

Accord cadre Cemagref - Agence de l'eau RM&C

**Médicaments à usage humain :
risque d'exposition et d'effet sur les
milieux récepteurs**

Rapport intermédiaire, partie chimie

***Etude de l'occurrence des substances pharmaceutiques
dans les effluents et les eaux de surface***

Cécile Miège, Virginie Gabet, Jean Marc Choubert, Marina Coquery

**Département Milieux Aquatiques, Qualité et
Rejets**

Unité de Recherche
« Qualité des Eaux et Prévention des Pollutions »

Cemagref - Groupement de Lyon
3bis Quai Chauveau – CP 220
69336 LYON Cedex 09

Mai 2008

Accord cadre Cemagref - Agence de l'eau RM&C

Rapport intermédiaire - partie chimie

**Etude de l'occurrence des substances
pharmaceutiques dans les effluents et les eaux
de surface**

Référence à citer : C. Miège, V. Gabet, J. M. Choubert, M. Coquery, (2008). Médicaments à usage humain, risque d'exposition et d'effet sur les milieux récepteur. Etude de l'occurrence locale des bêtabloquants et des hormones estrogéniques. Agence de l'eau RM&C, 50 pages

Résumé

Cette étude a pour objectif de tester la méthodologie d'évaluation des risques et de priorisation des substances d'origine pharmaceutiques basée sur le calcul des PEC dans les milieux récepteurs telle que proposée dans le modèle EMEA (2006) et présentée dans le rapport AE RM&C phase 1. Nous présentons dans ce rapport intermédiaire les résultats issus de deux types d'approches :

- Une approche de terrain, basée sur des mesures locales de concentrations de molécules modèles (i.e., bêtabloquants et hormones estrogéniques) dans des effluents de 8 stations d'épuration choisies dans la région Rhône-Alpes, ainsi que dans les milieux récepteurs. Nous présentons la stratégie d'échantillonnage choisie, les méthodes d'analyses développées et les concentrations mesurées pour ces molécules dans les influents et les effluents de stations d'épuration, et dans les eaux de surface en amont et en aval des rejets pour 3 sites.
- Une approche complémentaire, basée sur les données de la littérature scientifique nationale et internationale avec l'élaboration d'une base de données. Cette étude a permis notamment d'obtenir des données représentatives des concentrations dans les influents et dans les effluents et des taux d'abattement dans les stations d'épurations avec boues activées pour une cinquantaine de molécules d'origine pharmaceutiques.

Au terme de ce projet, après confrontation des résultats issus de ces différentes approches, nous serons en mesure de proposer un programme de mesure avec notamment une liste de molécules prioritaires.

Table des Matières

Résumé	3
Liste des abréviations	5
Liste des tableaux	6
Liste des figures	6
I/ Introduction	7
II/ Choix des sites d'étude et stratégie d'échantillonnage	10
II.1/ Sites retenus	10
II.1.1/ Filières conventionnelles retenues	11
II.1.2/ Critères de choix des sites à étudier	12
II.1.3/ Description des stations d'épurations sélectionnées en région Rhône Alpes	12
II.2/ Stratégie d'échantillonnage	13
III/ Mise au point des protocoles analytiques	14
III.1/ Matrices liquides	14
III.1.1/ Hormones estrogéniques	14
III.1.2/ Bêtabloquants	15
III.2/ Matrices solides	15
IV/ Etude du devenir des bêtabloquants et hormones estrogéniques dans les stations d'épuration : résultats de 4 campagnes de mesures dans les stations d'épuration et 3 campagnes sur les milieux récepteurs	16
IV.1/ Hormones estrogéniques	16
IV.1.1/ Résultats obtenus dans les stations d'épurations	16
IV.1.2/ Etude de l'impact des stations d'épuration dans les milieux récepteurs en région Rhône-Alpes	17
IV.2/ Bêtabloquants	20
IV.2.1/ Résultats obtenus dans les stations d'épurations	20
IV.2.2/ Etude de l'impact des stations d'épuration dans les milieux récepteurs en région Rhône-Alpes	21
IV.3/ Synthèse et recommandations	25
V/ Base de données bibliographiques sur les molécules pharmaceutiques dans les stations d'épuration	25
V.1/ Présentation de la base de données	25
V.2/ Définition d'un indice de fiabilité de la donnée	26
V.3/ Qualité des données rassemblées dans la base	27
V.4/ Résultats issus du traitement statistique de la base	28
V.4.1/ Les molécules les plus étudiées	28
V.4.2/ Concentrations dans les influents et effluents de stations d'épuration avec boues activées	29
V.4.3/ Taux d'abattement des molécules pharmaceutiques dans les influents et effluents de station d'épuration avec boues activées	30
VI/ Conclusion et perspectives	34

Liste des abréviations

AMPERES : Analyse de micropolluants prioritaires et émergents dans les rejets et les eaux superficielles, projet financé par l'ANR-PRECODD (2005), coordinateur : M Coquery, Cemagref

Ceff : Concentration dans les effluents de STEP

Cinf : Concentration dans les influents de STEP

E1 : Estrone

α E2 : 17 α -Estradiol

β E2 : 17 β -Estradiol

E3 : Estriol

EE2 : Ethinylestradiol

EMA : Agence européenne pour l'évaluation des médicaments

Fstep : Taux d'abattement dans les stations d'épuration

LC-MS-MS : Chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse en tandem

MEC : Concentration environnementale mesurée

MEC_{effluent} : Concentration mesurée dans les effluents de STEP

MEC_{milieu} : Concentration mesurée dans les milieux récepteurs (eaux de surface)

MES : Matières en suspension

PEC : Concentration environnementale prédite

STEP : Station d'épuration

SPE : Extraction en phase solide

Liste des tableaux

Tableau 1 : Description des 8 stations d'épuration choisies dans la région Rhône-Alpes.	13
Tableau 2 : Définition des niveaux 1 à 4 de l'indice de fiabilité Analyse.....	27
Tableau 3 : Définition des niveaux 1 à 4 de l'indice de fiabilité Procédé.....	27
Tableau 4 : Les molécules les plus étudiées dans les stations d'épuration.....	29
Tableau 5 : Concentrations moyennes, minimum et maximum de molécules pharmaceutiques dans les STEP avec boues activées (reportées pour les molécules avec un nombre de données $n > 3$).	32

Liste des figures

Figure 1 : Récapitulatif des filières d'épuration des eaux et des boues retenues.	11
Figure 2 : Concentration moyenne (ng/L, $n=2$ ou 3) en hormones estrogéniques dissoute (libre et totale) dans les influents et les effluents des STEP de Beaujeu, Andancette, St Fons et Montségur sur Lozon.	17
Figure 3 : Concentration (ng/L) en hormones estrogéniques dissoutes totales dans l'Ardières (aval de Beaujeu), la Bourbre (aval de Bourgoin Jallieu) et la Saône (aval de Fontaine sur Saône).	19
Figure 4 : Concentration moyenne (ng/L, $n=2$ ou 3) en bêtabloquants dans les influents et les effluents des STEP de Beaujeu, Andancette, St Fons et Montségur sur Lozon.	21
Figure 5 : Concentration (ng/L) en bêtabloquants dans la Bourbre (aval de Bourgoin Jallieu).	23
Figure 6 : Concentration (ng/L) en bêtabloquants dans la Saône (aval de Fontaine sur Saône).	24
Figure 7 : Indices de fiabilité des données issues des publications scientifiques.	27
Figure 8 : Taux d'abattement moyens (%) et écart type pour 50 molécules pharmaceutiques dans les STEP avec boues activées.....	33

I/ Introduction

La présence de molécules pharmaceutiques dans les effluents et les milieux aquatiques a été détectée dès les années 80, mais un certain nombre d'évènements récents ont concouru à mettre en lumière la question de leur présence dans notre environnement. L'intérêt pour le développement des recherches sur le comportement et les impacts sur l'environnement et la santé humaine de ces molécules s'est récemment accru (Christensen 1998, Schulman *et al.*, 2002), conséquence d'une double évidence :

- ✓ D'une part il est désormais avéré que des molécules pharmaceutiques de classes thérapeutiques variées, sont présentes dans les milieux terrestres et aquatiques, en même temps que d'autres substances chimiques (produits d'hygiène personnelle, produits phytosanitaires, plastifiants, retardateurs de flammes, etc.), partout dans le monde (Daughton et Ternes 1999, Halling-Sorensen *et al.*, 1998, Ternes 1998, Buser *et al.*, 1998a et b, Stumpf *et al.*, 1999, Zuccato *et al.*, 2000, Jones *et al.*, 2001, Heberer *et al.*, 2002, Kolpin *et al.*, 2002, Boyd 2003, Golet *et al.*, 2003).
- ✓ D'autre part il est également démontré que la présence dans les effluents d'épuration et les milieux aquatiques de composés actifs sur le système endocrinien humain et animal, dont des oestrogènes puissants comme l'ethyniloestradiol, peut être associée à des effets biologiques sur des organismes non –cibles (Purdom *et al.*, 1994, Desbrow *et al.*, 1998, Mathiessen et Gibbs 1998, Sonnenschein et Soto 1998, Tyler *et al.*, 1998, Petrovic *et al.*, 2002).

Par ailleurs, des travaux sont actuellement en cours au niveau européen en vue de définir des procédures adéquates d'évaluation du risque des nouvelles molécules de médicaments à usage humain (EMEA, 2006) et vétérinaire (VICH 2000, 2004), cohérentes avec les procédures d'évaluation du risque des substances chimiques en général, incluant le risque pour l'environnement (écosystèmes aquatiques et terrestres). Enfin la mise en œuvre au niveau européen de la Directive Cadre sur l'Eau, bien que n'imposant pas actuellement d'objectif ou de norme de qualité pour ce type de molécules, hormones comprises, conduit néanmoins les gestionnaires et les utilisateurs de l'eau (industriels, traitiers d'eau ...) à s'interroger à priori sur les conséquences de cette contamination, en terme de contribution à la dégradation des écosystèmes aquatiques, voire sur la santé humaine.

Ainsi, depuis les années 90, le nombre de publications sur ce sujet, et plus particulièrement sur la présence et le devenir de ces molécules dans les écosystèmes aquatiques et terrestres a largement augmenté (voir la revue de Ayscough *et al.*, 2000, Garric J. 2006), tout en restant encore modeste comparativement aux publications relatives à d'autres molécules plus communément étudiées (pesticides, HAPs, ...).

A l'inverse d'autres pays européens, du Canada et des Etats-Unis, peu de données sont actuellement disponibles en France sur l'occurrence de ces molécules dans les rejets urbains et les écosystèmes récepteurs. Lorsqu'elles existent, il s'agit de données ponctuelles, relevées sur les effluents seulement, limitées dans le temps (pas de distribution de fréquence). De ce fait, il s'avère impossible de conduire au plan local des évaluations pertinentes du risque environnemental.

Récemment le Plan National Santé Environnement (2004-2008) a souligné l'exigence d'acquisition d'informations sur la présence des médicaments à usage humain et vétérinaire (action 11 du PNSE), des perturbateurs endocriniens, des toxines algales et des agents anti-infectieux non conventionnels dans l'environnement aquatique, en vue d'une évaluation du risque, en particulier dans les eaux destinées à la consommation humaine.

Au plan européen, dans le cadre de l'autorisation de la mise sur le marché, des procédures d'évaluation du risque environnemental lié au rejet des médicaments vétérinaires et humains dans les milieux avaient été proposées en 2001, et viennent d'être réactualisées (EMEA, 2006) par l'EMEA.

La mise en œuvre d'un programme permettant de répondre à l'exigence de surveillance des substances pharmaceutiques dans les milieux récepteurs se heurte, même dans un contexte géographique limité, à la grande diversité des molécules pharmaceutiques distribuées sur une aire géographique donnée, associée à des difficultés analytiques certaines, compte tenu des faibles concentrations attendues dans les milieux récepteurs, et de la complexité des matrices analysées (effluents de station d'épuration en particulier). Une approche de priorisation des molécules à intégrer dans un programme de surveillance s'avère nécessaire pour élaborer un programme d'analyses réaliste, tant au plan financier que méthodologique.

Afin de tester la méthodologie d'évaluation des risques et de priorisation basée sur le calcul des PEC dans les milieux récepteurs telle que proposée dans le modèle EMEA (2006) et présentée dans

le rapport AE RM&C phase 1 (Besse et Garric, 2007), nous avons adopté dans ce deuxième rapport deux types d'approches :

1/ Une approche de terrain, proposée initialement, basée sur des mesures locales de concentrations de molécules modèles (des bêtabloquants et hormones estrogéniques) dans des effluents de stations d'épuration (STEP) et les milieux récepteurs : établissement de MEC_{effluent} et MEC_{milieu} mesurées localement. Les 10 bêtabloquants sélectionnés (sotalol, aténolol, acébutolol, timolol, nadolol, bêtaxolol, bisoprolol, metoprolol, oxprenolol, propranolol) sont principalement sous forme protonnée à pH neutre ; ce sont des molécules globalement hydrophiles du fait de la présence de groupements fonctionnels divers (alcool, amine, éthers, cétones, ...) avec une gamme de log Kow relativement large (0 à 3). Les 5 oestrogènes sélectionnés (17α -éthinyloestradiol, estrone, estriol, 17β -estradiol et 17α -estradiol) sont plus hydrophobes (log Kow compris entre 3,5 et 4,6) et non chargés à pH neutre.

2/ Une approche complémentaire, non prévue dans le projet initial, basée sur les données de la littérature scientifique nationale et internationale avec l'élaboration d'une base de données regroupant des données de plus de 180 molécules (familles de pharmaceutiques, hormones et produits d'hygiène corporelle) ; cette étude a permis d'obtenir notamment des données représentatives des taux d'abattement dans les STEP (F_{step}) et des concentrations dans les effluents (MEC_{effluent} issues de la littérature).

Au final ces deux types d'approches devraient permettre d'affiner le modèle EMEA et notamment les résultats présentés dans le Tableau 15 (page 63) du rapport AE RM&C phase 1 (Besse et Garric, 2007) :

- par comparaison des PEC calculées selon l'EMEA à partir d'une valeur de F_{step} égale à 1 par défaut, avec des PEC calculées à partir de valeurs de F_{step} issues de la littérature,
- par comparaison des PEC calculées selon l'EMEA avec (i) des PEC évaluées à partir des MEC_{effluent} issues de la littérature, (ii) des PEC évaluées à partir des MEC_{effluent} mesurées localement, ou (iii) des MEC_{milieu} mesurées localement.

Enfin, l'aboutissement de cette démarche de priorisation devrait nous permettre de proposer un programme de mesure plus général sur l'ensemble des molécules priorisées (la réalisation des mesures n'étant pas incluse dans le projet).

Dans ce rapport, après avoir présenté les sites d'étude choisis et la méthodologie mise en œuvre lors des campagnes d'échantillonnage, nous exposons l'état des développements des protocoles d'analyse

de bêtabloquants et hormones estrogéniques, ainsi que les résultats des campagnes de mesures menées en région Rhône-Alpes dans des stations d'épuration urbaines et les milieux aquatiques récepteurs. Puis, nous décrivons notre base de données bibliographiques sur les molécules d'origine pharmaceutique dans les stations d'épuration ; nous présentons également les résultats issus de l'exploitation de ces données qui nous a permis de faire le point sur l'occurrence et le devenir de ces contaminants émergents pendant l'épuration des eaux usées.

II/ Choix des sites d'étude et stratégie d'échantillonnage

II.1/ Sites retenus

La stratégie suivie pour choisir les stations d'épuration à étudier a été menée à la fois dans le cadre du présent projet, mais également dans le cadre du projet AMPERES (Analyse de Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les Eaux Superficielles) financé par l'ANR PRECODD. L'étude du devenir des contaminants à l'intérieur des stations d'épuration sera réalisée par l'analyse des influents, effluents et boues (Cf. II.2). Au final, compte tenu des filières conventionnelles retenues (cf II.1.1) et des critères de choix des sites à étudier (cf II.1.2.), nous avons retenu 15 stations d'épuration, dont 6 dans la région Rhône-Alpes, qui sont étudiées en détails dans le cadre de ce projet.

Le choix des milieux récepteurs s'est fait en concertation avec le laboratoire d'Ecotoxicologie de l'Unité de Recherche Biologie des Ecosystèmes Aquatiques. Les critères de choix additionnels concernaient notamment le taux de dilution de la rivière, la localisation des STEP sur le cours d'eau, la faisabilité de la mise en oeuvre des outils biologiques d'étude des effets et des échantillonneurs intégratifs sur ces sites. L'étude de l'impact des stations d'épuration sur le milieu naturel (analyse des effluents et amonts et aval de station) sera menée pour les sites de Beaujeu sur l'Ardières, Fontaine sur la Saône et Bourgoin Jallieu sur la Bourbre. Les STEP de Fontaine sur Saône et de Bourgoin Jallieu ont été ajoutées à la sélection des STEP d'étude pour le projet AMPERES ; en effet elles ne correspondent pas forcément à tous les critères de choix (notamment la représentativité du procédé au niveau national). Pour des raisons de calendrier et de faisabilité, seuls les effluents de STEP seront échantillonnés pour les STEP de Fontaine sur Saône et de Bourgoin Jallieu. Nous avons donc au total 8 STEP en région Rhône-Alpes pour lesquelles des données de concentrations de médicaments dans les effluents seront acquises (Tableau 1).

II.1.1/ Filières conventionnelles retenues

Une liste de 12 filières "eau" constituée des principaux procédés conventionnels de traitement rencontrés en France a été dressée (Figure 1). Cette liste inclut :

- Des filières répandues sur le territoire national soit en raison de leur aptitude à l'élimination des paramètres majeurs (pollution carbonée, azotée et phosphorée) avec une maintenance réduite (boue activée faible charge massique le plus souvent sans traitement primaire), soit en raison d'une compacité réduite (biofiltres). Ce dernier procédé à forte compacité est placé soit en aval de décantation primaire physico-chimique, soit après une boue activée à forte/moyenne charge massique, notamment lors de réhabilitation d'anciennes stations situées en ville par exemple (ex: STEP de Saint Fons).
- Des filières conventionnelles en plein essor au niveau national en raison de leur facilité d'exploitation dans les communes rurales (filtres plantés de roseaux ; bio-disques) fonctionnant seuls, ou bien placés en aval de lagunage naturel ou de lit bactérien pour un meilleur respect du niveau de rejet D4 (traitement du carbone et de l'azote).

