caractérisation des processus de dégradation de nouveaux anticoagulants et d'un cytotoxique en milieu aqueux avec évaluation des impacts pharmaceutiques et environnementaux

Philippe-Henri Secrétan

▶ **To cite this version:**

Philippe-Henri Secrétan. caractérisation des processus de dégradation de nouveaux anticoagulants et d'un cytotoxique en milieu aqueux avec évaluation des impacts pharmaceutiques et environnementaux. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS481 . tel-02012160

HAL Id: tel-02012160
https://theses.hal.science/tel-02012160

Submitted on 8 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université PARIS-SACLAY

NNT : 2018SACLS481

Thèse de doctorat

CARACTÉRISATION DES PROCESSUS DE DÉGRADATION DE NOUVEAUX ANTICOAGULANTS ET D'UN CYTOTOXIQUE EN MILIEU AQUEUX AVEC ÉVALUATION DES IMPACTS PHARMACEUTIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris Sud
Laboratoire Matériaux et Santé – EA 401

École doctorale n°569
Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué
Spécialité de doctorat : pharmacotechnie et physico-chimie pharmaceutique

Thèse présentée et soutenue à Chatenay Malabry, le 26 novembre 2018, par

Philippe-Henri Secrétan

Composition du Jury :

M. Philippe Maitre Professeur des universités Université Paris-Sud, laboratoire de chimie physique, UMR8000 CNRS	Président du jury
M. Bernard Do Maître de conférences des universités – praticien hospitalier Université Paris-Sud, laboratoire matériaux et santé, EA 401	Directeur de thèse
M. Philippe Cardot Professeur des universités Université de Limoges, laboratoire de chimie analytique, EA 3842	Rapporteur
M. Jean-Marc Chovelon Professeur des universités Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, IRCELYON	Rapporteur
Mme. Najet Yagoubi Professeur des universités Université Paris-Sud, laboratoire matériaux et santé, EA 401	Examinateur
M. Robert Barouki Professeur des universités – praticien hospitalier Université Paris Descartes, INSERM UMR-S 747	Examinateur
M. David Kryza Maître de conférences des universités – praticien hospitalier Université Lyon 1, CNRS, LAGEP UMR 5007	Examinateur
M. Yves Levi Professeur des universités Université Paris-Sud, laboratoire Ecologie, Systématique et Evolution	Examinateur

REMERCIEMENTS

Comme pour la plupart des travaux scientifiques, le contenu de ce Doctorat d'Université n'aurait pu voir le jour sans l'aide d'experts dans les disciplines mises en jeu. Les éléments qui sont développés dans le manuscrit, qu'ils proviennent de l'exploitation de publications ou des travaux scientifiques conduits dans le laboratoire Matériaux et Santé de l'Université Paris-Sud, se devaient d'être évalués par des enseignants-chercheurs spécialistes.

Pour cette raison, je souhaite adresser toute ma gratitude aux chercheurs qui m'ont aidé dans l'élaboration de ces travaux de thèse ainsi qu'à ceux qui ont accepté de les évaluer pour la délivrance de mon Doctorat d'Université.

Je souhaite aussi remercier tous ceux qui ont été à mes côtés pendant ces passionnantes années qui ont été pour moi pleines de découvertes et de défis scientifiques.

À Monsieur Bernard Do, Directeur de thèse

Bernard, je souhaite t'adresser mes plus vifs remerciements et souligner ici toute ma gratitude. Je te suis particulièrement reconnaissant pour ton encadrement, ta pédagogie et ta grande disponibilité durant ces années. Les méthodes, les connaissances et les savoir-faire scientifiques que tu m'as transmis, tes nombreux conseils, ta sympathie et ta bienveillance à mon égard n'ont fait qu'accroître ma passion pour la physico-chimie pharmaceutique. J'espère vraiment que nous pourrons continuer à travailler ensemble sur des projets scientifiques.

À Madame Najet Yagoubi, Directrice du laboratoire « Matériaux et Santé »

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez toujours manifestée et pour la façon avec laquelle vous m'avez accueilli puis intégré au laboratoire. Vous m'avez toujours conseillé et aidé afin que les travaux scientifiques entrepris aboutissent. Sachez que c'est un grand plaisir pour moi de travailler dans votre laboratoire avec l'ensemble de votre équipe. J'espère vivement qu'il me sera possible de continuer des travaux dans le laboratoire « Matériaux et Santé ».

À Monsieur Philippe Cardot, rapporteur

Votre expertise dans le domaine de la chimie analytique, en particulier dans le domaine des méthodes séparatives m'a conduit à vous solliciter pour être rapporteur de ma thèse. Je vous remercie très sincèrement d'avoir accédé à ma requête.

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

À Monsieur Jean-Marc Chovelon, rapporteur

Votre expertise dans le domaine de de la catalyse chimique et l'élucidation structurale des produits de dégradation m'a conduit à vous solliciter pour être rapporteur de ma thèse. Je vous remercie très sincèrement d'avoir accédé à ma requête.

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

À Monsieur Robert Barouki, membre du jury

Votre expertise dans le domaine de la pharmacologie et de la toxicologie, ainsi qu'en spectrométrie de masse m'a conduit à vous solliciter pour le jury de ma thèse.

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

À Monsieur David Kryza, membre du jury

La pharmacocinétique des principes actifs est l'un de vos domaines d'expertise ; il m'a conduit à vous solliciter pour le jury de ma thèse.

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

À Monsieur Yves Levi, membre du jury

Les travaux que vous conduisez concernant l'évaluation de l'impact environnemental des composés organiques m'ont conduit à vous solliciter pour le jury de ma thèse.

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

À Monsieur Philippe Maitre, membre du jury

Constituer un jury de spécialistes me tenait particulièrement à cœur c'est pourquoi je vous ai sollicité notamment en raison de votre expertise dans le développement d'approches pour caractériser la structure des composés organiques.

C'est un grand honneur pour moi que vous ayez accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

Aux membres de l'EA 401 Matériaux et Santé de l'Université Paris-Sud

Je tiens à remercier Johanna Saulnier et Emile Jubeli avec lesquels j'ai la chance d'avoir des échanges toujours riches et amicaux ainsi que Nicole Gourlain et Katia Manerlax pour leur gentillesse et leur aide. Aux anciens co-thésards, Mélisande Bernard, Hassane Sadou-Yayé et Lionel Tortolano, que nos collaborations continuent d'être fructueuses et dans la bonne humeur!

Aux membres du service de pharmacie de l'hôpital Necker-Enfants malades

Je tiens à remercier Monsieur Salvatore Cisternino, chef de Service de la pharmacie à usage intérieur de l'hôpital Necker, pour la confiance qu'il m'accorde et les missions qu'il me confie. J'espère vivement que je pourrais continuer à travailler avec vous sur des projets pharmaceutiques et scientifiques.

Je souhaite aussi remercier tous les pharmaciens avec lesquels j'ai beaucoup de plaisir à avoir des relations au quotidien. En particulier Monsieur Joël Schlatter avec lequel les échanges, notamment dans le cadre du développement de nouvelles préparations, sont toujours fructueux et agréables.

Je remercie l'ensemble du personnel de la pharmacie pour la qualité de leurs apports.

Aux pharmaciens que j'ai eu l'honneur de connaître

Je tiens à remercier Monsieur le chef de service François Chast, pour la confiance qu'il m'a accordée lorsque j'ai candidaté pour être pharmacien à l'hôpital Necker. Je lui suis très reconnaissant pour sa bienveillance et pour tout ce qu'il m'a apporté.

