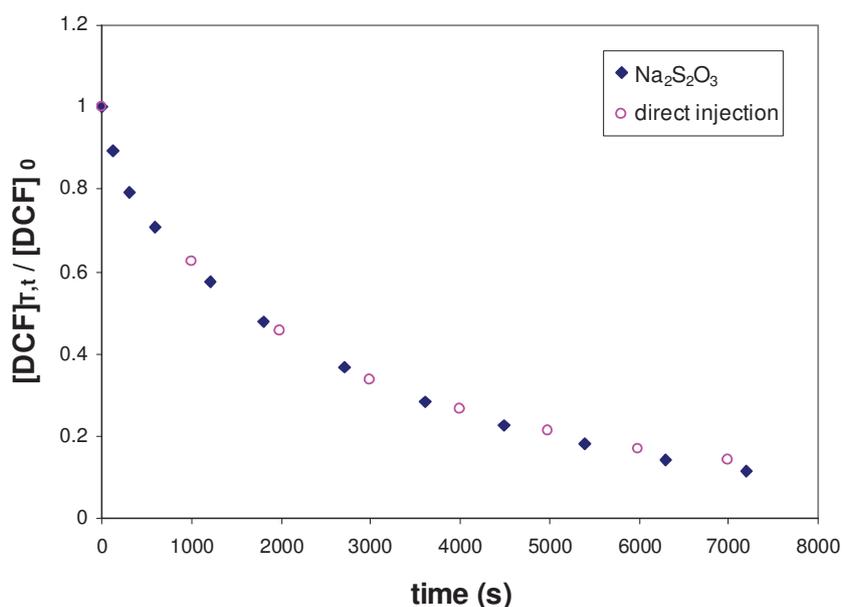
Chlorine stock solutions were standardized by iodometry (Rodier et al., 2009). In kinetic experiments, chlorine was analyzed by the N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) colorimetric method (Rodier et al., 2009).

pH was measured with a Tacussel LPH330T pH-meter equipped with a Radiometer Analytical combined electrode and previously calibrated with standard pH 4, 7, and 10 buffers.

## II.3- Results and discussion

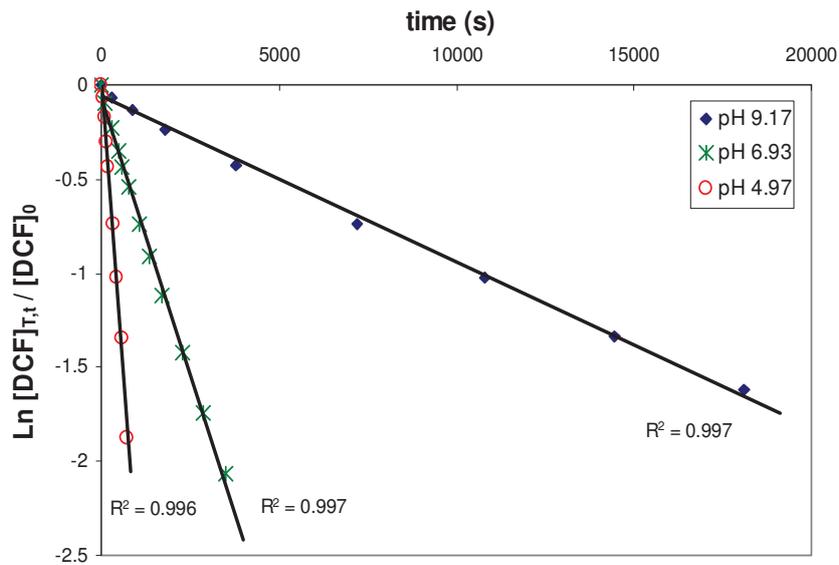
### II.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination

As shown by the example given in Figure 2, similar kinetic results were obtained for all chlorination experiments irrespective of the quenching method used. No induced back reactions or other interference by using  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  was shown.



**Figure 2:** Comparison of chlorination kinetic results obtained in direct injection or by using  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  as quenching method (pH 7 and  $20 \pm 2$  °C)

In the presence of a large excess of chlorine, chlorination experiments exhibit a pseudo-first order dependence on the DCF concentration as demonstrated by the linear time-course plot of  $\ln ([\text{DCF}]_{T,t} / [\text{DCF}]_{T,0})$ . Figure 3 presents an example of the pseudo-first-order kinetic plot of DCF chlorination at pH 4.97 and 6.93 with a total chlorine concentration of  $210 \pm 8$   $\mu\text{M}$ , and at pH 9.17 with a total chlorine concentration of  $2273$   $\mu\text{M}$ . These plots were linear ( $r^2 \geq 0.99$ ) for  $> 80$  % reactions. Similar correlation coefficients ( $r^2 \geq 0.99$ ) were obtained for the other experiments.



**Figure 3:** Pseudo-first-order kinetic plot of DCF chlorination at pH 9.17 with  $[\text{HOCl}]_T = 2273 \mu\text{M}$ , at pH 6.93 with  $[\text{HOCl}]_T = 218 \mu\text{M}$  and at pH 4.97 with  $[\text{HOCl}]_T = 202 \mu\text{M}$ .

Therefore, for each experiment, DCF disappeared at a pseudo-first-order rate relative to total DCF concentration. The following equation can be written:

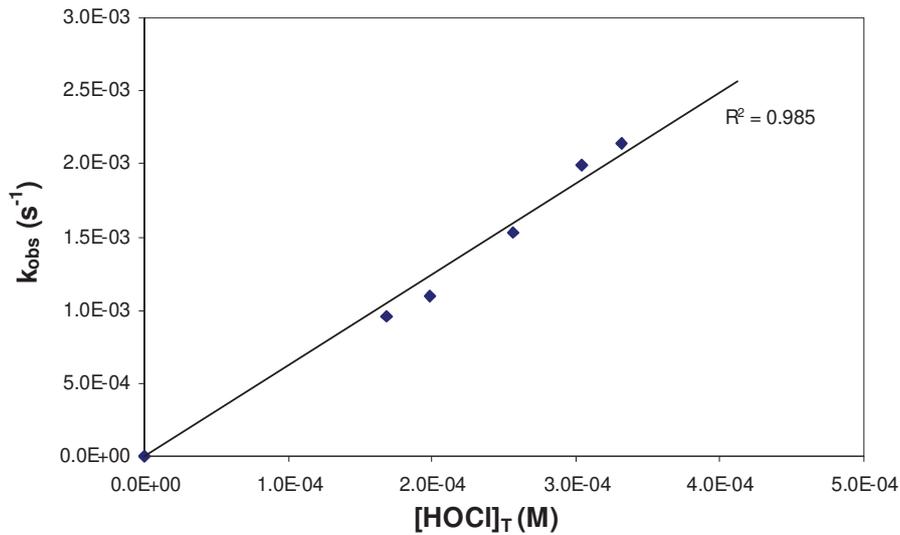
$$-\frac{d[\text{DCF}]_T}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{DCF}]_T \quad (1)$$

$$\text{or } \text{Ln} \frac{[\text{DCF}]_{T,t}}{[\text{DCF}]_{T,0}} = -k_{\text{obs}} t \quad (2)$$

with  $k_{\text{obs}}$  = pseudo-first-order kinetic constant, and  $[\text{DCF}]_T$  = total concentration of DCF.

For each experiment  $k_{\text{obs}}$  was determined from the slope of the linear time-course plot of  $\text{Ln} ([\text{DCF}]_{T,t}/[\text{DCF}]_{T,0})$ .

The reaction order relative to chlorine was then examined by representing  $k_{\text{obs}}$  variation as a function of total chlorine concentration  $[\text{HOCl}]_T$ . Figure 4 represents  $k_{\text{obs}}$  obtained at pH 6 for a total chlorine range of 168 to 332  $\mu\text{M}$ . This Figure illustrates that the pseudo-first-order kinetic constant is proportional to the total chlorine concentration. Similar results were obtained for other pH with correlation coefficients  $r^2 \geq 0.93$ .



**Figure 4:**  $k_{obs}$  variation as a function of  $[HOCl]_T$  at  $pH\ 6.0 \pm 0.1$  and  $20 \pm 2\ ^\circ C$ . Determination of the reaction order relative to chlorine

Whatever the considered pH, a first order reaction relative to chlorine concentration was thus shown. Therefore, the chlorination kinetic of DCF is a second-order reaction, first-order relative to the total DCF concentration ( $[DCF]_T$ ) and first-order relative to the free active chlorine concentration ( $[HOCl]_T$ ).

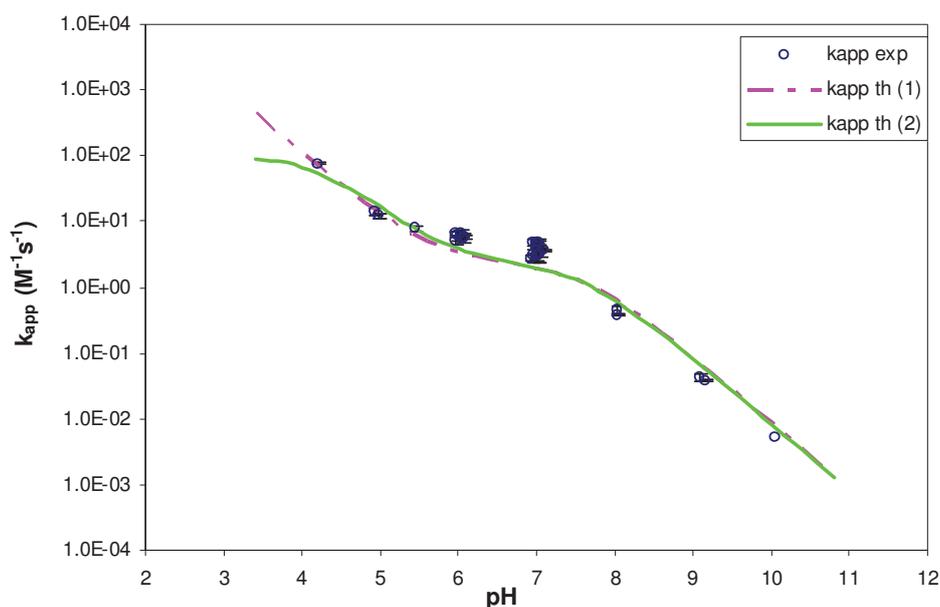
$$-\frac{d[DCF]_T}{dt} = k_{app}[HOCl]_T[DCF]_T \quad (3)$$

with  $k_{app} = k_{obs} / [HOCl]_T$  the second-order kinetic constant. (4)

For each experiment (performed at pH range 4-10),  $k_{app}$  values were determined by considering equation (4).

### II.3.2- pH dependence profile and rate constants of elementary reactions

Figure 5 presents the pH profile of the apparent second order rate constant  $k_{app}$  for DCF chlorination. This Figure also gives the standard deviations for each rate constant. These results show a pH dependence of the rate constants, with maxima for low pH values ( $pH < 5$ ), minima for high pH values ( $pH > 8$ ) and a landing for pH values between 6 and 7.



**Figure 5:** pH-dependence of the apparent second-order rate constants for the reaction of chlorine with DCF. Symbols represent measured data and lines represent the model calculations

Chemically, DCF presents in solution two forms whereas two major species of chlorine can be observed under experimental pH conditions ( $4 < \text{pH} < 10$ ).



$$\text{with } [\text{DCF}]_{\text{T}} = [\text{DCF}] + [\text{DCF}^-] \quad (7)$$

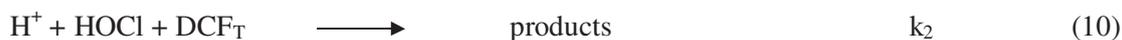
$$[\text{HOCl}]_{\text{T}} = [\text{HOCl}] + [\text{ClO}^-] \quad (8)$$

Therefore, according to chlorine speciation, the low increase in magnitude of  $k_{\text{app}}$  from pH 7.5 to 6 can be attributed to HOCl form of chlorine. Similarly, the decrease in magnitude of  $k_{\text{app}}$  above pH 7.5 can be attributed to deprotonation of HOCl to yield  $\text{ClO}^-$  which is generally less reactive than HOCl (Deborde and von Gunten, 2008).

At  $\text{pH} < 6$ , a higher increase in DCF reactivity with chlorine is observed. At this pH level, several hypotheses can then be proposed to explain the observed pH-dependence:

(i) Either, protonation of the carboxylate group of DCF was not considered because it would have little effect on the electron density of the aromatic ring due to its distance from the ring.

Under these conditions, as previously suggested by Pinkston and Sedlak (2004) in the case of indometacine and naproxene chlorination, both a neutral and an acid-catalyzed reactions can be considered:



Otherwise, reactions of HOCl and Cl<sub>2</sub> with diclofenac can be suggested. In this latter case, Cl<sub>2</sub> species of chlorine resulting from reaction (11) could be considered for global chlorine reactivity with DCF.



However, under our experimental conditions, the sodium hypochlorite solution used was controlled to ensure equimolar concentrations of hypochlorite and chloride. Based on reported equilibrium constant values for hydrolysis of Cl<sub>2</sub> (reaction 11) (Wang and Margerum, 1994) and for [Cl<sup>-</sup>] = [HOCl]<sub>T</sub> = 200 μM, the maximum Cl<sub>2</sub> concentration was calculated to be very low at pH 4 (i.e. 1 · 10<sup>-8</sup> M). Moreover, a first order reaction relative to chlorine concentration was shown under our experimental conditions. Consequently, Cl<sub>2</sub> species was considered to be negligible in our experimental conditions.

(ii) Or, the carboxylate group of diclofenac has a significant impact on chlorine reactivity and protonation of this functional group increases chlorine reactivity. Under these conditions, HOCl reaction with neutral and ionized forms of diclofenac can be considered.



These two hypotheses have been taken into consideration during this work.

Thus, considering that global chlorine reaction involves reactions 9 and 10 (hypothesis 1), or 12 and 13 (hypothesis 2), the DCF chlorination kinetic was expressed as follows:

$$-\frac{d[\text{DCF}]_T}{dt} = k_1[\text{HOCl}][\text{DCF}]_T + k_2[\text{H}^+][\text{HOCl}][\text{DCF}]_T \quad (\text{hypothesis 1}) \quad (14)$$

$$-\frac{d[\text{DCF}]_T}{dt} = k_3[\text{HOCl}][\text{DCF}] + k_4[\text{HOCl}][\text{DCF}^-] \quad (\text{hypothesis 2}) \quad (15)$$

or

$$-\frac{d[\text{DCF}]_T}{dt} = [\text{HOCl}]_T [\text{DCF}]_T (\alpha_{\text{HOCl}} k_1 + \alpha_{\text{HOCl}} [\text{H}^+] k_2) \quad (\text{hypothesis 1}) \quad (16)$$

$$-\frac{d[\text{DCF}]_T}{dt} = [\text{HOCl}]_T [\text{DCF}]_T (\alpha_{\text{DCF}} \alpha_{\text{HOCl}} k_3 + \alpha_{\text{DCF}^-} \alpha_{\text{HOCl}} k_4) \quad (\text{hypothesis 2}) \quad (17)$$

with  $\alpha_{\text{DCF}}$  and  $\alpha_{\text{DCF}^-}$  neutral and deprotonated diclofenac fraction of total diclofenac,  $\alpha_{\text{HOCl}}$  hypochlorous acid fraction of total chlorine.

Considering equation (3), the following expression of  $k_{\text{app}}$  as a function of pH was written.

$$k_{\text{app}} = \frac{k_1 [\text{H}^+] + k_2 [\text{H}^+]^2}{[\text{H}^+] + \text{Ka}_{\text{HOCl}}} \quad (\text{hypothesis 1}) \quad (18)$$

$$k_{\text{app}} = \frac{k_3 [\text{H}^+]^2 + k_4 [\text{H}^+] \text{Ka}_{\text{DCF}}}{([\text{H}^+] + \text{Ka}_{\text{DCF}}) \cdot ([\text{H}^+] + \text{Ka}_{\text{HOCl}})} \quad (\text{hypothesis 2}) \quad (19)$$

By considering these latter equations, the intrinsic constants  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  and  $k_4$  were calculated by multiple regression of the experimental  $k_{\text{app}}$ . The regression was performed by using the Solver function in Microsoft Excel in order to minimize the quadratic deviation defined as  $\Sigma(k_{\text{app exp}} - k_{\text{app theo}})^2 / (k_{\text{app exp}})^2$  where  $k_{\text{app exp}}$  and  $k_{\text{app theo}}$  represent the experimental and theoretical apparent second-order constant  $k_{\text{app}}$ . The chlorine acidity constant used for the calculation was  $\text{pKa}_{\text{HOCl}} = 7.54$  (Albert and Serjeant, 1984).

Table 1 shows the values of  $k_1$  ( $\text{HOCl} + \text{DCF}_T$ ),  $k_2$  ( $\text{H}^+ + \text{HOCl} + \text{DCF}_T$ ),  $k_3$  ( $\text{HOCl} + \text{DCF}$ ) and  $k_4$  ( $\text{HOCl} + \text{DCF}^-$ ). Moreover, Figure 5 represents the experimental and the modelled pH profiles obtained from these constants and equations (18) or (19). For  $\text{pH} > 6.5$ , a good correlation between experimental and modelled values was obtained by considering both hypotheses.

Due to the low  $\text{pKa}$  value of diclofenac ( $\text{pKa} = 4.2$  according to Huber et al., 2003), deprotonated form of DCF is the major form in solution (i.e.  $[\text{DCF}]_T \approx [\text{DCF}^-]$ ). Moreover, hypochlorous acid is the major reactive form of the total chlorine. Thus, similar values about  $2.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  were obtained in the case of  $k_1$  and  $k_4$ .

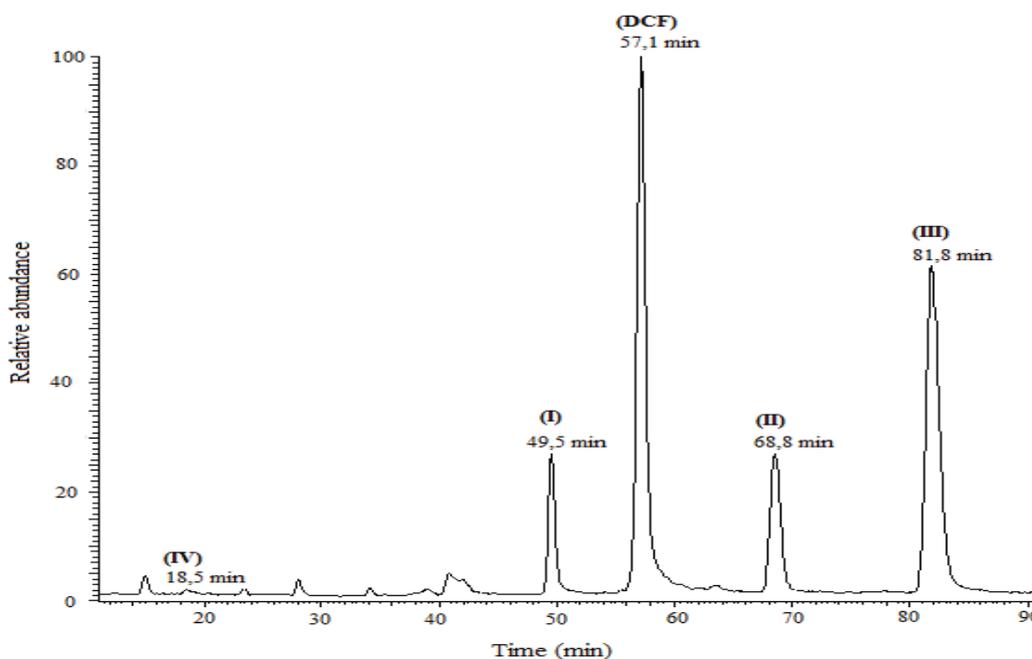
However, at pH level < 6, a better correlation between the experimental and the modelled pH profiles was observed by considering reaction of neutral and acid-catalyzed HOCl reaction with DCF. No significant impact of protonation of the carboxylate group of DCF on chlorine reactivity can then be expected.

**Table 1:** Second-order rate constants calculated for elementary reactions of DCF chlorination (reactions 9, 10, 12 and 13) at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$

	Elementary reactions	Rate constants
(1)	$\text{HOCl} + \text{DCF}_T$	$k_1 = 2.48 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$\text{H}^+ + \text{HOCl} + \text{DCF}_T$	$k_2 = 1.07 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$
(2)	$\text{HOCl} + \text{DCF}$	$k_3 = 1.07 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	$\text{HOCl} + \text{DCF}^-$	$k_4 = 2.40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

### II.3.3- Identification of oxidation by-products

Figure 6 represents an example of LC-MS chromatograms of chlorinated DCF obtained at pH 7. In addition to DCF peak, three major peaks (I, II and III) of transformation products have been observed. Moreover, added to these transformation products, few minor chromatographic peaks were also noted. For most of these latter peaks, due to low signal obtained in mass spectrometry, no chemical structure was proposed. However, in the case of peak (IV), some hypotheses were done. The overall UV, MS, MS/MS and MS<sup>3</sup> characteristics corresponding to these peaks are gathered in Figure 7 and Table 2. Due to higher response in positive mode for both DCF and transformation products, only positive APCI mode has been presented.



**Figure 6:** LC-MS (TIC 50-600 uma) chromatogram of chlorinated DCF solution at pH 7

Chosen names for the major chlorination by-products (P I, P II and P III) were proposed for this study, in order to facilitate reading and understanding.

#### Diclofenac

The MS spectrum showed a protonated molecular ion at  $m/z$  296 and one minor fragment at  $m/z$  at 278 (-18), which probably correspond to H<sub>2</sub>O loss. For this compound the isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  298 (+2) with abundance about 2/3 of molecular

ion) is characteristic of the presence of two chlorine atoms in the chemical structure. In the MS/MS fragmentation spectrum of  $m/z$  296, added to the fragment ion at  $m/z$  278 (-18) previously shown in the MS spectrum, an ion at  $m/z$  250 (-46), which could correspond to acid function loss, is observed. Finally, one additional fragment ion at  $m/z$  215 is shown in MS<sup>3</sup> fragmentation spectrum of  $m/z$  250. For this latter fragment, an isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  217 (+2) with abundance about 1/3) characteristic of the presence of one chlorine atom is observed. Thus, this fragment could result from Cl loss.

#### Product I: (decarboxy-DCF)

The MS spectrum in APCI positive mode showed two major ions at  $m/z$  282 and 268 and a minor ion at  $m/z$  250. Due to mass loss of (-32) observed in the MS/MS fragmentation spectrum of ion at  $m/z$  282, this ion could come from solvent (methanol) addition in ionization source. Thus, a protonated molecular ion at  $m/z$  268 was proposed in the MS spectrum. In ionization source, this ion would give fragments ions at  $m/z$  250 (-18) and 282 (+14) after successive H<sub>2</sub>O loss and methanol addition. For this compound, the isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  270 (+2) with abundance about 2/3 of molecular ion) is characteristic of the presence of two chlorine atoms in the chemical structure. In MS/MS fragmentation spectrum of  $m/z$  268, only an ion at  $m/z$  250 which could come from H<sub>2</sub>O loss is observed, and no acid function loss was shown. For this compound, due to mass different of -28 between molecular ion of this product and DCF, absence of acid function but probable presence of alcohol function, a decarboxylated derivative of DCF was then proposed. As previously suggested by Miyamoto et al. (1997), this transformation product could result from a successive decarboxylation and hydrolysis of DCF during chlorination.

#### Product II: (chloro-decarboxy-DCF)

Due to similar ion observed in APCI negative mode, a protonated molecular ion at  $m/z$  302 is expected for this product in the MS spectrum obtained in APCI positive mode.

The isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  304 (+2) with equivalent abundance of molecular ion) shows the presence of three chlorine atoms in chemical structure of this compound.

Added to molecular ion, three fragment ions at  $m/z$  284 (-18), 248 (-54) and 316 (+14) are observed in the MS spectrum. The fragments at  $m/z$  284 (-18) and 248 (-54) could correspond to successive H<sub>2</sub>O and Cl loss whereas the fragment at  $m/z$  316 could result from solvent (methanol) addition in the ionization source. For this compound, no additional information

was obtained from MS/MS or MS<sup>3</sup> fragmentation.

Due to mass difference of +6 between molecular ion of this product and DCF, presence of one additional chlorine atom, absence of acid function but probable presence of alcohol function, the structure presented in Figure 8 has then be proposed. This structure could result from electrophilic substitution of chlorine in aromatic ring of product (I).

#### Product III: (chloro-DCF)

The MS spectrum of this compound showed a protonated molecular ion at m/z 330 and two additional ion fragments at m/z 312 (-18) and 248 (-82). The isotopic distribution (i.e. presence of an ion at m/z 332 (+2) with equivalent abundance of molecular ion) shows the presence of three chlorine atoms in chemical structure of this compound. Similarly to DCF, the MS/MS spectrum of m/z 330 gives two main ions at m/z 312 (-18) and 284 (-46) which could correspond to H<sub>2</sub>O and acid function loss. Other MS/MS analysis mainly showed chlorine and/or CO loss.

Due to mass difference of +34 between molecular ion of this product and DCF, presence of an additional chlorine atom and acid function, a chlorinated derivative of DCF was then proposed for this compound. This transformation product could result from electrophilic attack of chlorine on aromatic ring of DCF.