En plus des filières primaires et secondaires conventionnelles, une liste de filières tertiaires classiques permettant de compléter le traitement secondaire a été dressée : filtration sur sable (pour la réduction des MES), membrane (pour les long temps de séjour, et les très faibles concentration en MES), désinfection chimique (Cl₂, UV, O₃).

Quatre types de filières "boues" ont été recensés : les procédés de digestion anaérobie, de compostage, de séchage (thermique ou gravitaire sur filtre planté), ou de chaulage.

Filières primaires et secondaires	Filières tertiaires	Filières boues
1. Dégrillage simple	A: filtration sur sable	Digestion anaérobie
2. Prétraitements + décantation primaire	B: membrane tertiaire	Compostage
3. Prétraitements + décantation primaire physicochimique	C: désinfection chlore	Séchage
4. Prétraitements + Boue activée & SBR (C + N ± P)	D: désinfection UV	Chaulage
5. Prétraitements + décantation primaire + Boue activée & SBR (C seul)	E: désinfection ozone	
6. Prétraitements + décantation primaire + Boue activée & SBR (C + N ± P)		
7. Prétraitements + décantation primaire ou non + Culture fixées (lit bactérien, biodisque)		
8. Prétraitements + décantation primaire (± réactifs) + Biofiltre (1, 2 ou 3 étages)		
9. Prétraitements + BRM		
10. Prétraitements + Lagune		
11. Prétraitements + Rhizopur		
12. Prétraitements + Infiltration / percolation		

Figure 1 : Récapitulatif des filières d'épuration des eaux et des boues retenues.

II.1.2/ Critères de choix des sites à étudier

Pour effectuer les campagnes de mesures, des stations d'épuration ont été sélectionnées de façon à être représentatives des 12 filières choisies. La conformité de fonctionnement de l'installation pour la bonne élimination des paramètres globaux a été le premier critère retenu. Au-delà de ce critère, ont été examinées des caractéristiques d'installation incontournables pour garantir le bon échantillonnage comme :

- les dispositions constructives (accès prélèvement, faisabilité de la mesure de débit),
- l'éloignement par rapport au laboratoire de base.

Lors de la recherche des installations, les critères suivants ont également été examinés :

- charges admises par rapport au nominal,
- connaissance de l'installation,
- originalité de la filière de traitement des boues, ou présence d'un traitement tertiaire,
- étude concomitante (intérêt du milieu récepteur pour une étude de l'impact des stations d'épuration).

Parmi les installations potentiellement intéressantes, les caractéristiques de taille de l'installation (capacité nominale) et d'équipement (aération de fond ou de surface, succession des conditions rédox appliquées, adjuvants utilisés) ont été examinées. A filière "eau" équivalente, la nature de la filière "boues" a pu être un critère de choix de la station étudiée.

L'effort porté sur telle ou telle filière (en nombre de sites par filière) a également été choisi en fonction des informations de la littérature scientifique. Un effort plus important a été porté sur les installations par cultures fixées plus rarement documentées dans la bibliographie alors que le nombre d'installations est important au niveau national.

II.1.3/ Description des stations d'épurations sélectionnées en région Rhône Alpes

La description des 8 stations d'épuration choisies dans la région Rhône-Alpes est présentée dans le Tableau 1. Les dates des campagnes d'échantillonnage sont également reportées dans ce tableau.

Tableau 1 : Description des 8 stations d'épuration choisies dans la région Rhône-Alpes.

Nom de la station	Département	Période d'échantillonnage	Filière Ier + IInd	Filière IIIe	Capacité (équ.hab)	Réseau	Milieu Récepteur	Départ
Beaujeu ¹	Rhône	5-8 février 07	4. Prétraitements + Boue activée & SBR (C + N ± P)	néant	2900	unitaire	Ardières	Rh-Alpes (69)
Andancette	Drôme	19-22 mars 07	4. Prétraitements + Boue activée & SBR (C + N ± P)	néant	13000	mixte	Rhône, aval de Lyon	Drôme (26)
St-Fons	Rhône	21-24 mai 07	5. Prétraitements + décantation primaire + Boue activée & SBR (C seul)	biofiltre 3e	950000	unitaire	Rhône, aval Lyon	Rh-Alpes (69)
Bourgoin Jallieu ¹	Isère	5-26 juin 07	5. Prétraitements + décantation primaire + Boue activée & SBR (C seul)	néant	78000		La Bourbre	Isère (38)
Fontaine sur Saone ¹	Rhône	8-20 novembre 07	8. Prétraitements + décantation primaire (± réactifs) + Biofiltre (1, 2 ou 3 étages)	néant	20000	inconnu	Saône	Rh-Alpes (69)
Givors	Rhône	3-6 décembre 07	8. Prétraitements + décantation primaire (± réactifs) + Biofiltre (1, 2 ou 3 étages)	décanteur rapide	80000	inconnu	Rhône, aval Lyon	Rh-Alpes (69)
Montségur s/ Lozon	Drôme	4-7 février 08	7. Prétraitements + décantation primaire ou non + Culture fixées (lit bactérien, biodisque)	néant	200	inconnu	Bourbon (bief) Rhône, amont Lyon	Ain (01)
Evieu	Ain	10-13 mars 08	12. Prétraitements + Infiltration / percolation	filtre apatite	200	inconnu	via fossé de plusieurs km	Ain (01)

1 : Station dont l'impact sur le milieu récepteur sera étudié

II.2/ Stratégie d'échantillonnage

Filière eau : Les dates des campagnes d'échantillonnage pour chaque STEP sont présentées dans le tableau 1. Du matériel de prélèvement spécifiquement acquis pour le programme est utilisé. Il met en œuvre des tuyaux Téflon et des flacons en verre ayant subi une procédure de lavage systématique. Des blancs de prélèvements sont effectués régulièrement pour vérifier la chaîne de prélèvement/conditionnement (absence d'adsorption et/ou de relargage). Chaque point de prélèvement (influent, effluent, point intermédiaire) a été échantillonné pendant deux ou trois jours consécutifs à l'aide de préleveurs automatiques réfrigérés à 4°C afin de constituer des échantillons représentatifs journaliers (moyen 24h). Un retour en tête est collecté à la main. Les phases dissoutes (filtrées sur filtre en fibre de verre GF/F 0,7µm) ainsi que les matières en suspension (MES) sont analysées.

Filière boue : pour la filière boue, un échantillonnage a été mené en amont et aval de chaque filière afin de constituer des échantillons représentatifs des flux admis, donc proportionnels au rythme des cycles de déshydratation. Ces échantillons sont collectés à la main : échantillonnage ponctuel composite, c'est à dire composé de plusieurs prélèvements ponctuels représentatifs.

Milieus récepteurs : Nous avons réalisé une première campagne préliminaire sur l'Ardières en février 2007 (1 seul prélèvement pour lequel seules les hormones ont été analysées), puis la Bourbre a été échantillonnée en juin 2007 et la Saône en novembre 2007. Une deuxième série de campagnes d'échantillonnage est prévue sur chaque site en 2008. L'échantillonnage des eaux de surface est réalisé à la main (échantillon ponctuel). Les prélèvements sont réalisés dans la rivière en plusieurs points à l'amont et à l'aval de la STEP. Ils sont effectués à intervalle régulier sur la durée de l'expérimentation, typiquement une fois par semaine pendant 3 à 4 semaines. Les échantillons sont prélevés dans des flacons en verre ayant subi une procédure de lavage systématique.

III/ Mise au point des protocoles analytiques

III.1/ Matrices liquides

III.1.1/ Hormones estrogéniques

Le protocole analytique pour doser 5 hormones estrogéniques (17 α -éthynylestradiol, estrone, estriol, 17 β -estradiol et 17 α -estradiol) dans des eaux de stations d'épuration et de rivières a été optimisé. Le protocole détaillé ainsi que les performances de cette méthode analytique sont présentés en Annexe 1. En résumé, ce protocole consiste en une extraction sur cartouche SPE Oasis HLB suivi d'une purification sur Florisil et d'une analyse par LC-MS-MS. Ce protocole a été validé selon la norme NF XP T90 210 (AFNOR, 1999). La linéarité a été vérifiée pour un domaine de 1,0 à 200 ng/L pour les influents et de 0,4 à 80 ng/L pour les effluents et les eaux de rivières. Les limites de quantification sont de l'ordre du ng/L dans les échantillons d'eaux réels. Les rendements et répétabilités des étapes d'extraction et de purification ont été validés avec des eaux de rivières, des eaux usées brutes (influents) et des effluents de station d'épuration : ils varient en général entre 82 et 115% avec un coefficient de variation inférieur à 22%. Par des essais et des tests statistiques, nous avons vérifié que cette méthode est spécifique, c'est à dire indépendante des effets de matrices et ceci grâce à l'utilisation de 4 hormones deutérées (estrone-d4, 17 β -estradiol-d2, 17 α -éthynylestradiol-d4 et estriol-d2) comme traceurs internes. Ces traceurs permettent en effet de corriger efficacement les résultats pour toute déviation éventuelle des rendements d'extraction due, notamment, à la matrice.

Les hormones sont excrétées en partie sous forme conjuguée (glucuronide ou sulfate) et sont déconjuguées progressivement dans les eaux usées et les rivières par hydrolyse. De façon à quantifier la fraction totale (conjuguée et libre) de ces hormones dans les eaux, il est nécessaire d'appliquer un protocole de déconjugaison aux échantillons. Le protocole choisi (une hydrolyse enzymatique par la β -glucuronidase -suc d'*Helix pomatia*- à pH = 5,2 pendant 15 heures à 52°C) a prouvé son efficacité avec l'hormone conjuguée β -estradiol 17-(β -D-glucuronide). On mesure donc les hormones libres, puis les hormones totales après déconjugaison. Par différence, on obtient la fraction d'hormones conjuguées initialement présente dans l'échantillon.

Des tests de conservation ont permis de vérifier que les hormones se dégradent d'environ 5% par tranche de 24h ; ceci nous oblige à analyser les échantillons dans les 24h après le prélèvement.

Enfin, la validation formelle de notre protocole, en s'inspirant de la norme NF XP T90 210 (AFNOR, 1999), est pratiquement finalisée : il nous reste à vérifier les limites de quantification dans les influents et effluents par dopage de matrices réelles.

III.1.2/ Bêtabloquants

Le développement analytique pour doser 10 bêtabloquants (sotalol, aténolol, acébutolol, timolol, nadolol, bêtaxolol, bisoprolol, metoprolol, oxprenolol, propranolol) dans les eaux est finalisé. Il consiste en une extraction sur Oasis MCX suivi d'une analyse par LC-MS-MS. Les seuls étalons internes disponibles sont l'aténolol deutéré (d7), qui sera utilisé avant extraction, et une impureté du métoprolol (impureté A), qui sera utilisé avant injection dans le système chromatographique. Nous prévoyons de doubler chaque échantillon d'un échantillon dopé afin de contrôler au mieux les biais dus aux effets de matrice ou à des dysfonctionnements analytiques (essentiellement des pertes d'analytes pendant les étapes d'extraction ou d'évaporation). Le protocole global appliqué à des eaux de sortie de station d'épuration permet d'obtenir des rendements supérieurs à 37% pour les bêtabloquants les plus polaires (aténolol et sotalol) et supérieurs à 80% pour les autres bêtabloquants avec des coefficients de variation satisfaisants (<25%). Il nous reste à tester la conservation des échantillons et à valider formellement le protocole en nous inspirant de la norme XP T90 210 (AFNOR, 1999), et ceci pour des eaux d'entrée et de sortie de station ainsi que pour des eaux de rivières.

III.2/ Matrices solides

Nous sommes en train de développer et optimiser un protocole d'analyse des hormones dans les matrices solides (boues, sédiments, matières en suspension). Le protocole en cours de test consiste en une extraction par ASE (Accelerated Solvent Extraction) avec un mélange méthanol/eau suivi de deux étapes successives de purification sur phase solides, HLB et florisil, avec une analyse par LC-MS-MS. Ce protocole, une fois optimisé et validé, sera adapté pour l'analyse des bêtabloquants. Nous prévoyons de finir ces développements analytiques d'ici fin 2008.

IV/ Etude du devenir des bêtabloquants et hormones estrogéniques dans les stations d'épuration : résultats de 4 campagnes de mesures dans les stations d'épuration et 3 campagnes sur les milieux récepteurs

Nous présentons ici les premiers résultats d'analyses dans les phases dissoutes obtenus suite aux 4 premières campagnes de prélèvement : dans la STEP de Beaujeu (5-7 février 2007), d'Andancette (19-21 mars 2007), de St Fons (21-23 mai 2007) et de Montségur sur Lozon (3-5 décembre 2007) (Cf tableau 1). Les résultats pour les STEP de Givors et d'Evieu sont en cours d'exploitation. Nous présentons également les premiers résultats sur l'impact des STEPs de Beaujeu, Bourgoin Jallieu et Fontaine sur Saône sur les milieux récepteurs, respectivement l'Ardières, la Bourbre et la Saône.

IV.1/ Hormones estrogéniques

IV.1.1/ Résultats obtenus dans les stations d'épurations

Les concentrations en hormones dissoutes libres et totales (fractions libre + conjuguée) mesurées dans les influents et effluents des 4 STEP étudiées sont reportées dans la Figure 2. Toutes les hormones recherchées ont été quantifiées dans les influents des deux STEP sauf EE2. Dans toutes les stations échantillonnées, E3 est l'hormone la plus concentrée dans les influents (concentration maximale de 495 ng/L pour la STEP de Montségur sur Lozon). L'estrone est également retrouvée à des concentrations non négligeables dans les influents : entre 25 et 140 ng/L. En revanche, les concentrations en hormones estrogéniques sont d'une manière générale assez faibles dans les effluents analysés : concentration maximale de 14 ng/L pour E1 dans la STEP d'Andancette. L'estrone est la seule des 5 hormones recherchées à être quantifiée dans tous les échantillons d'effluents. L'estriol qui était l'hormone la plus concentrée dans les influents n'est quantifiée que dans les échantillons d'effluents de la STEP de St Fons. EE2, non détectée dans les influents, n'est pas détectée non plus dans les effluents.

Pour une même matrice (même type d'échantillons issu de la même STEP), les proportions libres/conjuguées sont en général relativement similaires d'un jour sur l'autre. Cependant, pour chaque molécule, cette fraction d'hormones conjuguées varie d'une matrice à une autre. Dans tous les échantillons, la fraction de conjuguées par rapport à la fraction totale varie entre 10 et 40% pour E1, entre 0 et 30% pour α E2 et entre 0 et 50% pour E3 et β E2. Nous n'avons pas observé de tendance entre les échantillons d'influent et d'effluent. Compte tenu de la variabilité de la répartition libres/conjuguées, il est difficile de comparer les résultats obtenus sur les hormones libres : la prise en compte de la fraction totale d'hormones permet de s'affranchir de cette variabilité et donc d'avoir des résultats plus facilement comparables.

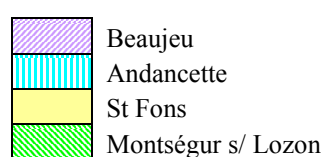
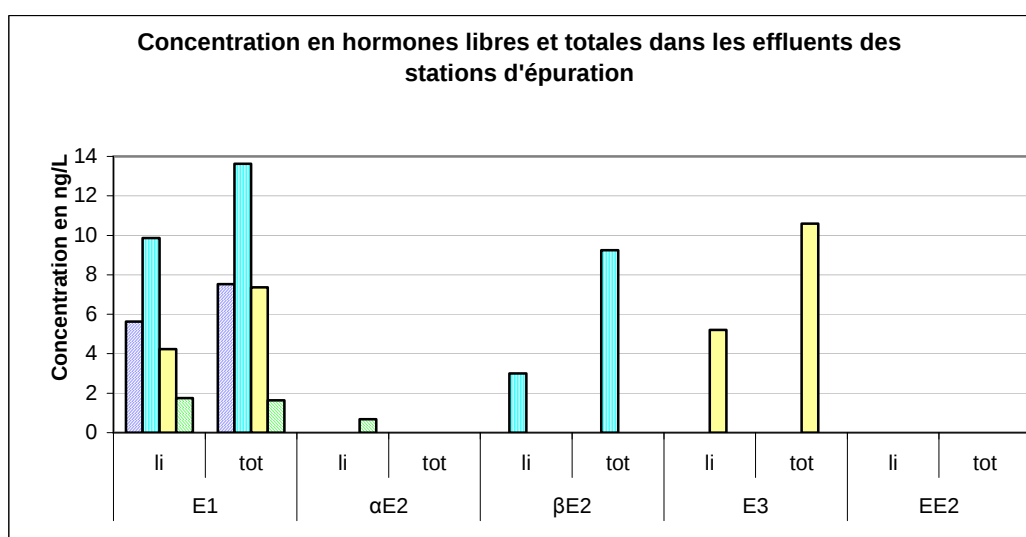
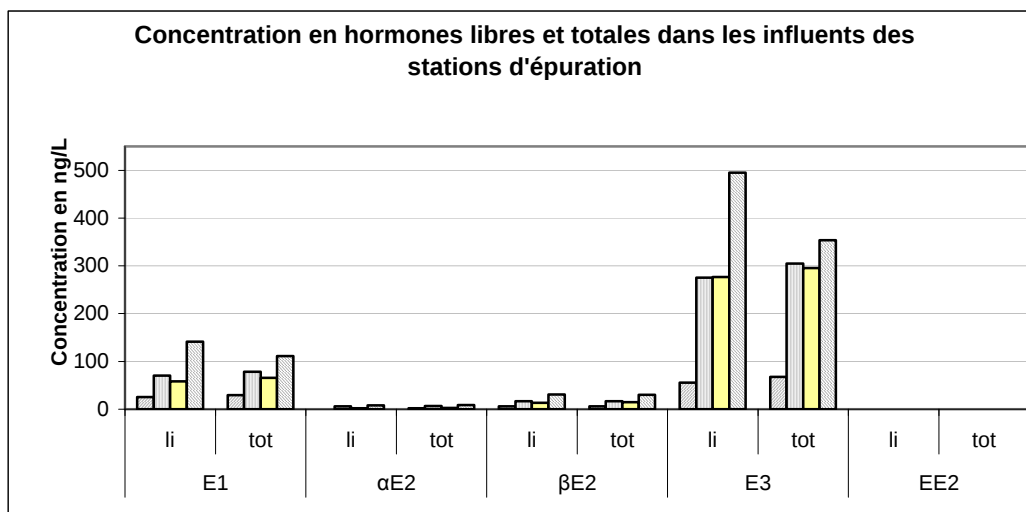


Figure 2 : Concentration moyenne (ng/L, n=2 ou 3) en hormones estrogéniques dissoute (libre et totale) dans les influents et les effluents des STEP de Beaujeu, Andancette, St Fons et Montségur sur Lozon.