Je remercie les chefs de Services, Mesdames Isabelle Debrix, Annie Durand et Muriel Paul ainsi que Messieurs Alain Astier et Pierre Faure, pour la confiance qu'ils m'ont donnée et pour leur encadrement bienveillant. Mes semestres d'internat en pharmacie dans leurs services ont été riches en apprentissages.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des pharmaciens hospitaliers qui m'ont aidé à progresser dans le domaine de la chimie pharmaceutique : Mesdames Mélisande Bernard, Sylvie Crauste-Manciet, Marie-Noëlle Guerrault-Moro, et Victoire Vieillard ainsi que Messieurs Olivier Thirion et Raphael Vazquez. Merci pour vos conseils, votre sympathie, votre disponibilité et votre pédagogie.

À mes très chers parents

Je souhaite vous adresser un immense merci pour votre soutien permanent qui s'est encore plus fait ressentir pendant ces passionnantes années pleines de défis scientifiques. Vous avez largement contribué à ma réussite et aux choix professionnels dont je suis pleinement satisfait. Un grand merci pour votre disponibilité de toujours et pour l'aide que vous m'apportez avec toujours autant de gentillesse.

À mes très chers proches

À Élisabeth, ma sœur, avec laquelle ma grande complicité continue de grandir au fil des années pour mon plus grand plaisir. À Thomas, mon très sympathique beau-frère, à mes nièces, Juliette et Marie toujours pleines de joie et de bonne humeur. Nos retrouvailles en famille sont toujours pour moi un immense plaisir. Le temps nous manque souvent pour nous voir davantage!

Aux amis de la faculté, de l'internat et de l'assistanat

Mathieu, grâce à toi cela a toujours été un grand plaisir de venir à la fac, de réviser l'internat et d'avoir poursuivi notre amitié en dehors du travail. Je vous souhaite tout le meilleur, à toi et Annabelle. Mathilde, Sydney et Xavier, merci pour tous ces moments partagés. À Nasrine, le travail t'a emmené loin, à très vite! À tous ceux que j'ai eu la chance de rencontrer dans ces années pharma et que j'ai toujours plaisir à voir : Laura et Sevag, Prune et Yo, Pierrick, Khalil…

À tous ceux que j'ai rencontrés pendant mon internat Carole, Virginie, Fatma, Lionel, Matthieu, Bastien, Alex et Bruno. Merci à vous, pour ces superbes souvenirs en salle de garde et en dehors !

Aux pharmaciens assistants que j'ai eu la chance de rencontrer ou de mieux connaitre à l'hôpital Necker et avec lesquels nous allons poursuivre l'aventure : Camille, Sylvain, Aurélie et Bruno. À Béatrice que j'espère continuer à côtoyer encore très longtemps…

Aux amis d'enfance

James, Fabien et Adrien, merci pour les très belles « années EPSI » et ces supers voyages, de très beaux breaks ! À Charlotte et Delphine pour leur bonne humeur, leur motivation de toujours et leur talent organisationnel/culinaire. JP, c'est toujours un plaisir de se faire des parties de billard au Montbauron. Aux deux papas du groupe : Benoit et Kevin, que vos petites familles se portent bien ! À Etienne, c'est toujours un grand plaisir de te voir.À tous mes amis qui comptent beaucoup pour moi : Gaël, Bertrand, JP, Benoit, James, Marine, Cédric, Valérie, Astrid, Jess, Tanguy, Maria…

Table des matières

Liste des abréviations 5

Liste des figures 7

Liste des tableaux 11

INTRODUCTION 13

CHAPITRE 1 : DÉGRADATION DU PRINCIPE ACTIF EN MILIEU AQUEUX ET CONSÉQUENCES POTENTIELLES 19

1. Aspects fondamentaux de la dégradation en milieu aqueux 21

1.1. Aspects thermodynamique et cinétique 21

1.2. Processus de dégradation 23

2. Dégradation du principe actif aux différentes étapes de son cycle de vie 35

2.1. Dégradation du principe actif au sein du médicament 35

2.2. Dégradation du principe actif éliminé dans l'environnement 37

2.3. Dégradation du principe actif par exposition aux conditions de traitement des eaux usées 40

3. Conséquences potentielles de la dégradation 43

3.1. Sur le plan pharmaceutique 43

3.2. Sur le plan environnemental 45

4. Conclusion 47

CHAPITRE 2 : APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DU PRINCIPE ACTIF ET DE SES CONSÉQUENCES POTENTIELLES 49

1. Choix méthodologiques 51

2. Dégradation en conditions de stress 53

2.1. Lignes directrices : rappels 53

2.2. Conditions expérimentales utilisées 54

3. Analyse structurale 57

3.1. Séparation chromatographique 57

3.2. Couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse multiniveaux à haute résolution (LC-HRMS^n) 58

3.3. Élucidation structurale par LC-HRMS^n 64

3.4. Optimisation analytique 67

4. Approches computationnelles 69

4.1. Approche *ab initio* : modélisation moléculaire 69

4.2. Approche *in silico* : évaluation toxicologique 74

CHAPITRE 3 : DÉGRADATION DE L'APIXABAN EN CONDITIONS HYDROLYTIQUES ET IMPLICATIONS POTENTIELLES 81

1. Contexte de l'étude 83

2. Méthodes et protocole d'essai 88

3. Résultats 89

3.1. Performances analytiques : évaluation de la capacité indicatrice de stabilité de la méthode séparative 89

3.2. Dégradation en fonction des conditions de stress 90

3.3. Élucidation structurale des produits de dégradation 91

3.4. Voies majoritaires de dégradation de l'apixaban 107

3.5. Toxicité potentielle des produits de dégradation de l'apixaban 112

4. Conclusion 119

Article 1 : a comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry 121

CHAPITRE 4 : PHOTODÉGRADATION DE L'ARGATROBAN ET IMPLICATIONS POTENTIELLES 123

1. Contexte de l'étude 125

2. Méthodes et protocole d'essai 127

3. Résultats 128

3.1. Photodégradation de l'argatroban : aspects quantitatifs 128

3.2. Élucidation structurale des produits de photodégradation.....130

3.3. Processus de photodégradation de l'argatroban.....144

3.4. Processus initiant la dégradation de l'argatroban selon une approche *ab initio*.....147

3.5. Étude *in silico* de la toxicité potentielle des produits de photodégradation de l'argatroban.....150

4. Conclusion.....152

Article 2 : photodegradation of aqueous argatroban investigated by LC/MS^n : photoproducts, transformation processes and potential implications. 155

CHAPITRE 5 : DÉGRADATION PHOTOCATALYTIQUE DU PÉMÉTREXED ET IMPLICATIONS ENVIRONNEMENTALES.....157

1. Contexte de l'étude 159

2. Méthodes et protocole d'essai.....162

3. Résultats 164

3.1. Cinétique de dégradation du pémétrexed en conditions photocatalytiques : aspects quantitatifs 164

3.2. Élucidation structurale des produits de transformation.....168

3.3. Voies de transformation du pémétrexed par photocatalyse 177

3.4. Toxicité potentielle des produits de dégradation par étude *in silico*, *in vitro* et *ab initio*.....180

4. Conclusion.....186

Article 3 : pémétrexed degradation by photocatalytic process: kinetics, identification of transformation products and estimation of toxicity.....189