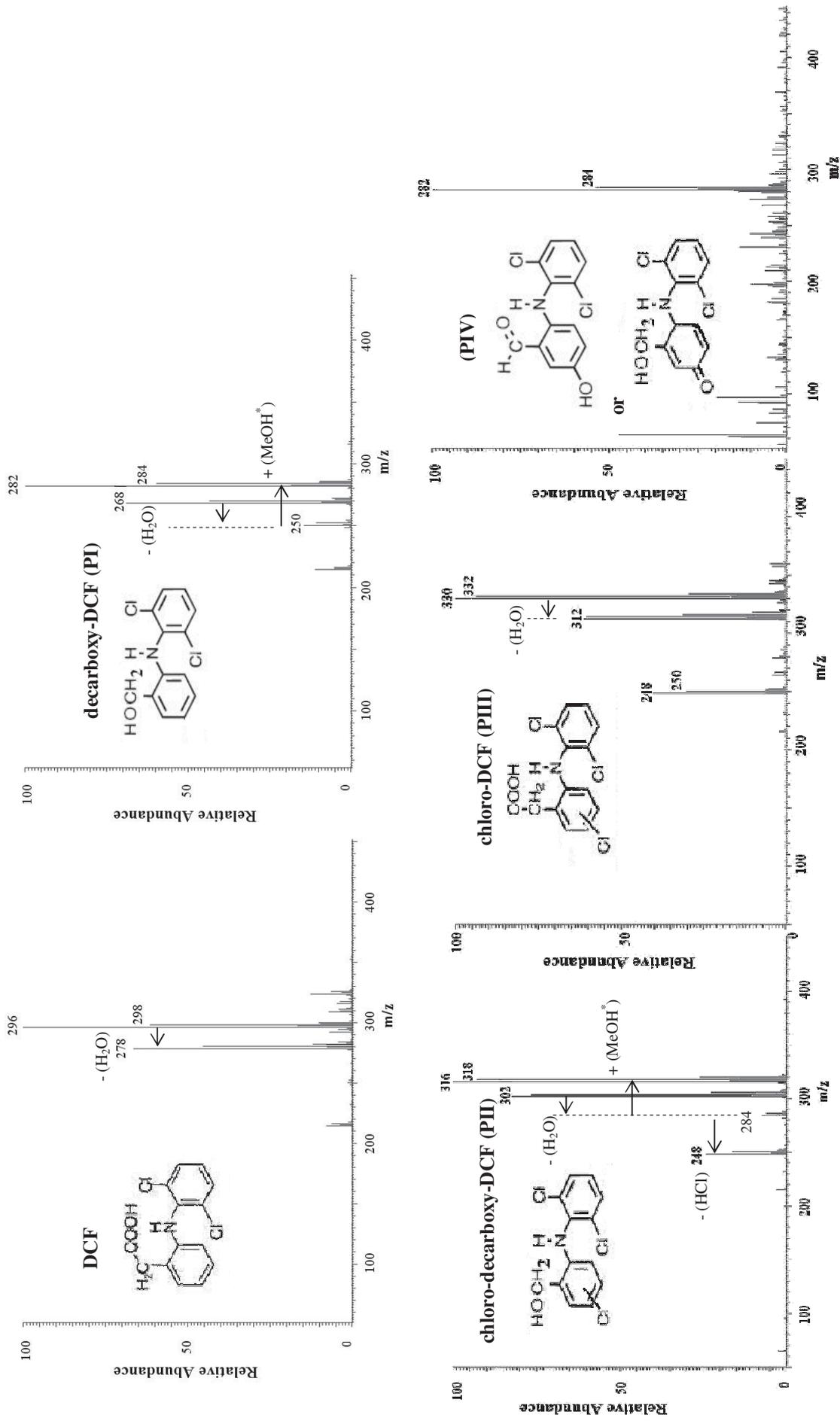
#### Product IV: (doubtful)

A protonated molecular ion at m/z 282 is clearly observed in the MS spectrum and an isotopic distribution (i.e. presence of an ion at m/z 284 with abundance about 2/3 of molecular ion) characteristic of the presence of two chlorine atoms is shown. In the MS/MS fragmentation spectrum of m/z 284, one major fragment at m/z 264 (-18) which could correspond to H<sub>2</sub>O loss is observed. No acid function loss is shown. The MS<sup>3</sup> fragmentation of m/z 264 leads to two additional ions at m/z 236 and 229 which could come from CO and chlorine loss.

Therefore, for this compound two chemical structures were proposed. These two structures are in agreement with MS, MS/MS and MS<sup>3</sup> fragmentations observed and are similar to those previously observed by Miyamoto et al., (1997) during DCF chlorination. A similar chlorination mechanism could then be proposed.

**Table 2:** UV characteristics and main fragment ions obtained from MS, MS<sup>2</sup> and MS<sup>3</sup> analyses of DCF and transformation products.

Compounds	UV characteristics			Observed fragment ions at m/z value ( <i>relative abundance</i> )		
	$\lambda_{max}$	MS	MS / MS	MS <sup>2</sup>	MS <sup>3</sup>	
DCF	228 and 276 nm	296 (100) ; 298 (65) 278 (62) ; 280 (42)	278 (100) ; 280 (64) 250 (65) ; 252 (41)	250 (100) 215 (100) ; 217 (28)	250 (100); 252 (62) 215 (100) ; 217 (28)	
decarboxy-DCF (P I)	228 and 278 nm	282 (100); 284 (67) 268 (65); 270 (40) 250 (18); 252 (12)	250 (100) 250 (100)	215 (100)	215 (100)	
chloro-decarboxy-DCF (P II)	226; 240 and 280 nm	316 (100) ; 318 (85) 302 (85); 304 (80) 284 (10) ; 286 (6) 248 (25) ; 250 (20)	284 (100) 284 (100)	249 (100)	249 (100)	
chloro-DCF (P III)	228 and 276 nm	330 (100) ; 332 (95) 312 (60) ; 314 (90) 248(55) ; 250 (44)	312 (100) ; 314 (90) 284 (65) ; 286 (59) 277 (100) ; 279 (90) 249 (80) ; 251 (35)	284 (100); 285 (96); 249 (25) ; 251 (60) 249 (100) ; 251 (38) 242 (100) ; 244 (28)	284 (100); 285 (96); 249 (25) ; 251 (60) 249 (100) ; 251 (38) 242 (100) ; 244 (28)	
Product IV	228 and 278 nm	282 (100); 284 (67) 252 (15); 250 (10); 214 (22)	264 (100) ; 266 (60) 205 (22)	236 (22); 238 (13); 229 (15)	236 (22); 238 (13); 229 (15)	



**Figure 7:** Mass spectra and proposed chemical structure of DCF and transformation products\* (methanol)

### **II.3.4- Monitoring of transformation products formation and proposed reaction pathways**

The monitoring of the evolution of the major transformation products was performed according to chlorination time at pH 5, 7 and 9, and for an initial chlorine dose of 1000  $\mu\text{M}$  (Figure 8). Whatever the studied pH, a similar profile of transformation products formation is observed. This shows that chloro-DCF (P III) and chloro-decarboxy-DCF (P II) accumulate in the solution, even in the presence of an excess of chlorine. A fast formation of decarboxy-DCF (P I) is observed at the beginning of the reaction. This is followed by a decrease over chlorination time. Finally, a low formation of product (P IV) is observed irrespective of the studied pH.

According to our results and the literature data, two main pathways of chlorine attack on DCF could be proposed.

***(i) Either an electrophilic substitution (H by Cl) on the aromatic ring owner the acid functional group:***

This attack of chlorine could lead to the formation of mono-chloro or di-chloro DCF derivative compounds, and is illustrated by the identification of chloro-DCF (P III) in this study and other works (Miyamoto et al., 1997 and Quintana et al., 2010). Under this condition, the observed chloro-DCF shows a great stability even in the presence of an excess of chlorine and seems to be among the most abundant transformation products observed during DCF chlorination; especially at neutral or slightly acid conditions.

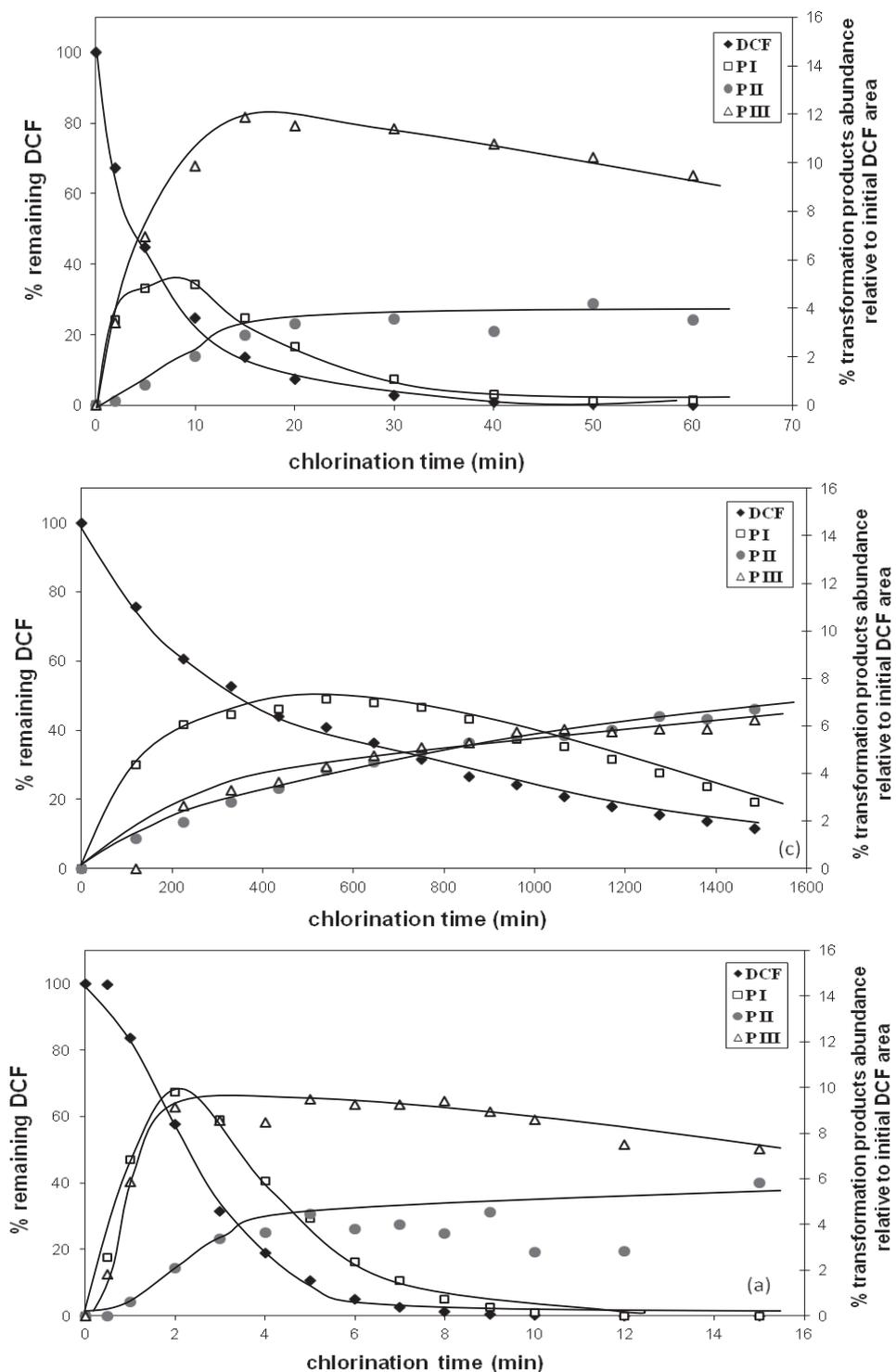
***(ii) Or, an electrophilic substitution (H by Cl) on the nitrogen:***

This attack of chlorine generally leads to mono-chloramine formation. This mono-chloramine derivative could be unstable in the case of diclofenac, and could be rapidly hydrolyzed. During this latter step, a similar pathway to that previously proposed by Miyamoto et al. (1997) leading to tricyclic intermediate, could firstly give decarboxy-DCF (P I) after  $\text{CO}_2$  loss.

This latter compound would then lead either to chloro-decarboxy-DCF (P II) after electrophilic substitution of chlorine on aromatic ring or to product IV after oxidation of  $\text{CH}_2\text{OH}$  function or/and hydroxylation of an aromatic ring.

In the case of chloro-decarboxy-DCF (P II) formation, this is in agreement with the results observed in Figure 8 which clearly shows the transformation of decarboxy-DCF (P I) in

chloro-decarboxy-DCF (P II). However, in the case of product IV formation, due to the low signal observed in mass spectrometry, no confirmation can be done.



**Figure 8:** Transformation products variation in the presence of an excess of chlorine at (a) pH 5, (b) pH 7 and (c) pH 9

## II.4- Conclusion

In this work, kinetic and mechanistic aspects of reaction of chlorine with diclofenac (DCF) were investigated to elucidate behaviour of this compound during water chlorination processes. From a kinetic point of view, chlorination of DCF was studied in the 4 - 10 pH range at  $20 \pm 2$  °C, and in the presence of an excess of total chlorine. Under these conditions, a second-order reaction (first-order relative to DCF concentration and first-order relative to free chlorine concentration) was observed, and apparent rate constants were determined. Moreover, to explain the observed pH-dependence of the apparent rate constants, elementary reactions (i.e. reactions of hypochlorous acid (HOCl) with neutral and ionized forms of DCF, or reaction of HOCl and acid-catalysed reaction of HOCl with total DCF) were proposed and the intrinsic constants of each of them were calculated. Under these conditions, a better correlation with experimental data was obtained by considering HOCl and acid-catalysed HOCl reactions with total DCF. Intrinsic rate constants about  $2.48 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (HOCl reaction) and  $1.07 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (acid-catalysed reaction) were obtained. From these results, at pH 7, a rate constant about  $3.89 \pm 1.17 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  can be expected. Thus, for a total chlorine concentration of  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , a half-life time about 215 min can be calculated. Therefore, a low reactivity of chlorine with DCF can then be expected under chlorination steps used during water treatment. From a mechanistic point of view, identification of degradation products formed during chlorination of DCF was undertaken from LC-MS and MS/MS analysis. Under our experimental conditions, several transformation products have been observed during DCF chlorination. As previously described in the case of chlorination of other organic compounds, some of these chlorinated derivatives seem to accumulate in solution in the presence of an excess of chlorine.

### III- PROJET D'ARTICLE N°: 3

## Aqueous chlorination of carbamazepine: kinetic study and transformation product identification

### ABSTRACT

Carbamazepine reactivity and fate during chlorination was investigated in this work. From a kinetic point of view, a third-order reaction (first-order relative to CBZ concentration and second-order relative to free chlorine concentration) at neutral and slightly acidic pH was observed. Whereas a second-order reaction (first order relative to CBZ concentration and first order relative to free chlorine concentration) was shown under alkaline conditions. To explain the observed pH-dependence of the reaction order, elementary reactions (i.e. reactions of  $\text{Cl}_2$ ,  $\text{Cl}_2\text{O}$ ,  $\text{HOCl}$  and  $\text{ClO}^-$  with CBZ) were proposed and second order rate constants of each of them were calculated. Under these conditions a good correlation with experimental data was obtained. At neutral and acidic pH values,  $\text{Cl}_2$  and  $\text{Cl}_2\text{O}$  would be the predominant chlorination agents.

From these results, at pH 7 and for a total chlorine concentration of  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , a half life time superior to 295 days can be expected.

Thus, a low reactivity of chlorine with CBZ can be expected under chlorination steps used during water treatment. From a mechanistic point of view, several transformation products have been observed during chlorination of carbamazepine. As previously described in the case of chlorination of polynuclear aromatic or unsaturated compounds, monohydroxylated, epoxide, diols or chlorinated alcohol derivatives of CBZ were proposed for CBZ degradation products. Most of these compounds seem to accumulate in solution in the presence of an excess of chlorine.

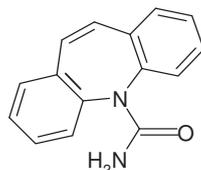
### KEY WORDS

Pharmaceuticals, carbamazepine, chlorination, kinetic, transformation products, LC-MS

### III.1- Introduction

Micropollutants in the aquatic environment have a great concern because of their potential impact on aquatic systems. Among the emerging micropollutants, pharmaceuticals have attracted a lot of attention for several years. Actually, a great variety of these compounds (e.g. antibiotics, analgesics, anti-inflammatory, antiepileptic, hypnotics....) has been reported in waters of numerous countries all over the world (Halling-Sorensen et al., 1998; Ternes, 1998; Stumpf et al., 1999; Zuccato et al., 2000; Zwiener et al., 2000; Heberer, 2002; Wiegel et al., 2004; Boyd et al., 2005; Mompelat et al., 2008). This pollution mainly results from metabolite excretion of drugs by human and animals. However, emission from pharmaceuticals production sites, surplus drugs in households or final effluents of fish farms have also been reported (Halling-Sorensen et al., 1998; Zuccato et al., 2000). Collected in wastewaters, these compounds are subjected to different treatment processes. However, numerous of them are only partially removed in classical municipal sewage system before being released into effluents and surface waters (Mompelat et al., 2008). In aquatic environment, traces of pharmaceuticals have then been observed. In surface water, concentration levels typically in the nanogram to microgram per litre range have been detected (Heberer, 2002; Paffoni et al., 2006; Togola and Budzinski, 2008). Even if these concentrations are usually low, it is difficult to exclude that these biologically active molecules can not affect aquatic organisms (especially in long-term exposure). Moreover, additive effects with other micropollutants could be observed. Concerning Human, surface water is widely used as water resource for drinking water. Hence, because drinking water could be a common mean of human exposure to pharmaceuticals, it is important to access water treatment processes with regard to their drug removal potential. Due to transformation products potentially induced during disinfection steps, a particular interest on pharmaceutical fate during chlorination or ozonation has to be yielded.

Carbamazepine (CBZ) belongs to the numerous pharmaceuticals found in aquatic environment. It is a dibenzazepine derivative (Figure 1) with antiepileptic and psychotropic activity, whose occurrence in municipal STP effluents and in domestic wastewaters has been reported in the literature (Ternes, 1998, Seiler et al., 1999).



**Figure 1:** Chemical structure of carbamazepine (CBZ)

According to recent published  $EC_{50}$  values, this compound could be considered as non-toxic ( $EC_{50} \geq 100$  mg/L) for most of tested fish species. However, it could be considered as very toxic ( $EC_{50} < 1$  mg/L) for bacteria, algae, and most of the tested invertebrates species (Halling Sorensen, 2000, Cleuver, 2003, Ferrari et al., 2003, Hernando et al., 2006). Therefore, due to its low sorption properties and its high resistance to biodegradation (Ternes et al., 2002), carbamazepine can be considered as a pharmaceutical of increasing environmental relevance. Concerning drinking waters, carbamazepine belongs the most frequently detected pharmaceutical in Europe and USA according to recent studies (Heberer et al., 2004, Stackelberg et al., 2004, Stackelberg et al., 2007, Mompelat et al., 2008; Togola and Budzinski, 2008). Under a classical drinking water treatment (clarification / filtration / chlorine disinfection), 85 % of carbamazepine removal was shown by Stackelberg et al. (2007). During disinfection steps, a rapid removal by ozone of carbamazepine with a second order rate constant of  $7.10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  at pH 7 and 20 °C was observed (Huber et al., 2003). Moreover, several oxidation products less reactive with ozone have been identified (McDowell et al., 2005). Concerning chlorination, few studies have been conducted. However, a high persistence of carbamazepine in chlorinated water was reported by Gibs et al. (2007).

The objective of this work was to assess carbamazepine reactivity and fate during chlorination steps. In a first part, kinetic studies were undertaken in pure aqueous solution and different pH levels. The reaction rate order and apparent rate constants of chlorination were determined. In a second part, a mechanistic study of carbamazepine chlorination has been done. Oxidation products were tentatively identified by LC coupled with UV diode array detector and mass spectrometer. The stability of these products in the presence of an excess of chlorine was studied.

## III.2- Materials and methods

### III.2.1- Standards and reagents

CBZ was supplied by Sigma-Aldrich. Sodium hypochlorite solution was purchased from Acros Organics and was controlled to ensure equimolar concentrations of hypochlorite ( $\text{ClO}^-$ ) and chloride ( $\text{Cl}^-$ ) ions, with 13.0% (w/V) of active chlorine. The other reagents ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , phosphate, etc.) were analytical grade or better and used without further purification. Solvents were LC or LC-MS grade.

All stock solutions were prepared with purified water ( $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ,  $\text{DOC} < 0.1 \text{ mg/L}$ ) obtained from a Milli-Q Millipore system.

### III.2.2- CBZ chlorination experiments

All kinetic experiments were performed in a batch reactor thermostated at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , under pseudo first-order kinetics conditions ( $[\text{HOCl}]_{\text{T}} \gg 10 [\text{CBZ}]_{\text{T}}$ ). The initial CBZ concentration was  $10 \mu\text{M}$  and at least  $250 \mu\text{M}$  of total chlorine was added. pH of tested aqueous solutions (1L) were adjusted using phosphate salts (10 mM). Under these conditions, no pH variation was observed and chlorine variations were shown to be less than 20 % during experiment time. For each experiment, kinetic runs were initiated by injecting, under rapid mixing, an aliquot of chlorine stock solution. At constant time intervals, 3 mL of solution were withdrawn and added to 4 mL vials containing an excess of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  or  $\text{NH}_4\text{Cl}$  to quench the residual chlorine and the oxidation reaction. Samples were then analyzed using Liquid Chromatography (LC) to determine the remaining CBZ concentration. To check the feasibility of using  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  or  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for quenching the reaction of chlorine, samples of unquenched reaction solutions containing chlorine and CBZ were directly injected into LC system at different kinetic run times for several experiments performed at 5-11 pH range.

CBZ chlorination experiments for the identification of transformation product were performed for an initial CBZ concentration of  $100 \mu\text{M}$  at pH 5, 7 and 9. In order to follow transformation products formation during chlorination, experiments were performed at pH 7 and 9 in the presence of an excess of chlorine about 1000 and 5000  $\mu\text{M}$  respectively. After different chlorination times, aliquots of solution were analysed directly by LC-UV and mass spectrometry. At pH 5, reactions were too fast to be followed over the reaction time.

Therefore different doses of chlorine (0 - 450  $\mu\text{M}$ ) were added to a series of reactors containing CBZ (100  $\mu\text{M}$ ) to achieve different levels of CBZ degradation. After total consumption of residual chlorine (about 24 hours), levels of CBZ degradation according to dose of chlorine were then determined, and the evolution of the formation of transformation products was performed by LC-UV and mass spectrometry.

### III.2.3- Analytical methods

Chlorine stock solutions were standardized by iodometry (Rodier et al., 2009). In kinetic experiments, chlorine was analyzed by the N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD) colorimetric method (Rodier et al., 2009).

Aqueous solution of CBZ reacting mixtures were directly analysed without any sample treatment. CBZ concentrations were determined by high performance liquid chromatography using an automatic Waters 717 plus auto-sampler injector and a Waters 600E pump. Isocratic reversed phase chromatography was optimized for CBZ using a Kromasil C18 column (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). A water-methanol mixture (40/60 v/v) was used as the mobile phase, with a flow-rate of 1 mL/min. For each sample, the injected volume was 100  $\mu\text{L}$ . Column effluent was monitored with a UV-visible spectrometer (Waters 484) at 284 nm.

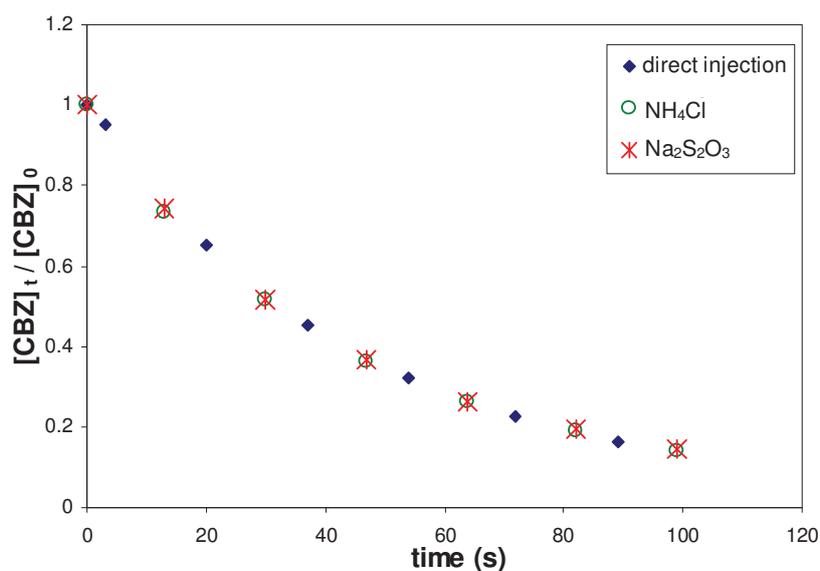
For degradation product identification, samples were analysed by LC-UV and mass spectrometry analyses (LC-MS and MS/MS). A Thermo chromatographic system (pump + thermostated autosampler Surveyor) equipped with a diode array detector (Surveyor) and an ion trap mass spectrometer Deca XP Ion max was used. The column was a Supelcosil C18 column (3 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ). A 0.1 % acetic acid water/methanol (55/45 v/v) mixture was used as the mobile phase with a flow-rate of 0.3 mL/min in isocratic mode. For each sample, the injected volume was 100  $\mu\text{L}$ . Mass spectrometry was performed with atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) in both positive and negative mode (mass range TIC 50-550 uma, ion transfer capillary temperature 250°C; APCI vaporizer temperature 450°C; Sheath gas flow 25 au; Corona discharges 5 kV). MS/MS experiments were performed with the following working conditions: isolation width 2 or 4 uma, activation time 30 ms, trapping radio-frequency voltage was set at 0.25 and the normalized collision energy at 35 % of the voltage amplitude applied to the end-cap electrode.

pH was measured with a Tacussel LPH330T pH-meter equipped with a Radiometer Analytical combined electrode and previously calibrated with standard pH 4, 7, and 10 buffers.