IV.1.2/ Etude de l'impact des stations d'épuration dans les milieux récepteurs en région Rhône-Alpes

Nous présentons les résultats obtenus pour les hormones estrogéniques dissoutes totales (fraction libre + conjuguée) sur trois sites : l'Ardières échantillonnée en février 2007, la Bourbre échantillonnée en juin 2007 et la Saône échantillonnée en novembre 2007 (Figure 3).

Au niveau de l'Ardières et de la Bourbre, on note clairement la pollution apportée par les STEP de Beaujeu et de Bourgoin Jallieu. Ces deux STEP représentent une source de E1 ; la concentration en E1 des effluents de ces STEP varie entre 7 et 32 ng/L. On voit nettement que les concentrations en E1 mesurées en aval de STEP sont supérieures à celles mesurées en amont de STEP, avec des concentrations généralement supérieures dans la Bourbre par rapport à l'Ardières. Les concentrations en E1 dans les rivières en amont des STEP sont très faibles dans la Bourbre (de l'ordre du ng/L) ou inférieures aux limites de quantification pour l'Ardières ; elles varient entre 2 et 10 ng/L en aval des rejets de STEP. On peut également noter la présence de β E2 dans un échantillon d'effluent de la STEP de Beaujeu, mais à une concentration inférieure à la limite de quantification (<0.3 ng/L). On note par ailleurs, que l'estradiol (β E2) a tendance à s'oxyder en E1 ce qui peut expliquer que l'on ne retrouve pas de β E2 dans l'Ardières.

Les résultats obtenus sur la Saône sont légèrement différents. On observe là encore un effet de la pollution dû au rejet de la STEP, mais c'est E3 qui est la plus présente avec une concentration dans l'effluent comprise entre 202 et 237 ng/L. On retrouve également de la E1 dans l'effluent à des concentrations de 13 et 22 ng/L selon la date de prélèvement. Les concentrations dans la Saône sont inférieures aux limites de quantification en amont et de l'ordre du ng/L pour E1 et de 25 ng/L pour E3 en aval de la STEP.

Finalement, seule la E1 pour les 3 sites et la E3 dans le cas de Fontaine sur Saône sont retrouvées dans les eaux de rivière (généralement < 10 ng/L). Compte tenu des concentrations déjà faibles mesurées dans les rejets de STEP (cf IV.1.1, <6 ng/L) et de l'effet de dilution entre l'effluent de STEP et la rivière, il n'est pas étonnant que les autres hormones ne soient pas détectées (seuils de détection dans les rivières entre 0,1 à 0,5 ng/L selon les molécules).

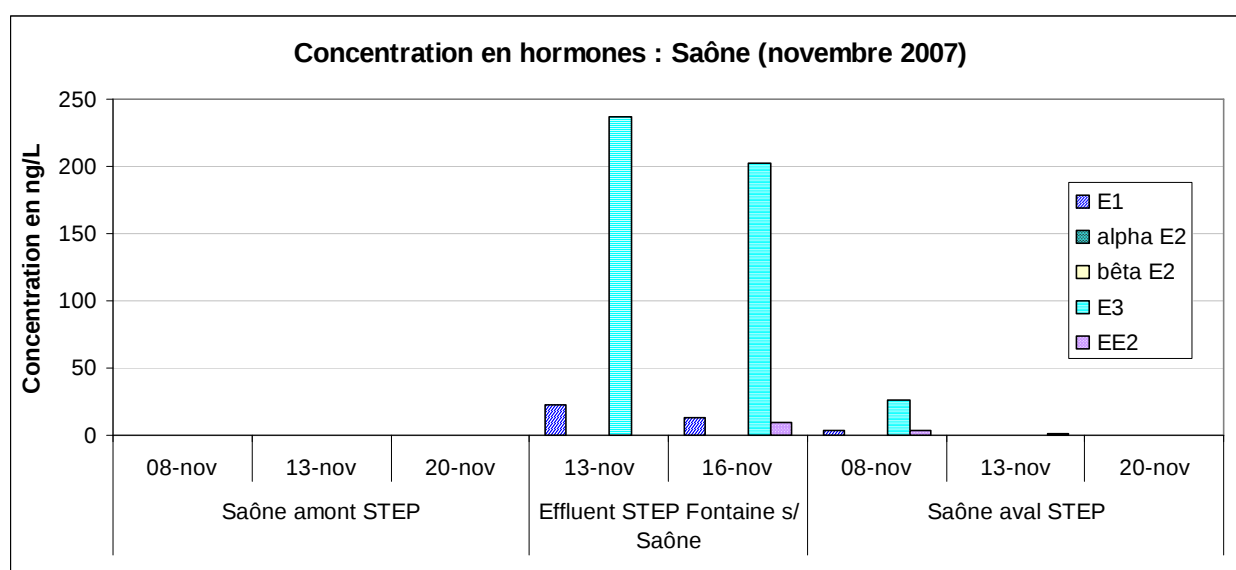
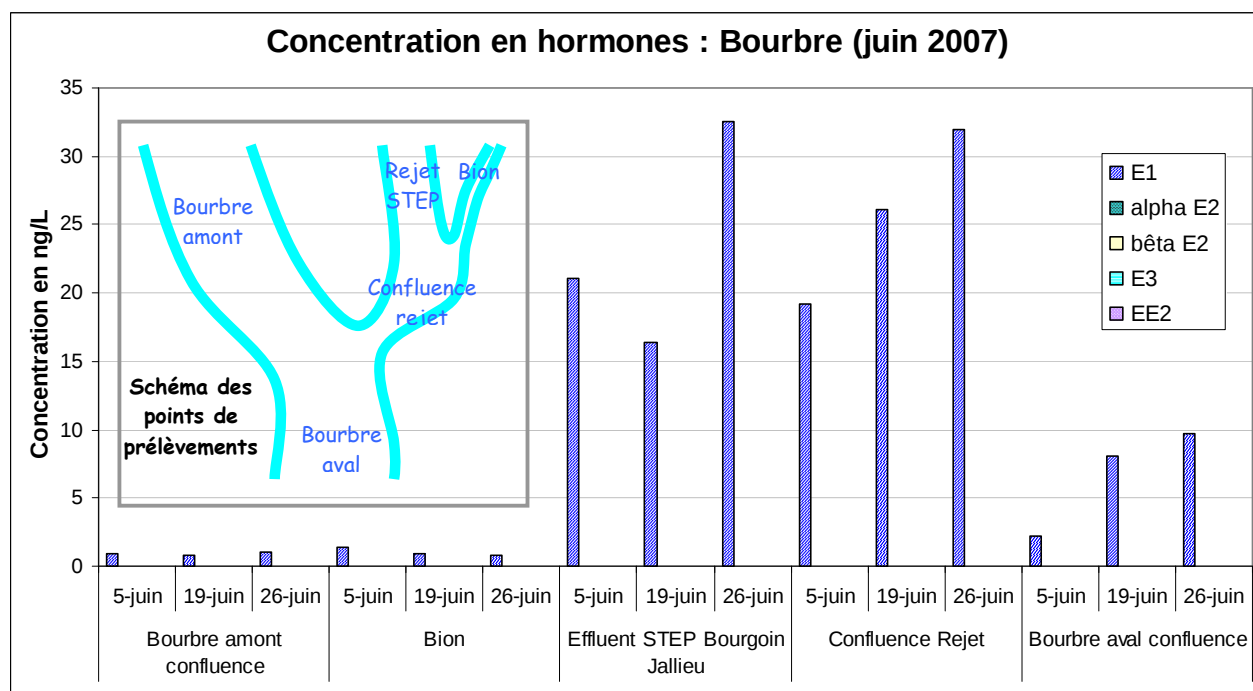
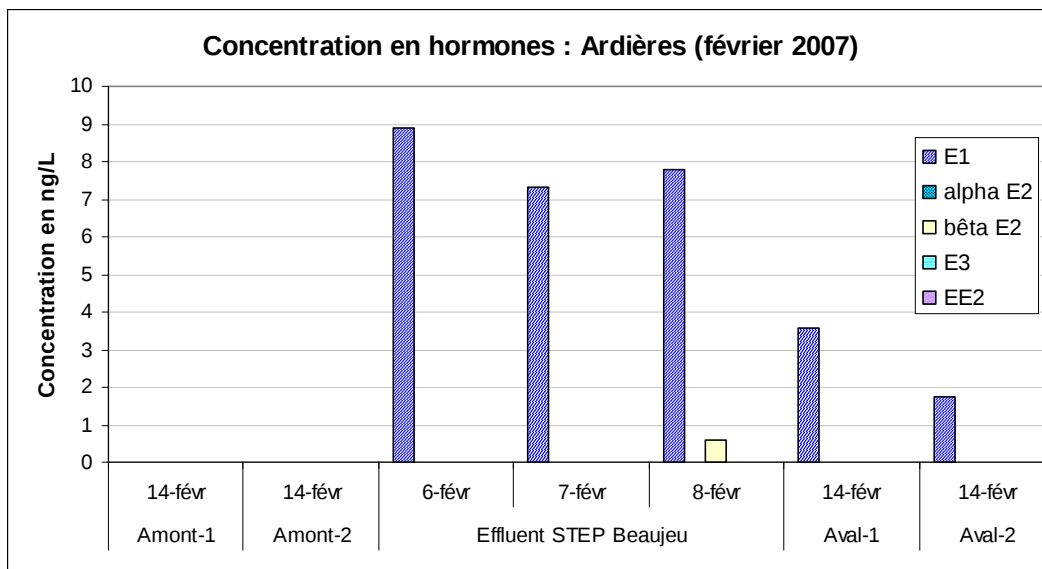


Figure 3 : Concentration (ng/L) en hormones estrogéniques dissoutes totales dans l'Ardières (aval de Beaujeu), la Bourbre (aval de Bourgoin Jallieu) et la Saône (aval de Fontaine sur Saône).

IV.2/ Bêtabloquants

IV.2.1/ Résultats obtenus dans les stations d'épurations

Les concentrations de bêtabloquants mesurées dans les influents et effluents pour les 4 STEP étudiées sont reportées Figure 4. Dans l'organisme humain, les bêtabloquants ne sont pas éliminés sous des formes conjuguées. Dans les eaux usées, la fraction dissoute totale correspond donc à la fraction dissoute libre.

D'après ces premiers résultats, on peut distinguer trois groupes de bêtabloquants différents.

Un premier groupe constitué de l'acébutolol, de l'aténolol et du sotalol qui sont présents dans tous les influents et à des concentrations assez élevées : entre 1261 et 2139 ng/L pour l'acébutolol, entre 272 et 2670 ng/L pour l'aténolol et entre 231 et 2723 ng/L pour le sotalol. Ces molécules sont également systématiquement retrouvées à des concentrations significatives en sortie de STEP : entre 157 et 1362 ng/L pour l'acébutolol, entre 37 et 1363 ng/L pour l'aténolol et entre 172 et 2044 ng/L pour le sotalol.

Le métoprolol, le bisoprolol le propranolol et le nadolol constituent un second groupe de bêtabloquants qui sont quantifiés dans presque tous les influents des STEP étudiées. On retrouve ces molécules en entrée de STEP à des concentrations allant de 5 à 610 ng/L. Le nadolol qui n'est pas quantifié dans 2 des 4 effluents étudiés représente un cas un peu particulier. Dans les effluents, on retrouve ces 4 bêtabloquants à des concentrations variant entre <LQ et 303 ng/L.

Enfin, le timolol, l'oxprénolol et le bêtaxolol constituent le dernier groupe de composés. Ces bêtabloquants sont quasiment absents des influents : concentration maximale de 12 ng/L pour le bêtaxolol dans les influents de St Fons. Dans les effluents, ces bêtabloquants sont également rarement quantifiés (concentration maximale de 14 ng/L pour l'oxprénolol dans les effluents de St Fons).

Les bêtabloquants acébutolol, aténolol, sotalol, métoprolol, bisoprolol et propranolol sont détectés et quantifiés dans tous les échantillons d'effluents, ce que nous avons déjà observé pour les trois derniers bêtabloquants lors des premières campagnes menées dans les stations d'épuration lyonnaise en 2004-2005 (Miège *et al.*, 2006). Lors de ces précédentes campagnes, nous avons également observé la quasi absence des bêtaxolol et oxprénolol dans les effluents.

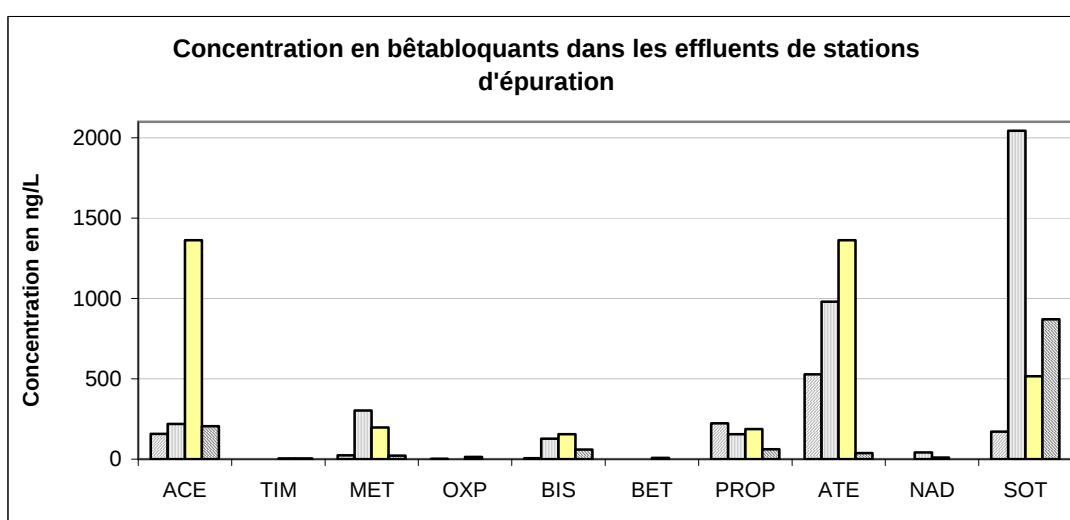
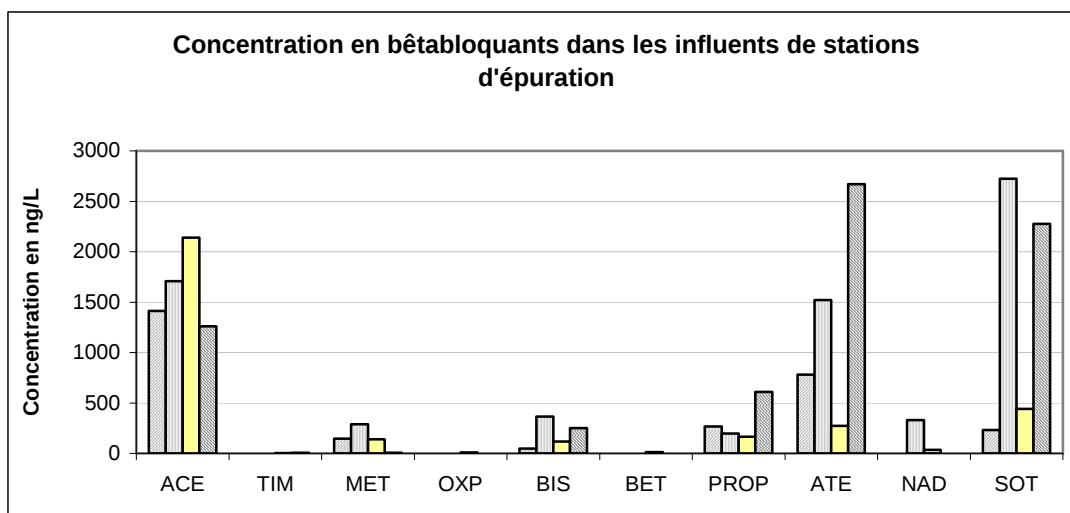


Figure 4 : Concentration moyenne (ng/L, n=2 ou 3) en bêtabloquants dans les influents et les effluents des STEP de Beaujeu, Andancette, St Fons et Montségur sur Lozon.

IV.2.2/ Etude de l'impact des stations d'épuration dans les milieux récepteurs en région Rhône-Alpes

Nous présentons dans les Figures 5 et 6 les résultats obtenus pour les 10 bêtabloquants étudiés sur les sites de la Bourbre, échantillonné en juin 2007, et la Saône, échantillonnée en novembre 2007.