CHAPITRE 6 : DISCUSSION 191

1. Caractérisation des produits de dégradation 193

1.1. Détection des principes actifs et des substances apparentées.....193

1.2. Élucidation structurale et mécanisme de dégradation.....194

2. Caractérisation des processus de dégradation 196

2.1. Par approche expérimentale uniquement 196

2.2. En utilisant l'approche *ab initio*.....196
3. Évaluation du risque toxicologique et écotoxicologique 199
CONCLUSION.....203
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....209
ANNEXES 223

Liste des abréviations

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

AOP : Advanced Oxidation Process

API : Active Pharmaceutical Ingredient

ARGA : Argatroban

CL : Chromatographie Liquide

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

EMA : European Medicines Agency

ESI : Electrospray Ionisation

FDA : Food and Drug Administration

FT : Transformée de Fourrier

HILIC : Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography

HR : Haute Résolution

HOMO : Highiest Occupied Molecular Orbital

ICH : International Conference on Harmonization

LC-MS : Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

LOD : Limit Of Detection

LOQ : Limit Of Quantification

LUMO : Lowest Unoccupied Molecular Orbital

MS^n : Multistage Mass Spectrometry

PEME : PEMEtrexed

PPM : Partie Par Million

QSAR : Quantitative Structure-Activity Relationship

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

RP : Reverse Phase

SIAM : Stability Indicating Assay Method

UV : UltraViolet

Liste des figures

Figure 1 : schéma d'hydrolyse de composés. 23
Figure 2 : groupes fonctionnels de principes actifs susceptibles de subir une hydrolyse 24
Figure 3 : réaction d'addition de Michael d'après (Lu et al., 2008). 26
Figure 4 : diagramme de Jablonski. 28
Figure 5 : diagramme des orbitales moléculaires des différents états du dioxygène. 31
Figure 6 : Réactivité du principe actif D en présence de lumière et d'excipient E. 33
Figure 7 : devenir du principe actif après administration. 38
Figure 8 : procédés d'oxydation avancée 41
Figure 9 : spectre UV-visible émis par l'appareil QSUN et spectre UV-visible de la norme ID 65. 55
Figure 10 : nombre de formules brutes possibles en fonction de l'exactitude relative et de la masse mesurée exprimée en dalton. 60
Figure 11 : représentation d'un spectromètre de masse Orbitrap® 62
Figure 12 : représentation d'un analyseur orbitrap 63
Figure 13 : méthode de caractérisation des produits de dégradation (DPs) par LC-$HRMS^n$ 66
Figure 14 : exemple de modèle basé sur des règles : modèle de type arborescent. 75
Figure 15 : étapes de modélisation selon l'approche QSAR. 76
Figure 16 : résumé de l'approche d'évaluation de la mutagénicité d'impuretés ou de produits de dégradation selon ICH M7. 77
Figure 17 : structure de l'apixaban 86
Figure 18 : éléments étudiés dans le chapitre 3. 87
Figure 19 : spectre $HRMS^2$ de l'apixaban. 92
Figure 20 : voies de fragmentation de l'apixaban en $HRMS^2$. 93
Figure 21 : spectre $HRMS^3$ de l'apixaban (460->443->). 93
Figure 22 : voie de fragmentation en $HRMS^3$ (460->443->415) 94
Figure 23 : voie de fragmentation en $HRMS^3$ (460->443->282) 95
Figure 24 : voie de fragmentation en $HRMS^3$ (460->443->227) 96
Figure 25 : voie de fragmentation en $HRMS^3$ (460->443->241) 96
Figure 26 : schéma de fragmentation de l'apixaban. 97
Figure 27 : fragmentation de DP-2. 98

Figure 28 : fragmentation de DP-6. 99
Figure 29 : voie de fragmentation de DP-1(1).....100
Figure 30 : voie de fragmentation de DP-1 (2).....101
Figure 31 : voie de fragmentation de DP-4 (1).....102
Figure 32 : voie de fragmentation de DP-4(2).....103
Figure 33 : voie de fragmentation de DP-4(3).....103
Figure 34 : voies de fragmentation de DP-7. 104
Figure 35 : schéma de fragmentation de DP-3 et DP-5. 106
Figure 36 : mécanismes de dégradation de l'apixaban en milieu basique. 107
Figure 37 : mécanismes de dégradation de l'apixaban en milieu acide. 108
Figure 38 : différence de réactivité de l'apixaban en fonction des conditions hydrolytiques. 110
Figure 39 : charges de Mulliken de chacun des atomes de l'apixaban. 111
Figure 40 : alertes structurales (en gris) pour DP-3 et DP-5. 116
Figure 41 : alerte structurale(en gris) pour DP-4 116
Figure 42 : structure de DP-6. 117
Figure 43 : spectre UV de l'argatroban (20 $mg.L^{-1}$ dans l'éthanol) issu de la Pharmacopée Japonaise. 125
Figure 44 : structure de l'argatroban.....126
Figure 45 : concentration en argatroban en fonction du temps. 128
Figure 46 : chromatogramme total d'ions après exposition de l'argatroban à la lumière. 129
Figure 47 : processus de fragmentation de l'argatroban en $HRMS^2$. 130
Figure 48 : deuxième voie de fragmentation de l'argatroban. 131
Figure 49 : troisième voie de fragmentation en $HRMS^2$ 132
Figure 50 : processus de fragmentation $HRMS^3$ (509->362->).....132
Figure 51 : structure de P_5. 133
Figure 52 : processus de fragmentation de P_2. 135
Figure 53 : structure et ions produits caractéristiques de P_1.....136
Figure 54 : structure et fragments caractéristiques de P_4. 137
Figure 55 : structure de P_3 et formation des ions produits caractéristiques. 138
Figure 56 : structures et voies de fragmentation de P_6 et P_7. 140
Figure 57 : numérotation des atomes pour les calculs de FED 141

Figure 58 : structure de P_6 obtenue d'après la combinaison des approches expérimentales *et ab initio* 142
Figure 59 : structure et fragmentation de P_8. 143
Figure 60 : processus de photodégradation de l'argatroban en solution aqueuse (1). 145
Figure 61 : processus de photodégradation de l'argatroban en solution aqueuse (2). 146
Figure 62 : devenir du principe actif (DRUG) en solution aqueuse, en présence d'oxygène et exposé à la lumière 147
Figure 63 : structure de P_2. 150
Figure 64 : structure de P_5 151
Figure 65 : synthèse des résultats et des implications de la photodégradation de l'argatroban. 153
Figure 66 : structure du pémétrexed. 160
Figure 67 : dégradation du pémétrexed exposé à de la lumière simulée en solution aqueuse et dans différentes conditions. 164
Figure 68 : spectre UV-visible d'une solution aqueuse de PEME à 80 $mg.L^{-1}$. 165
Figure 69 : chromatogrammes d'ions, totaux et extraits, après 30 ou 60 minutes d'exposition d'une solution aqueuse de PEME contenant du TiO_2. 166
Figure 70 : profils d'évolution des aires relatives des produits de transformation du pémétrexed en fonction du temps d'exposition. 167
Figure 71 : spectre $HRMS^2$ du pémétrexed. 168
Figure 72 : processus de fragmentation du PEME. 170
Figure 73 : schéma de fragmentation des TP_{431}, TP_{329} et TP_{301}. 172
Figure 74 : processus de fragmentation de TP_{226}. 173
Figure 75 : processus de fragmentation du TP_{443}. 174
Figure 76 : processus de fragmentation du TP_{459}. 175
Figure 77 : processus de fragmentation du TP_{475}. 176
Figure 78 : schéma de transformation du PEME. Les TPs sont colorés en bleu. 179
Figure 79 : pourcentage d'inhibition de bioluminescence en fonction du temps d'exposition 180
Figure 80 : toxicité globale normalisée (échelle logarithmique) en fonction de la durée d'exposition pour les trois espèces pour lesquelles des données QSAR existent dans le logiciel EPI 181