### III.3- Results and discussion

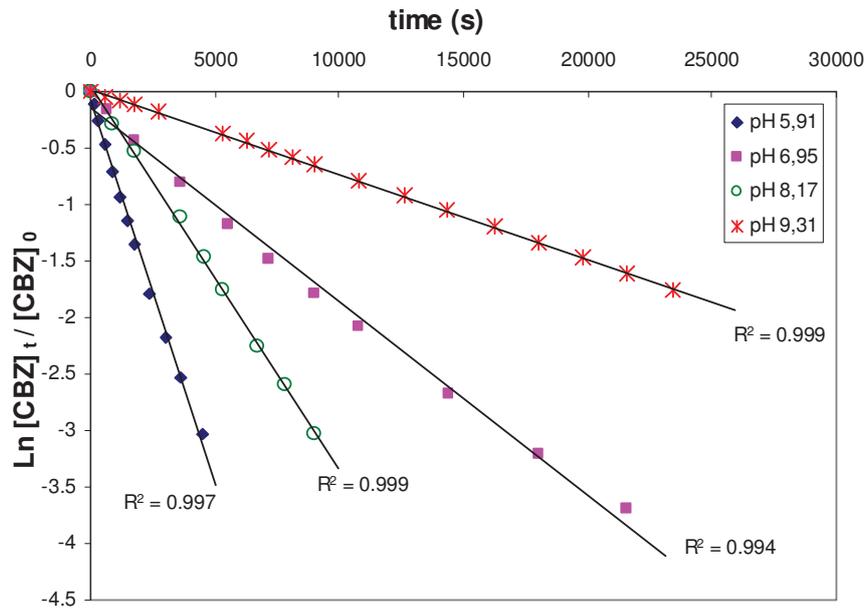
#### III.3.1- Reaction rate order and apparent rate constants of chlorination

As shown by the example presented in Figure 2, similar kinetic results were obtained for all chlorination experiments irrespective of the quenching method used. No induced back reactions or other interference by using  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  or  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was shown.



**Figure 2:** Comparison of chlorination kinetic results obtained by using different quenching methods (pH 6 and  $20 \pm 2$  °C)

In the presence of a large excess of chlorine, chlorination experiments exhibit a pseudo-first order dependence on the CBZ concentration as demonstrated by the linear time-course plot of  $\ln ([\text{CBZ}]_t / [\text{CBZ}]_0)$ . Figure 3 presents an example of the pseudo-first-order kinetic plot of CBZ chlorination at pH 5.91 and 6.95 with a total chlorine concentration of  $1190 \pm 15$   $\mu\text{M}$  and at pH 8.17 and 9.31 with a total chlorine concentration of  $4111 \pm 78$   $\mu\text{M}$ . These plots were linear ( $r^2 \geq 0.99$ ) for > 90 % reactions.



**Figure 3:** Pseudo-first-order kinetic plot of CBZ chlorination at pH 5.91 and 6.95 with  $[\text{HOCl}]_T = 1190 \pm 15 \mu\text{M}$  and at pH 8.17 and 9.31 with  $[\text{HOCl}]_T = 4111 \pm 78 \mu\text{M}$

Therefore, for each experiment, the following equation can be written:

$$-\frac{d[\text{CBZ}]}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{CBZ}] \quad (1)$$

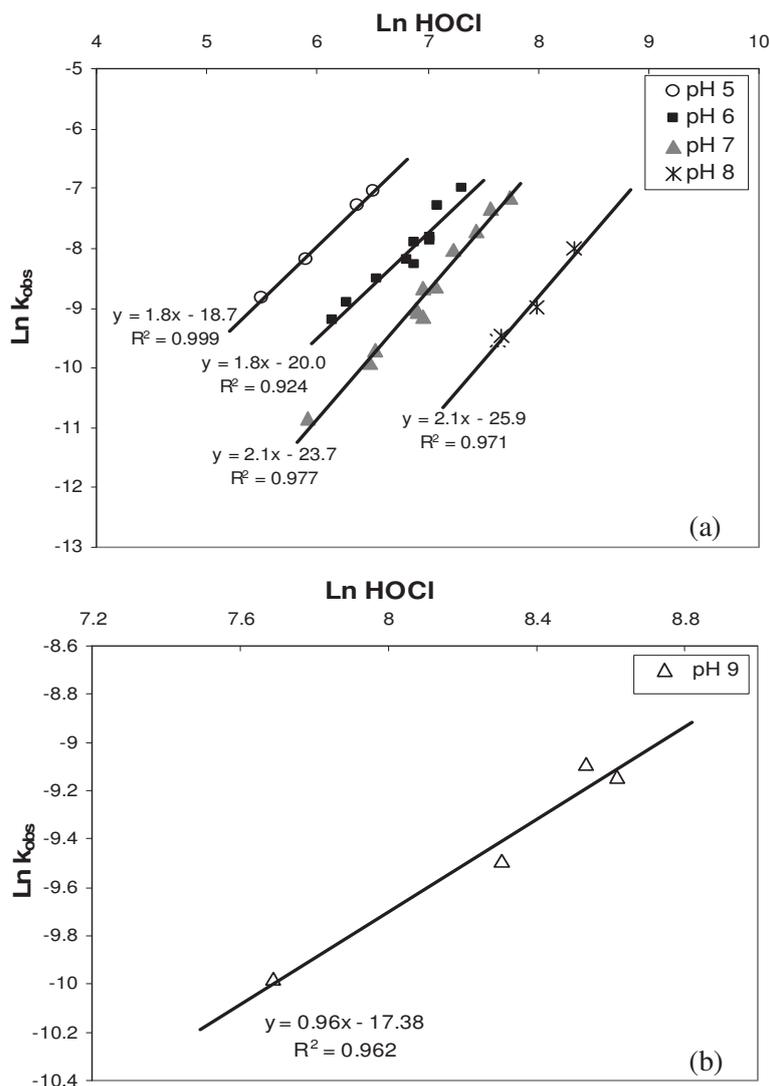
or, 
$$\text{Ln} \frac{[\text{CBZ}]_t}{[\text{CBZ}]_0} = -k_{\text{obs}} t \quad (2)$$

with  $k_{\text{obs}}$  : pseudo-first order kinetic constant

and  $[\text{CBZ}]$ : concentration of CBZ

For each experiment  $k_{\text{obs}}$  was determined from the slope of the linear time-course plot of  $\text{Ln} ([\text{CBZ}]_t/[\text{CBZ}]_0)$ .

The reaction order relative to chlorine was examined by studying  $k_{\text{obs}}$  variation as a function of the total chlorine concentration  $[\text{HOCl}]_T$ .



**Figure 4:** Examples of  $k_{obs}$  variation as a function of  $[HOCl]_T$  at pH 5 to 8 (a), and pH >8 (b), at  $20 \pm 2$  °C (Determination of the reaction order relative to chlorine)

Under these conditions, the pseudo-first-order kinetic constant was not found to be proportional to the total chlorine concentration for pH range from 5 to 8. In order to determine the reaction order relative to chlorine  $\ln k_{obs}$  versus  $\ln [HOCl]_T$  (for a total range of 370-5540  $\mu\text{M}$ ) was then represented as shown at pH 5, 6, 7 and 8 in Figure 4a. For this pH range (5 to 8), a second order reaction relative to chlorine was shown. Therefore, the chlorination kinetic of CBZ is a third-order reaction, first-order relative to the CBZ concentration ( $[CBZ]$ ) and second-order relative to the free active chlorine concentration ( $[HOCl]_T$ ).

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = k_{app} [HOCl]_T^2 [CBZ] \quad (3)$$

with  $k_{app} = k_{obs}/[HOCl]_T^2$  the third-order kinetic constant for  $pH \leq 8$ . (4)

At  $pH > 8$ , results showed that the pseudo-first-order kinetic constant is proportional to the total chlorine concentration (Figure 4b). Note that similar results to that obtained at  $pH 9$  was observed at  $pH 10.3$  (results not presented). Therefore, the chlorination kinetic of CBZ at  $pH 9$  is a second-order reaction, first-order relative to the CBZ concentration ( $[CBZ]$ ) and first-order relative to the free active chlorine concentration ( $[HOCl]_T$ ).

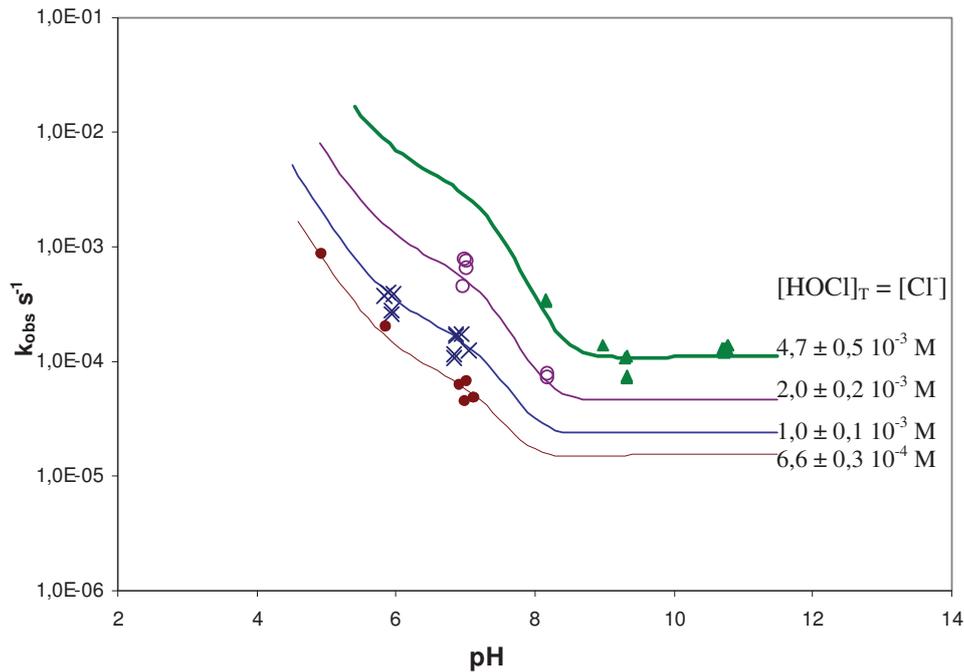
$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = k_{app} [HOCl]_T [CBZ] \quad (5)$$

with  $k_{app} = k_{obs}/[HOCl]_T$  the second-order kinetic constant for  $pH 9$ . (6)

For these higher  $pH$  values, a chlorination mechanism different to that observed at  $pH$  range 5-8 is then expected. Note that for each experiment (performed at  $pH > 8$ ), all values of  $k_{app}$  obtained were similar and about  $0.021 \pm 0.001 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

### III.3.2- pH dependence profile and rate constants of the proposed elementary reactions

The Figure 5 presents an example of the  $pH$  profile of the observed rate constant ( $k_{obs}$ ) at different free chlorine and chloride concentrations. This figure also gives the standard deviations for each rate constant. For a given chlorine and chloride concentration ( $[HOCl]_T = [Cl^-]$ ), these results show a  $pH$  dependence of the rate constants, with maxima for low  $pH$  values and minima for high  $pH$  values.



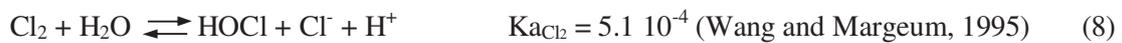
**Figure 5:** pH-dependence of the observed rate constants for the reaction of chlorine with CBZ.

Symbols represent measured data and dotted lines represent the model calculations.

Chemically, CBZ presents in solution only one neutral form whereas two major species of chlorine can be observed under experimental pH conditions ( $5 < \text{pH} < 11$ ).



In addition to these two major chlorine species,  $\text{Cl}_2$  mainly induced under acidic conditions can be also be formed (reaction 8). Moreover, taking into account weak CBZ reactivity, another minor species such as  $\text{Cl}_2\text{O}$  (reaction 9) could intervene during chlorination reaction, as recently shown by Sivey et al. (2010) in the case of chlorination of dimethamid.



So, under neutral and basic conditions, according to chlorine speciation, CBZ degradation could be attributed to direct HOCl and  $\text{ClO}^-$  reactivity.



Under acidic conditions (especially at  $\text{pH} \leq 8$ ), in addition to HOCl and  $\text{ClO}^-$  reactivity,  $\text{Cl}_2\text{O}$  and  $\text{Cl}_2$  reactivity can be considered for global chlorine reaction with CBZ.



These two chlorine species are generated either via HOCl and  $\text{Cl}^-$  equilibrium with  $\text{Cl}_2$  in acidic conditions (reaction 8) or dehydration of two molecules of HOCl (reaction 9). Because, sodium hypochlorite solution used for chlorination experiments was controlled to ensure equimolar concentrations in chloride and total chlorine (i.e.  $[\text{Cl}^-] = [\text{HOCl}]_T$ ),  $[\text{Cl}_2\text{O}]$  and  $[\text{Cl}^-]$  are proportional to  $[\text{HOCl}]_T^2$ . Therefore,  $\text{Cl}_2\text{O}$  and  $\text{Cl}_2$  reactivity could justify the second-order reaction relative to the total chlorine concentration previously observed at these pH levels. At  $\text{pH} < 6$ , the higher increase in CBZ reactivity with chlorine could be attributed to  $\text{Cl}_2$  species of chlorine.

Thus, considering that global chlorine reaction involves reactions 10, 11, 12 and 13, the CBZ chlorination kinetic was expressed as follows:

$$-\frac{d[\text{CBZ}]}{dt} = (k_1[\text{HOCl}] + k_2[\text{ClO}^-] + k_3[\text{Cl}_2] + k_4[\text{Cl}_2\text{O}])[\text{CBZ}] \quad (14)$$

For a given chloride and total chlorine concentration, considering equation 2, the following expression of  $k_{\text{obs}}$  as a function of pH was written:

$$k_{\text{obs}} = k_1 \alpha_{\text{HOCl}} [\text{HOCl}]_T + k_2 \alpha_{\text{ClO}^-} [\text{HOCl}]_T + k_3 \frac{\alpha_{\text{HOCl}} [\text{Cl}^-] [\text{H}^+]}{K_{a_{\text{Cl}_2}}} [\text{HOCl}]_T + k_4 \alpha_{\text{HOCl}}^2 K_{a_{\text{Cl}_2\text{O}}} [\text{HOCl}]_T^2$$

with  $\alpha_{\text{HOCl}}$  and  $\alpha_{\text{ClO}^-}$  hypochlorous acid and hypochlorite ion fractions of total chlorine. (15)

By considering this latter equation, the intrinsic constants  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  and  $k_4$  were calculated by multiple regression of the experimental observed rate constants  $k_{\text{obs}}$ . The regression was performed by using the Solver function in Microsoft Excel in order to minimize the quadratic deviation defined as  $\Sigma(k_{\text{obs exp}} - k_{\text{obs theo}})^2 / (k_{\text{obs exp}})^2$  where  $k_{\text{obs exp}}$  and  $k_{\text{obs theo}}$  represent the experimental and theoretical observed constant  $k_{\text{obs}}$ .

Table 1 shows the values of  $k_1$  (HOCl + CBZ),  $k_2$  ( $\text{ClO}^-$  + CBZ),  $k_3$  ( $\text{Cl}_2$  + CBZ) and  $k_4$  ( $\text{Cl}_2\text{O}$  + CBZ).

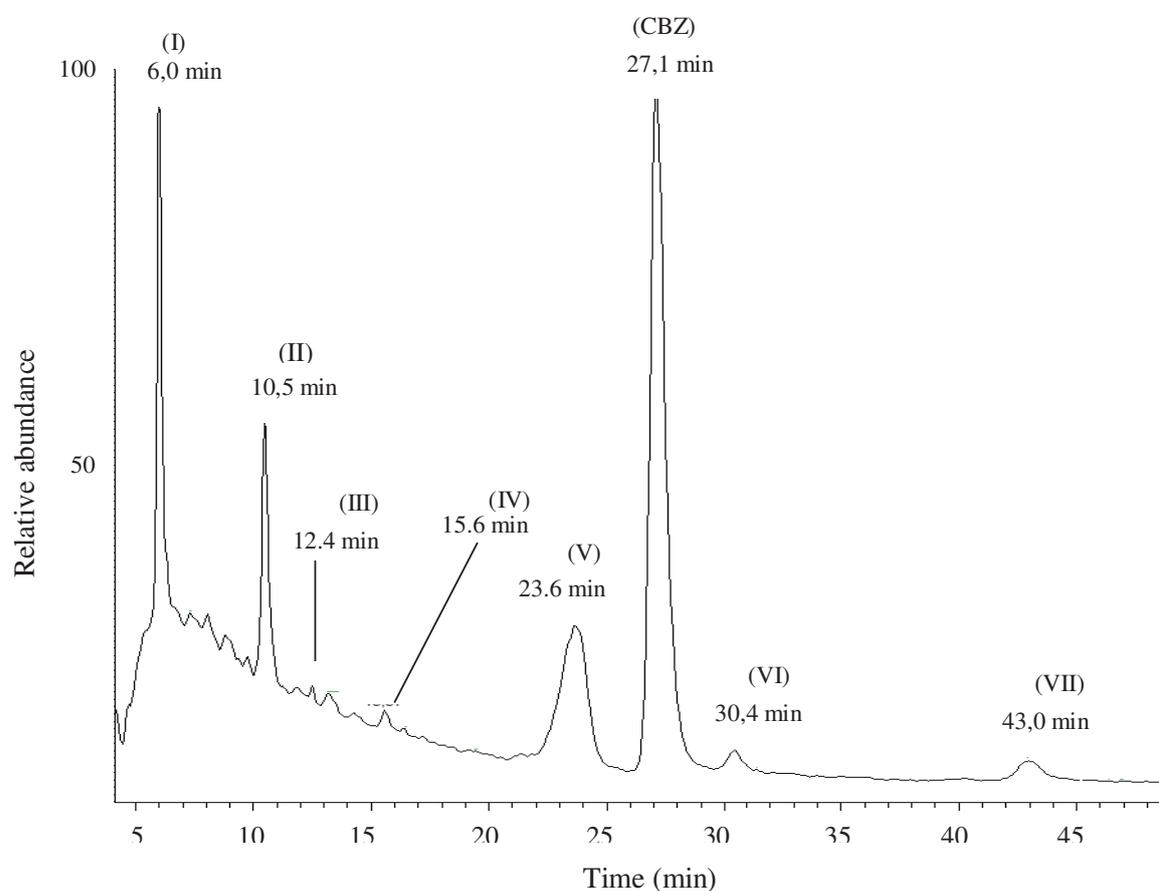
Moreover, Figure 5 represents the experimental and the modelled pH profiles obtained from these constants and equation (15). A good correlation between experimental and modelled values was obtained.

**Table 1:** Third-order rate constants calculated for elementary reactions of CBZ chlorination at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$

Elementary reactions	Rate constants ( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )
$\text{HOCl} + \text{CBZ}$	$< 1.00 \times 10^{-4}$
$\text{ClO}^- + \text{CBZ}$	$2.34 \times 10^{-2}$
$\text{Cl}_2 + \text{CBZ}$	$7.33 \times 10^4$
$\text{Cl}_2\text{O} + \text{CBZ}$	$2.18 \times 10^4$

### III.3.2- Identification of oxidation products

The Figure 6 represents an example of LC-MS chromatograms of chlorinated CBZ solution at pH 7 (64 % CBZ removal). In addition to CBZ peak, five major peaks (I, II, V, VI, and VII) and two minor peaks (III and IV) of transformation products have been observed. The overall UV, MS and MS/MS characteristics corresponding to the peaks are gathered in Table 2 and Figure 7. Due to higher response in positive mode for both CBZ and transformation products, only positive APCI mode has been presented. However, a response in negative APCI mode was also observed in the case of product V.



**Figure 6:** LC-MS (TIC 50-550 uma) chromatogram of chlorinated CBZ solution (64 % CBZ removal and pH 7)

On the basis of mass spectra, some proposed structures are presented below and chosen names have been proposed for a better reading and understanding

Carbamazepine (CBZ)

The MS spectrum showed a protonated molecular ion at  $m/z$  237 and a minor fragment at  $m/z$  194 (-43). This minor fragment probably results from the cleavage of  $\text{NH}_2\text{-CO}$  fragment in the ion source. A similar fragmentation is observed for several transformation products for which no chlorine attack on this site is expected. The MS/MS fragmentation spectrum presents one additional peak at 220 (-17) which could result from  $\text{NH}_2$  loss.

Products I, II (CBZ diols cis and trans) and VI (CBZ chloramide)

A common protonated molecular ion at  $m/z$  271 is shown for these three products in the MS spectra. However, in the case of peak VI, the isotopic distribution (i.e. presence of an ion at  $m/z$  273 (+2) with abundance about 1/3 of molecular ion) and the presence of an additional fragment ion at  $m/z$  235 (-36) in the MS spectra show the presence of a chlorine atom in chemical structure of this compound. For this latter product, the MS/MS fragmentation spectrum of  $m/z$  271 gives three main ions at  $m/z$  235 (-36), 220 (-51) and 194 (-77) which could correspond to Cl,  $\text{NH}_2\text{Cl}$  and  $\text{CONHCl}$  loss. Accordingly, a chloramide derivative has then been supposed for this product (Figure 10).

In the case of peaks I and II, similar MS spectra with two main fragment ions at  $m/z$  253 (-18) and 208 (-63) were shown. Moreover, similar MS/MS spectra with a main peak at  $m/z$  253 (-18) which could correspond to  $\text{H}_2\text{O}$  loss were observed. As shown in the case of chlorination of polynuclear aromatic compounds (Oyler et al., 1983) diol derivatives of CBZ (with opening of a double bond) has then been proposed. For these two transformation products, this is in agreement with MS/MS spectra obtained from peak at 253 which gives fragment ions at  $m/z$  236 (-17), 210 (-43) and could correspond to  $\text{NH}_2$  and  $\text{NH}_2\text{CO}$  loss.

Products III (CBZ epoxide) and V (hydroxy-CBZ)

For these two peaks, the MS spectra showed a protonated molecular ion at  $m/z$  253. However only one additional fragment ion at  $m/z$  208 (-45) is observed for product III whereas four additional ions at  $m/z$  208 (-45), 267 (+14), 285 (+32) and 299 (+46) were shown in the case of product V. For these two compounds, similar MS/MS fragmentation of  $m/z$  253 leading to peaks at  $m/z$  210 (-43), 236 (-17) and 268 (+15) were observed. These ions could correspond to  $\text{NH}_2\text{CO}$  or  $\text{NH}_2$  loss and solvent (methanol) addition in the case of peak at  $m/z$  268. Due to mass difference of +16 between molecular ion of these products and CBZ, as previously shown in the case of polynuclear aromatic compounds chlorination, monohydroxylated or epoxide derivative of CBZ were supposed for these two products.

In order to check the presence of an epoxide derivative, an aqueous solution of carbamazepine epoxide (CBZE) was then analysed under similar LC-UV/MS conditions. Under these analytical conditions, a chromatographic peak at 12.4 min with a UV, MS and MS/MS spectrum similar to product III were observed. Therefore, an epoxide derivative of CBZ was proposed for product III. Due to differences observed in MS spectrum (presence of probable ion fragments resulting from solvent addition after H<sub>2</sub>O loss), a monohydroxylated derivative of CBZ was supposed for product V. This structure is in agreement with the response in negative APCI mode observed.