On remarque tout d'abord un gradient entre les concentrations retrouvées en amont et celles retrouvées en aval des STEP, avec des concentrations légèrement plus élevées au niveau de la Saône qu'au niveau de la Bourbre.

Sur les deux sites étudiés, on retrouve les trois groupes identifiés dans le paragraphe précédent.:

L'acébutolol, l'aténolol et le sotalol sont très concentrés dans les effluents de Bourgoin Jallieu et de Fontaine sur Saône concentration maximale de 2450 ng/L pour l'aténolol dans l'effluent de Fontaine sur Saône. Ces trois composés sont quantifiés dans tous les échantillons analysés. Dans les eaux de surface, on les retrouve à des concentrations comprise entre 3 et 678 ng/L. A noter tout de même que les plus fortes concentrations dans les eaux de surface sont retrouvées pour le point de prélèvement "confluence rejet" qui est principalement constitué de l'effluent de la STEP de Bourgoin Jallieu. Si l'on exclue ce point de prélèvement un peu particulier, les concentrations dans les eaux de surface atteignent au maximum 240 ng/L pour l'aténolol dans la Saône, en aval de la STEP. Pour ce groupe de composés, l'impact de la station d'épuration sur les concentrations mesurées en aval dans le milieu récepteur est donc perceptible.

Le métoprolol, le bisoprolol, le propranolol et le nadolol sont quantifiés dans tous les effluents des STEP étudiées (concentrations comprises entre 4 et 630 ng/L), mais ne sont pas systématiquement détectés dans le milieu naturel. Pour ce groupe de molécules, la concentration la plus forte retrouvée dans le milieu est de 110 ng/L de propranolol (point de prélèvement "confluence rejet"). Cette fois encore, si l'on exclue ce point particulier, on retrouve au maximum 38 ng/L de bisoprolol dans les eaux de surface étudiées (concentration dans la Saône en aval de la STEP de Bourgoin Jallieu).

Enfin, le timolol, l'oxprénolol et le bêtaxolol sont rarement quantifiés dans les effluents de STEPs, et a fortiori dans les eaux de surface. Au niveau des prélèvements réalisés sur la Bourbre, le timolol n'est quantifié que dans un seul échantillon d'effluent (sur les 3 analysés) et un seul échantillon "confluence rejet" à des concentrations inférieures à 2 ng/L. L'oxprénolol est uniquement détecté dans un effluent (à moins de 2 ng/L), et le bêtaxolol est retrouvé à une teneur inférieure à 1 ng/L dans un des échantillons "confluence rejet". Pour la campagne réalisée sur la Saône, on retrouve ces bêtabloquants dans tous les effluents de Fontaine s/ Saône (concentrations comprises entre 8 et 33 ng/L) et pour les échantillons prélevés dans la Saône, on atteint au maximum 4 ng/L d'oxprénolol.

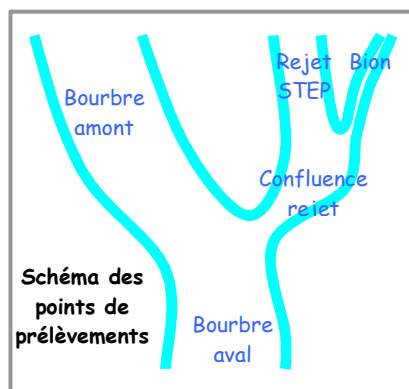
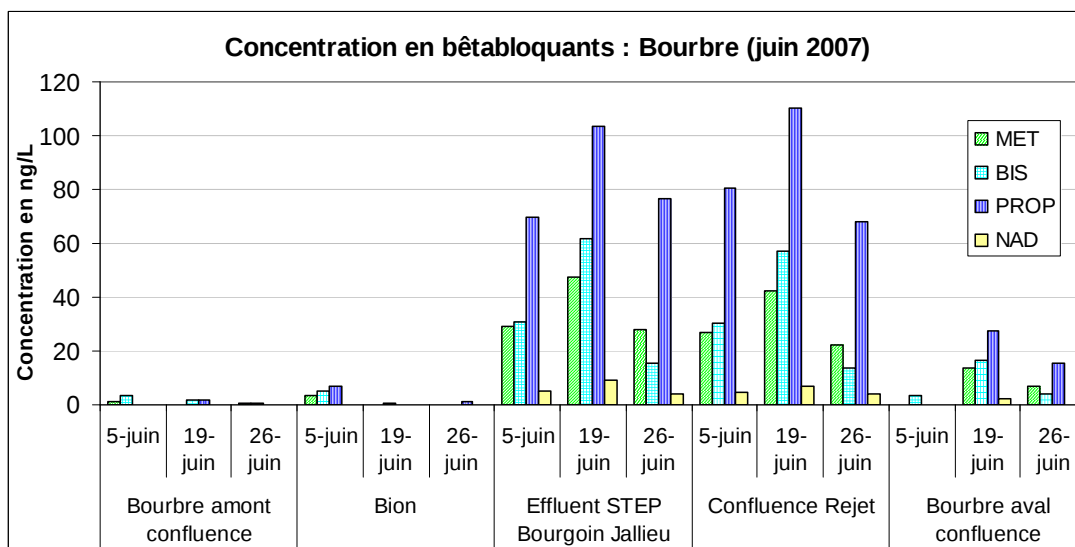
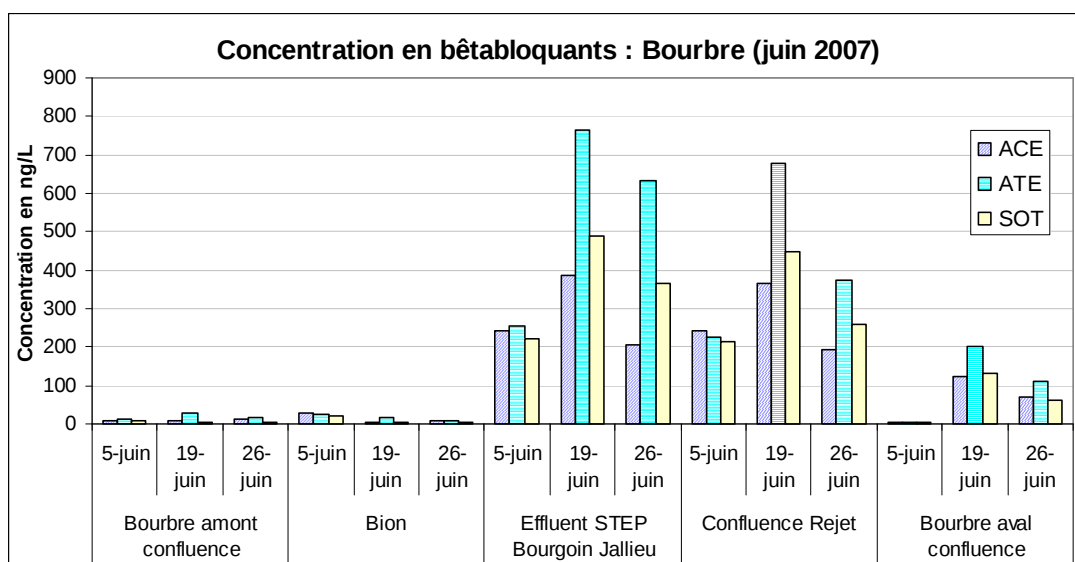


Figure 5 : Concentration (ng/L) en bêtabloquants dans la Bourbre (aval de Bourgoin Jallieu).

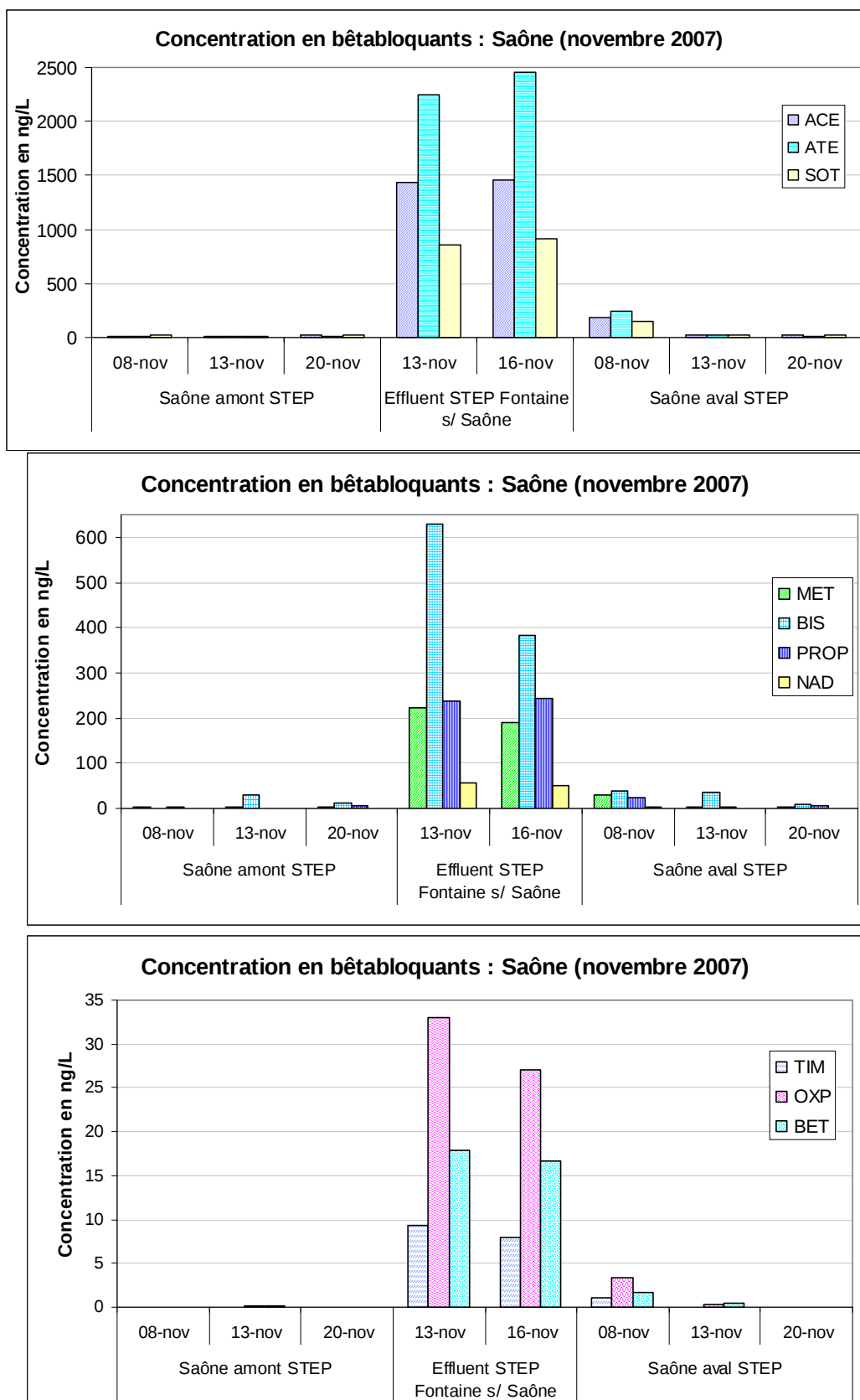


Figure 6 : Concentration (ng/L) en bêtabloquants dans la Saône (aval de Fontaine sur Saône).

IV.3/ Synthèse et recommandations

Nous présenterons ici, dans le rapport final à rendre en fin de projet (début 2009), un cahier des charges récapitulant les consignes de prélèvements et d'analyses à suivre pour l'étude de bêtabloquants, hormones et autres contaminants organiques dans les stations d'épuration et les milieux.

V/ Base de données bibliographiques sur les molécules pharmaceutiques dans les stations d'épuration

Au premier semestre 2006, nous avons initié la construction d'une base de données, provenant de sources bibliographiques diverses (articles scientifiques et compte-rendus de projets, littératures nationales et internationales). Cette base prend en compte des données liées aux molécules (propriétés physico-chimiques, dégradation), au type et au fonctionnement des stations d'épuration (type de procédés, capacités, temps de résidence des boues et des eaux, ...), ainsi que des données de concentrations, de taux d'abattement et de flux de ces molécules dans les stations d'épuration. Nous avons également intégré des indices de fiabilité permettant de prendre en compte la plus ou moins grande confiance que l'on peut accorder à ces données.

Dans ce rapport d'activité, nous présentons le contenu de la base de données, la démarche des indices de fiabilité et des résultats issus du traitement statistique de ces données bibliographiques (taux d'abattement moyens pour les procédés boues activées, concentrations moyennes dans les influents, dans les effluents) qui serviront à l'évaluation de la méthodologie d'évaluation des risques basée sur le calcul des PEC telle que proposée dans le modèle EMEA. Cette base de données a fait l'objet d'un poster présenté en Annexe 2 et d'un article publié dans *Water Science and Technology* présenté en Annexe 3 (Miege *et al.*, 2008).

V.1/ Présentation de la base de données

Notre base est la compilation des données issues de 115 publications scientifiques et 2 rapports nationaux couvrant la période de janvier 1997 à juin 2006 pour les données internationales et jusqu'à février 2007 pour les données françaises. Nous avons considéré les molécules pharmaceutiques à usage thérapeutique humaine en incluant les hormones, antiseptiques et produits de soin corporels (184 molécules au total).

Concernant le compartiment aqueux (phase dissoute et particulaire) des stations d'épuration, nous avons recensé 6641 données dont 1602 de concentrations dans des influents, 3120 de concentrations

dans des effluents, 115 de flux dans les influents, 186 de flux dans les effluents et 1618 de rendements d'élimination.

Quand l'information était disponible, nous avons également renseigné la base sur les caractéristiques des stations d'épuration : capacité, nature des influents, type de filière (primaire, secondaire et tertiaire), température et pH du milieu réactionnel dans le réacteur biologique, volume du réacteur, temps de rétention des boues et eaux, caractéristiques des eaux usées (ex. : demande chimique en oxygène, concentration en matières en suspension ou en carbone organique).

Les protocoles d'échantillonnage et d'analyse sont aussi décrits : type d'échantillonnage (moyen 24h ou ponctuel), période d'échantillonnage (mois, saison, année), nature de l'échantillon (eaux usées, effluents primaires, secondaires ou tertiaires), fraction analysée (dissoute, particulaire, brute ou totale), étapes d'analyse (extraction, purification, analyse chromatographique, utilisation d'étalons internes) et performances d'analyse (rendements de récupération, répétabilité, limites de détection et de quantification).

Enfin, nous avons défini des indices de fiabilité nous permettant d'apprécier la confiance à accorder à chaque donnée de la base. Cet indice de fiabilité est développé dans le paragraphe suivant.

V.2/ Définition d'un indice de fiabilité de la donnée

Le rassemblement des données bibliographiques au sein d'une base commune a impliqué plusieurs personnes. De formations et spécialités différentes (génie des procédés, chimie analytique et environnementale), le risque était important pour les différents acteurs d'avoir une appréciation "faussée" de la valeur de la donnée trouvée. Il est donc normal de s'interroger sur la qualité de l'information que contient, au final, la base de données. Deux indices de fiabilité de la donnée ont donc été définis pour permettre d'évaluer la qualité de chaque donnée insérée dans la base : un indice de fiabilité prenant en compte la description des protocoles analytique (l'indice "Analyse") et un autre indice prenant en compte la description des procédés d'épuration (l'indice "Procédé"). Pour chaque indice, 4 niveaux décrivant le contexte d'acquisition de la donnée ont été distingués :

- Le niveau 1, si toutes les informations quantitatives et qualitatives sont disponibles ;
- Le niveau 2, si les informations qualitatives jugées indispensables sont disponibles ;
- Le niveau 3, si les informations qualitatives jugées indispensables sont incomplètes ;
- Le niveau 4 si aucune information n'est indisponible.

Les Tableaux 2 et 3 ci-dessous précisent les informations nécessaires à l'appréciation des indices de fiabilité Analyse et Procédé.

Tableau 2 : Définition des niveaux 1 à 4 de l'indice de fiabilité Analyse.

Critère ANALYSE					
Niveau de fiabilité		1	2	3	4
Description		Valide sans restriction	Valide avec restriction	Non valide	Indéterminé
Prélèvement	Type (ponctuel, moyen)	X		Niveau 2 non atteint	Résultats bruts, matériel et méthode non disponible
	Nature de l'échantillon (influent, effluent...)	X	X		
	Fraction (dissoute, particulaire...)	X	X		
Analyse	Extraction	X ¹	X		
	Méthode chromatograph.	X ¹	X		
	Rendements	X ¹			
	LOD ou LOQ	X ¹			
	n>LOD ou LOQ	X ¹			
	Standard interne	X ¹			
	Effet de matrice	X ¹			

¹: ou Guideline

Tableau 3 : Définition des niveaux 1 à 4 de l'indice de fiabilité Procédé.

Critère PROCEDE					
Niveau de fiabilité		1	2	3	4
Description		Valide sans restriction	Valide avec restriction	Non valide	Indéterminé
Descript. Filière	Prétrait., Trait. I ^e , II ^e et III ^e , C, N et/ou P	X	X	Niveau 2 non atteint	Résultats bruts, matériel et méthode non disponible
	Capacité ou/et volume admis	X			
Caract. fonctionn.	T°	X			
	Param. majeurs (DCO, DBO, SRT, HRT et concentration	X			

¹: ou Guideline

Ces indices permettent d'une part de donner une idée des informations disponibles dans la base et d'autre part de pouvoir sélectionner les données les plus fiables sur lesquelles travailler (la "bonne" donnée bibliographique).

V.3/ Qualité des données rassemblées dans la base

La Figure 7 ci-dessous présente les indices de fiabilité ("Analyse" et "Procédé") obtenus sur des données de taux d'abattement et de concentrations pour les publications scientifiques étudiées dans notre base.