Figure 81 : distribution des couples ΔE et log P pour le PEME et ses produits de transformation.....184

Liste des tableaux

Tableau 1 : caractéristiques des lampes et durée d'exposition à choisir pour obtenir une exposition correspondant à la norme ICH Q1B. 55
Tableau 2 : conditions d'obtention, temps de rétention et composition élémentaire des produits de dégradation. 90
Tableau 3 : résultats obtenus avec le logiciel Derek Nexus.....113
Tableau 4 : résultats obtenus avec le logiciel Toxtree 113
Tableau 5 : données pharmacocinétiques obtenues avec le logiciel ACD/I-Labs....114
Tableau 6 : données pharmacologiques obtenues avec le logiciel ACD/I-Labs. 114
Tableau 7 : résultats des calculs de FED pour les atomes ; la numérotation arbitraire est indiquée en figure 57. 141
Tableau 8 : énergies d'ionisation (E_i) et d'affinité électronique (E_a) des différents niveaux énergétiques de l'argatroban exprimées en eV. 148
Tableau 9 : variations d'enthalpie libre (en eV) de transferts électroniques.....148
Tableau 10 : évaluation des réactions possibles par transfert d'énergie. 149
Tableau 11 : résultats obtenus avec les logiciels Swiss Target Prediction et Swiss ADME.. 151
Tableau 12 : résultats de la validation de la méthode de dosage du pémétrexed. ..163
Tableau 13 : pourcentage moyen de recouvrement du pémétrexed (400 $mg.L^{-1}$) en fonction du temps de mise en contact avec le dioxyde de titane P25 (1 $mg.L^{-1}$). 163
Tableau 14 : valeurs de 2 FED^2_{HOMO} et de $FED^2_{LUMO} + FED^2_{HOMO}$ pour les atomes du PEME (numérotation effectuée selon celle de la figure 72). 177
Tableau 15 : Ci/EC50i (96 heures, algue verte) en fonction de la durée d'irradiation. 182
Tableau 16 : coefficients de corrélation entre l'inhibition de bioluminescence et l'aire relative pour chaque TP et plages de pH dans lesquelles les TPs sont isoélectriques. 183

INTRODUCTION

Au cours de trois étapes de son cycle de vie, le principe actif est régulièrement exposé à un environnement aqueux : au sein de formes pharmaceutiques liquides, lors de son devenir dans l'organisme et/ou après son élimination dans l'environnement via les eaux usées.

Tout d'abord, en termes de formulation, même si les formes pharmaceutiques solides sont privilégiées pour des raisons de stabilité, de manipulation et de facilité d'administration, les formes liquides, quant à elles, présentent l'avantage de délivrer l'ingrédient actif à l'état déjà dissous ou partiellement dissous, limitant ainsi des variations d'exposition systémique dues au processus de libération à partir d'une forme solide. De plus, la forme liquide est plus appropriée à l'ajustement posologique et à l'administration via d'autres voies que la voie digestive. Elle est également plus adaptée aux patients pédiatriques et à ceux présentant des difficultés de déglutition.

Ensuite, quelle que soit la forme pharmaceutique, après administration, le médicament est systématiquement exposé aux différents compartiments aqueux de l'organisme au cours des étapes allant de sa distribution à son élimination.

Enfin, il arrive fréquemment que le principe actif soit partiellement éliminé sous forme inchangée par le patient ce qui explique que le principe actif est susceptible d'être présent dans les eaux usées.

Au cours des trois étapes précédemment décrites, des mécanismes de dégradation et/ou de métabolisation en milieu aqueux opèrent sur le principe actif conduisant ainsi à des changements en matière d'identité et de teneur du médicament.

Ces transformations impliquent une disparition partielle ou totale de la molécule mère et, parallèlement, l'apparition d'autres composés de structure plus ou moins apparentée mais dont le profil bénéfice-risque est souvent moins bien évalué voire reste inconnu. Cet aspect est à prendre en compte dans la mesure où de tels produits de transformation peuvent posséder des profils d'activité et de toxicité différents de ceux du principe actif vis-à-vis de l'homme (Melo et al., 2014) et/ou de l'environnement (DellaGreca et al., 2014).

Si l'on considère la première des trois étapes présentées ci-dessus, c'est-à-dire si l'on se place sous l'angle qualité du médicament, les risques de dégradation sont souvent anticipés lors du développement pharmaceutique. Toutefois les conditions

expérimentales alors appliquées ne sont pas toujours suffisamment larges pour prendre en compte des évènements courants pouvant survenir en dehors des conditions de manipulation et de conservation préconisées par le laboratoire pharmaceutique. Aussi, ce n'est pas parce que le médicament se présente sous une forme orale solide que des études de son comportement en milieu aqueux peuvent être exclues. Par exemple, le broyage des comprimés ou l'ouverture des gélules suivis de la mise en suspension de la poudre sont des pratiques courantes à l'hôpital. Elles sont employées pour faciliter l'administration des formes solides chez les patients intubés, les sujets âgés présentant des difficultés de déglutition et les enfants en bas âge lorsqu'il n'existe pas de formes pédiatriques adaptées. Ces pratiques, logiquement non anticipées par le laboratoire titulaire compte tenu de la forme pharmaceutique revendiquée, sont de nature à remettre en cause la stabilité du médicament et donc son rapport bénéfice-risque au moment de l'administration. Ainsi, il a été montré que le broyage suivi de la mise en suspension du médicament en milieu aqueux induit des incertitudes quant à la quantité de principe actif administrée et son devenir dans l'organisme (Cornish, 2005 ; Thong et al., 2018) d'où l'intérêt de systématiquement étudier le comportement du médicament en milieu aqueux quelle que soit la forme pharmaceutique.

L'étude des phases relatives au devenir du médicament dans l'organisme, bien qu'essentielle, ne fait pas partie du travail développé dans cette thèse.

Si l'on examine le devenir du médicament en aval de son élimination par l'organisme, les nombreux types de milieux aquatiques dans lesquels le polluant pharmaceutique est susceptible d'être transformé rendent l'évaluation du risque environnemental particulièrement complexe (Heberer, 2002). C'est pourquoi ce travail de thèse se limite volontairement à l'analyse du risque inhérent à l'emploi de procédés visant à réduire son empreinte environnementale. Le choix s'est porté sur les procédés d'oxydation avancée, ces procédés étant souvent particulièrement efficaces pour dégrader des polluants rémanents et résistants aux traitements conventionnels, mais présentant le risque de générer des produits toxiques (Schrank et al., 2004).

Face au besoin d'élargir la connaissance des processus de dégradation en solution, une première étape a consisté à déterminer quels principes actifs paraissaient les plus pertinents à étudier. Le premier critère retenu a été celui de l'absence de

données relatives au processus de dégradation du principe actif ou de principes actifs qui lui sont apparentés d'un point de vue structural. En effet, il fallait s'assurer que l'étude menée contribue à enrichir l'espace des connaissances scientifiques. Un second critère a été l'importance de l'activité pharmacologique du principe actif, un composé à haute activité pharmacologique étant susceptible d'induire des effets néfastes lors de sa dégradation.