#### Product IV (CBZ chloroalcohol)

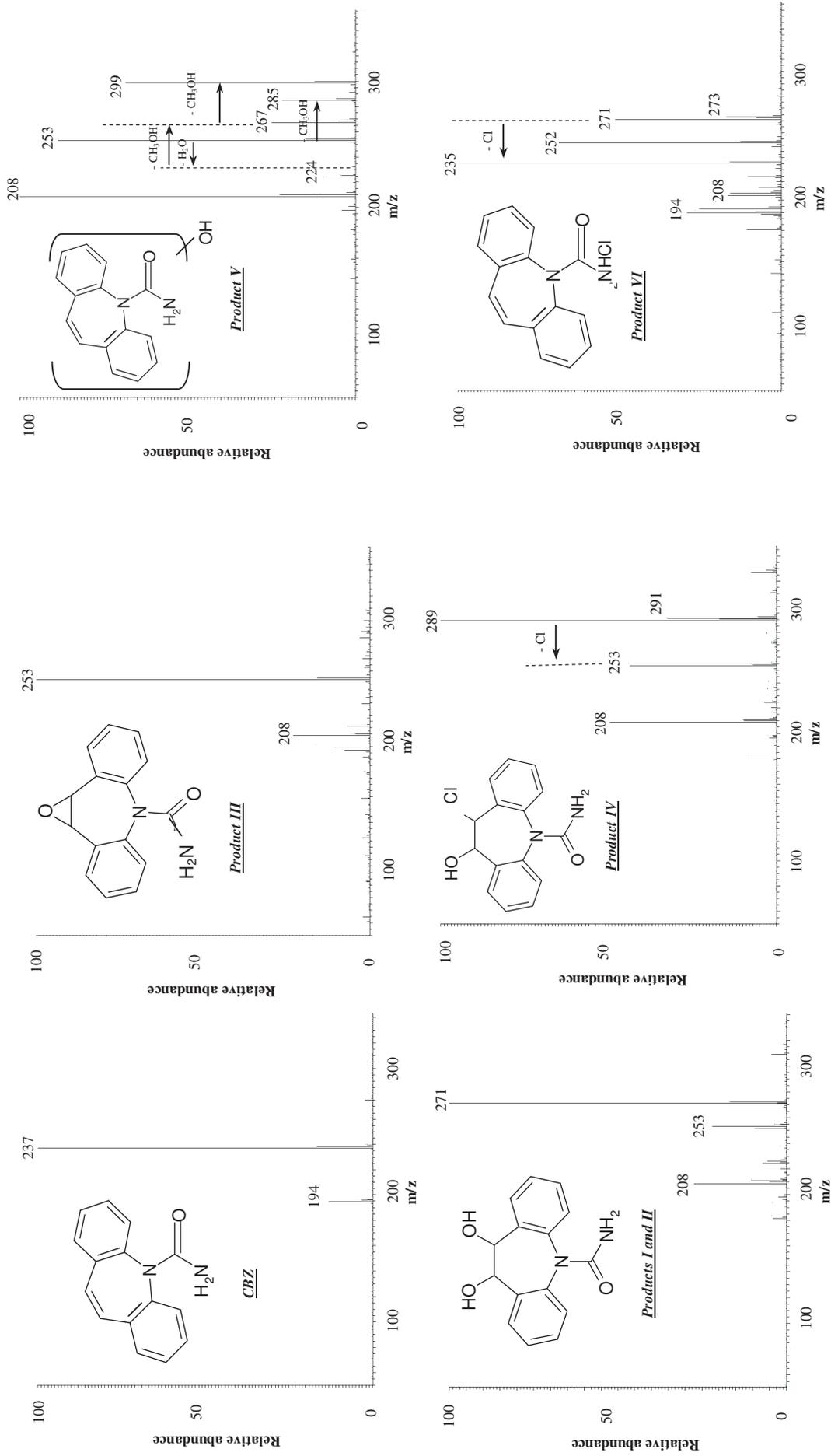
The MS spectrum of this compound shows a molecular ion at  $m/z$  289. Moreover, the isotopic distribution of the molecular ion (i.e. presence of an ion at  $m/z$  291 (+2) with abundance about 1/3 of molecular ion) and the presence of an additional fragment ion at  $m/z$  253 (-36) in the MS spectra show the presence of a chlorine atom. For this product, the MS/MS fragmentation of the peak at  $m/z$  289 leads to ions at  $m/z$  271 (-18) and 228 (-61). These ions could correspond to successive H<sub>2</sub>O and CONH<sub>2</sub> loss. Accordingly, a monohydroxylated chlorinated CBZ derivative with opening of a double bond has been proposed for this product. Such changes in CBZ structure is in agreement with transformations observed during chlorination of polynuclear aromatic compounds and other unsaturated compounds (Oyler et al., 1983, Kopperman et al., 1976, Carlson and Caple, 1978, Ghanbari et al., 1983). A similar chlorination mechanism can then be proposed.

#### Product VII (unknown)

No chemical structure was proposed for product VII. However, the MS spectrum of this compound shows a molecular ion at  $m/z$  320. Due to the probable impair mass, the presence of only one nitrogen atom in the chemical structure of this product can then be expected. Moreover, due to the isotopic distribution of the molecular ion (i.e. presence of ions at  $m/z$  322 (+2) with the abundance about 2/3 and at  $m/z$  324 (+4)), the presence of two chlorine atoms can be suggested for this compound.

**Table 2:** UV characteristics and main fragment ions obtained from MS and MS<sup>2</sup> analyses of CBZ and transformation products.

Compounds	UV characteristics		Observed fragment ions at m/z value ( <i>relative abundance</i> )	
	$\lambda_{\max}$	SM	SM	SM / SM *
CBZ	236 and 284 nm	237 (100)	220 (20) ; 194 (100)	
		194 (36)		
Product I and II (CBZ diols)	230 nm	271 (100)	253,0 (100) ; 236,0 (5) ; 210 (15)	
		253 (25)	268 (60) ; 236 (30) ; 210 (60)	
Product III (CBZ epoxide)	228 nm	208 (30)		
		253 (100)	268 (65) ; 236 (20) ; 210 (60)	
Product IV (CBZ chloramide)	226 nm	208 (20)		
		289 (100) ; 291 (33)	271 (100) ; 253 (4) ; 228 (50)	
Product V (hydroxy-CBZ)	238 nm	253 (45)	268 (100) ; 236 (65) ; 210 (70)	
		208 (50)		
Product VI (CBZ)	228 and 286 nm	253 (95)	268 (65) ; 236 (15) ; 210 (60)	
		299 (60) ; 285 (20) ; 267 (25) ; 224 (10) ; 208 (100)		
chlorolacohol	228 and 272 nm	271 (50) ; 273 (18)	236 (50) ; 235 (38) ; 220 (30) ; 194 (56) ; 193 (100)	
		252 (70)	220 (1) ; 210 (100)	
Product VII (unknown)	228 and 272 nm	235 (100)	207 (50) ; 193 (100) ; 137 (30)	
		208 (20) ; 194 (30)		
		320 (100) ; 322 (70) ; 324 (12)	302 (10) ; 285 (100) ; 284 (22) ; 257 (30) ; 241 (40) ; 205 (15)	
		248 (30) ; 205 (50) ; 182 (35)		



**Figure 7:** Mass spectra and proposed chemical structure of CBZ and transformation products I -VI

### III.3.4- Monitoring of transformation products formation and proposed reaction pathways

The Figure 9 shows the monitoring of the evolution of the transformation products, which was performed according to chlorination time at pH 7 (initial chlorine concentration = 1000  $\mu\text{M}$ ) and pH 9 (initial chlorine concentration = 5000  $\mu\text{M}$ ), or according to chlorination doses at pH 5. At pH 7, this Figure shows that most of these compounds, excepted CBZ chloramide (Product IV) and hydroxy-CBZ (Product V), accumulate in the solution in the presence of an excess of chlorine. In the case of hydroxy-CBZ (Product V), the observed decrease in formation is in agreement with the proposed chemical structures which includes an additional hydroxyl function and is in favour of further electrophilic attack of chlorine on the molecule. The CBZ epoxide (Product III) was already mentioned as a metabolite or photolysis transformation product of CBZ (Vogna et al., 2004; Lam et al., 2005). As observed during chlorination of CBZ epoxide standard solution performed at pH 7 (results no presented), a great stability of this compound is noted during CBZ chlorination. Finally, at pH 9, the chloramide derivative compound (Product VI) is the major transformation product observed.

In a mechanistic point of view, an initial electrophilic attack of chlorine can be expected concerning CBZ chloroalcohol (Product IV) and CBZ chloramide (Product VI) formation. According to Morris (1978), a mechanism via an initial  $\text{Cl}^+$  addition to a double bond followed by addition of  $\text{OH}^-$  can then be proposed for CBZ chloroalcohol (Product IV) formation. Similarly, in the case of CBZ chloramide (Product VI), a  $\text{Cl}^+$  transfer from molecular chlorination agents to the nitrogen atom could be suggested. However, for  $\text{pH} > 8$ , rate constants weren't significantly changed, while  $\text{ClO}^-$  is the major species of chlorine in solution and  $\text{HOCl}$  is gradually decreasing to be neglected. From these results, as previously proposed in the case of other amide compounds (Thomm and Wayman, 1969 or Prutz et al., 1999), a major  $\text{ClO}^-$  reaction with amide function of CBZ can be then expected at these pH values. According to Thomm and Wayman (1969), an initial hydrogen bond formation between the amido hydrogen and  $\text{O}^-$  group can then be proposed.

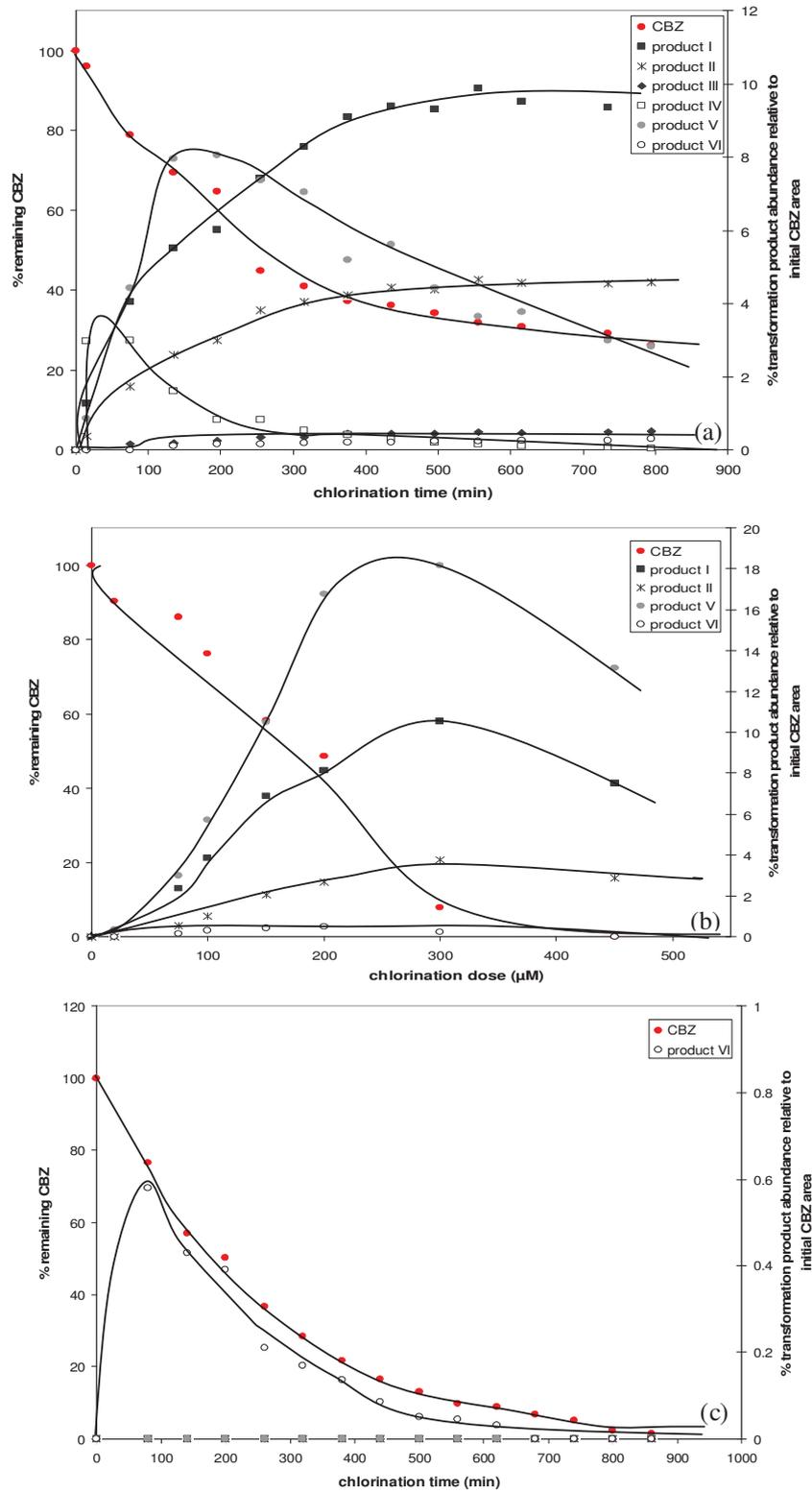
Diol 10-11 CBZ derivatives are metabolites which were often stated in the bibliography as a transformation product of oxidation or photolysis (Vogna et al., 2004; Lam et al., 2005). In this study, it was checked that these diols weren't formed in the absence of chlorine at different pH value. Thus, CBZ diols (Product I and Product II) probably come from an initial

chlorine attack under our experimental conditions. One of these products could be the "Cis" form and the other the "Trans" form (Figure 8).



**Figure 8:** Cis and Trans forms of the transformation products P I and P II

No reaction pathway or mechanism has been clearly proposed in the case of CBZ diols (Products I and II), hydroxyl-CBZ (Product V) and CBZ epoxide (Product III) formation. However, according to Rabasso (2011), chloroalcohol compound could give epoxide or hydroxyl compounds. Moreover, epoxide compounds could lead to diol derivative under acidic or basic conditions. These hypotheses, stating that CBZ chloroalcohol (Product IV) could lead to CBZ epoxide (Product III) then CBZ diols (Products I and II), could explain the observed low stability of CBZ chloroalcohol (Product IV) at pH 7 and the low CBZ epoxide (Product III) formation especially at acidic pH values. In addition to this hypothesis, for these compounds, especially in the case of hydroxyl CBZ (Product V) and CBZ diols (Products I and II), nucleophilic substitution or addition of HOCl (with Cl<sup>-</sup> release) could also be proposed. However, in the case of CBZ diols (Products I and II), this would impose a  $\delta^+$  charge on both carbon atoms 10 and 11 and simultaneous attack of two moles of HOCl. These 2 HOCl attacks could explain the order 2 relative to chlorine previously observed but are slightly probable. Finally, for these compounds, another hypothesis considering direct or indirect (via radicals) actions of Cl<sub>2</sub>O could be suggested. However, this hypothesis has to be carefully studied.



**Figure 9:** Transformation products variation in the presence of an excess of chlorine, or for different chlorine doses, at (a) pH 7 (initial chlorine concentration =  $1000\mu\text{M}$ ), (b) pH 5 (chlorine doses from 0 to  $450\mu\text{M}$ ) and (c) pH 9 (initial chlorine concentration =  $5000\mu\text{M}$ )

### III.4- Conclusion

This work investigated the oxidation of carbamazepine (CBZ) during chlorination processes applied in water treatment. In a first step, chlorination kinetic of CBZ was studied in the pH range of 5-11, at  $20 \pm 2$  °C, and in the presence of an excess of total chlorine. Under these conditions, a third-order reaction (first-order relative to CBZ concentration and second-order relative to free chlorine concentration) was observed at neutral and slightly acidic pH, whereas a second order reaction (first order relative to each constituent) was shown at alkaline pH. For a pH range from 5 to 8, a major  $\text{Cl}_2$  and  $\text{Cl}_2\text{O}$  reactivity with CBZ was then suggested while a major  $\text{HOCl}$  and  $\text{ClO}^-$  reactivity with CBZ was proposed at  $\text{pH} > 8$ . From the observed rate constants determined in the presence of an excess of total chlorine and at various pH levels, each elementary reaction rate constant (i.e. the reaction of  $\text{HOCl}$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{Cl}_2$  and  $\text{Cl}_2\text{O}$  with CBZ ( $k_1 < 1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 2.34 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_3 = 7.33 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $k_4 = 2.18 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )) was calculated. From these results, at pH 7, and for total chlorine concentration of  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , a half life time more than 295 days can be expected. A low reactivity of chlorine with CBZ can then be expected under chlorination steps used during water treatment. In the second part of the study, identification of degradation products formed during chlorination of CBZ was undertaken from LC-MS and MS/MS analysis. Under our experimental conditions, several transformation products have been observed during CBZ chlorination. As previously described in the case of chlorination of polynuclear aromatic or unsaturated compounds, monohydroxylated, epoxide, chloramide, diol or monohydroxylated chlorinated derivatives of CBZ were proposed for these products. Most of these compounds seem to accumulate in solution in the presence of an excess of chlorine.

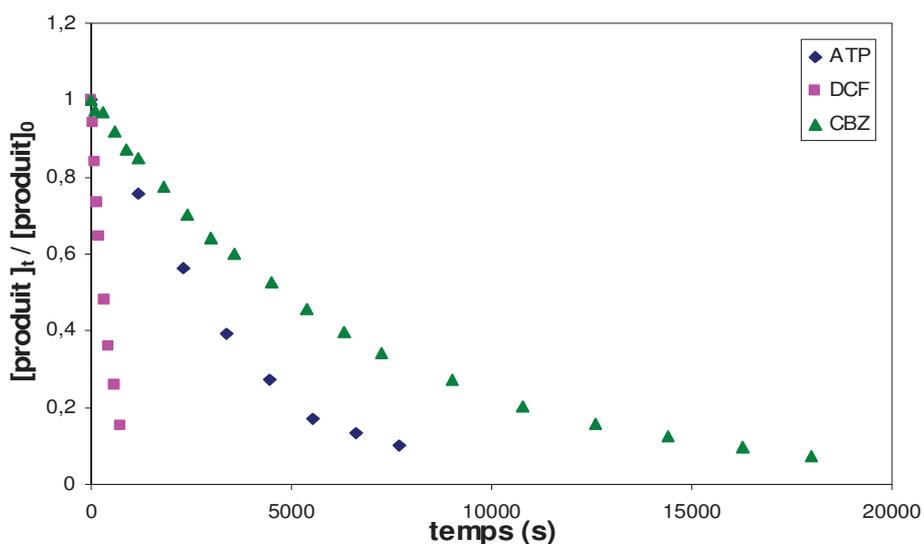
## IV- SYNTHÈSE ET DISCUSSION GÉNÉRALE

Cette partie est consacrée à la synthèse des résultats présentés dans les trois projets d'articles et à une discussion générale portant, tout d'abord, sur les études cinétiques de réaction du chlore à différentes valeurs de pH, puis sur des propositions de schémas réactionnels s'appuyant notamment sur les sous-produits de dégradation identifiés au cours de ce travail. Cette partie comporte également d'autres interprétations cinétiques et/ou de schémas réactionnels qui n'ont pas été décrites dans les projets d'articles, soit parce qu'elles n'ont pas été jugées suffisamment argumentées, soit parce qu'elles ont été considérées négligeables.

### IV.1- Cinétiques de chloration à différents pH

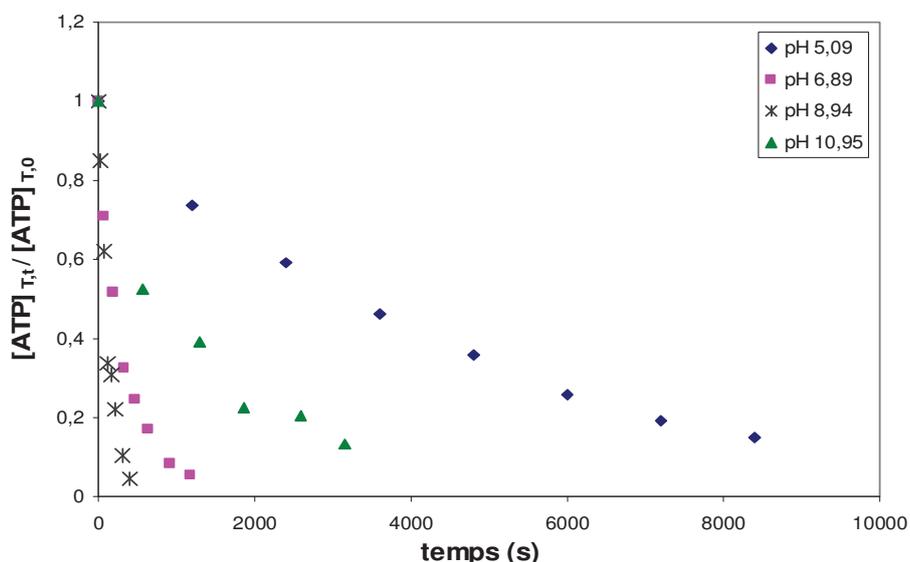
Dans ce travail, de manière à apprécier l'action du chlore sur chaque composé et les éventuelles variations de vitesse d'action du chlore en fonction du pH, de nombreuses expériences de cinétique de chloration ont été effectuées à  $20 \pm 2$  °C, différents pH et en présence d'un large excès en chlore (méthode de dégénérescence d'ordre).

Pour l'ensemble des composés étudiés, une dégradation plus ou moins rapide au cours de la chloration a été observée. La Figure III.1 montre un exemple de dégradation de chaque composé étudié, pour un même pH et une même concentration initiale en chlore total. Pour cet exemple, à pH 5, c'est la carbamazépine (CBZ) qui est le moins réactif et le diclofénac (DCF) le plus réactif.



**Figure III.1:** Comparaison de l'élimination des trois composés par le chlore à pH  $5,05 \pm 0,1$  ( $20^\circ\text{C}$ ,  $[\text{HOCl}]_T = 255 \pm 30 \mu\text{M}$ )

De même, pour un composé donné et une concentration initiale en chlore total donnée, une dégradation plus ou moins rapide suivant le pH du milieu a pu être notée. L'exemple du paracétamol (ATP), montré dans la Figure III.2, présente une évolution classique à celle généralement observée pour les composés phénoliques, c'est à dire une augmentation de la vitesse avec l'augmentation du pH jusqu'à une valeur de pH au-dessus de laquelle la vitesse de réaction diminue ensuite avec l'augmentation du pH.



**Figure III.2:** Comparaison de l'élimination par le chlore du paracétamol à  $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $[\text{HOCl}]_T = 190 \pm 10 \mu\text{M}$  et différentes valeurs du pH

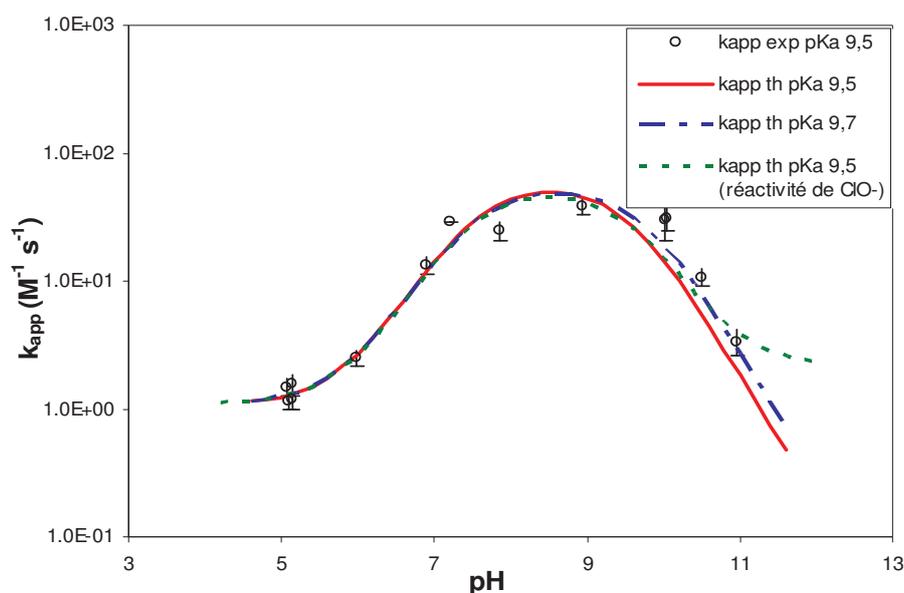
Pour les deux autres composés (DCF et CBZ), la vitesse de réaction diminue constamment avec l'augmentation du pH.

De manière à apprécier l'ordre partiel par rapport au chlore total de la cinétique de réaction, pour chaque composé, différentes expériences de chloration ont été ensuite réalisées pour un pH donné, en présence de différentes concentrations en chlore total. Les résultats obtenus dans ces conditions ont montré, quel que soit le pH étudié, une réaction de premier ordre partiel par rapport à la concentration totale en chlore dans les cas du paracétamol et du diclofénac. En revanche, concernant la carbamazépine, une réaction d'ordre partiel 2 par rapport à la concentration en chlore total a été observée pour une large gamme de pH (milieu acide à légèrement basique) et d'ordre partiel 1 pour des pH plus élevés (pH ~ 9 à 10).

Pour justifier l'ordre de la réaction, quel que soit le composé concerné, les réactions élémentaires de chloration ont été proposées et leur constante cinétique associée ont été déterminées à partir de la spéciation des différents éléments en solution et en tenant compte de la variation des constantes de vitesse en fonction du pH.

#### IV.1.1- Le paracétamol ou acétaminophène (ATP)

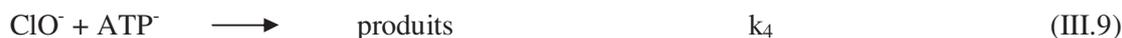
Dans le cas du paracétamol, la Figure III.3 représente l'évolution des constantes cinétiques apparentes en fonction du pH à  $20 \pm 2$  °C.



**Figure III.3:** Evolution des constantes cinétiques apparentes en fonction du pH au cours de la chloration du paracétamol à  $20 \pm 2$  °C

Comme lors de la chloration des phénols, (Gallard et Von Gunten, 2002), des constantes de vitesse maximales à  $\text{pH} > 9$  et minimales à  $\text{pH} < 6$  et  $> 10$  sont observées. Ainsi, pour ce composé, un impact significatif de la fonction phénolique sur la réactivité du chlore a été supposé.