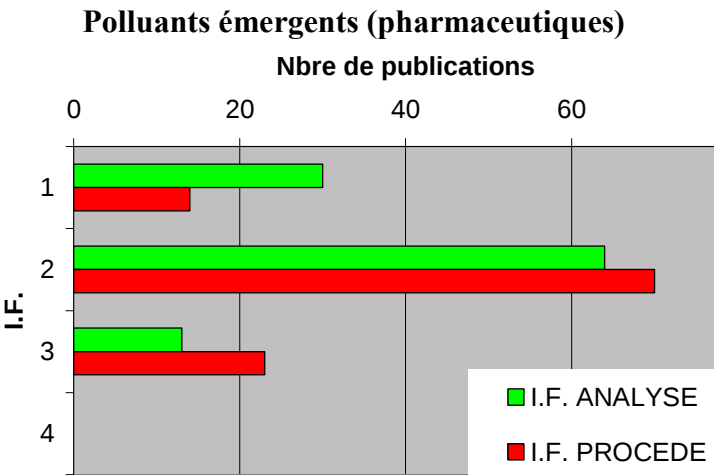


Figure 7 : Indices de fiabilité des données issues des publications scientifiques.

On observe que les informations analytiques caractérisant les données se situent dans le niveau 2 (60% des données) et le niveau 1 (30%). Les informations caractérisant les procédés sont, pour la grande majorité, de niveau 2 qui correspond à la description des étapes de traitement, sans pour autant qu'il y ait d'informations précises sur les conditions de fonctionnement des installations étudiées et sur les performances d'élimination des paramètres majeurs.

Finalement, le nombre de publications avec des indices de fiabilité Analyse et Procédé de niveau 1 est insuffisant pour une exploitation statistique. Par contre, travailler sur les données des niveaux 1 et 2 revient à travailler sur 80% des publications scientifiques.

V.4/ Résultats issus du traitement statistique de la base

V.4.1/ Les molécules les plus étudiées

Les molécules les plus étudiées dans les stations d'épuration sont reportées dans le Tableau 4. La fréquence de citation pour chaque molécule est définie par le ratio du nombre de données pour la molécule sur le nombre de données pour toutes les molécules. La fréquence de citation cumulée pour ces 33 molécules correspond à 80%, c'est à dire que les données relative à ces 33 molécules correspondent à 80% des données reportées dans notre base. Si l'on considère les familles thérapeutiques, les plus représentées sont les hormones (fréquence de citation : 30% pour 7 molécules), les analgésiques et anti-inflammatoires (20% pour 5 molécules) et les antibiotiques (9% pour 7 molécules). Les vasodilatateurs, désinfectants et antidépresseurs reportés dans le Tableau 4 ont une fréquence de citation inférieure à 1%.

Les informations sur les 151 autres molécules de notre base sont donc plus limitées, avec, par exemple, des fréquences de citation de 0,5% pour le paracétamol et la tetracycline, 0,4% pour l'aspirine, 0,3% pour le bisoprolol et le sotalol.

Tableau 4 : Les molécules les plus étudiées dans les stations d'épuration.

Classe thérapeutique	Molécules	Fréquence de citation (%)
Hormones	Estrone, 17 β -estradiol, 17 α -éthynylestradiol, Estriol, 17 α -estradiol, Testosterone, Progesterone	30
Analgesiques, anti-inflammatoires	Ibuprofène, Diclofenac, Naproxen, Ketoprofène, Acide méfénamique	20
Antibiotiques	Sulfaméthoxazole, Triméthoprim, Ciprofloxacine, Roxithromycine, Norfloxacine, Clarithromycine, Erythromycine	8.7
Régulateurs lipidiques	Bezafibrate, Gemfibrozil	4.4
Anti-épileptiques	Carbamazépine	4.0
Métabolites	Clofibracide, Salicylique	3.9
Bétabloquants	Metoprolol, Propranolol, Atenolol	2.8
Produits d'hygiène corporelle	Galaxolide, Tonalide	2.7
Produits de contraste	Iopromide	1.1
Désinfectants	Triclosan	0.8
Vasodilatateurs	Pentoxifylline	0.7
Antidépresseurs	Diazépam	0.6
Total		80

V.4.2/ Concentrations dans les influents et effluents de stations d'épuration avec boues activées

Pour 43 molécules, en considérant les concentrations dans les filières boues activées (avec prétraitement et éventuellement un traitement primaire par sédimentation, un traitement de l'azote, un traitement du phosphore, un traitement tertiaire), nous avons calculé une concentration moyenne avec coefficients de variation (CV), une concentration minimum et maximum dans les influents et effluents de STEP. Ces résultats sont reportés dans le Tableau 5 (dans l'ordre alphabétique).

Pour ce calcul nous avons considéré :

- Seulement les données de concentrations issues de prélèvements moyens 24h,
- Les données de concentrations ponctuelles et aussi moyennées (s'il était possible de pondérer ces dernières par le nombre de mesures ponctuelles),
- Aucune donnée issue d'étude sur pilote ni batch,

Nous n'avons reporté dans le Tableau 5 que les concentrations pour lesquelles au moins 3 données de concentrations étaient disponibles dans les influents ou dans les effluents.

La concentration moyenne dans la phase dissoute des influents varie de 7,4 ng/L pour le 17 α -estradiol (détecté dans 100% des 36 échantillons d'influents analysés) à 212 μ g/L pour l'acide salicylique (détecté dans 100% des 16 échantillons d'influents analysés). Les plus basses concentrations quantifiées dans les influents concernent les hormones (ng/L), et les plus hautes

concentrations sont mesurées pour certains analgésiques et anti-inflammatoires comme le paracétamol et le naproxen (80 et 26,4 µg/L) et le métabolite acide salicylique (212µg/L). Ces concentrations dans les influents dépendent principalement des quantités de médicaments distribuées et de leur métabolisation dans l'organisme humain.

La concentration moyenne dans la phase dissoute des effluents varie de 0,8 ng/L pour le 17α-estradiol (détecté dans 64% des 9 échantillons d'effluents analysés) à 5,68 µg/L pour l'iopromide (détecté dans 57% des 4 échantillons d'effluents analysés). Les plus basses concentrations quantifiées dans les influents concernent les hormones (< ng/L), et les plus hautes concentrations sont mesurées pour certains analgésiques et anti-inflammatoires et produits de contraste (> µg/L). Ces concentrations dans les effluents dépendent principalement des concentrations dans les influents et du taux d'abattement dans la STEP.

D'après le Tableau 5, on note que la fréquence de quantification dans les influents et effluents est forte : elle est supérieure à 50% dans la plupart des cas et elle atteint 100% dans plus de la moitié des résultats (50 cas sur 82).

V.4.3/ Taux d'abattement des molécules pharmaceutiques dans les influents et effluents de station d'épuration avec boues activées

Les données de la littérature font principalement état du taux d'abattement entre dans la phase dissoute des influents et celle des effluents. En effet, excepté quelques articles plus récents, les auteurs ne tiennent pas compte de la teneur en molécules pharmaceutiques dans les MES et les boues, et ceci probablement à cause de la difficulté à analyser ces matrices complexes. Sur les 117 publications étudiées, seulement 15 comprennent des concentrations dans le particulaire.

Pour 50 molécules, en considérant les taux d'abattement dans les filières boues activées (avec prétraitement et éventuellement un traitement primaire par sédimentation, un traitement de l'azote, un traitement du phosphore), nous avons calculé un taux d'abattement moyen avec son écart type. Pour ce calcul nous avons considéré :

- Seulement les données de taux d'abattement issues de prélèvements moyens 24h,
- Les données mesurées et aussi celles calculées à partir de concentrations dans les influents et effluents (si ces concentrations étaient mesurées dans une même station),
- Les données ponctuelles et aussi moyennées (s'il était possible de pondérer ces dernières par le nombre de mesures ponctuelles),
- Aucune donnée issue d'étude en batch,

- Aucun taux d'abattement de valeur négative.

Ces résultats, qui permettent d'évaluer la persistance des molécules dans les STEP, sont reportés Figure 8 (dans l'ordre de taux d'abattement croissant). Pour quelques molécules, le nombre de données (n) disponible est seulement de 1. Mais nous avons vérifié que cette valeur était fiable car cette donnée est une moyenne de plusieurs mesures dans une même STEP et sur une courte période.

D'après la Figure 8, si l'on considère les molécules avec un nombre de données, $n > 3$:

- L'aténolol, la carbamazépine, le métoprolol, le trimetoprim, l'acide méfénamique et l'acide clofibrique sont identifiés comme persistants avec un taux d'abattement inférieur à 30%,
- Le triclosan, la norfloxacin, le 17bêta-estradiol et l'estriol sont identifiés comme peu persistents avec un taux d'abattement supérieur à 80%.

Ce taux d'abattement est lié à la biodégradation de ces molécules (oxydation, hydrolyse, déméthylation, ...), leur sorption sur les boues ou MES (par interactions hydrophobes et électrostatiques), aux pertes par filtration ou oxydation chimique (dans le cas de traitement tertiaire). Les pertes par volatilisation sont négligeables car ces molécules sont peu volatiles (excepté les parfums).

Tableau 5 : Concentrations moyennes, minimum et maximum de molécules pharmaceutiques dans les STEP avec boues activées (reportées pour les molécules avec un nombre de données n > 3).

Classe thérapeutique	Molécule	Concentration dans les influents (µg/L)						Fréquence de quantification dans les influents (%)	Concentration in effluent (µg/L)						Fréquence de quantification dans les effluents (%)
		Moyenne	CV (%)	Médiane	Min	Max	n		Moyenne	CV (%)	Médiane	Min	Max	n	
Analgesique-antiinflammatoire	Dextropropoxyphene	0.0273	20	0.0270	0.0220	0.0330	3	100	0.0523	27	0.0560	0.0370	0.0640	3	100
Analgesique-antiinflammatoire	Diclofenac	1.34	83	0.997	0.105	4.11	91	81	0.680	82	0.420	0.0350	1.95	101	85
Analgesique-antiinflammatoire	Ibuprofen	14.6	149	3.20	0.170	83.5	101	97	1.96	177	0.800	0.0020	24.6	109	93
Analgesique-antiinflammatoire	Ketoprofen	1.03	117	0.340	0.0800	5.70	55	73	0.325	101	0.210	0.0400	1.62	53	73
Analgesique-antiinflammatoire	Mefenamic acid	1.73	52	1.70	0.136	3.20	41	100	1.14	57	1.00	0.0900	2.40	41	100
Analgesique-antiinflammatoire	Naproxen	26.4	343	6.00	1.79	611	45	96	1.89	245	0.880	0.170	33.9	53	87
Analgesique-antiinflammatoire	Paracetamol	80.0	152	26.0	5.53	292	5	100	/	/	/	/	/	/	/
Antibiotique	Azithromycin	0.260					6	100	0.138					6	100
Antibiotique	Ciprofloxacin	0.413	27	0.430	0.180	0.571	20	83	0.0723	27	0.071	0.0450	0.140	29	91
Antibiotique	Clarithromycin	0.647					6	100	0.359					6	100
Antibiotique	Erythromycin	0.108	33	0.113	0.0710	0.141	3	100	0.212	34	0.202	0.145	0.290	3	100
Antibiotique	Levofloxacin	0.552					6	100	0.301					6	100
Antibiotique	Norfloxacin	0.438	12	0.433	0.343	0.515	18	100	0.0608	37	0.0515	0.0390	0.120	26	100
Antibiotique	Roxithromycin	0.0620	62	0.0640	0.0250	0.117	5	100	0.0496	27	0.0450	0.0360	0.069	5	100
Antibiotique	Sulfamethazin	0.333	91	0.210	0.110	0.680	3	43	/	/	/	/	/	/	/
Antibiotique	Sulfamethoxazole	0.342	114	0.157	0.0200	1.25	10	71	0.115	85	0.0700	0.0180	0.320	11	73
Antibiotique	Tetracyclin	0.457	43	0.465	0.240	0.790	6	86	0.282	135	0.115	0.0500	0.850	4	67
Antibiotique	Trimetoprim	0.449	94	0.281	0.0800	1.30	10	100	0.118	120	0.0600	0.0200	0.550	27	93
Anti-épileptique	Carbamazepin	0.968	61	0.732	0.100	1.90	64	100	0.674	68	0.520	0.150	2.30	63	100
Antifongique	Clotrimazole	0.0290	18	0.0310	0.0230	0.0330	3	100	0.0170	52	0.0140	0.0100	0.0270	3	100
Antineoplasique, cytostatique	Tamoxifen	0.170	23	0.153	0.143	0.215	3	19	0.238	49	0.199	0.146	0.369	3	19
Betablockant	Atenolol	0.0300					1	100	0.154	44	0.150	0.0100	0.380	18	100
Betablockant	Bisoprolol	/	/	/	/	/	/	/	0.709	68	0.637	0.303	1.43	18	100
Betablockant	Metoprolol	0.160					1	100	0.338	55	0.373	0.0100	0.688	37	97
Betablockant	Propranolol	0.0747	41	0.0650	0.0500	0.119	4	100	0.341	54	0.381	0.0100	0.615	24	100
Désinfectant	Triclosan	0.380					1	100	0.150	48	0.130	0.0700	0.430	19	100
Hormone	17alpha-estradiol	0.0074	58	0.0063	0.0015	0.0172	36	100	0.0008	110	0.0006	0.0001	0.0031	9	64
Hormone	17beta-estradiol	0.0222	78	0.0186	0.0025	0.125	108	100	0.0028	165	0.0015	0.0003	0.0300	63	74
Hormone	17beta-ethinylestradiol	0.0042	237	0.0019	0.0004	0.0700	70	91	0.0009	120	0.0005	0.0002	0.0050	33	59
Hormone	Estriol	0.115	112	0.0695	0.0146	0.660	36	100	0.0131	365	0.0014	0.0004	0.275	33	92
Hormone	Estrone	0.0672	95	0.0600	0.0024	0.670	109	100	0.0209	121	0.0100	0.0006	0.0950	79	93
Métabolite	Acide clofibrique	0.294	55	0.250	0.0150	0.651	40	70	0.150	46	0.152	0.0420	0.230	24	55
Métabolite	Acide salicylique	212	81	170	16.0	606	16	100	2.50	86	2.80	0.300	4.80	5	45
Métabolite	Carbamazepin-10OH	0.0222					3	100	0.0325					3	100
Métabolite	Carbamazepin-2OH	0.0590					3	100	0.0704					3	100
Métabolite	Carbamazepin-3OH	0.0554					3	100	0.0692					3	100
Métabolite	Carbamazepin-DiOH	1.001					3	100	1.08					3	100
Métabolite	Carbamazepin-EP	0.0392					3	100	0.0191					3	100
Métabolite	Erythromycin-H2O	0.545	87	0.455	0.0700	1.20	4	67	0.220	52	0.270	0.0900	0.300	3	50
Produit de contraste	Iopromide	4.49	75	5.22	0.0260	7.50	4	57	5.68	71	6.58	0.250	9.30	4	57
Produit d'hygiène corporelle	Galaxolide	2.51	51	3.06	0.790	4.443	9	100	0.642	32	0.600	0.451	1.08	9	100
Produit d'hygiène corporelle	Tonalide	0.990	50	1.02	0.210	1.69	8	100	0.162	11	0.160	0.144	0.200	8	100
Régulateur lipidique	Bezafibrate	2.44	93	2.00	0.100	7.60	25	100	0.816	168	0.250	0.0200	4.80	21	78
Régulateur lipidique	Gemfibrozil	1.63	69	1.40	0.700	3.00	4	25	0.564	59	0.600	0.0600	1.34	21	70
Vasodilatateur	Pentoxifyllin	/	/	/	/	/	/	/	0.533	11	0.500	0.500	0.600	3	30

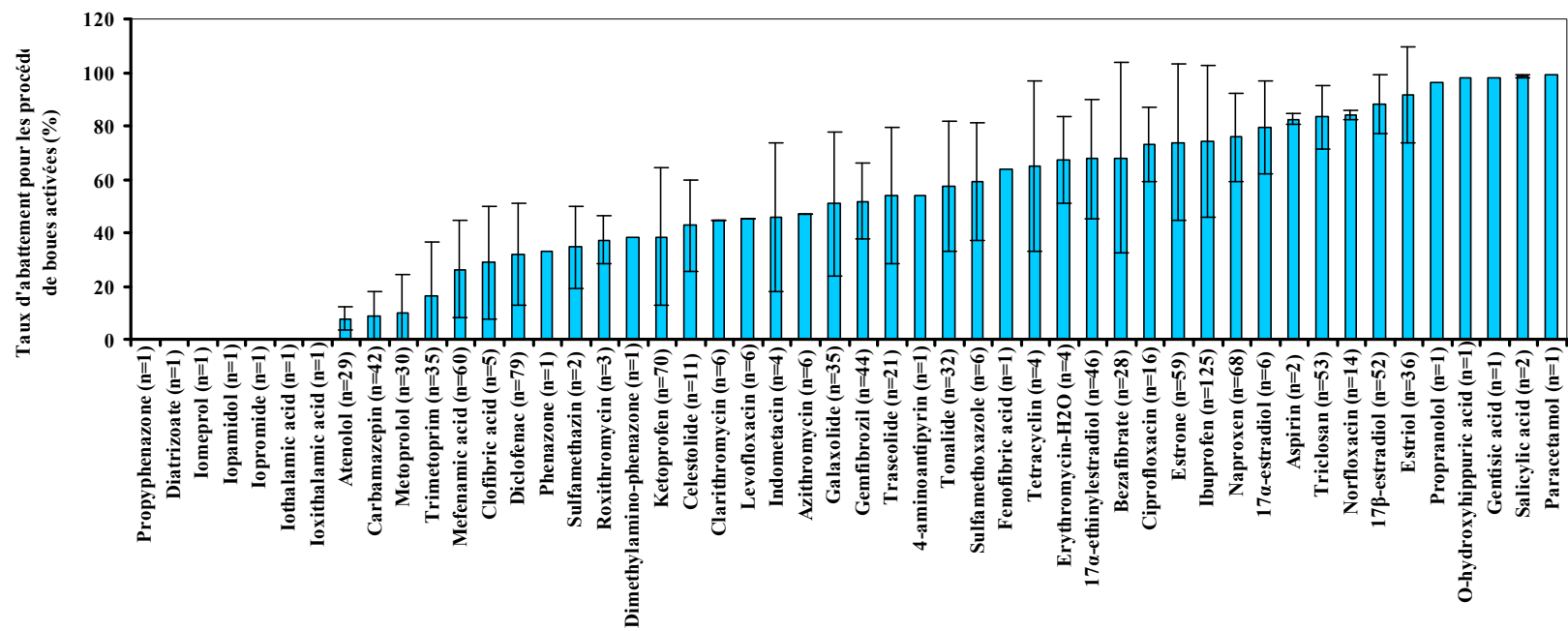


Figure 8 : Taux d'abattement moyens (%) et écart type pour 50 molécules pharmaceutiques dans les STEP avec boues activées.