Répondant à ces deux critères de choix, les études relatives au devenir en solution de deux principes actifs de la classe des nouveaux anticoagulants : l'apixaban et l'argatroban, ainsi que d'un principe actif cytotoxique, le pémétrexed, ont été réalisées. Les trois études illustrent les travaux à mener dans le cadre de l'évaluation du devenir du principe actif en solution aqueuse dans des situations d'écarts de conservation, de manipulation et d'élimination.

La première étude a eu pour objet le devenir en solution aqueuse de l'apixaban, principe actif actuellement commercialisé sous forme orale solide, afin d'offrir des données pouvant aider au développement de formes pharmaceutiques liquides.

La seconde étude avait trait à mettre en évidence les mécanismes de photodégradation de l'argatroban et à évaluer le potentiel toxique des produits de dégradation pour apporter des données nécessaires au choix de procédés capables de réduire la photodégradation de l'argatroban et son impact sur les patients.

Enfin, dans un contexte autre que le contexte pharmaceutique, une étude de dégradation du pémétrexed par photocatalyse via un procédé d'oxydation avancée a été réalisée afin d'évaluer si ce procédé pouvait être utilisé pour réduire l'impact environnemental de ce composé potentiellement très toxique.

Les deux premiers chapitres du manuscrit ont pour objet de préciser le contexte des études (chapitre 1), puis d'expliquer les approches analytiques et théoriques choisies (chapitre 2). Les trois chapitres suivants exposent les travaux menés dans le cadre de la caractérisation des processus de dégradation de l'apixaban, de l'argatroban et du pémétrexed ainsi que pour l'évaluation des impacts pharmaceutiques et/ou environnementaux de leurs transformations.

CHAPITRE 1 : DÉGRADATION DU PRINCIPE ACTIF EN MILIEU AQUEUX ET CONSÉQUENCES POTENTIELLES

1. Aspects fondamentaux de la dégradation en milieu aqueux

1.1. Aspects thermodynamique et cinétique

La réaction de dégradation d'un principe actif (PA) en présence d'un réactant conduisant au produit de dégradation (DPi) peut s'écrire, dans le cas simple où les coefficients stœchiométriques sont égaux à 1 :

PA+réactant ->DPi + autres produits de réaction,

les autres produits de réaction étant constitués des parties du principe actif et du réactant qui ne se retrouvent pas dans DPi. La thermodynamique nous indique que pour que la réaction de dégradation précédente conduisant à DPi puisse se dérouler à la température T, sa variation d'enthalpie libre ΔGi(T) doit être négative. ΔGi(T) peut être déterminée si l'on connait à la température T les valeurs des enthalpies libres molaires de toutes les espèces qui interviennent dans la réaction.

La condition thermodynamique ΔGi(T)< 0 est une condition nécessaire pour que le produit de dégradation puisse se former mais n'est pas suffisante. Des considérations cinétiques sont aussi à prendre en compte. Ainsi, la vitesse Vi de la réaction de formation de DPi doit permettre de le produire, dans une durée acceptable, en quantité telle qu'il puisse être observé. La constante de vitesse k de la réaction peut être déterminée à partir de la loi d'Arrhenius :

$$k = Ae^{-\frac{Ea}{RT}}$$

avec A : facteur de fréquence prenant en compte la fréquence des collisions et les effets stériques ; E_a : énergie d'activation en $J.mol^{-1}$; R : constante des gaz parfaits en $J.K^{-1}.mol^{-1}$; T : température en K.

Au total, des considérations de thermodynamique et de cinétique devraient permettre de prévoir les réactions conduisant à la formation effective des produits de dégradation.

Mais cette approche se heurte à une difficulté importante : la connaissance des valeurs des grandeurs thermodynamiques et cinétiques en jeu. Cela tient à deux raisons principales. D'une part, ces valeurs sont difficilement accessibles car elles ont trait non pas à des corps purs mais à des mélanges en solution : la dégradation

du principe actif doit être examinée dans les conditions dans lesquelles il est utilisé ou dans lesquelles il sera rejeté dans l'environnement. D'autre part, les molécules de principe actif sont des molécules complexes renfermant généralement plusieurs dizaines de liaisons. Aussi, le nombre d'espèces susceptibles de se former dans les réactions de dégradation est très élevé du fait du nombre important de ruptures de liaisons dans le principe actif et de reformations.

Pour les raisons qui précèdent une approche expérimentale, fondée sur la caractérisation structurale des produits de dégradation a été préférée à l'approche prédictive, formelle, fondée sur de seules considérations thermodynamiques et cinétiques.

Pour que l'approche expérimentale soit développée en cohérence avec ce qui est susceptible de survenir en solution, cette approche doit être construite à partir des situations rencontrées dans le cycle de vie du principe actif. Elle doit aussi prendre en compte l'état de connaissance existant sur les mécanismes de dégradation pour déterminer une approche expérimentale appropriée. Ces aspects mécanistiques seront développés dans le paragraphe suivant.

1.2. Processus de dégradation

1.2.1. Hydrolyse

Les processus d'hydrolyse des principes actifs sont décrits en détail dans la revue (Waterman et al., 2002a). D'après les auteurs, la majeure partie des cas d'hydrolyse des principes actifs sont la conséquence de la présence d'un carbone électrophile relié à un groupe qui peut facilement partir. Ainsi, les composés contenant un groupe carbonyle constituent l'essentiel des composés hydrolysables (figure 1, d'après Waterman et al., 2002a). Il existe aussi d'autres types de composés hydrolysables dont une partie est rapportée dans la figure 2 (d'après Waterman et al., 2002a).

Figure 1 : schéma d'hydrolyse de composés.