Comme ce composé se présente sous deux formes ( $\text{ATP}$  et  $\text{ATP}^-$ ) en solution en raison de sa constante d'acidité ( $K_{\text{aATP}} = 10^{-9.5}$ , Dasmalchi *et al.*, 1995), pour expliquer l'évolution des constantes apparentes en fonction du  $\text{pH}$ , les réactions de ces deux formes avec les espèces majoritaires du chlore en solution ( $\text{HOCl}$  et  $\text{ClO}^-$ ) peuvent donc être proposées:



Dans ce travail, en raison de la plus forte réactivité de la forme  $\text{HOCl}$  généralement observée (Deborde et von Gunten, 2008), la réactivité de  $\text{ClO}^-$  a tout d'abord été négligée et seules les réactions III.6 et III.7 précédentes ont été considérées dans le projet d'article. Dans ces conditions, une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et modélisées a été obtenue (courbe rouge dans Figure III.3). Cependant, à  $\text{pH} > 9$ , la courbe théorique semble être légèrement décalée vers la gauche par rapport aux valeurs expérimentales.

Ce décalage pourrait être expliqué par la réactivité non négligeable de  $\text{ClO}^-$ . Pour vérifier cette réactivité, lors de la chloration de  $\text{ATP}$ , une autre modélisation des constantes cinétiques apparentes en fonction du  $\text{pH}$  au cours de la chloration a ensuite été menée, mais en considérant les réactions III.6, III.7, III.8 et III.9 précédentes. Les relations suivantes ont alors été considérées pour exprimer la cinétique de chloration du paracétamol ( $\text{ATP}$ ),

$$-\frac{d[\text{ATP}]_{\text{T}}}{dt} = k_{\text{app}} [\text{HOCl}]_{\text{T}} [\text{ATP}]_{\text{T}} \quad (\text{III.10})$$

ou,

$$-\frac{d[\text{ATP}]_{\text{T}}}{dt} = k_1 [\text{HOCl}] [\text{ATP}] + k_2 [\text{HOCl}] [\text{ATP}^-] + k_3 [\text{ClO}^-] [\text{ATP}] + k_4 [\text{ClO}^-] [\text{ATP}^-] \quad (\text{III.11})$$

soit encore,

$$-\frac{d[\text{ATP}]_{\text{T}}}{dt} = [\text{HOCl}]_{\text{T}} [\text{ATP}]_{\text{T}} (\alpha_{\text{ATP}} \alpha_{\text{HOCl}} k_1 + \alpha_{\text{ATP}^-} \alpha_{\text{HOCl}} k_2 + \alpha_{\text{ATP}} \alpha_{\text{ClO}^-} k_3 + \alpha_{\text{ATP}^-} \alpha_{\text{ClO}^-} k_4)$$

avec:  $\alpha_{\text{ATP}}$  et  $\alpha_{\text{ATP}^-}$  les fractions des formes protonée et déprotonée de ATP, (III.12)  
 et  $\alpha_{\text{HOCl}}$  et  $\alpha_{\text{ClO}^-}$  les fractions d'acide hypochloreux et d'ion hypochlorite.

En considérant l'égalité entre les relations (III.10) et (III.12) et les constantes d'acidité  $K_{\text{aATP}}$  et  $K_{\text{aHOCl}}$ , l'expression suivante de  $k_{\text{app}}$  en fonction du pH, a alors pu être établie,

$$k_{\text{app}} = \frac{k_1[\text{H}^+]^2 + k_2K_{\text{aATP}}[\text{H}^+] + k_3K_{\text{aHOCl}}[\text{H}^+] + k_4K_{\text{aHOCl}}K_{\text{aATP}}}{([\text{H}^+] + K_{\text{aHOCl}})([\text{H}^+] + K_{\text{aATP}})} \quad (\text{III.13})$$

Ainsi, à partir de cette dernière équation, les constantes  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  et  $k_4$  ont été calculées par régression multiple des valeurs expérimentales de  $k_{\text{app}}$ . La régression a été réalisée en utilisant la fonction Solveur Excel afin de minimiser l'écart définie comme  $\Sigma (k_{\text{app exp}} - k_{\text{app theo}})^2 / (k_{\text{app exp}})^2$  où  $k_{\text{app exp}}$  et  $k_{\text{app theo}}$  représentent les constantes de second ordre expérimentales et théoriques (Figure III.3).

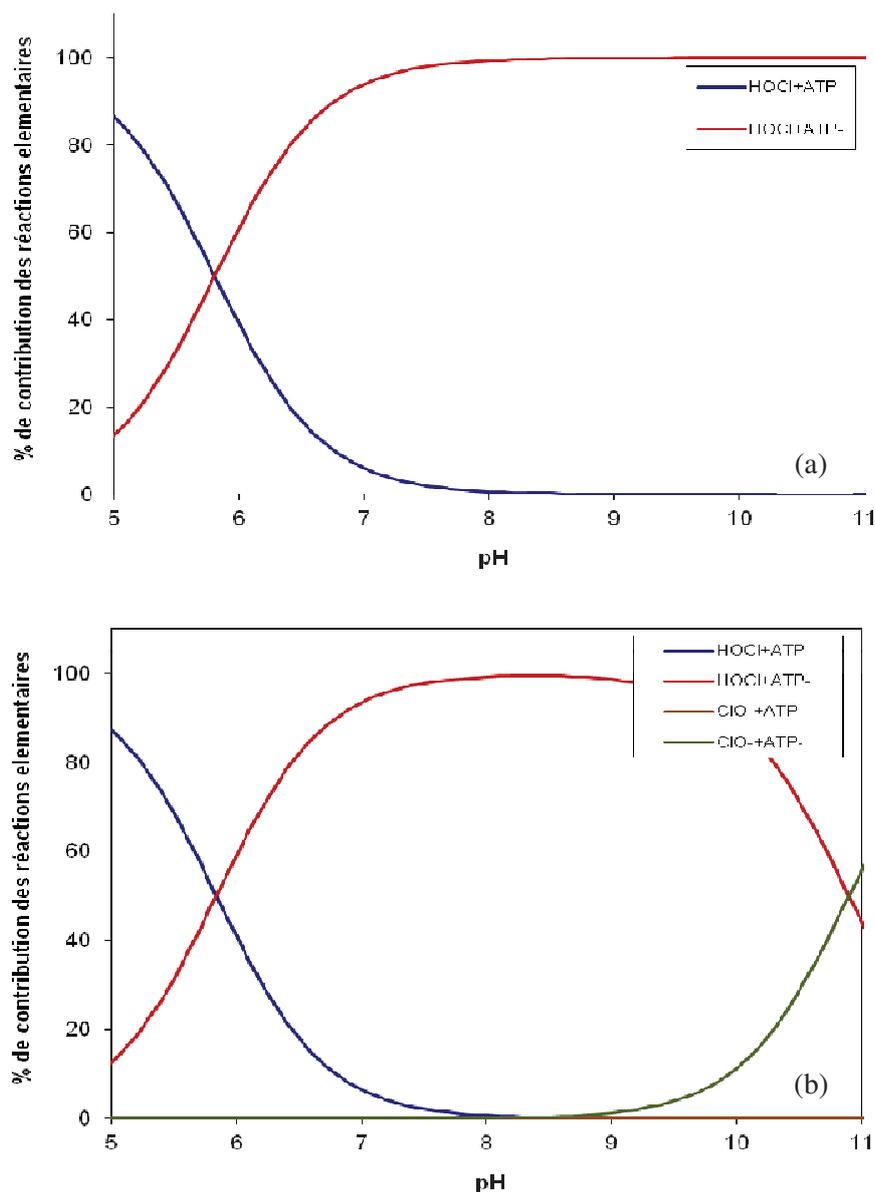
Le Tableau III.1 montre les valeurs de  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  et  $k_4$  obtenues. Dans ces conditions, de très faibles constantes de vitesse ont été obtenues pour les réactions élémentaires faisant intervenir  $\text{ClO}^-$ . La très faible réactivité de  $\text{ClO}^-$  a été confirmée, et aucune meilleure modélisation n'a été observée (courbe verte dans Figure III.3). C'est donc l'action de l'acide hypochloreux sur la forme dissociée du paracétamol qui est nettement déterminante.

Comme à  $\text{pH} > 9$ , la réaction totale est principalement contrôlée par la réaction entre HOCl et ATP déprotoné ( $\text{ATP}^-$ ), le décalage observé (Figure III.3) pourrait également être expliqué par une incertitude sur la valeur du pKa de l'ATP. En effet, une meilleure corrélation (courbe bleue dans Figure III.3) a été obtenue en considérant les réactions élémentaires III.6 et III.7 précédentes, et la valeur de pKa de 9,7, donnée par Sorasuchart *et al.*, (1999). Les constantes  $k_1$  et  $k_2$  obtenues dans ces conditions sont reportées dans le tableau III.1.

**Tableau III.1:** Constantes cinétiques des réactions élémentaires proposés au cours de la chloration du paracétamol à  $20 \pm 2$  °C

Reactions élémentaires	constantes cinétiques (pKa = 9,5)	constantes cinétiques (pKa = 9,7)	constantes cinétiques (pKa = 9,5) (considérant la réactivité de $\text{ClO}^-$ )
HOCl + ATP	$k_1 = 1,07 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_1 = 1,09 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_1 = 1,1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
HOCl + $\text{ATP}^-$	$k_2 = 5,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_2 = 8,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_2 = 5,1 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$\text{ClO}^-$ + ATP			$k_3 = 0,1 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$\text{ClO}^-$ + $\text{ATP}^-$			$k_4 = 2,2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

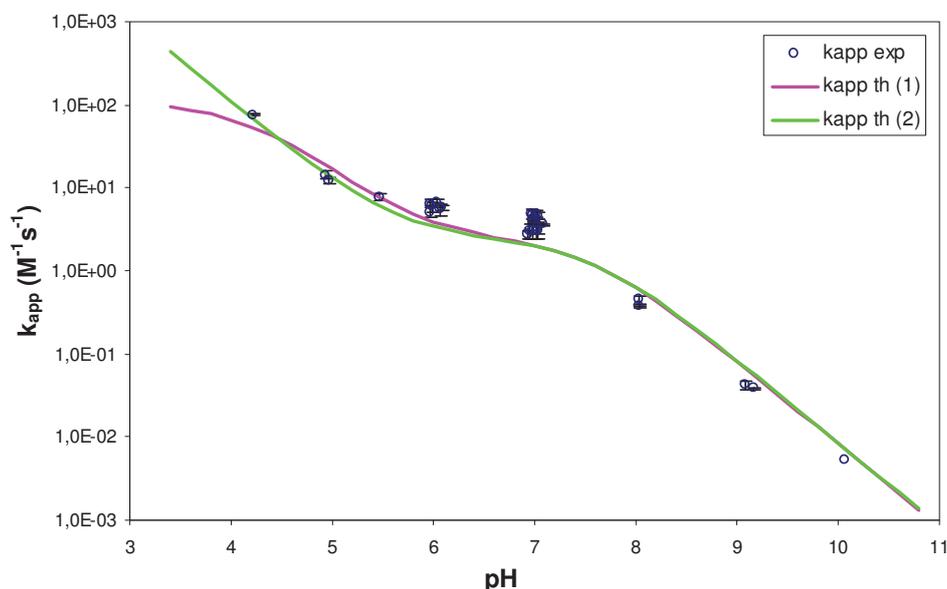
A partir de ces résultats, la contribution des réactions élémentaires au cours de la chloration du paracétamol a alors été représentée dans la Figure III.4. En considérant que la réactivité de HOCl avec les deux formes d'ATP (Figure III.4(a)), ces résultats montrent qu'à  $\text{pH} > 6$ , la réaction de HOCl avec la forme déprotonée du paracétamol est la réaction majoritaire. En prenant en compte la réactivité de  $\text{ClO}^-$  (Figure III.4(b)), cette représentation graphique confirme la très faible réactivité de  $\text{ClO}^-$  par rapport à celle de HOCl.



**Figure III.4:** Contribution des réactions élémentaires au cours de la chloration du paracétamol  
 (a) En considérant que la réactivité de HOCl. (b) En prenant en compte la réactivité non négligeable de  $\text{ClO}^-$

### IV.1.2- Le diclofénac (DCF)

La Figure suivante (III.5) représente l'évolution des constantes cinétiques apparentes en fonction du pH obtenues au cours de la chloration du DCF à  $20 \pm 2$  °C.



**Figure III.5:** Evolution des constantes cinétiques apparentes en fonction du pH au cours de la chloration du diclofénac  $20 \pm 2$  °C. ( $k_{app}$  th(1): réactions 9 et 10 –  $k_{app}$  th: (2) réactions 11 et 12)

Pour ce composé, des constantes de vitesse maximales à  $\text{pH} < 5$ , et minimales à  $\text{pH} > 8$  avec un plateau pour les valeurs de pH compris entre 6 et 7 sont observées.

Comme le paracétamol, en raison de sa constante d'acidité ( $K_a = 10^{-4,2}$  Hubert *et al.*, 2003), ce composé est présent sous deux formes (DCF et DCF<sup>-</sup>) en solution. Pour expliquer l'évolution des constantes apparentes en fonction du pH, les réactions de ces deux formes avec HOCl (la forme du chlore la plus réactive parmi les espèces majoritaires en solution) ont donc tout d'abord été proposées



Cependant pour ce composé, la fonction acide est relativement éloignée du noyau aromatique. Sa protonation a donc probablement peu d'influence sur la réactivité du chlore. Comme précédemment proposé par Pinkston et Sedlak (2004) dans le cas de la chloration de l'indométacine et du naproxène (de structure voisine à celle du DCF), la réaction du diclofénac totale avec HOCl a donc également été envisagée. Dans ce second cas, pour

expliquer l'augmentation des constantes de vitesse à  $\text{pH} < 5$ , la réaction de HOCl catalysée par les ions  $\text{H}^+$  a été proposée.



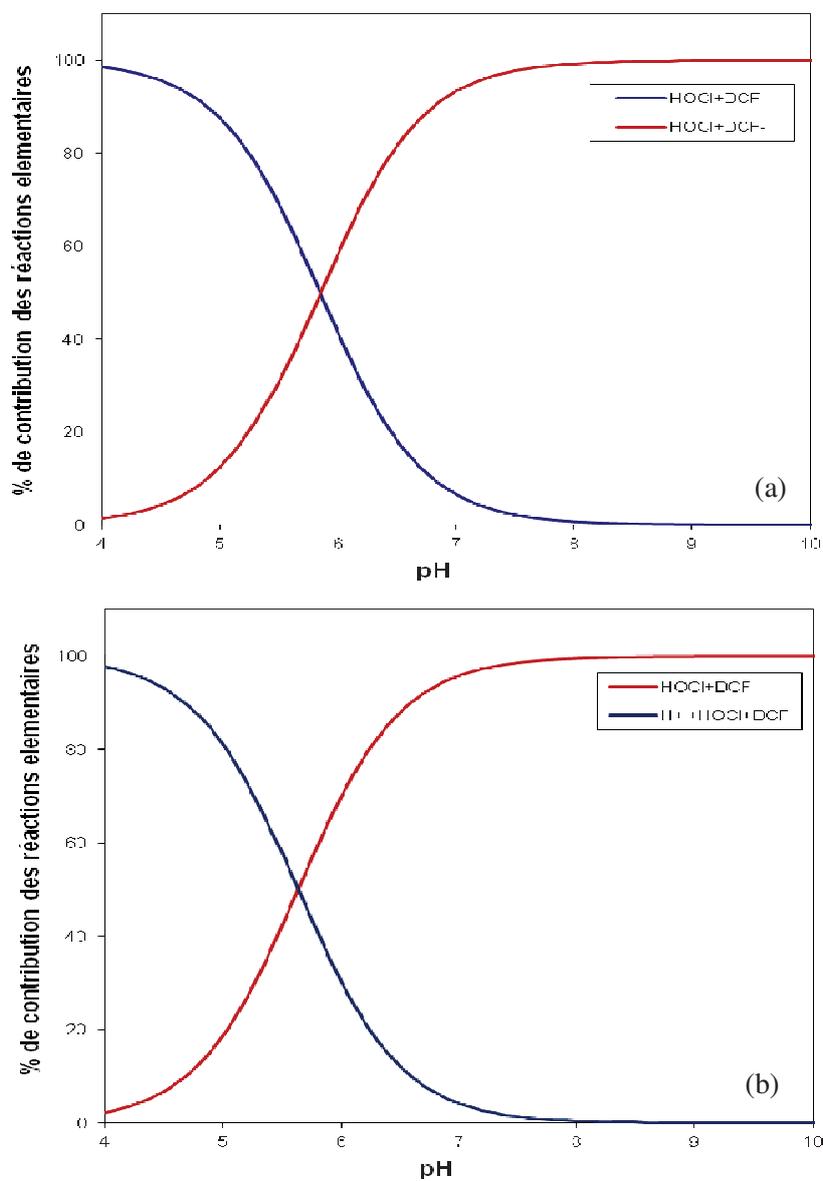
La Figure III.5 présente une comparaison entre l'évolution des constantes cinétiques apparentes en fonction du pH au cours de la chloration du DCF à  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , pour ces deux hypothèses. Quelles que soient les réactions élémentaires considérées, une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et modélisées a été obtenue à  $\text{pH} > 6,5$ . En revanche, à  $\text{pH} < 6$ , une meilleure corrélation a été observée en considérant les réactions de HOCl et HOCl catalysée par les ions  $\text{H}^+$  avec le diclofénac total (courbe verte dans la Figure III.5). Un impact négligeable de la protonation de la fonction acide du diclofénac sur la réactivité du chlore est donc attendu.

Le tableau III.2 montre les valeurs de  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  et  $k_4$  obtenues en considérant ces deux hypothèses.

**Tableau III.2:** Constantes cinétiques des réactions élémentaires proposés au cours de la chloration du diclofénac à  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

	Reactions élémentaires	constants cinétiques
(1)	HOCl + DCF	$k_1 = 1,07 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	HOCl + DCF <sup>-</sup>	$k_2 = 2,40 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
(2)	HOCl + DCF <sub>T</sub>	$k_3 = 2,48 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	H <sup>+</sup> + HOCl + DCF <sub>T</sub>	$k_4 = 1,07 \cdot 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$

A partir des valeurs des constantes cinétiques obtenues pour les 2 hypothèses, la contribution de chaque réaction élémentaire à la réaction globale de la chloration du diclofénac a été estimée (Figure III.6). Quelles que soient les réactions élémentaires considérées, l'action de l'acide hypochloreux sur la forme déprotonée du diclofénac semble déterminante à  $\text{pH} > 6$ . A  $\text{pH} < 6$ , en revanche, la réaction de HOCl avec la forme moléculaire ou la réaction de HOCl catalysée par les ions  $\text{H}^+$  serait majoritaire. Pour ces valeurs de pH, une accélération très nette de la réaction avec l'augmentation de la concentration en protons dans la solution est observée.



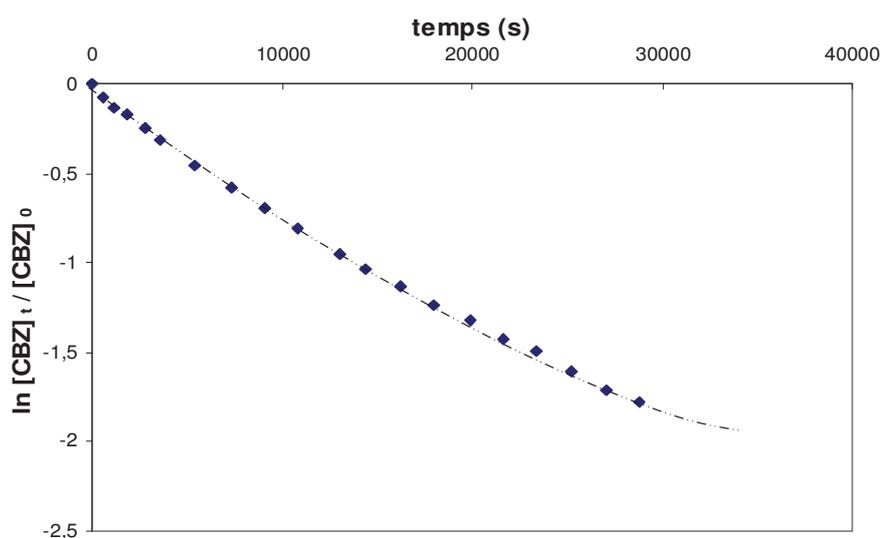
**Figure III.6:** Contribution des réactions élémentaires au cours de la chloration du diclofénac  
 (a) En considérant la réactivité de HOCl avec les deux formes du diclofénac. (b) En considérant les réactions de HOCl et HOCl catalysée par les ions  $H^+$  avec le diclofénac total.

### IV.1.3- La carbamazépine (CBZ)

Avant de conclure pour le projet d'article, sur une réactivité de  $\text{Cl}_2\text{O}$  avec un ordre partiel 2 par rapport au chlore total (entre pH~ 5 et 8), d'autres hypothèses de modèle cinétique ont été étudiées.

**Hypothèse 1: Réaction réversible en 1<sup>ère</sup> étape (par formation d'une chloramide par exemple)**

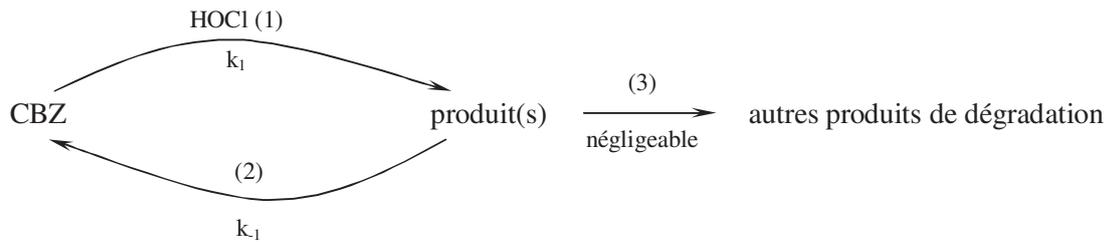
A pH 7, lors des expériences de chloration de la carbamazépine réalisées selon la méthode de dégénérescence d'ordre, contrairement aux autres composés pharmaceutiques étudiés, un léger ralentissement de la réaction (« palier ») a été observé en fin de réaction pour les plus faibles concentrations en chlore total utilisées (Figure III.7)



**Figure III.7:** Cinétique de la chloration de CBZ à pH 6,92 et  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , pour  $[\text{HOCl}]_T = 677 \mu\text{M}$ .

Ainsi, afin de s'assurer qu'aucune interférence avec les sous-produits (i.e. co-élution) ne s'est produite pendant l'analyse chromatographique des échantillons de CBZ chlorés, des changements de conditions chromatographiques (phase mobile et colonne) ont été testés. De même, des analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées. Toutefois, dans ces conditions, des résultats similaires ont été obtenus, et aucune interférence lors de l'analyse CBZ n'a pu être démontrée.

Pour expliquer les résultats observés dans la Figure III.7, il a alors été supposé qu'un (ou plusieurs) sous-produit peut être lentement converti en CBZ, par réversibilité, lorsque sa présence est suffisamment importante en solution. Le chemin réactionnel de la Figure III.8 a alors été proposé et la formation d'une chloramide pouvant, par exemple, faire l'objet d'une réaction réversible a été envisagée.



**Figure III.8:** Autre chemin réactionnel proposé au cours de la chloration de CBZ.

Dans ces conditions, en prenant en compte les réactions (1) et (2) dans la Figure III.8, et en supposant que les réactions du chlore avec les premiers produits de transformation, (i.e. la réaction 3 dans la Figure III.8) sont négligeables, alors, la disparition observée de la CBZ est en fait le résultat de la disparition suivant la voie (1) diminuée de l'apparition par la voie (2):

$$V_{\text{obs}} = V_{\text{disparition (1)}} - V_{\text{apparition (2)}}$$

$$\text{ou} \quad -\frac{d[\text{CBZ}]}{dt} = -\frac{d[\text{CBZ}]}{dt}(1) - \frac{d[\text{CBZ}]}{dt}(2) \quad (\text{III.18})$$

$$\text{si:} \quad \frac{d[\text{CBZ}]}{dt}(2) = -\frac{1}{x} \frac{d[\text{Prod}]}{dt}(2) \quad (\text{III.19})$$

avec,  $x$ , le ratio de CBZ conduisant à la formation des produits convertis en CBZ au cours de la chloration. Donc,

$$-\frac{d[\text{CBZ}]}{dt} = -\frac{d[\text{CBZ}]}{dt}(1) + \frac{1}{x} \frac{d[\text{Prod}]}{dt}(2) \quad (\text{III.20})$$

$$\text{ou} \quad -\frac{d[\text{CBZ}]}{dt} = k_1[\text{CBZ}] - \frac{k_{-1}}{x}[\text{Prod}] \quad (\text{III.21})$$

$$\text{avec, } [\text{Prod}] = x ([\text{CBZ}]_0 - [\text{CBZ}]) \quad (\text{III.22})$$

Dans ces conditions,

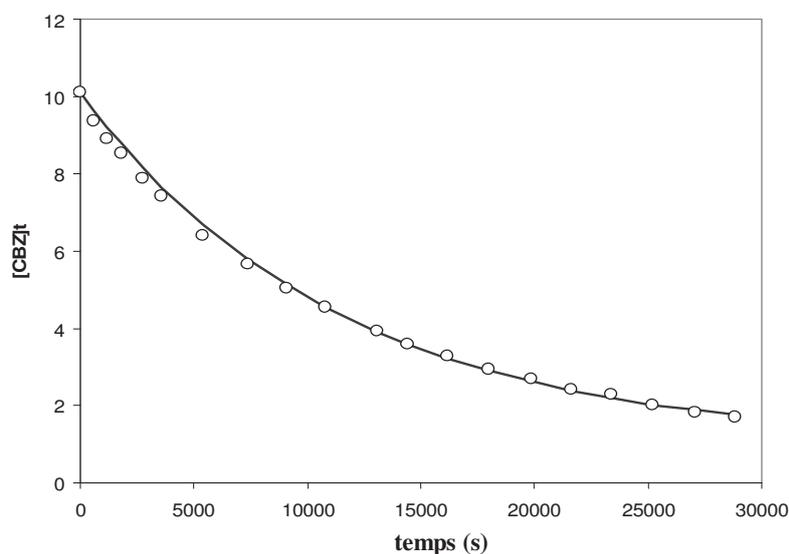
$$\frac{d[\text{CBZ}]}{dt} = [\text{CBZ}](-k_1 - k_{-1}) + k_{-1}[\text{CBZ}]_0 \quad (\text{III.23})$$

$$\text{ou } [\text{CBZ}]_t = ([\text{CBZ}]_0 - B/A) e^{At} + B/A \quad (\text{III.24})$$

$$\text{avec, } A = -k_1 - k_{-1} \quad \text{and} \quad B = -k_{-1} [\text{CBZ}]_0$$

Pour chaque expérience, en considérant l'équation (III.24),  $k_1$  et  $k_{-1}$  ont alors été calculés par régression multiple des résultats expérimentaux. La régression a été réalisée en utilisant la fonction Solveur Excel afin de minimiser l'écart défini comme  $\Sigma([\text{CBZ}]_{\text{exp}} - [\text{CBZ}]_{\text{theo}})^2 / ([\text{CBZ}]_{\text{exp}})^2$  où  $[\text{CBZ}]_{\text{exp}}$  et  $[\text{CBZ}]_{\text{theo}}$  représentent les concentrations expérimentales et théoriques en CBZ.