VI/ Conclusion et perspectives

Les protocoles analytiques applicables aux matrices liquides sont opérationnels et performants. Il nous reste à valider des protocoles pour les matrices solides (MES et boues). Les campagnes d'échantillonnages sur site programmées en 2008 vont nous permettre de compléter les résultats de mesures dans les milieux récepteurs. Ces résultats complémentaires seront utilisés pour compléter cette étude en ce qui concerne la mise en oeuvre d'une méthodologie d'évaluation des risques et de priorisation des substances pharmaceutiques présentée dans le rapport de l'étude AE RM&C phase 1 de Besse et Garric (2007). Par ailleurs, l'exploitation des données obtenues dans le cadre du projet sur les phases dissoute, particulaire et les boues dans les stations d'épuration (influent et effluent) devrait nous permettre d'évaluer des Fstep plus représentatifs que ceux présentés dans la littérature et plus proches des concentrations totales rejetées par les stations d'épurations.

Au terme de ce projet, nous devrions pouvoir proposer un programme de mesure plus général sur l'ensemble des molécules priorisées (la réalisation des mesures n'étant pas incluse dans le projet).

Références bibliographiques

- Ayscough N.J., Fawell J., Franklin G. and Young W. 2000. Review of human pharmaceuticals in the environment. R&D. Technical report P390. Water Research Centre, Environment Agency, R&D Dissemination Centre, WRc Franklin Road Swindon UK.
- Besse J-P., Garric J. 2007. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales" (avril 2007), rapport phase 1 du projet avec l'AE RM&C "Médicaments à usage humain : risques d'exposition et effets sur les milieux récepteurs" (2006-2008).
- Boyd G.R., Reemtsma H., Grimm D.A., Mitra S. 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment* 311, 135-149.
- Buser H.R., Poiger T. and Müller M.D. 1998. Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: Rapid photodegradation in a lake. *Environmental Science and Technology* 32, 3449-3456.
- Christensen F.M. 1998. Pharmaceuticals in the environment-A human risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 28, 212-221.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?, *Environmental Health Perspectives*, 107 (6) 907-938
- Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P. and Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent.1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology* 32, 1549-1558.
- EMEA 2006. Note for guidance on environmental risk assessment of medicinal products for human use. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00. Committee for proprietary medicinal products. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, London, UK. <http://www.emea.eu.int/pdfs/human/swp/444700en.pdf>
- Garric J., Ferrari B., Fraysse B., Mons R., Vollat B. 2006. Effects of some human pharmaceutical on freshwater organisms | [Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce]. *Environnement, Risques et Sante* 5 (4) 290-295.
- Golet E.M., Xifra I., Siegriest H, Alder A. and Giger W. 2003. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3243-3249.
- Heberer T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131, 5-17.
- Halling-Sorensen, B., Nielsen, S. N., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Luthoft, H. C. H., Jorgensen, S. E. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review, *Chemosphere*, 36 (2) 357-394
- Jones O.A.H, Voulvoulis N., Lester J.N. 2001. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a review. *Environmental Science and Technology* 22, 1383-1394.
- Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B., Buxton H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 199-2000: a national reconnaissance. *Environ. Science and Technology* 36, 1202-1211.

- Mathiessen P., Gibbs P. 1998. Critical appraisal of the evidence for the tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 37-43.
- Miège C., Coquery M., Eusèbe M., Choubert J-M. 2008. Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions – Conception of a database and first results. *Water Science and Technology* 1 (57) 49-56.
- Miège C., M Favier, C Brosse, J-P Canler et M Coquery. 2006. Occurrence of bêtablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers, *Talanta*, 70, 739-744
- AFNOR. 1999. Norme NF XP T90 210, Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence
- Petrovic M., Solé M., Lopez de Alda M.J., Barcelo D. 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving water and sediments, integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2146-2156.
- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8,:275-285.
- Schulman, L. J., Sargent, E. V., Naumann, B. D., Faria, E. C., Dolan, D. G., Wargo, J. P. A. 2002. human health risk assessment of pharmaceuticals in the aquatic environment *Human and Ecological Risk Assessment*, 8 (4) 657-680
- Sonnenschein C. et Soto A.M. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65, 143-150.
- Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Vianna Rodrigues S., Baumann, W. 1999. Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil *Science of the Total Environment* 225 (1-2) 135-141.
- Ternes T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Water Research*, 32 (11) 3245-3260
- Tyler C.R., Jobling S., Sumpter J.P. 1998. Endocrine disruption in wildlife, a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 319-361.
- VICH. 2000. Environmental impact assessment for veterinary medicinal products Phase I. CVMP/ VICH/592/98-final. <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/vich/059298en.pdf>
- Zuccato E., Calamari D., Natangelo M. et Fanelli R. 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 355, 1789-1790.

Annexe 1 : Protocole détaillé d'analyse des hormones dans les eaux

(proceeding de communication présentée à 2nd EMCO workshop on "The analysis and removal of contaminants from wastewaters monitoring tools and treatment technologies", 26-27 April 2007, Belgrade, Serbie ; poster présenté au 4th LC-MS-MS workshop, 7,8 février 2008, Barcelone, Espagne).

Method validation for the analysis of estrogenic hormones (including conjugated compounds) in various aqueous matrices

C Miège, P Bados, C Brosse, M Coquery

Cemagref, Freshwater Quality Research Unit, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon, France

E-mail: miege@lyon.cemagref.fr

Introduction

During the last five decades, the consumption of estrogens for human medicine (contraception, management of menopausal and post-menopausal syndrome, physiological replacement therapy in deficiency states and treatment of prostate and cancers) and animal farming (growth promoters, developers of single-sex populations of fish in aquaculture) has considerably increased. Estrogens are usually not entirely metabolized and they reach aquatic environments mainly via the effluents from wastewater treatment plants (WWTP). The lack of knowledge on the toxicity and level of exposition of these compounds and their impact on ecosystems and human health has raised public concern about their occurrence in the environment. Thus, efficient analytical protocols are needed to identify and quantify these emerging contaminants in various environmental compartments.

In this study, we developed an analytical protocol for the determination of five estrogenic hormones (estrone [E1], 17 α estradiol [17 α -E2], 17 β estradiol [17 β -E2], 17 α ethynylestradiol [EE2] and estriol [E3]) including their conjugated forms in various aqueous matrices (rivers, WWTP influents, WWTP effluents) using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). These 5 hormones were chosen because of their strong endocrine-disrupting potency in surface waters. The analytical protocol was validated according to the French standard NF XPT 90-210 (AFNOR, 1999). The procedure included the verification of linearity, the determination of limits of detection (LD) and quantification (LQ) and the evaluation of the specificity of the method (absence of matrix effects for various sample types). We also studied the recoveries and repeatability for the extraction and purification steps and for the hydrolysis of conjugated forms, and we evaluated preservation of wastewaters during 6 days.

Experimental section

Less than one day after sampling, aqueous samples are filtered through pyrolyzed (450°C, 1h) glass fiber filter (Whatman GF/F, 0.7 µm pore size). Perdeuterated hormones (estrone-D4 [E1-D4], 17βestradiol-D2 [17β-E2-D2], 17αethynylestradiol-D4 [EE2-D4] and estriol-D2 [E3-D2]), used as internal surrogates, are spiked before the extraction step.

Extraction is performed on Oasis HLB (200 mg) cartridges and purification on Florisil (1 g). Analysis is achieved by LC-MS-MS. β-estradiol acetate (β-E2 acetate) is spiked into sample extracts before injection to be used as internal standard. As recommended in the EU Commission Decision 2002/657/EC (EU Commission, 2002), the MS-MS conditions include the use of 2 fragment ions for each compound, one for the quantification and one for the identity confirmation. Final concentrations are corrected by the use of recoveries obtained for the internal perdeuterated surrogates.

Concerning the analysis of conjugated steroids, a fraction of the sample is submitted to enzymatic hydrolysis by bêta glucuronidase aryl sulfatase from *Helix pomatia* at pH à 5.2 and 52°C during 15h. The sample is then extracted, purified and analysed as described for unconjugated forms. The conjugated forms concentration is deduced by subtracting concentration of free steroids (sample not submitted to hydrolysis before SPE) from concentration of total steroids (sample submitted to hydrolysis)(Lebizec *et al.*, 1993).

According to the French standard NF XPT 90-210 (AFNOR, 1999), the linearity is validated using Fisher statistic test with a risk α of 1%. For the definition of LQ and LD, firstly their values need to be evaluated. The operator is free to choose the method: for example the LQ can be calculated using the linearity standard curves or estimated graphically from chromatograms of low concentrated standards. Then the value of the estimated LQ should be verified by spiking 10 replicates of each studied matrix at the LQ. The LQ is validated if: $(LQ - C_{LQ})/(s_{LQ}/\sqrt{10}) < 10$ and $5 \times s_{LQ} < LQ$, with C_{LQ} : the mean of the 10 measured concentrations of the spiked sample and s_{LQ} : the standard deviation of the 10 measured concentrations. Finally, specificity is tested using 10 samples of various aqueous matrices spiked at different levels of concentrations. For each molecule, the analytical method is considered specific if the regression curve [(analyzed concentration) = f(spiked concentration)] has (i) a slope not significantly different from 1 with the risk α of 1% and (ii) an origin ordinate not significantly different from 0 with the risk α of 1% (Student statistic tests).

Results and discussion

- Linearity and limits of detection (LD) and quantification (LQ)

Linearity in the extract was verified from 0.5 to 100 µg/L for E1, 17α- and β-E2, and from 0.2 to 100 µg/L for EE2 and E3. From chromatograms of 0.5 and 1 µg/L standard solutions, we evaluated

the LD graphically by considering a ratio signal / noise of 3, and the LQ by considering a ratio signal / noise of 10. We report in Table 1 these calculated LQ, corrected for recoveries and concentration factors for surface waters, WWTP influents and WWTP effluents. These evaluated LQ values are probably lower than actual LQ as matrix effects are not taken into account. Therefore, according to standard NF XPT 90-210, we have to verify them by spiking 10 replicates of each matrix (which need to be naturally not contaminated) at LQ level, corrected by a safety factor of 2 for rivers and WWTP effluents and a safety factor of 4 for WWTP influent. But, the difficulty is that until now, we have not found influents nor effluents naturally not contaminated by E1 and E3.

Table 1: Limits of quantification (LQ) evaluated for the 5 hormones.

Hormones	LQ in the extract (µg/L)	LQ in the extract (pg injected)	LQ in river water (ng/L)	LQ in WWTP influent (ng/L)	LQ in WWTP effluent (ng/L)
E1	0.25	2.5	0.2	0.5	0.2
17α-E2	0.2	2	0.2	0.4	0.1
17β-E2	0.3	3	0.3	0.7	0.3
EE2	0.7	7	0.6	1.5	0.5
E3	0.5	5	0.4	1.3	0.4

- Recoveries and repeatability of the extraction and purification steps

Recoveries and relative standard deviation (RSD) obtained for 5 replicate samples of surface water, WWTP influent and effluent are reported in Table 2. The average recoveries ranging from 85% for 17α-E2 to 108% for E3, with RSD from 4 to 26%, are generally satisfying. The lowest recovery was obtained for 17α-E2 with 56% in WWTP influent. The average recovery of $174 \pm 75\%$ obtained for E3 in influent could be explained by the fact that the influent sample used in this experiment had a concentration of E3 of 150 ng/L (for a spiking concentration of 20 ng/L). Therefore, it will be necessary to complete our validation with low spikes in influent using a less contaminated matrix.

Table 2: Recoveries (R, %) and relative standard deviation (RSD, %) for the 5 hormones in river water, WWTP influent and effluent.

Hormones	River water				WWTP influent				WWTP effluent			
	Spiking conc.		Spiking conc.		Spiking conc.		Spiking conc.		Spiking conc.		Spiking conc.	
	10 ng/L		40 ng/L		20 ng/L		80 ng/L		15 ng/L		60 ng/L	
	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD	R	RSD
E1	86	11	104	6	113	26	84	8	112	11	110	4
17α-E2	63	9	88	8	56	12	106	6	100	7	97	4
17β-E2	72	12	89	5	80	18	95	11	95	10	96	4
EE2	75	7	110	20	79	12	105	15	105	16	128	4
E3	88	9	104	5	174	75	75	36	111	12	97	7

n = 5

- Specificity of the whole analytical method

Specificity was tested using 10 aqueous samples (3 river waters, 3 WWTP influents and 4 WWTP effluents) spiked at different levels of concentrations (from 10 to 80 ng/L). On Figure 1, we can verify that the regression curve [(analyzed concentration) = f(spiked concentration)] obtained for E1, after correction with E1-D2, is very close to the $y = x$ curve.

By Student statistic tests, we verified the specificity of our method for the 5 estrogenic hormones, which means that matrix effects are not significant. The use of perdeuterated hormones as internal standards appears to be an efficient method to correct for matrix effects.

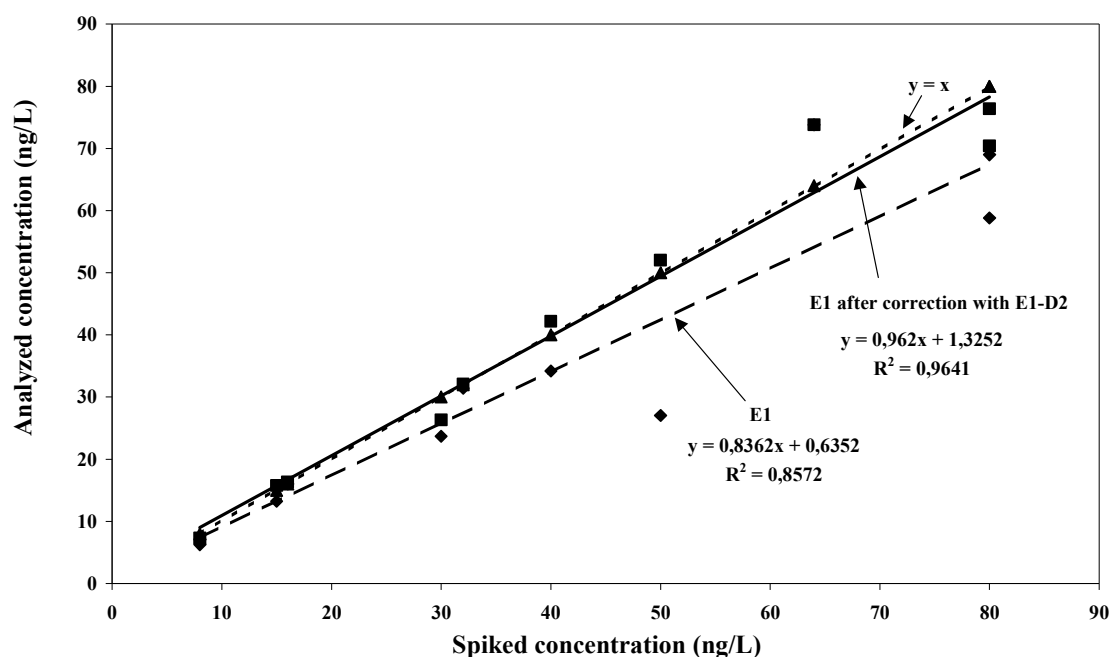


Figure 1: Illustration of the analytical method specificity for E1.

- Recoveries and repeatability of the hydrolysis of conjugated forms

We tested the efficiency of our method designed to hydrolyse 17 β E2 Glucuronide sodium acetate salt, a conjugated form of 17 β E2. A sample of tap water was spiked with 40 ng/L of 17 β E2 Glucuronide sodium acetate salt. We obtained an hydrolysis recovery of 64% with a RSD of 6% (n=3). A higher recovery (106% with a RSD of 13%, n=3) was obtained for a WWTP influent spiked at the same level. These results are all the more satisfying since 17 β E2 Glucuronide sodium acetate salt induce the formation of glucuronic acid during the hydrolysis, which is known to inhibit β glucuronidase aryl sulfatase enzyme. Therefore, recoveries are most likely higher for other conjugated forms, as they are not supposed to induce the formation of glucuronic acid.

- Samples preservation

We studied the stability of the 5 hormones spiked at around 40 ng/L in filtered WWTP influent samples stored at 4°C during 1, 3 and 6 days. As shown in Figure 2, we observed a decrease of the concentrations of all studied hormones of about 5% per day. Thus, samples must be analyzed within 24h after sampling and filtration steps. Alternatively, some authors choose to store samples at a pH between 2 and 5, which allows to guarantee a longer stability of the molecules (up to 14 days after collection according to Trenholm *et al.* [2006]).