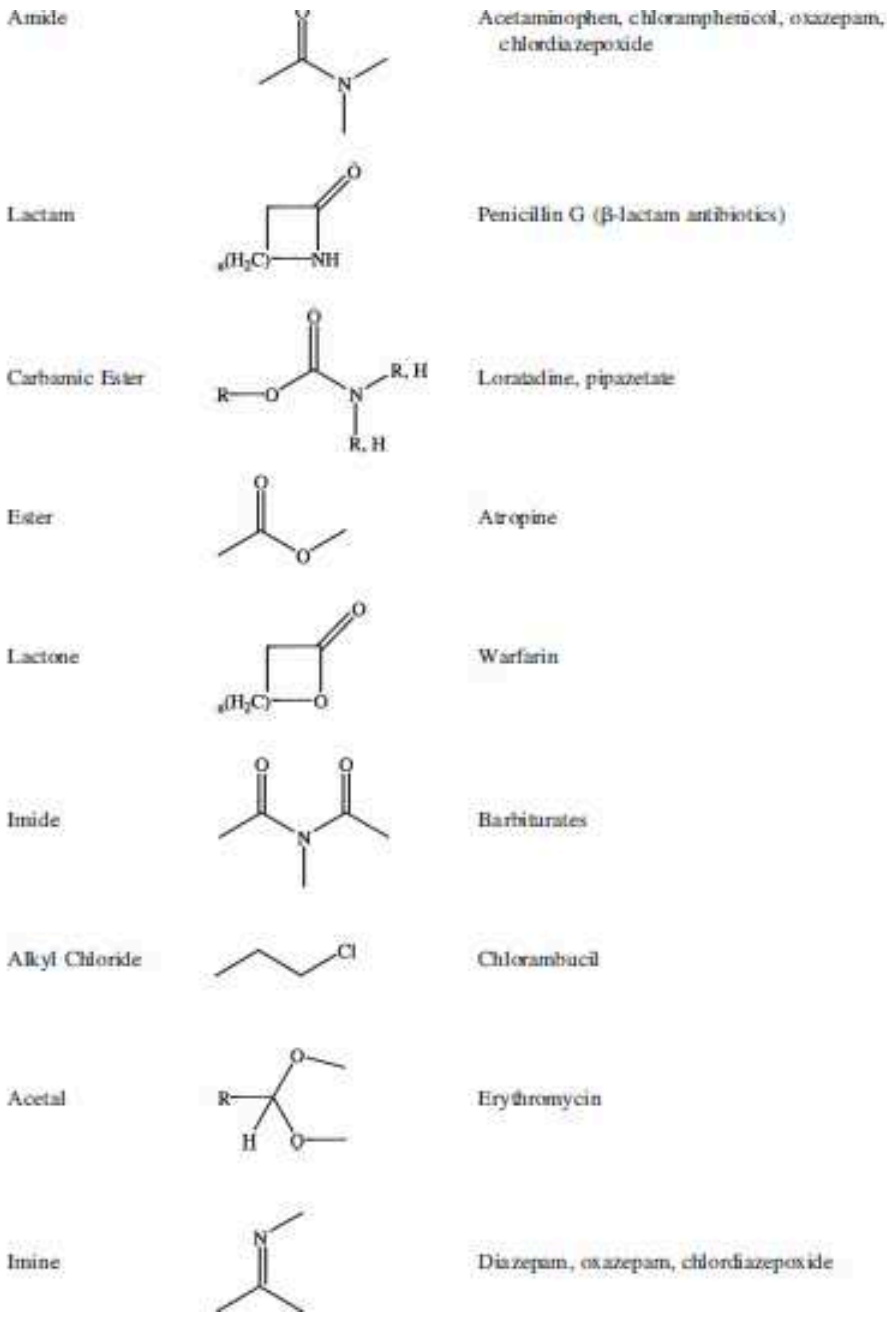


Figure 2 : groupes fonctionnels de principes actifs susceptibles de subir une hydrolyse

1.2.2. Processus d'oxydation radicalaire

Les processus d'oxydation radicalaire par réaction en chaîne consistent en une séquence de phases initiant, propageant et terminant la réaction (Waterman et al., 2002b).

Phase d'initiation

L'initiation consiste en l'obtention de radicaux. À l'obscurité un radical peut se former par la rupture homolytique d'une liaison, en général d'une liaison C-H.

PaH étant le principe actif, la réaction d'initiation est du type : $PaH + O_2 \rightarrow Pa^{\bullet} + HO_2^{\bullet}$

Phase de propagation

Une fois que le radical initiant la réaction ($Pa^{\bullet}$) est formé, les réactions suivantes peuvent se produire :

$Pa^{\bullet} + O_2 \text{->} PaOO^{\bullet}$

$PaOO^{\bullet} + PaH \text{ -> } PaOOH + Pa^{\bullet}$

Phase de terminaison

Elle correspond à la disparition de radicaux par réaction de deux radicaux entre eux :

$Pa^{\bullet} + Pa^{\bullet} \text{->} Pa\text{-}Pa$

$Pa^{\bullet} + PaOO^{\bullet} \text{->} PaOOPa$

$PaOO^{\bullet} + PaOO^{\bullet} \text{->} PaOO\text{-}OOPa \text{->} PaOOPa + O_2$

1.2.3. Processus d'oxydation en présence de contaminants

Les excipients ajoutés au principe actif sont susceptibles de contenir des peroxydes et/ou des traces de métaux qui provoquent des réactions supplémentaires (Waterman et al., 2002b).

Réactivité des peroxydes

- Les peroxydes peuvent réagir avec des insaturations du principe actif par addition nucléophile. Par exemple les cétones α,β-insaturées réagissent avec un peroxyde en milieu basique selon l'addition de Michael (figure 3)

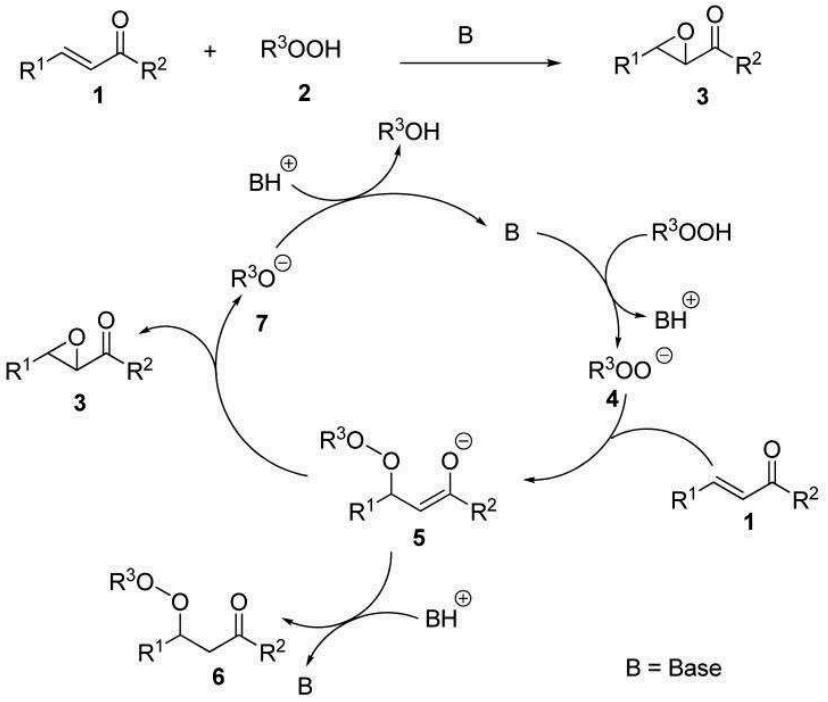


Figure 3 : réaction d'addition de Michael d'après (Lu et al., 2008).

- Les principes actifs à centre nucléophile (amines et thiols par exemple) peuvent facilement réagir en présence de peroxydes, en formant pour les amines tertiaires un amine N-oxyde, pour les amines primaires et secondaires une hydroxylamine, et pour les thiols un sulfoxyde.

- En présence d'ions métalliques, les peroxydes sont des réactifs permettant la formation de radicaux hydroxyle lors de la réaction de Fenton (cf. *infra*). Le radical hydroxyle est un oxydant très puissant (E^0=+2,81V).

Réactivité des métaux/catalyse

Comme nous l'évoquerons davantage dans la partie relative à la réactivité de l'oxygène, les réactions entre l'oxygène à l'état fondamental (état triplet) et une molécule de principe actif (état singulet) sont cinétiquement très peu favorables car les deux molécules ont des spins différents (McClure, 1949).

Des catalyseurs métalliques permettent de faciliter l'oxydation du principe actif. Ils interviennent en réduisant l'oxygène en espèces radicalaires très réactives : l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$.