La Figure III.9 représente la concentration  $[\text{CBZ}]_t$  expérimentale et modélisée au cours de la chloration à pH 7, 20°C et pour  $[\text{HOCl}]_T = 677 \mu\text{M}$ . Dans ces conditions, une très bonne corrélation a été obtenue entre les valeurs expérimentales et le modèle.



**Figure III.9:** Modélisation de  $[\text{CBZ}]_t$  au cours de la chloration, pour  $[\text{HOCl}]_T = 677 \mu\text{M}$  à pH 6,92 et  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , avec le schéma incluant une réversibilité. Les points du graphique représentent les données expérimentales. La ligne continue correspond à la régression linéaire obtenue à partir de ces valeurs.

Le tableau III.3, reporte les valeurs de  $k_1$  obtenues par cette méthode à pH 7. De même, pour les expériences pour lesquelles la réaction réversible étaient suffisamment significative (i.e. expériences réalisées pour  $[\text{HOCl}]_T < 900 \mu\text{M}$ ), ce tableau montre les valeurs de  $k_1$  obtenues dans ces conditions. Lors de la comparaison entre les valeurs de  $k_1$  obtenues par cette méthode, et les valeurs de  $k_{\text{obs}}$  déterminées à partir de la pente du graphique de chaque expérience (tableau III.3), qui présente  $\ln [\text{CBZ}]_t / [\text{CBZ}]_0$  en fonction du temps, les

résultats montrent que plus la concentration en chlore est élevée, moins la différence entre ces deux valeurs est importante.

**Table III.3:** *Constants observées obtenues expérimentalement ou par la modélisation précédente à pH  $7,0 \pm 0,2$  and  $20 \pm 2^\circ\text{C}$*

[HOCl] <sub>T</sub> (μM)	k <sub>obs</sub> (s <sup>-1</sup> ) expérimental	k <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> ) théorique	k <sub>-1</sub> (s <sup>-1</sup> ) théorique
370	1,93 10 <sup>-5</sup>	2,22 10 <sup>-5</sup>	1,06 10 <sup>-5</sup>
651	4,87 10 <sup>-5</sup>	6,15 10 <sup>-5</sup>	1,57 10 <sup>-5</sup>
677	6,14 10 <sup>-5</sup>	7,93 10 <sup>-5</sup>	0,92 10 <sup>-5</sup>
698	6,61 10 <sup>-5</sup>	8,23 10 <sup>-5</sup>	1,98 10 <sup>-5</sup>
987	1,23 10 <sup>-4</sup>	1,36 10 <sup>-4</sup>	nc
1003	1,14 10 <sup>-4</sup>	1,32 10 <sup>-4</sup>	nc
1048	1,73 10 <sup>-4</sup>	1,92 10 <sup>-4</sup>	nc
1061	1,07 10 <sup>-4</sup>	1,15 10 <sup>-4</sup>	nc
1181	1,78 10 <sup>-4</sup>	2,05 10 <sup>-4</sup>	nc
1380	3,26 10 <sup>-4</sup>	3,49 10 <sup>-4</sup>	nc
1695	4,46 10 <sup>-4</sup>	4,91 10 <sup>-4</sup>	nc
1930	6,49 10 <sup>-4</sup>	6,74 10 <sup>-4</sup>	nc
2309	7,83 10 <sup>-4</sup>	8,47 10 <sup>-4</sup>	nc

nc = non calculable

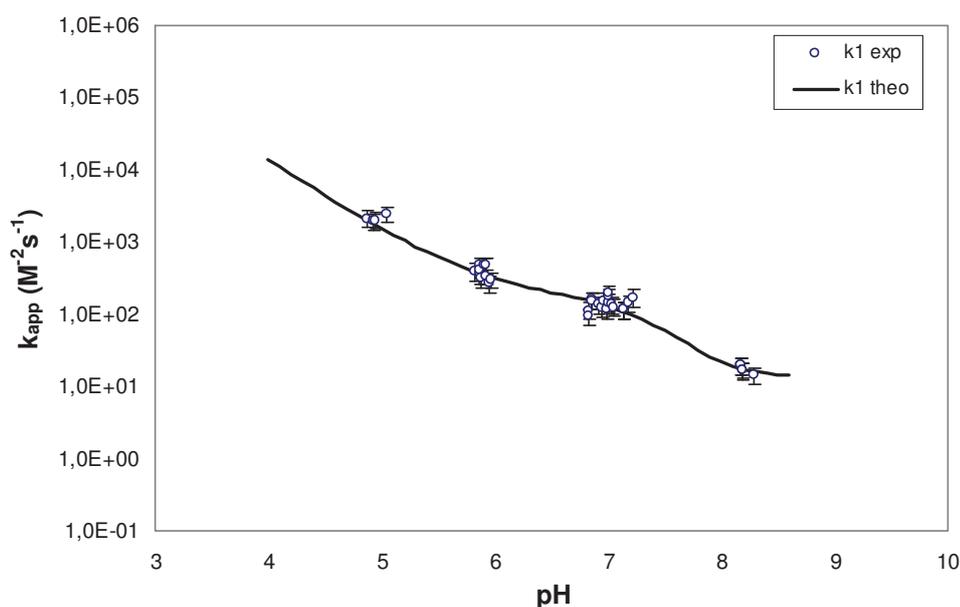
A partir des résultats obtenus avec [HOCl]<sub>T</sub> > 900 μM à pH 7, on constate que la différence entre les valeurs de k<sub>obs</sub> et k<sub>1</sub> reste faible.

Si ce modèle cinétique semble être satisfaisant, il ne permet pas d'expliquer l'observation d'un ordre partiel 2 par rapport au chlore observée en milieu acide à légèrement basique. Ainsi, la réaction réversible n'a pas été considérée au cours de l'interprétation des résultats de la chloration de CBZ dans le projet d'article.

**Hypothèse 2: Deux molécules de chlore réagissent simultanément en 1<sup>ère</sup> étape (sur la double liaison 10-11 par exemple)**

Pour expliquer l'ordre partiel 2 par rapport au chlore observée en milieu acide à légèrement basique, l'hypothèse de deux molécules de chlore réagissant simultanément en première étape (sur la double liaison 10-11 par exemple) a alors été envisagée. Pour chaque expérience réalisée à pH ≤ 8, les constantes apparentes d'ordre 3 ont alors été calculées.

La Figure III.10 représente l'évolution de ces constantes en fonction du pH obtenues au cours de la chloration de la CBZ à pH ≤ 8 et 20 ± 2 °C.



**Figure III.10:** Evolution des constantes cinétiques apparentes en fonction du pH au cours de la chloration de CBZ à  $20 \pm 2$  °C

Pour ce composé, des constantes de vitesse maximales à pH acide, et minimales à pH basique, avec un plateau pour les valeurs de pH neutre comprises entre 6 et 8 sont observées.

Comme la carbamazépine se présente en solution sous une seule forme, et que les formes majoritaires du chlore sont HOCl et ClO<sup>-</sup>, les réactions élémentaires suivantes ont alors été proposées pour expliquer la réaction globale de chloration de CBZ. Pour ce composé, en raison des constantes apparentes similaires observées à pH > 8 ( $k_{app} = 0,021 \pm 0,001 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), une réactivité non négligeable de ClO<sup>-</sup> a été envisagée.



De même, pour expliquer l'augmentation des constantes de vitesse à pH < 5, la réaction de HOCl catalysée par les ions H<sup>+</sup> a été proposée.



En prenant en compte ces trois réactions, et aussi l'ordre 2 partiel par rapport au chlore, les relations suivantes ont alors été considérées pour exprimer la vitesse globale de la réaction de chloration de CBZ à pH ≤ 8.

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = k_{app}[HOCl]_T^2[CBZ] \quad (III.28)$$

$$\text{ou } -\frac{d[CBZ]}{dt} = k_1[HOCl]^2[CBZ] + k_2[ClO^-]^2[CBZ] + k_3[HOCl]^2[H^+][CBZ] \quad (III.29)$$

$$\text{soit encore, } -\frac{d[CBZ]}{dt} = [HOCl]_T^2[CBZ](\alpha_{HOCl})^2 k_1 + (\alpha_{ClO^-})^2 k_2 + (\alpha_{HOCl})^2 [H^+] k_3 \quad (III.30)$$

avec,  $\alpha_{HOCl}$  et  $\alpha_{ClO^-}$  les fractions d'acide hypochloreux et d'ion hypochlorite.

En considérant l'égalité entre les relations (III.28) et (III.30), et  $Ka_{HOCl}$  l'expression suivante de  $k_{app}$  a alors été établie:

$$k_{app} = \frac{k_1[H^+]^2 + k_2 Ka_{HOCl}^2 + k_3[H^+]^3}{([H^+] + Ka_{HOCl})^2} \quad (III.31)$$

Ainsi, à partir de cette dernière équation, les constantes  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_3$  ont été calculées par régression multiple des valeurs expérimentales de  $k_{app}$ . La régression a été réalisée en utilisant la fonction Solveur Excel afin de minimiser l'écart définie comme  $\Sigma (k_{app\ exp} - k_{app\ theo})^2 / (k_{app\ exp})^2$  où  $k_{app\ exp}$  et  $k_{app\ theo}$  représentent les constantes de second ordre expérimentales et théoriques.

Dans ces conditions, une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et le modèle est observée (Figure III.10). Les valeurs de  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_3$  obtenues sont reportées dans le tableau III.4.

**Tableau III.4:** Constantes cinétiques des réactions élémentaires proposés au cours de la chloration de la carbamazépine à  $20 \pm 2$  °C

Reactions élémentaires	constants cinétiques
HOCl + CBZ	$k_1 = 1,98 \cdot 10^2 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$
$ClO^-$ + CBZ	$k_2 = 1,58 \cdot 10^1 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$
$H^+$ + HOCl + CBZ	$k_3 = 1,34 \cdot 10^8 \text{ M}^{-3} \text{ s}^{-1}$

Cependant, l'attaque simultanée de deux molécules de HOCl semble peu probable, ce d'autant plus que les sous-produits majoritaires identifiés dans ce travail sont les diols. Cette approche n'a donc pas été retenue dans le projet d'article.

**Hypothèse 3: Participation de l'hémioxyde de chlore Cl<sub>2</sub>O**

Ainsi, en s'appuyant sur les travaux récents de Sivey *et al.* (2010) sur la chloration de composés très faiblement réactifs et de manière à expliquer l'ordre 2 de la réaction par rapport à la concentration totale en chlore, pour  $\text{pH} \leq 8$ , une participation de l'hémioxyde de chlore Cl<sub>2</sub>O dans la réaction globale de chloration de CBZ a été envisagée.

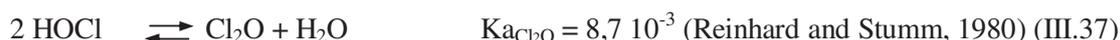
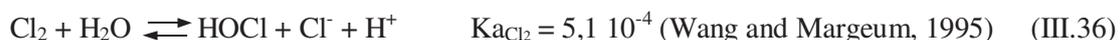
Pour cela, deux approches ont été utilisées pour déterminer les constantes cinétiques des réactions élémentaires de chloration: (i) une approche globale considérant l'ensemble des expériences et correspondant à celle décrite dans le projet d'article et (ii) une approche en deux étapes considérant d'abord les manipulations réalisées à  $\text{pH} \leq 8$  (réactions pour lesquelles un ordre global 3 a été observé) puis celles réalisées à  $\text{pH} > 8$  (réactions pour lesquelles un ordre global 2 a été noté).

Pour ces 2 approches, ce composé se présentant sous une seule forme en solution, de manière à expliquer la réaction d'ordre 2 par rapport au chlore observée à pH neutre et acide, les réactions de Cl<sub>2</sub> et Cl<sub>2</sub>O avec CBZ ont été considérées (réactions III.34 et III.35), en plus des réactions de HOCl et ClO<sup>-</sup> avec CBZ (réactions III.32 et III.33).



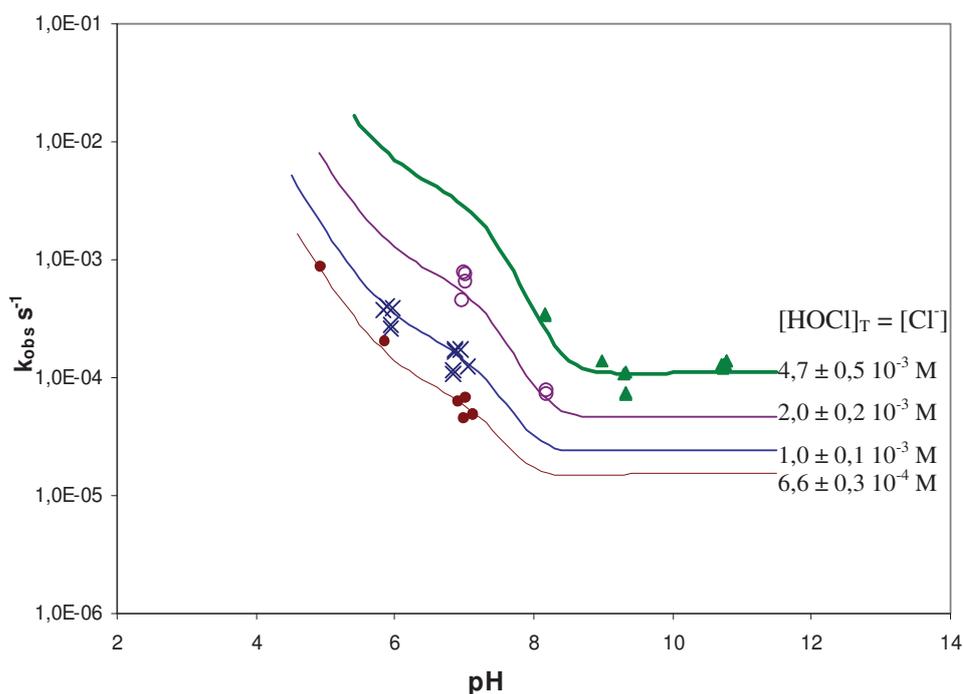
Dans ces conditions, si la forme Cl<sub>2</sub> joue un rôle important, l'ordre partiel 2 est alors justifié par l'équilibre (III.36) et par  $[\text{Cl}^-] = [\text{HOCl}]_T$  dans nos conditions expérimentales.

De même, si la forme Cl<sub>2</sub>O joue un rôle important, l'ordre partiel 2 est alors justifié par l'équilibre (III.37).



Dans la première approche, en raison du changement d'ordre de la réaction en fonction du pH, l'ensemble des valeurs de constantes observées obtenues expérimentalement et ces quatre réactions élémentaires ont été considérées pour expliquer la réaction globale de

chloration de CBZ. Dans ces conditions, la Figure III.11 montre des exemples d'évolution des constantes observées obtenues en fonction du pH, pour la chloration de la carbamazépine à différentes concentrations en chlore total et chlorure données. Ces résultats montrent des constantes maximales en milieu acide et minimales à pH élevé. Quelles que soient les concentrations en chlore total et chlorure considérées, une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales et modélisées a été obtenue. Les constantes  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  et  $k_4$  obtenues sont résumées dans le tableau III.5.



**Figure III.11:** Evolution des constantes cinétiques observées en fonction du pH, au cours de la chloration de CBZ à  $20 \pm 2$  °C

De manière à déterminer  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  et  $k_4$ , une modélisation des résultats en deux étapes a été réalisée dans la seconde approche. Une réaction d'ordre 2 par rapport au chlore ayant été observée à  $\text{pH} \leq 8$ , seules les réactions de  $\text{Cl}_2$  et  $\text{Cl}_2\text{O}$  et les expériences effectuées dans ces conditions ont alors tout d'abord été considérées pour expliquer la réaction globale de chloration à ces valeurs de pH (réactions III.34 et III.35). En prenant en compte les relations III.36 et III.37 précédentes, la cinétique de chloration de CBZ, à  $\text{pH} \leq 8$ , peut ainsi être exprimée par la relation suivante:

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = k_{app}[HOCl]_T^2[CBZ] \quad (III.38)$$

$$\text{ou,} \quad -\frac{d[CBZ]}{dt} = (k_3[Cl_2] + k_4[Cl_2O])[CBZ] \quad (III.39)$$

soit encore,

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = (k_3 \frac{\alpha_{HOCl}}{Ka_{Cl_2}} [Cl^-][H^+][HOCl]_T + k_4 \alpha_{HOCl}^2 Ka_{Cl_2O} [HOCl]_T^2)[CBZ] \quad (III.40)$$

avec,  $\alpha_{HOCl}$  et  $\alpha_{ClO^-}$  acide hypochloreux et hypochlorite fractions du chlore total.

Comme  $[Cl^-] = [HOCl]_T$ :

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = (k_3 \frac{\alpha_{HOCl}}{Ka_{Cl_2}} [H^+] + k_4 \alpha_{HOCl}^2 Ka_{Cl_2O})[CBZ][HOCl]_T^2 \quad (III.41)$$

De même, en considérant l'égalité entre les relations (III.38) et (III.41) et les constantes  $Ka_{Cl_2}$  et  $Ka_{Cl_2O}$ , l'expression suivante de  $k_{app}$  a alors été établie,

$$k_{app} = k_3 \frac{[H^+]^2}{Ka_{Cl_2}([H^+] + Ka_{HOCl})} + k_4 Ka_{Cl_2O} \frac{[H^+]^2}{([H^+] + Ka_{HOCl})^2} \quad (III.42)$$

A partir de cette dernière équation, les constantes  $k_3$  et  $k_4$  ont été calculées par régression multiple de valeurs expérimentales  $k_{app}$ . La régression a été réalisée en utilisant la fonction Solveur Excel afin de minimiser l'écart définie comme  $\Sigma (k_{app\ exp} - k_{app\ theo})^2 / (k_{app\ exp})^2$  où  $k_{exp}$  et  $k_{theo}$  représentant les constantes apparentes expérimentales et théoriques d'ordre 3.

Pour les expériences réalisées à  $pH > 8$ , en raison de la réaction d'ordre 1 par rapport au chlore observée, seules les réactions de HOCl et  $ClO^-$  avec CBZ ont ensuite été considérées (réaction III.32 et III.33). Pour ces valeurs de pH, en raison de l'absence de diminution des valeurs des constantes apparentes de second ordre avec l'augmentation du pH, ( $k_{app} = 0.021 \pm 0.001 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) la réactivité de  $ClO^-$  n'a pas été négligée. Ainsi, la cinétique de chloration de CBZ a été exprimée par la relation suivante,

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = k_{app}[HOCl]_T[CBZ] \quad (III.43)$$

$$\text{ou,} \quad -\frac{d[CBZ]}{dt} = (k_1[HOCl] + k_2[ClO^-])[CBZ] \quad (III.44)$$

soit encore,

$$-\frac{d[CBZ]}{dt} = \left( \frac{k_1[H^+] + k_2 K_{a_{HOCl}}}{[H^+] + K_{a_{HOCl}}} \right) [HOCl]_T [CBZ] \quad (III.45)$$

En considérant l'égalité entre les relations (III.43) et (III.45) et la constante  $K_{a_{HOCl}}$ , l'expression suivante de  $k_{app}$  a alors été obtenue,

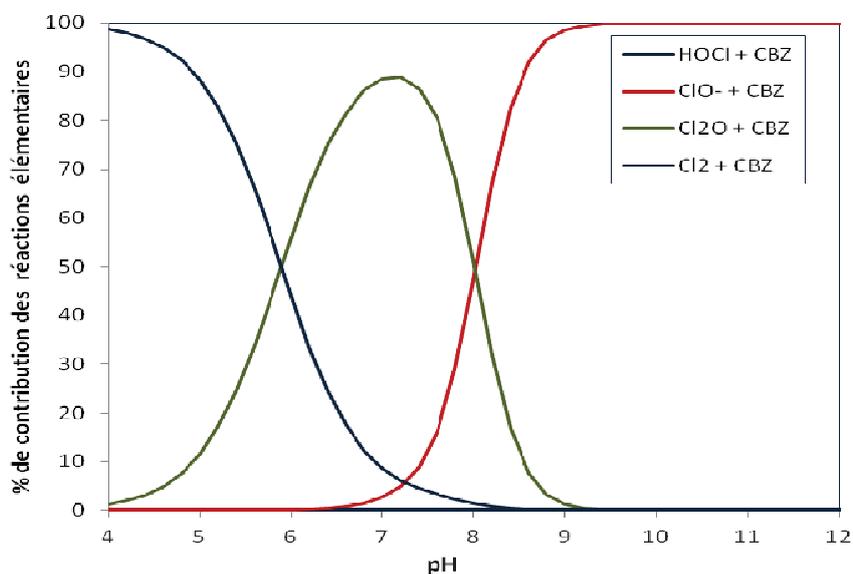
$$k_{app} = \frac{k_1[H^+] + k_2 K_{a_{HOCl}}}{[H^+] + K_{a_{HOCl}}} \quad (III.46)$$

A partir de cette équation, de la même manière que précédemment pour  $k_1$  et  $k_2$ , les valeurs de  $k_3$  et  $k_4$  ont été calculées par régression multiple de  $k_{app}$  expérimentales. Le tableau III.5 montre les valeurs de  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  et  $k_4$  obtenues par cette seconde approche.

**Tableau III.5:** Constantes cinétiques des réactions élémentaires proposées au cours de la chloration de la carbamazépine à  $20 \pm 2$  °C

Reactions élémentaires	constants cinétiques (considérant les 4 réactions)	constants cinétiques (obtenus en deux temps)
HOCl + CBZ	$k_1 < 1,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_1 < 1,00 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$\text{ClO}^- + \text{CBZ}$	$k_2 = 2,34 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_2 = 2,29 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$\text{Cl}_2 + \text{CBZ}$	$k_3 = 7,33 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_3 = 7,34 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
$\text{Cl}_2\text{O} + \text{CBZ}$	$k_4 = 2,18 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$k_4 = 2,35 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Les résultats montrent que les valeurs de  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  et  $k_4$  sont comparables à celles obtenues par l'approche globale qui considère les réactions III.32, III.33, III.34 et III.35 (discutée dans le projet d'article). A partir de ces valeurs, la contribution des réactions élémentaires au cours de la chloration de la carbamazépine a été estimée pour une concentration moyenne en chlore de  $1500 \mu\text{M}$  (Figure III.12). Ces résultats montrent, dans ces conditions, que la réactivité de HOCl est négligeable quel que soit le pH considéré. D'après l'approche globale (choisie pour le projet d'article), à  $\text{pH} \leq 8$ ,  $\text{Cl}_2$  et  $\text{Cl}_2\text{O}$  seraient donc les principales espèces du chlore capables de dégrader la carbamazépine alors qu'à  $\text{pH} > 8$ ,  $\text{ClO}^-$  serait la forme réactive majoritaire.



**Figure III.12:** Contribution des réactions élémentaires au cours de la chloration de la carbamazépine pour  $[HOCl]$  moyenne de  $1500 \mu M$

## IV.2- Sous-produits de chloration et schémas réactionnels

Certains sous-produits de chloration du paracétamol et du diclofénac ont déjà été identifiés dans la littérature (Miyamoto *et al.*, 1997; Bedner et Maccrehan, 2006; Xagorarakis *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2010) alors que la carbamazépine n'a fait l'objet d'aucune étude sur les sous-produits de chloration, à notre connaissance.