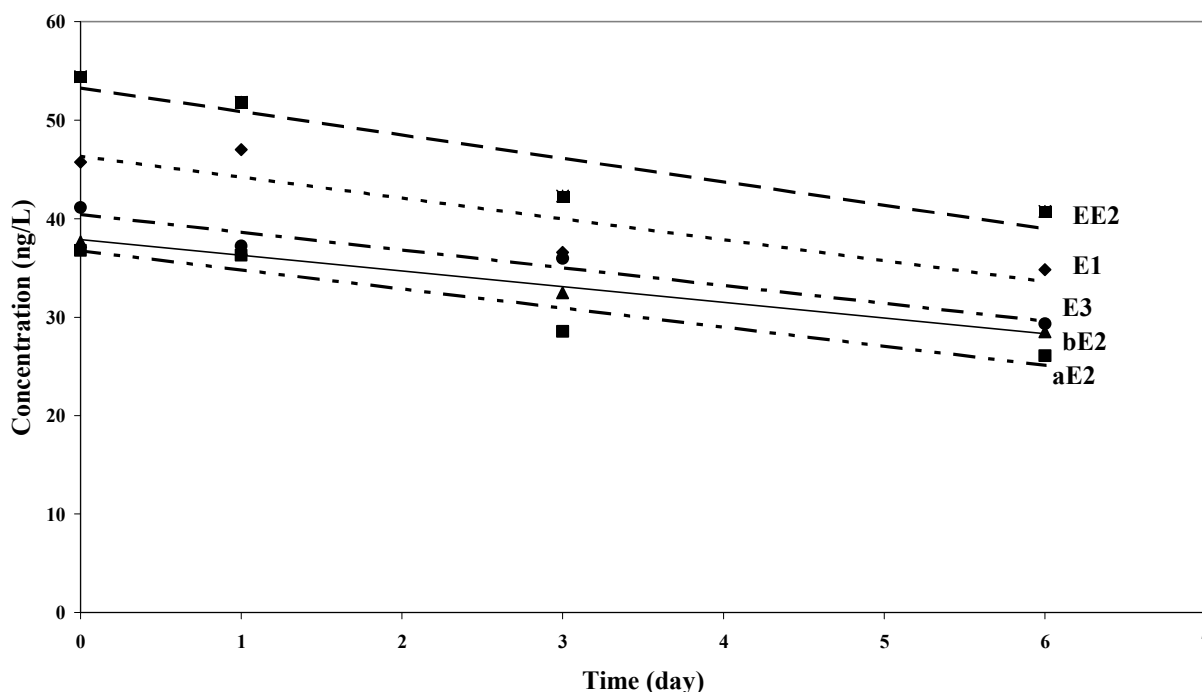


Figure 2: Decreasing concentrations of the 5 hormones in wastewater influent sample stored at 4°C for a 6-day period.

Conclusion

Our analytical protocol allows quantifying the 5 estrogenic hormones and their conjugated forms at the ng/L level in rivers, WWTP influents and WWTP effluents. To fully complete this validation, we need to find naturally non-contaminated waters for all studied compounds in order to verify the calculated LQ. Recovery and repeatability of the extraction and purification of E3 spiked at low level in influent must be also verified with a less naturally contaminated influent.

References

- Lebizec B., Montrade M.P., Monteau F. and André F. Detection and identification of anabolic steroids in bovine urine by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 275 (1993) 123-133
- Trenholm R.A., Vanderford B.J., Holady J.C., Rexing D.J., Snyder S.A. Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Chemosphere* 65 (2006) 1990-1998

- AFNOR, Norme NF XPT 90-210, Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique par rapport à une méthode de référence (1999), 58p
- EU Commission Decision 2002/657/EC, 2002, Décisions de la Commission portant modalités d'application de la Directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats, C(2002) 3044, 29p.

Acknowledgements

The French Agence Nationale de la Recherche and Agence de l'Eau Rhône Méditerranée & Corse are thanked for financial support.

METHOD VALIDATION FOR ANALYSIS OF ESTROGENIC COMPOUNDS (INCLUDING FREE AND CONJUGATED FORM) IN VARIOUS AQUOUS MATRICES

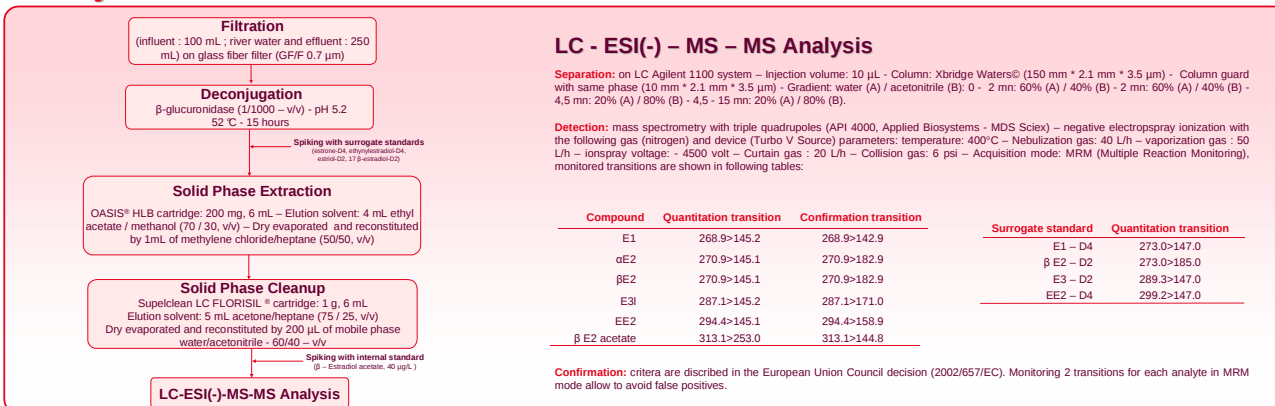
Philippe Bados¹, Cécile Miège¹, Corinne Brosse¹, Marina Coquery¹

¹Cemagref, Groupement de Lyon, Unité de Recherche Qualité des Eaux et Préventions des Pollutions, Laboratoire des Micropolluants Organiques
3 bis Quai Chauveau - CP 220 - 69336 LYON cedex 09 - FRANCE

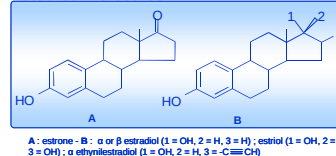
Introduction

The main aim of this work is to develop and validate according to the NF XPT90-210 norm a reliable analytical method for determination of five estrogenic compounds (estrone [E1], 17 α estradiol [α E2], 17 β estradiol [β E2], 17 α ethynylestradiol [EE2] and estriol [E3]) in aqueous samples.

Analytical Procedure



Studied Molecules



Method performances

Linearity & calibration range

Linearity of the method has been statistically tested by verifying validity of linear model and the chosen calibration range (Fisher-Snedecor lack-of-fit test with $P=0.01$). Good linear responses were obtained using standard mixtures containing 0.5 µg/L-80 µg/L before injection (quantitation interval considered is from 1 to 200 ng/L for influents and 0.4 to 80 ng/L for effluents and river water)

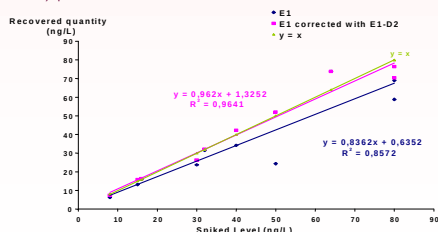
Limits of quantitation (LOQ)

According to the french norm, initial step consist in an estimation of these limits and then by an experimental verification of them. First step of our strategy was to determine the signal to noise ratio (S/N) on calibration standards analysed by LC/MS-MS to estimate instrumental LOQ. Then by correcting these values by recovery and enrichment factor depending of the type of matrix, we have got a robust assessment of value of limit of quantitation for the whole method that we want to verify. In fact we verify these values on only one matrix (river water) but a correction factor can give LOQ for all type of matrix. They're listed in the following table :

Compound	Instrumental LOQ (µg/L)		LOQ (ng/L)		
	Instrumental LOQ (µg/L)	LOQ (ng injected)	River water	WWTP Effluent	WWTP Influent
E1	0.25	2.5	0.4	0.4	1.0
α E2	0.15	1.5	0.4	0.4	0.8
β E2	0.3	3	0.6	0.6	1.4
E3	0.5	5	0.8	0.8	2.6
EE2	0.7	7	1.2	1.0	3.0

Specificity

The principle bases on deviation test of correlation curve (recovered quantity = f(fortified level)) versus $y=x$ curve (Student t test). Experimentally specificity of the method had been check with 10 samples of aqueous matrices (3 river waters, 3 influents and 4 effluent) spiked at different levels. Estrone results are shown here:



For each of the five estrogenic compounds, analytical method is specific, it means that there aren't any significant matrix effects.

Accuracy & repeatability

Recoveries (%) and their RSD (%) are shown in the following table :

Matrix	Fortified level (ng/L)	E1	α E2	β E2	E3	EE2
River water	10	87 (3)	91 (9)	84 (82)	88 (14)	82 (10)
	40	106 (6)	88 (8)	89 (5)	104 (5)	110 (20)
	20	115 (19)	105 (22)*	103 (22)	91 (17)	96 (21)
WWTP influent	80	84 (8)	106(6)	95 (11)	75 (36)	105 (15)
	15	112 (11)	100 (7)	95 (10)	111 (12)	105 (16)
	60	110 (4)	97 (4)	96 (4)	97 (7)	128 (4)

*nominal concentration of α E2 before fortification in this matrix has been quantitate but not confirmed.

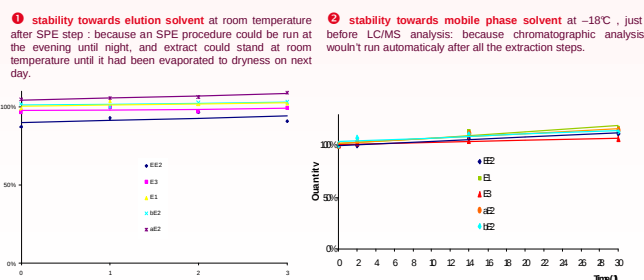
Deconjugation efficiency

In order to quantitate both conjugated and free forms of estrogenic compounds, we have developed a procedure for conjugates hydrolysis. Efficiency of this step were tested on 2 different matrices fortified with a 40 µg/L 17 β E2- glucuronide sodium acetate solution. Recoveries are presented in the following table:

Matrix	Recoveries (%)	RSD (%)
Tap water (n=3)	64	6
WWTP influent (n=3)	104	13

Extract's stability

We know that each sample have to be filtered and extracted in 24 hours following sampling step but to eliminate doubt during the analysis process we want to demonstrate that there isn't any degradation at each step where we could hold the procedure:



In these 2 cases, we haven't observed any degradation trends, so if it's necessary, the analytical procedure could be hold after SPE step and the final extract in mobile phase could be frozen for weeks.

Conclusion & perspectives

- Our analytical method has been shown efficient and reliable. At the present time, it has been used for monitoring purpose.
- Hydrophobic characteristic (non polar) of studied molecules, has been driven us to develop an analytical method to determine them in suspended solids and in sewage sludge in order to know what's append to these compounds in the different WWTP processes.

Aknowledgements : The authors are grateful to National Research Agency (A.N.R.) and to the French Water Agency (Rhône, Méditerranée and Corse) for the financial support of program PRECODD AMPERES (Emergent and Priority Micropollutants Analysis in Waste and Surface Waters)

Removal efficiency of pharmaceuticals and personal care products with varying wastewater treatment processes and operating conditions – Conception of a database and first results

C. Miège, J.M. Choubert, L. Ribeiro, M. Eusèbe, M. Coquery

Cemagref, Water Quality and Pollution Control Research Unit, 3 bis quai Chauveau, CP 220, F-69336 Lyon, France
Corresponding author : cecile.miege@cemagref.fr

Abstract : We created a database in order to quantitatively assess the occurrence and removal efficiency of PPCPs in WWTPs. From 113 scientific publications, we compiled 5887 data on the concentrations and loads of PPCPs in WWTP influents and effluents, and on their removal efficiency. The first outputs of our database include: (1) a list of the most frequently studied molecules, their frequency of detection, their mean concentration and removal in liquid influent and effluent; (2) a comparison of the removal efficiency for different WWTP processes; (3) a study of the influence of the operating conditions (sludge and hydraulic retention times).

Keywords : database; pharmaceuticals and personal care products; removal efficiency; wastewater treatment plants

Introduction

The concern for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as toxic substances in the environment and the need to assess their environmental risk has greatly increased since the early nineties. Several reviews have already been published and allow identifying more than 140 PPCPs from various prescription classes measured in several countries (e.g., Halling-Sorensen, 1998 ; Daughton, 1999 ; Kümmerer, 2001 ; Heberer, 2002 ; Janex-Habibi, 2004 ; Larsen, 2004 ; Garric, 2005 ; Fent, 2006). Some of these reviews compiled ranges of values on the concentrations and removals efficiency of PPCPs in wastewater treatment plants (WWTPs). But some conclusions from the literature remain contradictory. Moreover, we note that none of the reviews on PPCPs in WWTPs used a database to collect and process data from the literature to reach quantitative conclusions.

The aim of our work was to conceive a database in order to study the occurrence and removal efficiency of PPCPs in WWTPs, with a special interest on the influence of the type of process and the operating conditions.

Description of the database

Our database was built from the compilation of 113 international research papers covering a period from January 1997 to June 2006 for international studies and from 1997 to February 2007 for French studies. We considered all pharmaceuticals used for human treatment, including hormones and antiseptics, and personal care products (musk fragrances, sun-screen agents and insect repellents). The total number of molecules covered in the database reaches 169.

We recorded 5887 data from the literature including concentrations in influent (1444 data), concentrations in effluent (2646 data), load in influent (111 data), load in effluent (114 data) and removal efficiency (1572 data) for the aqueous compartment of WWTPs.

When it was available, we also reported detailed information on the WWTPs: design capacity (mean flow rate in m³/d and population equivalent), nature of influent; type of treatment (primary, secondary and tertiary stages); temperature and pH of the mixed liquor in the biological reactor; volume of the reactor; hydraulic and sludge retention times; characteristics of wastewaters (e.g. chemical oxygen demand, suspended solid concentration).

The sampling and analytical procedures were also documented in detail if possible: sampling type (grab or flow proportional), nature of the sample (raw sewage, pre-treatment effluent, primary, secondary or tertiary effluents), water fraction (dissolved, particular, raw or total), period of the year (month or season, year), description of the analytical method (extraction and purification steps, chromatographic analysis, use of internal standards), and description of the performances of the analytical method (recovery, relative standard deviation, limits of detection and quantification).

Lastly, we defined reliability indicators for the recorded data, which we evaluated from the available information on the WWTPs and on the sampling and analytical protocols. These reliability indicators vary from 1 to 4 according to the quantity and the quality of the information and metadata available (i.e., 1: reliable without restriction, 2: reliable with restriction, 3: not reliable, 4: undetermined).

Results and discussion

The PPCPs the most investigated in WWTPs

The molecules and the therapeutic classes the most investigated in WWTPs are reported in Table 1. The frequency of citation for each molecule was calculated as the ratio of the number of data recorded in the database for a given molecule over the total number of data for all studied molecules. We then compiled this information for each therapeutic class for the 80% most frequently cited molecules. The results presented in Table 1 show that the therapeutic classes the most cited in our database are hormones (30%, 7 molecules), analgesics and antiinflammatories (20%, 5 molecules) and antibiotics (9%, 7 molecules). The lipid regulators, anti-epileptics, metabolites, personal care products and betablockers cited in Table 1 have citation frequencies between 1 and 5%. For all other molecules, the frequency of citation is below 1%.

Thus 32 molecules represent 80% of the recorded data. They have been investigated because they are highly prescribed and continuously discharged in the environment, and could be potentially toxic. For the other PPCPs (137 molecules), more limited information is available: e.g., only 0.5% for paracetamol and tetracyclin, only 0.4% for aspirin, 0.3% for bisoprolol and sotalol.

Concentrations of PPCPs in influent and effluent of WWTPs

We calculated the mean, relative standard deviation (RSD), minimum and maximum concentrations of PPCPs in WWTPs for activated sludge processes combined with a pretreatment and one or more of the following treatments: (i) primary sedimentation tank, (ii) treatment of nitrogen and / or phosphorus, and (iii) tertiary treatment. Results are presented in Table 2 (in alphabetic order). We only considered data obtained from 24h flow proportional composite sample which represent 63% of the total number of data on concentrations. Also, we only used individual values for our computation (i.e., we did not include mean values of several 24h flow proportional composite sample measurements, which represents 22% of the total values on concentrations). In Table 2, we only reported the results for the molecules with more than 3 data recorded. This represents a total of 30 molecules for which we could report statistics for influent concentrations and 32 molecules for effluent concentrations.

Mean dissolved concentrations in the influent range from 1.5 ng/L for 17 α -ethinylestradiol (detected in 85% of the influent samples) to 223 μ g/L for salicylic acid (detected in 100 % of the influent samples). The lowest influent concentrations quantified (ng/L level) are found for the hormones and the highest measured concentration (above 100 μ g/L) are recorded for some analgesic-antiinflammatory (naproxen and paracetamol) and a metabolite (salicylic acid). These influent concentrations depend mainly on the degree of prescription and human metabolism.

Mean dissolved concentration in the effluent range from 0.6 ng/L for 17 α -ethinylestradiol (detected in 45% of the effluent samples) to 4.9 μ g/L for iopromide (detected in 50% of the effluent samples). As for the influent, we observe that the lowest quantified concentrations are found for hormones (around 0.1 ng/L) and the highest ones for analgesic-antiinflammatory (around 10 ng/L). We can also note that the frequency of quantification in influent and effluent is generally very high for all molecules (above 50% and it reaches 100% for several molecules).

Removal of PPCPs in the dissolved aqueous phase of WWTPs

In the literature that we have studied to complete our database, the removal efficiency is generally computed as the percentage of reduction between the dissolved aqueous phase concentration of the contaminant in the influent and the dissolved aqueous phase concentration of the contaminant in the effluent. Excepting a few recent studies, the authors did not consider sludge or suspended solid, probably because of the difficulty to sample and to analyse such complex matrices. On the 113 publications we studied, only 15 reported sludge and suspended matter PPCPs concentrations.