Par exemple, en présence du métal M la réaction suivante est susceptible d'intervenir, PaH étant le principe actif :

O_2+ M -> $O_2^{\bullet-}$+$M^{\bullet+}$

$O_2^{\bullet-}$+ PaH-> $PaO_2H^{\bullet-}$

$PaO_2H^{\bullet-}$+$M^{\bullet+}$-> PaO_2H+M

La réaction de Fenton, au cours de laquelle l'ion Fe^{2+} cède un électron au peroxyde d'hydrogène conduit à la formation d'un radical hydroxyle HO• (Pignatello et al., 2006) :

$$Fe^{2+}_{(aq)} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}_{(aq)} + OH^-_{(aq)} + HO^{\bullet}$$

1.2.4. Processus de dégradation du principe actif sous irradiation lumineuse

La lumière peut interagir avec le principe actif ou les excipients et engendrer des réactions à l'origine de la dégradation du principe actif (Baertschi et al., 2013). Ces réactions sont rendues possibles par des transferts électroniques ou énergétiques.

Le diagramme de Jablonski (figure 4) rend compte de l'interaction entre la lumière et la matière et des différents transferts susceptibles de survenir entre les niveaux énergétiques. Ces transferts permettent d'interpréter les phénomènes pouvant induire la dégradation du principe actif :

- processus de photolyse directe : le principe actif absorbe les radiations,

- processus de photolyse indirecte, qui concerne le cas où les excipients absorbent les radiations et interagissent ensuite avec le principe actif,

-processus comportant de la photolyse directe et de la photolyse indirecte.

Conséquences de l'interaction lumière-matière : diagramme de Jablonski

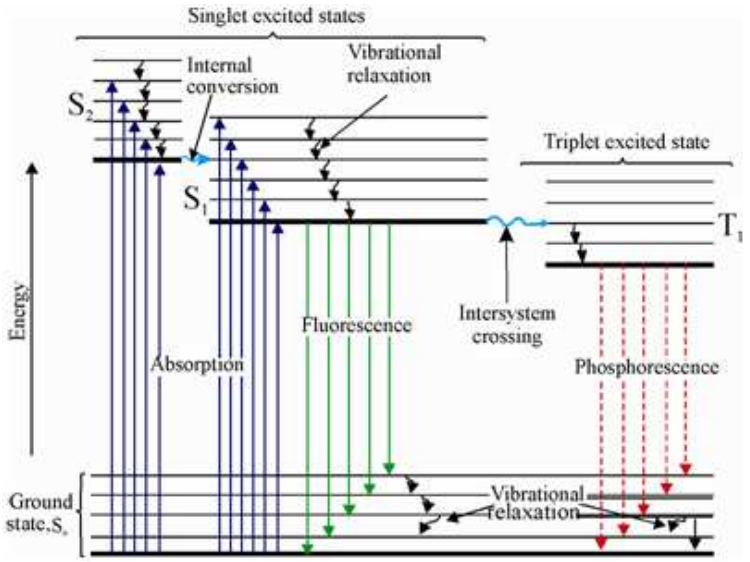


Figure 4 : diagramme de Jablonski.

Dans le diagramme (figure 4), l'état fondamental de la molécule est singulet (multiplicité de spin égale à 1), ce qui est la situation la plus fréquente.

La notation « S_n » renvoie à un niveau d'énergie n dans lequel la molécule est dans un état singulet. La notation « T_n » renvoie à un niveau d'énergie n dans lequel la

molécule est dans un état triplet (multiplicité de spin égale à 3). Lors d'un retour à l'état fondamental singulet S_0, la durée de vie d'un état triplet excité est généralement bien plus longue que celle d'un état singulet excité. Cela a pour origine un changement de la multiplicité de spin dans la transition T_1 -> S_0 alors que la multiplicité est inchangée dans la transition S_1 -> S_0. En pratique, la possibilité de former un état triplet qui a plus de temps pour interagir est donc à considérer.

Une radiation de longueur d'onde spécifique peut interagir avec un électron d'une molécule et induire une excitation : l'électron est porté à un niveau d'énergie plus élevé. Dans le diagramme ci-dessus, la radiation induit une excitation : l'électron passe du niveau fondamental singulet S_0 à un état excité singulet S_1 ou S_2.

Ces états excités sont métastables et l'électron perd de l'énergie pour retrouver son état fondamental par différentes transitions énergétiques qui peuvent être (figure 4) :

- radiatives : émission de fluorescence correspondant à la transition S_1->S_0 ou de phosphorescence correspondant à la transition T_1->S_0,

- non radiatives : relaxation vibrationnelle, conversion interne, conversion intersystème.

Photolyse directe

Dans ce cas, le principe actif (PA) absorbe directement l'UV-A et/ou le visible ce qui entraîne son excitation (formation de PA*, réaction (1)) qui peut induire les réactions suivantes :

$PA + hv \rightarrow PA^*$ (état S_n) (1)

$PA^* \rightarrow$ produits de dégradation (2)

$PA^* + PA^* \rightarrow PA^{-\bullet} + PA^{+\bullet}$ (3)

$PA^{-\bullet}$ ou $PA^{+\bullet}$ +autre molécule → autres radicaux (4)

$PA^{-\bullet}$ ou $PA^{+\bullet}$ +autre radical→ produits de dégradation (5)

$PA^* \rightarrow PA^{*'}$ + chaleur (conversion interne S_2->S_1 ou conversion intersystème S_1->T_1) (6)

PA*' → PA+ hv' (S_1->S_0 fluorescence) (7)

PA*' → PA+ hv'' (T_1-> S_0 phosphorescence) (8)

PA*+excipient → PA + excipient* (transfert d'énergie) (9)

La réaction (2) : réarrangement électronique interne et la succession des réactions (3), (4) et (5) conduisent à l'obtention de produits de dégradation.

Les réactions (6), (7), (8) et (9) permettent de perdre de l'énergie sous forme thermique ou lumineuse et sont en compétition avec la photodégradation.

Ainsi, un principe actif qui absorbe de l'énergie lumineuse peut ne pas être dégradé car il peut perdre de l'énergie sous forme radiative ou transférer de l'énergie à un excipient.

Photolyse directe en présence de dioxygène

Le dioxygène, molécule ubiquitaire, peut réagir avec des composés excités ou des radicaux formés et conduire à des espèces très réactives : le dioxygène singulet $^1O_2$ et l'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$.

En réagissant avec le principe actif, ces deux espèces amènent des voies supplémentaires de dégradation du principe actif en présence de lumière.

<u>*Réactivité du dioxygène singulet</u>

Contrairement à la plupart des composés, l'état fondamental du dioxygène est un état triplet. En effet, à l'état fondamental, en respect de la règle de Hund, les deux orbitales occupées les plus énergétiquement élevées sont chacune occupées par un électron de même spin. Le spin global S a pour valeur +1 et la multiplicité de spin 2S+1 vaut 3, indiquant la présence d'un état triplet noté $^3\Sigma^-_g$.

Dans les états excités, les électrons ont des spins opposés de sorte que le spin global S est nul. La multiplicité de spin 2S+1 vaut 1. Les états excités notés $^1\Sigma^+_g$ et $^1\Delta_g$, sont donc des états singulets (figure 5).