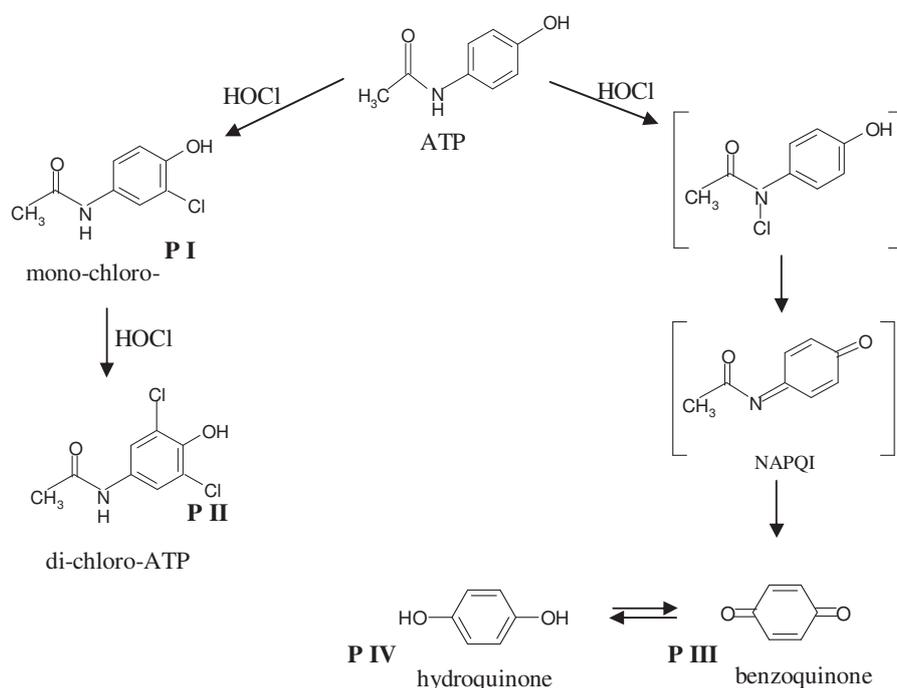
Pour compléter les données de la littérature, un travail d'identification des sous-produits de chloration par analyses CLHP/UV, CLHP/MS et CLHP/MS/MS a été entreprise pour chaque composé.

### IV.2.1- Le paracétamol ou acétaminophène (ATP)

Concernant le paracétamol, quatre sous-produits majoritaires ont été identifiés au cours de ce travail (mono-chloro-paracétamol, di-chloro-paracétamol, benzoquinone et hydroquinone). A côté de ces sous-produits, trois sous-produits minoritaires ont été observés.

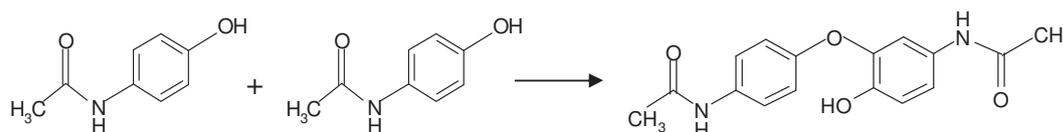
C'est probablement une attaque par substitution électrophile classique d'atomes d'hydrogène par des atomes chlore sur le cycle aromatique qui conduit à la formation des

deux composés majoritaires chlorés (mono-chloro-paracétamol et di-chloro-paracétamol). Une autre attaque électrophile initiale du chlore sur l'atome d'azote est envisagée pour la formation de la benzoquinone et de l'hydroquinone. Cette seconde attaque conduirait à la formation de *N*,acetyl, *p*-benzoquinone imine (NAPQI), un intermédiaire identifié par Bedner et Maccrehan (2006) qui à son tour pourrait générer la formation de benzoquinone et/ou hydroquinone par hydrolyse. Ainsi, pour ces composés majoritaires, le chemin réactionnel présenté dans la Figure III.13 a été proposé.



**Figure III.13:** Chemins réactionnels proposés pour le mécanisme de l'attaque de chlore sur ATP. Les structures proposées entre parenthèses n'ont pas été observées

Concernant les oligomères formés, similairement aux mécanismes précédemment envisagés lors de la chloration de bisphénol A (Hu *et al.*, 2002), des réactions secondaires entre le paracétamol et les sous-produits chlorés ont été envisagées. Des chemins comparables à celui présentés dans la Figure III.14 ont alors été envisagés.



**Figure III.14:** Exemple du chemin réactionnel proposé pour le mécanisme de la formation des oligomères

Dans le cadre de ce travail, l'évolution des sous-produits majoritaires en fonction de la dose du chlore a été réalisée à pH 5, 7 et 9.

Concernant les dérivés chlorés du paracétamol (chloro-ATP (P I) et di-chloro-ATP (P II)), ces produits sont principalement formés en milieu basique. La formation du chloro-ATP (P I), suivie par une dégradation significative, simultanément avec une augmentation de la formation du dichloro-ATP (P II), confirme le chemin réactionnel proposé. Pour ces deux composés, une augmentation de la formation suivie par une diminution lors de l'augmentation de la dose du chlore a été observée. Des transformations supplémentaires de ces composés au cours de la chloration peuvent donc être envisagées.

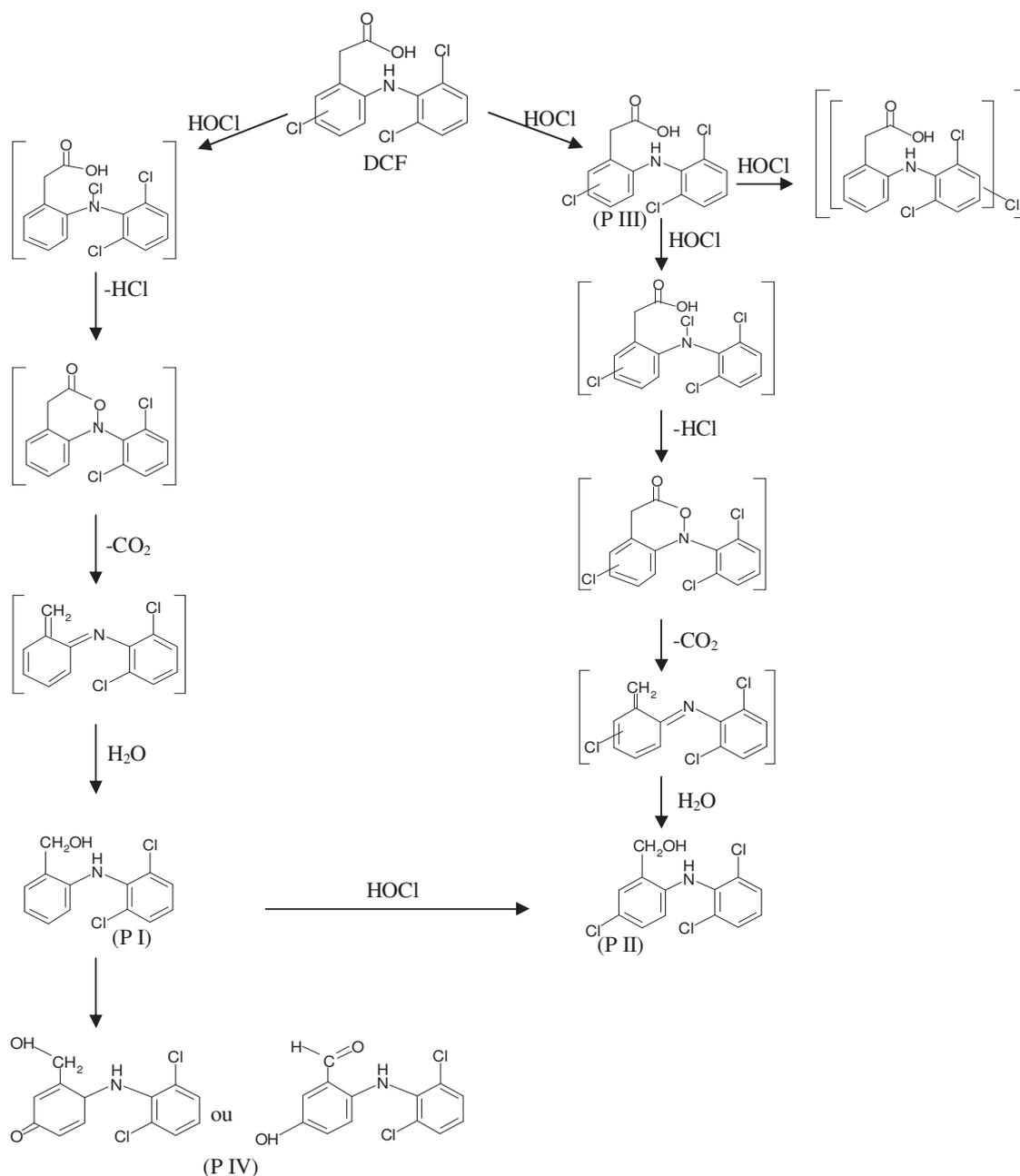
Concernant la benzoquinone, une accumulation dans la solution, même en présence d'un large excès de chlore, a été observée à pH 5, contrairement aux pH 7 et 9. Enfin, une faible formation de l'hydroquinone a été observée quel que soit le pH étudié.

#### **IV.2.2- Le diclofénac (DCF)**

Dans le cas du diclofénac, quatre sous-produits de chloration correspondant notamment au decarboxy-DCF (P I), au chloro-decarboxy-DCF (P II) et au chloro-DCF (P III) ont été identifiés.

Comme précédemment décrit dans le cas du paracétamol, c'est une attaque électrophile du chlore sur le cycle aromatique du diclofénac qui doit probablement conduire à la formation de chloro-DCF (P III). De plus, pour ce composé, une attaque initiale du chlore sur l'atome d'azote pourrait expliquer la formation de decarboxy-DCF (P I), puis du chloro-decarboxy-DCF (P II), voire la formation du produit P IV de structure chimique incertaine.

Pour l'ensemble des composés identifiés, le chemin réactionnel présenté dans la Figure III.15, impliquant une attaque électrophile initiale du chlore sur le noyau aromatique ou sur l'atome d'azote a été proposé.



**Figure III.15:** Chemins réactionnels proposés pour la chloration du DCF.

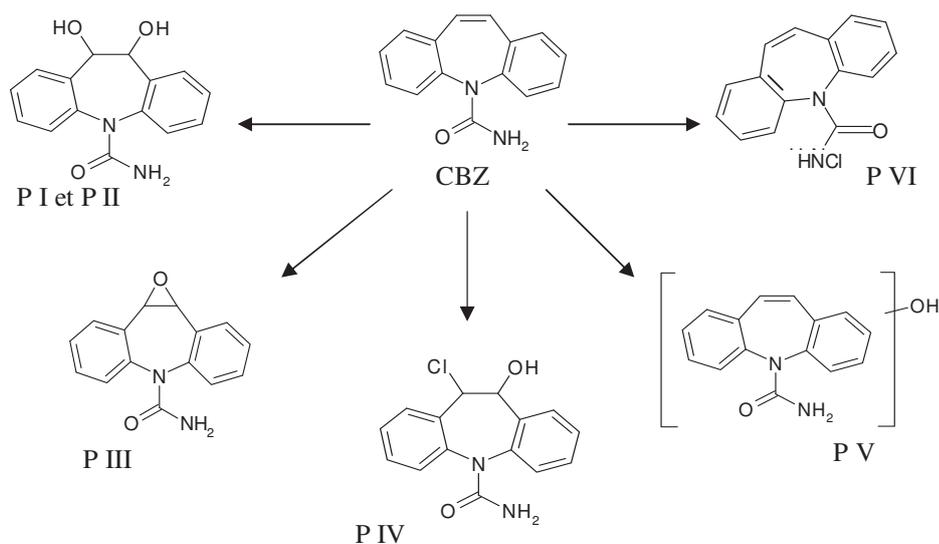
Les structures proposées entre parenthèses n'ont pas été observées

Quel que soit le pH étudié, une formation importante, suivie par une dégradation rapide a été noté pour décarboxy-DCF (P I).

Concernant les autres sous-produits majoritaires, chloro-DCF (P III) et chloro-décarboxy-DCF (P II), une accumulation dans le milieu réactionnel a été observée même en présence d'un large excès en chlore. Pour le produit P IV, une faible formation a été montrée quel que soit le pH étudié.

#### IV.2.3- La carbamazépine (CBZ)

Concernant la carbamazépine, six sous-produits de dégradation par le chlore (dont l'hydroxy-carbamazépine (P V), la carbamazépine époxyde (P III), et des dérivés diols (P I et P II), chloroalcool (P IV) et chloramide de la carbamazépine (P VI)) ont été mis en évidence (Figure III.16). Deux d'entre eux, sont des dérivés chlorés de CBZ.



**Figure III.16:** structures chimiques proposés pour les sous-produits lors de la chloration de CBZ.

La chloramide (P VI) formée principalement (et uniquement) en milieu basique est probablement due à l'attaque lente de l'ion hypochlorite sur l'azote de la fonction amide. L'alcool chloré (P IV) pourrait être la conséquence d'une addition électrophile de HOCl (ou Cl<sub>2</sub>) sur la liaison C10-C11, suivie d'une hydrolyse (telle que proposée par Morris, 1978).

Pour les autres sous-produits majoritairement identifiés, qui sont des produits hydroxylés (P I, P II, P V) et un époxyde (P III), aucun mécanisme sérieux ne peut être proposé dans l'état actuel de nos travaux et des connaissances, notamment sur les mécanismes d'action de l'hémioxyde de chlore ( $\text{Cl}_2\text{O}$ ) et/ou du dichlore ( $\text{Cl}_2$ ) qui sont les voies privilégiées au plan cinétique en milieu acide et neutre. Le constat de sous-produits similaires à ceux observés lors de la photolyse ou de l'ozonation (Vogna *et al.*, 2004; Lam *et al.*, 2005), pourrait laisser envisager un mécanisme radicalaire (via le radical OH).

A l'exception de la chloration à pH 9, qui est toutefois très lente, ces sous-produits hydroxylés semblent être très stables, notamment à pH 7.

### IV.3- Application à la désinfection des eaux

En France, le Ministère de la Santé autorise l'utilisation de procédés oxydants (chloration, ozonation, ...) au sein des filières de traitement des eaux, principalement comme désinfectant et accessoirement comme aide à la clarification, mais ne les conseille pas pour dégrader des polluants. La chloration en particulier peut être utilisée pour oxyder certains polluants minéraux (comme  $\text{NH}_4^+$  par exemple), mais n'est jamais communément employée pour l'élimination des polluants organiques. Toutefois, lorsque des polluants organiques sont présents dans les eaux à traiter, il est important de connaître leur réactivité vis-à-vis des désinfectants usuels ainsi que la nature des éventuels sous-produits formés.

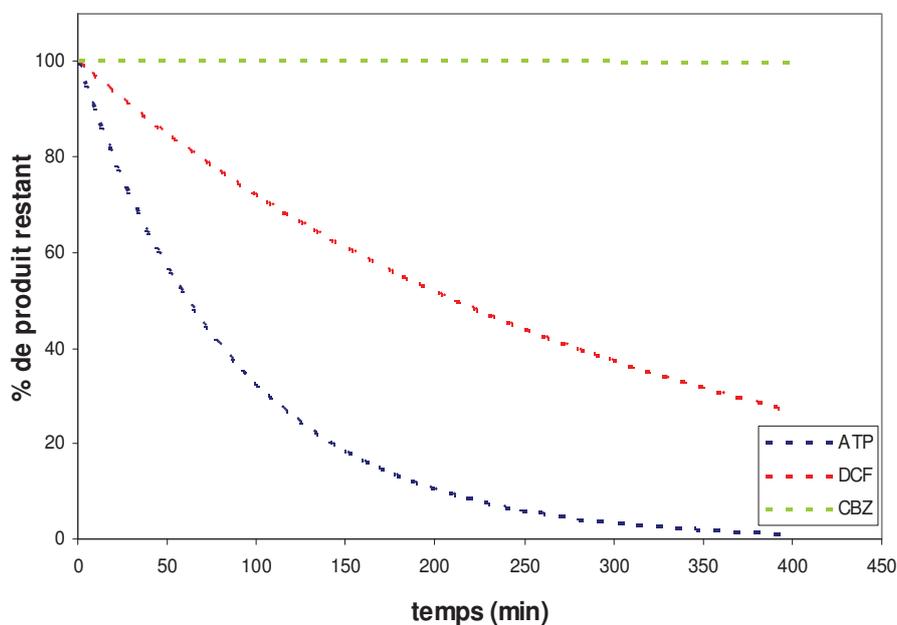
A partir de l'étude cinétique réalisée au cours de ce travail, à pH 7, pour chacun des composés étudiés, les valeurs des constantes apparentes de chloration calculées à  $20 \pm 2$  °C sont reportées dans le tableau III.6.

**Tableau III.6:** Constantes cinétiques apparentes de chloration estimées à pH 7 et  $20 \pm 2$  °C pour le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine

Composés	$k_{app}$
Paracétamol (ATP)	$13,4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Diclofénac (DCF)	$3,9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
Carbamazépine (CBZ)	$138 \text{ M}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

A partir de ces résultats, de manière à apprécier les effets de la désinfection par le chlore sur l'élimination des différents composés étudiés au cours de la filière de traitement des eaux, la Figure III.17 représente, à pH 7 et  $20 \pm 2$  °C, une estimation de l'élimination du

paracétamol, du diclofénac et de la carbamazépine en fonction de temps d'exposition pour une concentration constante de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  en chlore résiduel.



**Figure III.17:** Estimation de l'élimination du paracétamol (ATP), du diclofénac (DCF) et de la carbamazépine (CBZ) au cours la désinfection par le chlore à  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  à pH 7 et à  $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Pour la chloration, dans ces conditions, des temps de demi-vie d'environ de 61 min, 215 min et 7118 h peuvent être calculés pour le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine respectivement.

Dans les conditions de traitement des eaux, les valeurs de « Ct » les plus fréquemment utilisées sont rarement supérieures à  $50 \text{ mg.min.L}^{-1}$  pour la chloration (en excluant le réseau).

Ainsi, ces résultats laissent espérer, au cours de la production d'eau potable pour un Ct de  $50 \text{ mg.min.L}^{-1}$  au maximum, une élimination rapide par le chlore du paracétamol (environ de 45 % de dégradation), et une élimination faible pour le diclofénac (environ de 15 % de dégradation). En ce qui concerne la carbamazépine, bien que le même calcul ne s'applique pas, son élimination par le chlore peut être, en revanche, considérée comme négligeable.

Lors de la chloration des différents composés étudiés, de nombreux sous-produits ont été mis en évidence, dont, certains déjà mentionnés dans la littérature.

Certains de ces sous-produits résistent à la chloration encore plus que leur molécule mère. L'analyse d'eau traitée devra donc prendre en compte ces sous-produits, notamment la benzoquinone (P III pour l'ATP), le chloro-decarboxy-DCF et le chloro-DCF (P II et P III pour le DCF). Malgré sa faible réactivité, la CBZ pourra générer en réseau dans certaines conditions (i.e. chloration choc en réseau) des diols CBZ stables, voire l'époxyde CBZ.

---

## **Conclusion**

---

## CONCLUSION

L'objectif général de ce travail entrepris au laboratoire était de contribuer à une meilleure connaissance du devenir des composés pharmaceutiques au cours de la désinfection des eaux destinées à la consommation humaine. Pour cela, une étude de l'oxydation par le chlore de trois composés pharmaceutiques (le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine) a été menée.

Cette étude a été réalisée en deux parties principales: en première partie, de manière à déterminer la réactivité du chlore vis-à-vis des différents composés étudiés, une étude cinétique de réaction à  $20 \pm 2$  °C et différents pH a été effectuée; en deuxième partie, pour chaque composé, une étude des sous-produits de chloration a été réalisée.

L'étude cinétique de réaction a été effectuée, pour les expériences de chloration, en présence d'un large excès en chlore.

Dans ces conditions, des réactions d'ordre partiel 1 par rapport au chlore, pour le paracétamol et le diclofénac, et 2 pour la carbamazépine ont été notées. Lors de la chloration, une dégradation plus ou moins rapide suivant le pH et le composé étudié a été observée. Pour le paracétamol (ATP), cette dégradation a été attribuée, aux réactions élémentaires de HOCl avec les formes ionisée et non ionisée d'ATP ( $5,5 \cdot 10^3$  et  $1,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement). Concernant le diclofénac (DCF), les réactions élémentaires de DCF totale avec HOCl et HOCl catalysée par les ions  $\text{H}^+$  ( $2,5$  et  $1,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement), ont été proposées. En ce qui concerne la carbamazépine (CBZ), qui se présente sous une seule forme dans le milieu réactionnel, à côté des réactions de HOCl et  $\text{ClO}^-$  avec CBZ ( $< 1,0 \cdot 10^{-4}$  et  $2,3 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), les réactions de  $\text{Cl}_2$  et  $\text{Cl}_2\text{O}$  ont été prises en compte ( $7,3 \cdot 10^4$  et  $2,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivement). Ainsi, à pH 7 et 20 °C, des constantes cinétiques apparentes de réaction de l'ordre de 13,4 et  $3,9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  et de  $138 \text{ M}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  sont attendues pour le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine respectivement.

A cette valeur de pH, des valeurs de constante cinétique d'ozonation de l'ordre de  $6,5 \cdot 10^6$ ,  $1,1 \cdot 10^6$  et  $7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ont été rapportées dans la littérature pour le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine respectivement. Une dégradation plus rapide de ces composés est donc attendue au cours de l'ozonation.

Egalement réalisée, en présence d'un excès de chlore, l'étude des sous-produits de chloration de chaque composé, a été effectuée à pH 5, 7, 9.

Dans ces conditions, pour le paracétamol, quatre sous-produits principaux d'oxydation (mono-chloro-ATP, di-chloro-ATP, benzoquinone et hydroquinone) issus probablement d'une attaque électrophile initiale du chlore sur le cycle aromatique ou l'atome d'azote ont été identifiés. De plus, trois oligomères ont été observés. De même, pour le diclofénac, quatre sous-produits (dont notamment le decarboxy-DCF, le chloro-decarboxy-DCF, le chloro-DCF et P IV) ont été mis en évidence. Une attaque électrophile du chlore sur le cycle aromatique du diclofénac ou sur l'atome d'azote, ont été proposées pour expliquer la formation de ces composés. Concernant la carbamazépine, cinq sous-produits de dégradation (hydroxy-CBZ, CBZ époxyde, des dérivés diols, chloroalcool et chloramide de CBZ) ont été mis en évidence. Deux d'entre eux, sont des dérivés chlorés de CBZ.

Au cours de l'ozonation, différents sous-produits de dégradation ont également été reportés dans la littérature. Ces sous-produits d'ozonation seraient issus principalement d'une attaque électrophile initiale de l'ozone sur le cycle aromatique du paracétamol et du diclofénac, ou sur la double liaison 10-11 de la carbamazépine.

Dans les conditions industrielles de désinfection des eaux, c'est le concept du « Ct » (concentration résiduelle en désinfectant × temps de contact ou exposition au désinfectant) qui permet de gérer cette étape primordiale pour la Santé Publique et des valeurs rarement supérieures à 50 mg.min.L<sup>-1</sup> sont généralement utilisées (en excluant le réseau). Nos résultats laissent espérer une élimination significative par le chlore de paracétamol avec un temps de demi-vie de 61 min, pour 1 mg.L<sup>-1</sup>. Dans le cas de diclofénac, une dégradation lente de ce composé avec un temps de demi-vie d'environ 4 h pour une concentration en chlore de 1 mg.L<sup>-1</sup> est attendue au cours de chloration. Dans le cas de la carbamazépine, une grande persistance a été observée lors de la chloration, et un temps de demi-vie dépassant de 295 jours a été estimé.

D'après les données de la littérature, pour une même concentration en ozone, des temps de demi-vie < 0,05 s sont attendus.

En matière de perspectives, afin d'évaluer au mieux le risque potentiel lié à la présence des composés pharmaceutiques dans les eaux lors de la désinfection par le chlore,

des études complémentaires pourraient être menées dans des conditions plus réalistes (par exemple par chloration d'eaux naturelles dopées ou non). Des études portant l'activité biologique des sous-produits d'oxydation pourraient être aussi envisagées. Un suivi au sein d'usines de traitement des eaux de ces composés et de leurs sous-produits, couplé à des mesures d'activité biologique (par des tests *in vitro* et *in vivo*) pourrait être réalisé afin de confirmer les résultats obtenus à l'échelle du laboratoire.

Au plan fondamental, l'approfondissement des connaissances sur la réactivité de certaines espèces minoritaires du chlore, comme l'hémioxyde de chlore  $\text{Cl}_2\text{O}$ , le dichlore  $\text{Cl}_2$  ou l'espèce  $\text{H}_2\text{OCl}^+$  sur des structures chimiques plus simples que les composés pharmaceutiques semble nécessaire.

---

## **Références bibliographiques**

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Académie nationale de Pharmacie (2008) "MEDICAMENTS ET ENVIRONNEMENT".
- Abia L., Armesto X.L., Canle L. M., Garcia M.V., Santabaila J.A. (1998) "Oxidation of Aliphatic Amines by Aqueous Chlorine" *Tetrahedron*, **54**, 521-530.
- AFNOR Recueil de normes françaises. NTF (1994) 90 - 038, 403 - 414.
- Albert A., Serjeant E.P., (1984) "The determination of Ionization Constants" A Laboratory Manual, 3rd Ed.; Chapman and Hall: New York.
- Alcaide E. Garay E. (1984) "R-Plasmid Transfer in Salmonella spp. Isolated from wastewater and Sewage –Contaminated surface water" *Applied and Environmental Microbiology*, **48**, 435-438.
- Alder A.C., Joss A., McArdeell C.S., Ternes T.A. (2006) "Consumption and occurrence" in: Ternes T.A, Joss A. (Eds), Human Pharmaceuticals, hormones and fragrances. The challenge of micropollutants in urban water management. IWA publishing, London, New York.
- Andreozzi R., MarottaR., Praéxus N.A. (2003) "Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment" *Chemosphere*, **50**, 1319-1330.
- Andreozzi R., Caprio V., Marotta R., Vogna D. (2003b) "Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV system" *Water Research*, **37**, 993-1004.
- Arotsky, J., Symons., M.C.R. (1962) "Halogen cations" *Quarterly Review of the Chemical Society*, **16**, 282-297.
- Bader H., Hoigné J. (1982) "Determination of ozone-mechanisms in aqueous media" In: Ozone in Water and Wastewater Treatment, Evans F.L, Ann Arbor Science Publishers Inc, Chap. III, 29-59.