In order to compute mean removal (R) for the different molecules, we used removal from our database: (1) only for 24h flow proportional composite sample, (2) for measured and also calculated data from influent and effluent concentrations (if measured in the same WWTP), (3) for full scale WWTP and pilots WWTP but not for batch experiments, (4) taking into account individual and mean removal values.

The type of process significantly influences the removal efficiency of PPCPs. Activated sludge process is well documented in our database: 246 data with nitrogen treatment, 74 data without nitrogen treatment, 57 with nitrogen and phosphorus treatment. We also recorded data for other processes: membrane bioreactor with nitrogen treatment (41 data), pre-treatment and primary sedimentation tank (21 data), immersed biofilters (12 data) and fixed biomass reactor (6 data).

Influence of the nature of the molecule on the removal for activated sludge processes

The calculated mean values of removal for WWTPs with activated sludge processes allowed to evaluate the persistence of the studied PPCPs compounds (Figure 1). This removal data include activated sludge processes with a pretreatment and one or more of the following treatments: (i) a primary sedimentation tank, (ii) a treatment of nitrogen and / or phosphorus. Removal data could be obtained for 43 molecules. Considering molecules with a data set higher than 3, norfloxacin, triclosan and 17 β -estradiol can be pointed out as highly removed contaminants (R > 80%), whereas carbamazepine, mefenamic acid and clofibric acid have low removal efficiency (R < 30%). For several molecules, only one data set is available but we verified that it was a mean value of several measurements in a single WWTP over a short period, therefore these results can be considered reliable (see Figure 1).

The main mechanisms involved in their removal are biodegradation (oxidation, hydrolysis, demethylation, cleavage of glucuronide conjugates, ...), sorption on sludge or particulate matter (by hydrophobic or electrostatic interactions), filtration and chemical oxidation. Loss by volatilization is negligible for PPCPs except for musk fragrances, slightly volatile (Larsen, 2004).

Influence of the operating conditions

The hydraulic retention time (HRT) and the sludge retention time (SRT) are often used to explain the variation of PPCPs removal efficiency inside WWTPs.

Processes with nitrogen treatment (i.e., primary treatments with physico-chemical treatment, membrane bioreactors, submerged biofilters and some activated sludges), which are characterized by high HRT (>12 h) and high SRT (>10 d), are more efficient in removing PPCPs than processes without nitrogen treatment (i.e., primary treatments without physico-chemical treatment, fixed

biomass reactors, waste stabilization ponds and some activated sludges) which are characterized by low HRT and SRT and which only provide suspended particles and dissolved carbon removal (Figure 2). Indeed, high retention times provide more time for low rate reactions like biodegradation and sorption mechanisms to occur.

Influence of the type of process

The comparison between several processes was carried out for each molecule. Computed mean removal efficiencies for different processes (y axis) are plotted versus mean removal efficiencies for the high-SRT activated sludge process (x axis) (Figure 3). We observe that most removal rates are located under the $y=x$ line, which means that conventional activated sludge process with nitrogen treatment is one of the most efficient process, together with membrane bioreactors combined with nitrogen treatment and also activated sludge with both nitrogen and phosphorus treatments. Primary treatment sedimentation tank provide removal efficiency in the range 0-40%, whereas, removal with biological treatment are mainly in the range 50-90%. Besides, the data indicate that filtration membrane bioreactors would provide 15% higher removal rates than the ones obtained with activated sludge process with nitrogen removal. Half of the removal rates obtained with both nitrogen and phosphorus activated sludge treatment are equivalent to the ones obtained for activated sludge with nitrogen removal. For the other half, removal are 30% higher, or 30% lower without obvious explanation. This difference could be explained by the quality of the data, particularly because of the type of phosphorus removal (biological, or chemical), which is not specified. It is difficult to conclude on the removal efficiencies with fixed growth biomass processes because of the too small number of data.

Conclusion and Perspectives

Using our database, we were able to: (1) obtain reliable and quantitative values from the literature on concentrations and removals of PPCPs in WWTPs, (2) identify the most persistent PPCPs, (3) verify that high HRT and SRT were essential for high removals. Future data treatment will include statistical tests on the influence of operating conditions such as SRT, HRT and also the temperature of the mixed liquor in the biological reactor. These results unfortunately cannot take into account the full removal of PPCP in WWTPs as only the dissolved concentrations are usually measured. This should not be such a problem for hydrophilic molecules but cannot be overlooked for more hydrophobic compounds such as hormones for instance. Future studies in our laboratory will include full scale WWTP mass balance for dissolved and solid phase of pharmaceutical compounds.

Acknowledgements

The French National Agency of Research (ANR) and European projects NORMAN and KNAPPE are thanked for financial support.

References

- Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft CH, Jorgensen SE (1998) Chemosphere 36:357-393
- Daughton CG, Ternes TA (1999) Environmental Health Perspectives 107 Supplement 6:907-938
- Kümmerer K (2001) Chemosphere 45:957-969
- Heberer T (2002) Journal of Hydrology 266:175-189
- Janex-Habibi ML, Bruchet A, Ternes TA (2004) Techniques, Sciences, Méthodes 11:59-67
- Larsen TA, Lienert J, Joss A, Siegrist H (2004) Journal of Biotechnology 113:295-304
- Garric J, Ferrari B (2005) Revue des sciences de l'eau 18:307-330
- Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Aquatic Toxicology 76:122-159

Table 1: The PPCPs the most investigated in WWTPs.

Therapeutic class	Molecules	Frequency (%) ^a
Hormone	17 β -estradiol, Estrone, 17 α -ethinylestradiol, Estriol, 17 α -estradiol, Testosterone, Progesterone	30
Analgesic-antiinflammatory	Ibuprofen, Diclofenac, Naproxen, Ketoprofen, Mefenamic acid	20
Antibiotic	Sulfamethoxazole, Trimetoprim, Ciprofloxacin, Roxithromycin, Erythromycin, Norfloxacin, Clarithromycin	8.5
Lipid regulator	Bezafibrate, Gemfibrozil	4.7
Anti-epileptic	Carbamazepine	4.1
Metabolite	Clofibric acid, Salicylic acid	3.8
Betablocker	Metoprolol, Propanolol, Atenolol	2.9
Personal Care Product	Galaxolide, Tonalide	2.7
Contrast product	Iopromide	1.2
Disinfectant	Triclosan	0.8
Vasodilator	Pentoxifylline	0.7
Total		80

^a: frequency of citation in our database (113 papers, 5887 data, 169 molecules)

Table 2: Mean, minimum and maximum concentrations of PPCPs in WWTPs with activated sludge processes (reported only for individual value with a data set n > 3).

Therapeutic class	Name	Concentration in influent ($\mu\text{g/L}$)					Frequency of quantification in influent (%)	Concentration in effluent ($\mu\text{g/L}$)					Frequency of quantification in effluent (%)
		Mean	RSD (%)	Min	Max	n		Mean	RSD (%)	Min	Max	n	
Analgesic-antiinflammatory	Dextropropoxyphene	0.0273	20	0.022	0.033	3	100	0.0777	50	0.037	0.141	6	100
Analgesic-antiinflammatory	Diclofenac	0.882	117	0.105	4.11	27	68	0.477	93	0.035	1.72	42	81
Analgesic-antiinflammatory	Ibuprofen	14.2	119	0.17	59.2	48	94	2.87	192	0.002	24.6	48	89
Analgesic-antiinflammatory	Ketoprofen	1.75	88	0.08	5.7	18	53	0.418	111	0.04	1.62	16	50
Analgesic-antiinflammatory	Mefenamic acid	0.664	80	0.136	1.9	12	100	0.617	51	0.09	1.08	15	100
Analgesic-antiinflammatory	Naproxen	40.3	288	1.79	611	27	93	2.61	274	0.17	33.9	22	73
Analgesic-antiinflammatory	Paracetamol	93.5	145	5.53	292	4	100	/	/	/	/	/	/
Antibiotic	Ciprofloxacin	0.195	11	0.18	0.21	2	33	0.0760	47	0.06	0.14	5	63
Antibiotic	Erythromycin	0.108	33	0.071	0.141	3	100	0.206	28	0.145	0.29	6	100
Antibiotic	Roxithromycin	0.0620	62	0.025	0.117	5	100	0.0496	27	0.036	0.069	5	100
Antibiotic	Sulfamethazine	0.333	91	0.11	0.68	3	43	/	/	/	/	/	/
Antibiotic	Sulfamethoxazole	0.342	114	0.02	1.25	10	71	0.115	85	0.018	0.32	11	73
Antibiotic	Tetracycline	0.457	43	0.24	0.79	6	86	0.283	135	0.05	0.85	4	67
Antibiotic	Trimetoprim	0.449	94	0.08	1.3	10	100	0.214	87	0.02	0.55	17	89
Anti-epileptic	Carbamazepine	0.900	54	0.1	1.9	22	100	1.02	46	0.18	2.3	23	100
Antifongic	Clotrimazole	0.0290	18	0.023	0.033	3	100	0.0185	42	0.01	0.027	6	100
Antineoplastic, cytostatic	Tamoxifen	0.170	23	0.143	0.215	3	100	0.421	59	0.146	0.74	6	100
Betablocker	Atenolol	/	/	/	/	/	/	0.184	72	0.01	0.38	5	100
Betablocker	Metoprolol	/	/	/	/	/	/	0.143	50	0.08	0.24	6	86
Betablocker	Propanolol	0.0748	41	0.05	0.119	4	100	0.236	72	0.01	0.414	9	100
Contrast product	Iopromide	3.49	95	0.026	6.6	3	50	4.87	93	0.25	9.3	3	50
Disinfectant	Triclosan	/	/	/	/	/	/	0.194	70	0.09	0.43	5	100
Hormone	17 α -estradiol	0.0074	58	0.0015	0.0172	36	100	0.0008	115	0.0001	0.0031	10	63
Hormone	17 α -ethinylestradiol	0.0015	37	0.0008	0.0028	34	85	0.0006	65	0.0002	0.0014	9	45
Hormone	17 β -estradiol	0.0274	43	0.0025	0.0484	46	100	0.0018	98	0.0003	0.0052	15	52
Hormone	Estrone	0.0725	40	0.0024	0.139	47	100	0.0136	143	0.0006	0.0728	26	93
Lipid regulator	Bezafibrate	2.04	112	0.1	7.6	15	100	0.718	178	0.02	4.8	13	76
Lipid regulator	Gemfibrozil	1.63	69	0.7	3	4	25	0.458	118	0.06	1.34	8	47
Metabolite	Clofibric acid	0.194	108	0.015	0.651	8	62	0.0864	57	0.042	0.185	8	44
Metabolite	Erythromycin-H ₂ O	0.545	87	0.07	1.2	4	67	0.220	52	0.09	0.3	3	50
Metabolite	Salicylic acid	223	78	16	606	15	100	2.50	86	0.3	4.8	5	50
Personal Care Product	Galaxolide	2.51	51	0.79	4.44	9	100	0.642	32	0.451	1.08	9	100
Personal Care Product	Tonalide	0.990	50	0.21	1.69	8	100	0.162	11	0.144	0.2	8	100
Vasodilator	Pentoxifylline	/	/	/	/	/	/	0.533	11	0.5	0.6	3	30

/: no individual value reported (n<3)

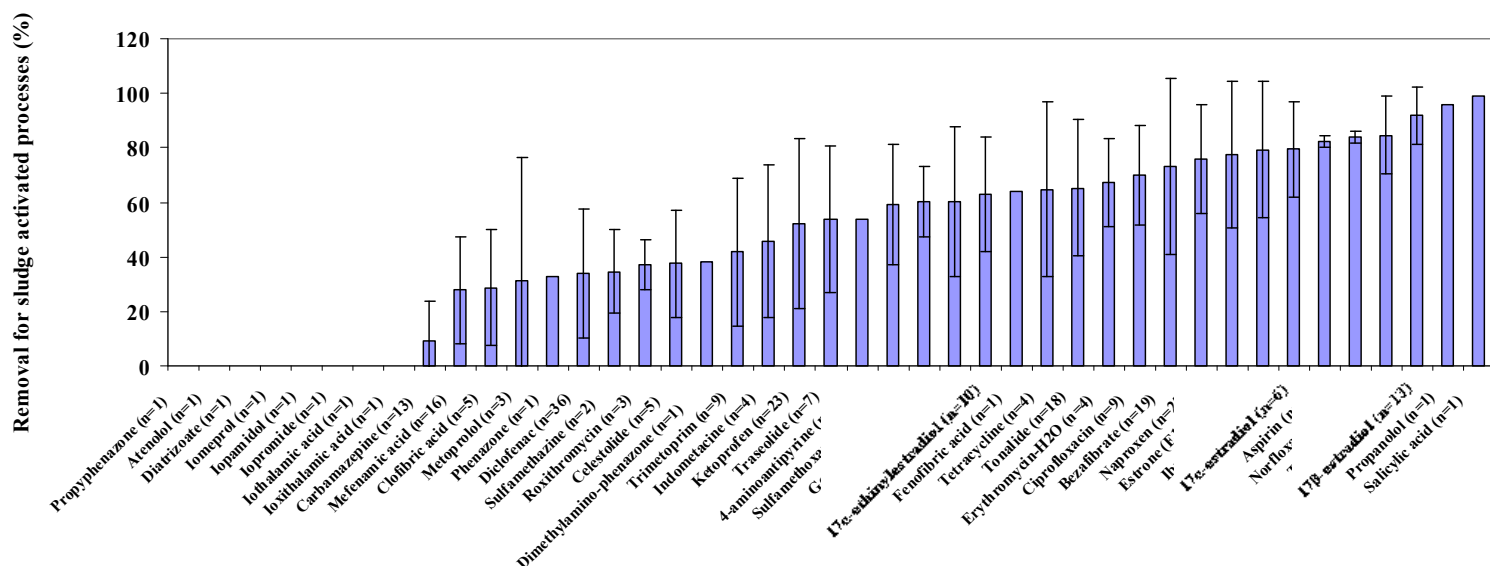


Figure 1: Mean removal efficiency (%) and standard deviation for PPCPs in WWTPs with activated sludge processes (from individual and mean values).

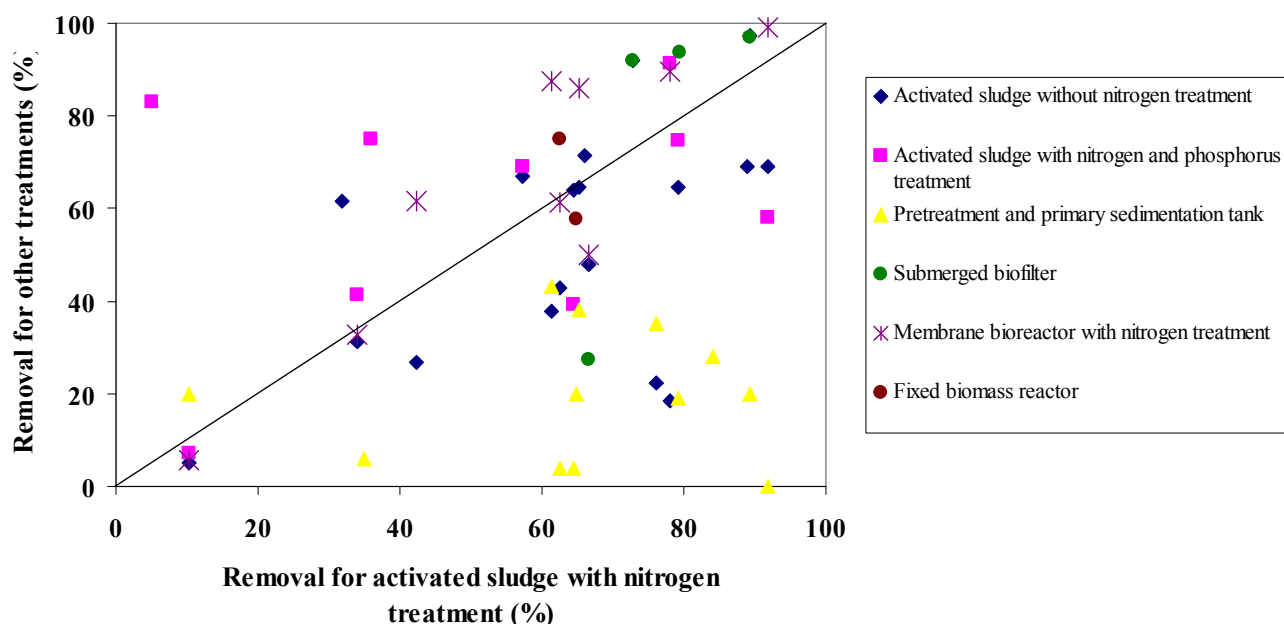


Figure 2: Comparison of removal efficiency (%) obtained for activated sludge process with nitrogen treatment (x-axis) with other treatment processes (y-axis).

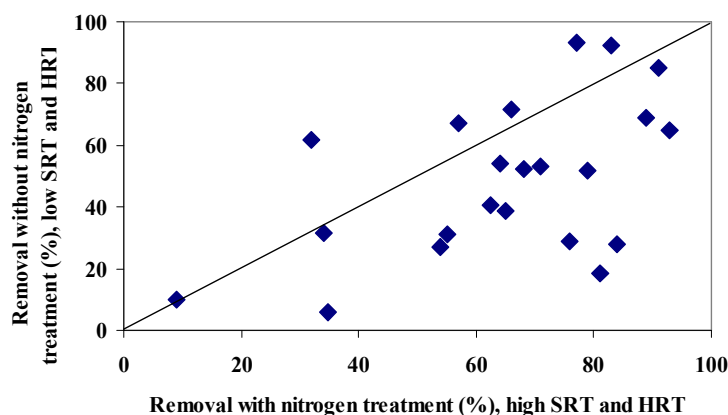


Figure 3: Comparison of removal efficiency (%) obtained for WWTPs processes with nitrogen treatment (x-axis) or without nitrogen treatment (y-axis), each point represents one molecule.