Bailey P.S. (1972) "Organic grouping reactive toward ozone-mechanisms in aqueous media" In: *Ozone in Water and Wastewater Treatment*, Evans F.L, Ann Arbor Science Publishers Inc, Chap. III, 29-59.

Batty J., Lim R. (1999) "Morphological and reproductive characteristics of male mosquitofish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage-contaminated water in New South Wales, Australia" *Archive Environmental contamination Toxicology*, **36**, 301-307.

Beausse J. (2004) "Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances" *Analytical Chemistry*, **23**, 753-761.

Bedner M., Maccreehan W.A. (2006) "Transformation of Acetaminophen by Chlorination Produces the Toxicants 1,4-Benzoquinone and N-Acetyl-p-benzoquinone Imine" *Environmental Science and Technology*, **40**, 516-522.

Bendz D., Paxéus N.A., Ginn T.R., Loge F.J. (2005) "Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden" *Journal of Hazardous Materials*, **122**, 195-204.

Bessems J.G., Vermeulen N.P. (2001) "Paracetamol (acetaminophen)? Induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches" *Critical Review in Toxicology*, **31**, 55-138.

Boyd G.R., Reemtsma H., Grimm D.A., Mitra S. (2003) "Pharmaceuticals and personal care products in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada", *The Science of the Total Environment*, **311**, 135-149.

Boyd G.R., Shaoyuan Z., Grimm D.A. (2005) "Naproxen removal from water by chlorination and biofilm processes", *Water Research*, **39**, 668-676.

Budzinski H., Togola A. (2006) "Présence des résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique", *Environnement Risques et Santé*, **5**, 248-252.

Burttschell R.M., Rosen A.A., Middleton F.M., Ettinger M. B. *J.A.W.W.A.* (1959), **51**, 205-214.

Calamari D., Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R., Fanelli R. (2003) "Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy" *Environmental Science and Technology*, **37**, 1241-1248.

Carlson R.M., Caple R. (1978) "Organochemical implications of water chlorination" In: Jolleys R.L. (Ed), *Water chlorination: Environmental impact and health effects*. Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 65-75.

Carlsson C., Johansson A.K., Alvan G., Bergman K., Kühler T. (2006) "Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients" *Science of the Total Environment*, **364**, 67-87.

Cherney D.P., Duirk S.E., Tarr J.C., Colette T.W. (2006) "Monitoring the speciation of aqueous free chlorine from pH 1 to 12 with Raman spectroscopy to determine the identity of potent low-pH oxidant" *Applied Spectroscopy*, **60**, 764-772.

Coelho A.D., Sans C., Agüera A., Gómez M.J. (2009) "Effects of ozone pre-treatment on diclofenac: Intermediates, biodegradability and toxicity assessment" *Science of the Total Environment*, **407**, 3572-3578.

Cleuvers M. (2003) "Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects" *Toxicology Letters*, **142**, 185-194.

Dasmalchi S., Rashidi M., Rassi M. (1995) "Simultaneous determination of the pKa and octanol/water partition coefficient (Pm) of acetaminophen" *J. School Pharm. Med. Sci. Tehran University*, **4**, 7-14.

Deborde M., Von Gunten U. (2008) "Reactions of chlorine with inorganic and organic compounds during water treatment-kinetics and mechanisms: A critical review" *Water Research*, **42**, 13-51.

Deborde M., Rabouan S., Gallard H., Legube B. (2004) "Aqueous chlorination kinetics of some endocrine disruptors" *Environmental Science and Technology*, **38**, 5577-5583.

De Laat J., Merlet N., Doré M. (1982) "Chloration de composés organiques : Demande en chlore et réactivité vis-à-vis de la formation en trihalométhanes" *Water Research*, **16**, 1437-1450.

- De La Mare P.B.D. (1974) "Pathways in electrophilic aromatic substitutions. Cyclohexadienes and related compounds as intermediates in halogenation" *Account of Chemical Research*, **7**, 361-368.
- Dodd M.C., Huang C.H. (2007) "Aqueous chlorination of the antibacterial agent trimethoprim: reaction kinetics and pathways" *Water Research*, **41**, 647-655.
- Doré M. (1989) "Chimie des oxydants et traitement des eaux" Edition Technique et Documentation. Lavoisier, Paris.
- Doros P. (1999) In guide pratique des médicaments, Edition Maloine, Paris.
- Ellis J.B. (2006) "Pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in urban receiving waters" *Environmental Pollution*, **144**, 184-189.
- Ferrari B., Paxeus N., Lo Giudice R., Pollio A., Garric J. (2003) "Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac" *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**, 450-450.
- Ferreira C.S.G., Nunes B.A., de Melo Henriques-Almeida J.M., Guilhermino L. (2007) "Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*" *Ecotoxicology Environmental Safety*, **67**, 452-458.
- Gallard H., Von Gunten U. (2002) "Chlorination of phenols: kinetics and formation of chloroform" *Environmental Science and Technology*, **36**, 884-890.
- Gallard H., Leclercq A., Croué J.P. (2004) "Chlorination of bisphenol A: kinetics and byproducts formation" *Chemosphere*, **56**, 465-473.
- Ghanbari H.A., Wheeler W.B., Kirk J.R. (1983) "Reactions of chlorine and chlorine dioxide with free fatty acids, fatty acid esters, and triglycerides" In: Jolleys R.L., Brungs W.A., Cotruvo J.A., Cumming R.B., Mattice J.S., Jacobs V.A., (Eds), *Water chlorination: Environmental impact and health effects*, **4**, Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 167-177.

Gibs J., Stackelberg P.E., Furlong E.T., Meyer M., Zaugg S.D., Lippincott R.L. (2007) "Persistence of pharmaceuticals and other organic compounds in chlorinated drinking water as a function of time" *Science of the Total Environment*, **373**, 240-249.

Gibson T.M., Haley J., Righton M., Watts C.D. (1986) "Chlorination of fatty acids during water treatment disinfection: reactivity and product identification" *Environmental Technology Letters*, **7**, 365-372.

Glassmeyer S.T., Shoemaker J.A. (2005) "Effects of chlorination on the persistence of pharmaceuticals in the environment" *Environmental Contamination and Toxicology*, **74**, 24-31.

Guardabassi L., Dalsgaard A., Olsen J. E. (1999) "Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. Isolated from aquatic sources" *Applied Microbiology.*, **87**, 659-667.

Guo Y.C., Krasner S.W. (2009) " Occurrence of primidone, carbamazepine, caffeine and precursor for N-nitrosodimethylamine in drinking waters sources impacted by wastewater" *Journal of the American Water Ressources Association*, **45**, 58-67.

Halling-Sørensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhøft H.C., Jørgensen S.E. (1998) "Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A Review" *Chemosphere*, **36**, 357-393.

Harshbarger J.C., Coffey M.J., Young M.Y. (2000) "Intersexes in Mississippi river shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA" *Marine Environmental*, **50**, 247-250.

Heberer T., Fuhrmann B., Schmidt-Baumler K., Tsipi D., Koutsouba V., Hiskia A. In: Daughton C.G., Jones-Lepp T. (Editors) "Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Scientific and Regulatory Issues" Symposium Series 791, American Chemical Society, Washington, DC, USA, (2001), p. 70.

Heberer T. (2002) "Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data" *Toxicology Letters*, **131**, 5-17.

- Heberer T., Mechlinski A., Fanck B., Knappe A., Massmann G., Pekdeger A., Fritz B. (2004) "Field studies on the fate and transport of pharmaceutical residues in bank filtration" *Ground Water Monitoring and Remediation*; **24**, 70-77.
- Henschel K. P., Wenzel A., Diedrich M., Flidner A. (1997) "Environmental hazard assessment of pharmaceuticals" *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **25**, 220-225.
- Hernando M.D., Mezcua M., Fernandez-Alba A.R., Barcelo D. (2006) "Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments" *Talanta*, **69**, 334-342.
- Hoigné J., Bader H. (1983) "Rate constants for reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-I" *Water Research*, **17**, 185-194.
- Hoigné J., Bader H., Haag W.R., Staehelin J. (1985) "Rate constants of reactions of ozone with organic and inorganic compounds in water-III" *Water Research*, **19**, 993-1004.
- Hu J.Y., Aizawa T., Ookubo S. (2002) "Products of aqueous chlorination of bisphenol A and their estrogenic activity" *Environmental Science and Technology*, **36**, 1980–1987.
- Huber M.M., Canonica S., Park G.Y., Von Gunten U. (2003) "Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes" *Environmental Science and Technology*, **37**, 1016-1024.
- Janex M.L., Bruchet A., Levi Y., Ternes T.A. Paper of Oral Presentation at WQTC Seattle, November 2002.
- Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N. (2001) "Human pharmaceutical in the aquatic environment" *Environmental Technology*, **22**, 1383-1394.
- Jones O.A.H, Voulvoulis N, Lester J.N. (2002) "Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals" *Water Research*, **36**, 5013-5022.
- Jones O.A.H., Voulvoulis N., Lester J.N. (2003) "Potential impact of pharmaceuticals on environmental health" *Bulletin of the World Health Organization*, **81**, 768-769

Joss A., Zabczynski S., Göbel A., Hoffman B., Löffler D., McArdell C.S., Ternes T.A., Thomsen A., Siegrist H. (2006) "Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme" *Water Research*, **40**, 1686-1696.

Joyeux M. (2006) "Résidus médicamenteux et risques sanitaires d'origine hydrique" *Environnement Risques Santé*, **5**, 301-306.

Khan S.J., Ongerth J.E. (2002) "Estimation of pharmaceutical residues in primary and secondary sewage sludge based on quantities of use and fugacity modelling" *Water Science and Technology*, **46**, 105-113.

Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.A.T. (2002) "Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance" *Environmental Science & Technology*, **36**, 1202-1211.

Kopperman H.L., Hallcher R.C., Riehl A., Carlson R.M., Caple R. (1976) "Aqueous chlorination of  $\alpha$ -terpineol" *Tetrahedron*, **32**, 1621-1626.

Kumar K., Margerum D.W. (1987) "kinetics and mechanism of general acid assisted oxidation of bromide by hypochlorite and hypochlorous acid" *Inorganic Chemistry*, **26**, 2706-2711.

Kümmerer K., Helmers E. (2000) "Hospitals as a source of gadolinium in the aquatic environment" *Environmental Science and Technology*, **34**, 573-577.

Lam M.W., Mabury S.A. (2005) "Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters" *Aquatic Sciences*, **67**, 177-188.

Lee G.F., Morris J.C. (1962) "Kinetics of chlorination of phenol – chlorophenolic tasted and odors" *International Journal Air and Water Pollution*, **6**, 419-431.

Legube B. (1996) "Le traitement des eaux de surface pour la production d'eau potable" Guide Technique, Agence de l'eau Loire et Bretagne.

- Lewin M., Avrohami M. (1955) "The decomposition of hypochlorite-hypobromite mixtures in the pH range 7-10" *Journal of the American Chemical Society*, **77**, 4491-4498.
- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., McCormick D. (1997) "Abnormalities in the reproductive health of the flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works" *Marine Pollution Bulletin*, **34**, 34-41.
- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E. (1998) "Seasonal reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to sewage effluent" *Marine Ecology - Progress Series*, **170**, 249-260.
- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., Cooper D.W., Jones D.M. (1999) "Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments and water from U.K. Tyne and Tee estuaries" *Environmental Science and Technology*, **33**, 1009-1014.
- McDowell D.C., Huber M.M., Wagner M., Von Gunten U., Ternes T.A. (2005) "Ozonation of carbamazepine in drinking water: identification and kinetic study of major oxidation products" *Environmental Science and Technology*, **39**, 8014-8022.
- Metcalf C.D., Miao X.S., Servos M. (2004) "Pharmaceuticals in the Canadian environment" In: Kümmerer K. (Ed), "Pharmaceuticals in the environment-sources, fate, effects and risks" Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 67-90.
- Miyamoto G., Zahid N., Uetrecht J.P. (1997) "Oxidation of Diclofenac to Reactive Intermediates by Neutrophils, Myeloperoxidase, and Hypochlorous Acid" *Chemical Research in Toxicology*, **10**, 414-419.
- Moldovan Z. (2006) "Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania" *Chemosphere*, **64**, 1808-1817.
- Mompelat S., Leblot B., Thomas O. (2008) "Occurrence and fate of pharmaceutical products and byproducts from resource to drinking water" *Environmental International*, **35**, 803-814.
- Morris J.C. (1966) "The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35" *Journal of Physical Chemistry*, **70**, 3798-3805.

Morris J.C. (1967) "Kinetics of reactions between aqueous chlorine and nitrogen compounds" In: Faust, S.D., Hunter, J.V. (Eds) Principles and Applications of water Chemistry. Wiley, New York, 23-53.

Morris J.C. (1978) "The chemistry of aqueous chlorine in relation to water chlorination" In: Jolleys R.L. (Ed) Water chlorination: Environmental impact and health effects, 1, Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 21-35.

Moubarek C., Bourgeois N., Doucet-Populaire F. (2003) "L'utilisation des antibiotiques en pratique vétérinaire et ses risques pour la santé humaine" *Environnement Risques Santé*, 2, 97-104.

Nagy J.C., Kumar K., Margerum D.W. (1988) "Non-metal kinetics: Oxidation of iodide by hypochlorous acid and nitrogen trichloride measured by the pulsed accelerated flow method" *Inorganic Chemistry*, 27, 2773-2780.

Oaks J.L., Gilbert M., Virani M.Z., Watson R.T., Meteyer C.U., Rideout B.A., Shivaprasad H.L., Ahmed S., Chaudhry M.J.I., Arshad M., Mahmoud S., All A., Khan A.A. (2004) "Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan" *Nature*, 427, 630-633.

Oyler A.R., Liukkonen R.J., Lukasewycz M.T., Helkkila K.E., Cox D.A., Carlson R.M. (1983) "Chlorine disinfection chemistry of aromatic compounds. Polynuclear aromatic hydrocarbons: rates, products and mechanisms" *Environmental Science & Technology*, 17, 334-342.

Paffoni C., Welte B., Gousailles M., Montiel A. (2006) "Nouvelles molécules mises en cause par les directives européennes : de la station d'épuration à l'usine de traitement d'eau potable" *Journal Européen d'Hydrologie*, 37, 21-37.

Pattison D.I., Davies M.J. (2001) "Absolute Rate Constants for the Reaction of Hypochlorous Acid with Protein Side Chains and Peptide Bonds" *Chemical Research in Toxicology*, 14, 1453-1464.

Pinkston K.E., Sedlak D.L. (2004) "Transformation of aromatic ether- and amine-containing pharmaceuticals during chlorine disinfection" *Environmental Science and Technology*, **38**, 4019-4025.

Prutz W.A. (1999) "Consecutive halogen transfer between various functional groups induced by reaction of hypohalous acids: NADH oxidation by halogenated amide groups" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **371**, 107-114.

Quintana J.B., Rodil R., Lopez-Mahia P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodríguez D. (2010) "Investigating the chlorination of acidic pharmaceuticals and by-product formation aided by an experimental design methodology" *Water research*, **44**, 243-255.

Rabasso N. (2011) "Chimie organique: généralités, études des grandes fonctions et méthodes spectroscopiques" 2<sup>e</sup> édition, Edition de boeck, Bruxelles.

Rebenne L.M., Gonzalez A.C., Olson T.M. (1996) "Aqueous chlorination kinetics and mechanism of substituted dihydrobenzenes" *Environmental Science & Technology*, **30**, 2235-2242.

Reinhard M., Stumm W. (1980) "Kinetics of chlorination of p-xylene in aqueous solution" In: Jolley R.L., Brungs W.A., Cumming R.B., Jacobs V.A. (Eds) *Water Chlorination: Environmental Impact and Health Effects*, **3**, Ann Arbor Science Publishers, Michigan, 209-218.

Rodier J., Legube B., Merlet N. (2009) "L'analyse de l'eau" Dunod, Paris.

Rosal R., Rodriguez A., Perdigon-Melon J.A., Petre A., Garcia-Calvo E., Gomez M.J., Aguera A., Fernandez-Alba A.R. (2010) "Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation" *Water Research*, **44**, 578-588.

Sacher F., Lange F.T., Brauch H.J., Blankenhorn I. (2001) "Pharmaceuticals in ground waters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany" *Chromatography A*, **938**, 199-210

Santos L. H.M.L.M., Araujo A.N., Adriano Fachini., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M. (2010) “Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment” *Hazardous Materials*, **175**, 45-95.

Schlenk D. (2008) “Are steroids really the cause for fish feminization? A mini-review of in vitro and in vivo guided TIEs” *Marine Pollution Bulletin*, **57**, 250-254.

Seiler R.L., Zaugg S.D., Thomas J.M., Howcroft D.L. (1999) “Caffeine and pharmaceuticals as indicators of wastewater contamination in wells” *Ground Water*, **37**, 405-410.

Sivey J., Mccullough C., Roberts A.L. (2010) “Chlorine monoxide (Cl<sub>2</sub>O) and molecular chlorine (Cl<sub>2</sub>) as active chlorinating agent in reaction of dimethenamide with aqueous free chlorine” *Environmental Science and Technology*, **44**, 3357-3362.

Shao B., Chen D., Zhang J., Wu Y., Sun C. (2009) “Determination of 76 pharmaceutical drugs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in slaughterhouse wastewater” *Chromatography A*, **1216**, 8312–8318.

Sorasuchart W., Wardrop J., Ayres J.W. (1999) “Drug release from spray layered and coated drug-containing beads: effects of pH and comparison of different dissolution methods” *Drug Development and Industry Pharmacy*, **25**, 1093–1098.

Stackelberg P.E., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Henderson A.K., Reissman D.B. (2004) “Decomposition of ozone in water: Rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide” *Science of the Total Environment*, **329**, 99–113.

Stackelberg P.E., Gibs J., Furlong E.T., Meyer M.T., Zaugg S.D., Lippincott R.L. (2007) “Efficiency of conventional drinking-water-treatment processes in removal of pharmaceuticals and other organic compounds” *Science of the Total Environment*, **377**, 255-272.

Standard Méthodes for the Examination Water and Wastewater (1995) 19<sup>th</sup> edition, ALPHA-AWWA-WPCF.

Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodrigues S.V., Baumann W. (1999) “Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil” *The Science of the Total Environment*, **225**, 135-141.

Sumpter J.P., Johnson A.C., Williams R.J. (2006) "Modeling effects of mixtures of endocrine disrupting chemicals at the river catchment scale" *Environmental Science and Technology*, **40**, 5478-5489.

Tamtam F., Mercier F., Le Bot B., Eurin J., Dinh Q.T., Clément M., Chevreuil M. (2008) "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers" *Science of the Total Environment*, **393**, 84-95.

Ternes T.A. (1998) "Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers" *Water Research*, **32**, 3245-3260.

Ternes T.A., Herrmann N., Bonerz M., Knacker T., Siegrist H., Joss A. (2004) "A rapid method to measure the solid-water distribution coefficient (K<sub>d</sub>) for pharmaceuticals and musk fragrance in sewage sludge" *Water Research*, **38**, 4075-4084.

Ternes T.A., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H.J., Haist-Gulde B., Preuss G., Wilme U., Zulei-Seibert N. (2002) "Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment" *Environmental Science and Technology*, **36**, 3855-3863.

Thomm E.W.C.W., Wayman M. (1969) "N-chlorination of secondary amides. II. Effects of substitutions on rate of N-chlorination" *Canadian Journal of Chemistry*, **47**, 3289-3297.

Togola A., Budzinski H. (2008) "Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples" *Journal of Chromatography A*, **1177**, 150-158.

Tauber R. (2003) "Quantitative Analysis of Pharmaceuticals in Drinking Water from Ten Canadian Cities" Enviro-Test Laboratories, Xenos Division, Ontario, Canada.

Thèse d'Université de BONNIN Cécile; "Étude cinétique de la chloration de quelques micropolluants aqueux: le diclofénac, l'acide salicylique et l'acide clofibrique" soutenue le 14 novembre 2006 à l'Université de Poitiers

Vasconcelos T., Henriques D.M., König A., Martins A.F., Kümmerer K. (2009) "Photodegradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products" *Chemosphere*, **76**, 487-493.

- Vieno N., Tukkanen T., Kronberg L. (2007) "Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland" *Water Research*, **41**, 1001-1012.
- Vogna D., Marotta R., Napolitano A., Andreozzi R., d'Ischia M. (2004) "Advanced oxidation of pharmaceutical drug diclofenac with UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and ozone" *Water Research*, **38**, 414- 422.
- Wang T.X., Margerum D.W. (1994) "Kinetics of reversible chlorine hydrolysis: Temperature dependence and general-acid / base assisted mechanisms" *Inorganic Chemistry*, **33**, 1050-1055.
- Weast R.C. (1980-1981) In: Handbook of Chemistry and Physics, 61<sup>st</sup> Edition, CRC Press Inc, Boca Raton, Florida.
- Westerhoff P., Yoon Y., Snyder S., Wert E. (2005) "Fate of Endocrine Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes" *Environmental Science and Technology*, **39**, 6649-6663.
- Wiegel S., Aulinger A., Brockmeyer R., Harms H., Löffler J., Reincke H., Schmidt R., Stachel B., Von Tümpling W., Wanke A. (2004) "Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries" *Chemosphere*, **57**, 107-126.
- Xagorarakis I., Hullman R., Song W., Li H., Voice T. (2008) "Effect of pH on degradation of acetaminophen and production of 1,4-benzoquinone in water chlorination" *Research and Technology*, **57.6**, 381-390.
- Xu J., Wu L., Chang A.C. (2009) "Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils" *Chemosphere*, **77**, 1299-1305.
- Yu Y., Wu L. (2011) "Comparison of four extraction methods for the analysis of pharmaceuticals in wastewater" *Chromatography A*, **1218**, 2483-2489.
- Yu J.T., Bouwer E.J., Coelhan M. (2006) "Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent" *Agricultural Water Management*, **86**, 72-80.
- Zimmermann G., Strong F.C. (1957) "Equilibria and spectra of aqueous chlorine solutions" *Journal of the American Chemical Society*, **79**, 2063-2066.

*Références bibliographiques*

Zuccato E., Calamari D., Natangelo M., Fanelli R. (2000) "Presence of therapeutic drugs in the environment" *The Lancet*, **355**, 1789-1790.

Zwiener C., Frimmel F.H. (2000) "Oxidative treatment of pharmaceuticals in water" *Water Research*, **34**, 1881-1885.

## RESUME

L'objectif de ce travail a été de contribuer à une meilleure connaissance du devenir des composés pharmaceutiques au cours de la filière de traitement des eaux. Pour cela, une étude de l'oxydation par le chlore (un procédé de désinfection fréquemment employé comme étape de potabilisation) de trois composés pharmaceutiques (le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine) a été menée.

Tout d'abord, une étude cinétique a été conduite à  $20 \pm 2$  °C et différentes valeurs de pH. Dans ces conditions, une dégradation possible et plus ou moins rapide suivant le pH a été observée pour l'ensemble de ces composés. Les réactions élémentaires de chloration et leur constante cinétique associée ont été déterminées. A pH 7, et pour une concentration de chlore de l'ordre de 1 mg, des temps de demi-vie de l'ordre de 1 h, 3,5 h et 7118 h ont été calculés pour le paracétamol, le diclofénac et la carbamazépine respectivement.

Ensuite, pour les composés étudiés, un travail d'identification des sous-produits de dégradation a été entrepris. Par analyses chromatographiques (CLHP/UV, CLHP/SM et CLHP/SM/SM), pour chacun de ces composés, de nombreux sous-produits de chloration ont été mis en évidence. Leur stabilité au chlore a été alors évaluée et les schémas réactionnels impliqués ont été discutés.

**Mots clés:** composé pharmaceutique, paracétamol, diclofénac, carbamazépine, oxydation, chlore, cinétique, sous-produits, schémas réactionnels.

## ABSTRACT

The objective of this work was to better assess pharmaceuticals removal and fate during water treatment process. Thus, a study of the oxidation by chlorine (a frequently used disinfection step) of three pharmaceutical compounds (paracetamol, diclofenac and carbamazepine) was performed.

In a first part, a kinetic study was conducted at  $20 \pm 2$  °C and different pH values. Under these conditions, a pH-dependence of the studied compounds removal was observed. Elementary chlorination reactions and associated rate constants were then determined. At pH 7, and for a chlorine concentration of about 1 mg, half-life times about 1, 3.5 and 7118 h were calculated for paracetamol, diclofenac and carbamazepine, respectively.

Secondly, transformation products of the chlorination of these compounds were studied. Numerous transformation products were identified by chromatographic analyses (HPLC/UV, HPLC/MS and HPLC/MS/MS). The stability of transformation products in the presence of an excess of chlorine was then studied and the pathways of reactions were proposed.

**Key words:** pharmaceutical compound, paracetamol, diclofenac, carbamazepine, oxidation, chlorine, kinetic, transformation product, pathway of reaction.