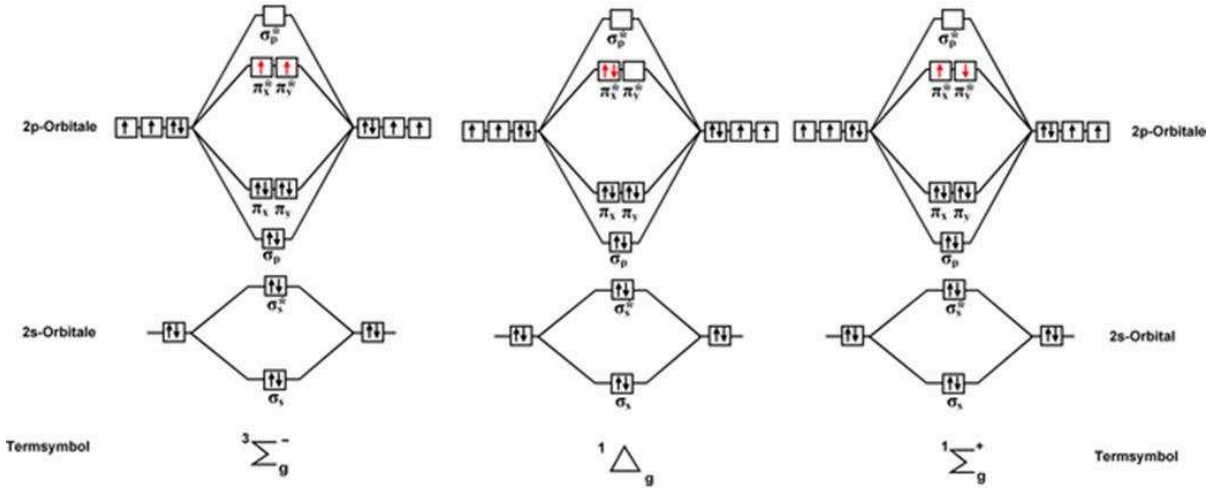


Figure 5 : diagramme des orbitales moléculaires des différents états du dioxygène.

Le dioxygène à l'état singulet est très réactif (DeRosa, 2002) car :

- s'agissant d'un état excité le retour à un état plus stable, l'état triplet, se traduit par une libération d'énergie

- s'agissant d'un état singulet, si l'oxygène réagit avec une autre molécule, la somme des spins sera plus faible que si c'était l'état triplet qui réagissait. Cette réaction est donc favorisée par rapport à celle pouvant survenir lorsque le dioxygène est à l'état triplet.

<u>*Réactivité de l'anion superoxyde</u>

L'anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ est formé par transfert d'un électron d'un radical au dioxygène. C'est un précurseur de nombreux radicaux libres, tels que le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$, qui peuvent réagir très facilement avec le principe actif ou les excipients en solution (Hayyan et al., 2016).

Photolyse indirecte

Dans ce cas, un excipient ou une impureté A-B absorbe dans l'UV-A et/ou le visible, ce qui induit la formation d'espèces réactives qui peuvent ensuite réagir suivant les différentes réactions ci-dessous :

A-B +hv → A-B* (1)

A-B* → A$^{\bullet}$+$^{\bullet}$B (2)

A$^{\bullet}$ ou B$^{\bullet}$ + O_2 → A-OO$^{\bullet}$ ou B-OO$^{\bullet}$ (3)

A-OO$^{\bullet}$ ou B-OO$^{\bullet}$ + Principe actif → Produits de dégradation (4)

A-B est une molécule susceptible d'absorber dans l'UV-A et/ou le visible, de s'exciter (1). La liaison A-B peut se rompre pour former les radicaux A$^{\bullet}$ et B$^{\bullet}$ (2). Ces radicaux sont capables de réagir avec l'oxygène moléculaire ce qui conduit à la formation de radicaux peroxyle (AOO$^{\bullet}$ ou BOO$^{\bullet}$) (3) qui peuvent dégrader le principe actif (4).

Photolyse directe et indirecte dans un médicament, en l'absence d'oxygène

Les deux processus peuvent se dérouler simultanément pour un médicament contenant un principe actif (D) et un excipient (E) absorbant tous les deux dans le domaine de l'UVA-visible, comme cela est résumé sur le schéma ci-dessous (figure 6). Dans ce cas, en plus de la dégradation par photolyse directe (i), le principe actif est susceptible d'interagir avec l'excipient qui peut jouer un rôle (figure 6) :

- photoprotecteur, lorsqu'il est à l'état fondamental E : en tant que filtre, (ii) ce qui empêche la dégradation du principe actif ou en tant qu'extincteur « quencher » en facilitant le retour du principe actif à l'état fondamental (iv),

- inducteur, à l'état fondamental E, de la dégradation du principe actif en réagissant avec le principe actif excité D* (v),

- inducteur, à l'état excité E*, de la dégradation du principe actif à l'état fondamental D en transférant de l'énergie au principe actif directement (iii et vii) ou après formation d'intermédiaires radicalaires (vi).

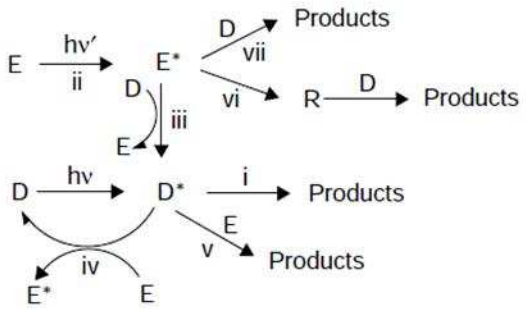


Figure 6 : Réactivité du principe actif D en présence de lumière et d'excipient E.

Processus de dégradation photocatalytique

Un autre phénomène susceptible de survenir au cours du cycle de vie du principe actif est sa dégradation par des phénomènes photocatalytiques.

La photocatalyse d'un composé organique se déroule suivant la séquence :

– adsorption du substrat organique à la surface du catalyseur,

– photoexcitation du photocatalyseur,

– transfert de charge entre le catalyseur et le substrat.

Lorsqu'un composé est dissous dans de l'eau, les particules de catalyseur sont recouvertes de groupements hydroxyle ou de molécules d'eau physiosorbés qui induisent l'adsorption de substrats organiques par interactions faibles : électrostatique, hydrophobe, liaison hydrogène.

En milieu aqueux, deux catégories de processus de dégradation peuvent survenir sur le catalyseur :

- la dégradation directe du composé organique par oxydation par intervention des lacunes électroniques, h^+ et/ou réduction par intervention des électrons,

- la dégradation du composé organique par des espèces très réactives par exemple le radical hydroxyle $^{\bullet}OH$ et l'ion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ qui sont formées par oxydation de l'eau (1, 2) et/ou réduction de l'oxygène (4).

$h^+ + H_2O \rightarrow H^+ + {}^{\bullet}OH$ (1)

$2\ h^+ + 2\ H_2O \rightarrow 2\ H^+ + H_2O_2$ (2)

$H_2O_2 \rightarrow 2\ {}^{\bullet}OH$ (3)

$e^- + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -}$(4)

2. Dégradation du principe actif aux différentes étapes de son cycle de vie

2.1. Dégradation du principe actif au sein du médicament

Après sa synthèse, le principe actif est généralement sous forme pulvérulente. La production de médicaments étant réalisée dans un contexte maîtrisé, le responsable du site de production met en place une stratégie de contrôle et un suivi des paramètres affectant sa dégradation, de sorte que le principe actif est très peu dégradé pendant la fabrication du médicament. En revanche, toutes les étapes suivantes jusqu'à ce que le principe actif se retrouve dans l'organisme sont moins bien maîtrisées. Les conditions de conservation et d'administration peuvent fluctuer de façon conséquente et être à l'origine de la dégradation du principe actif dans le médicament.

2.1.1. Dégradation en solution en cours de conservation

L'influence de l'eau et de la température sont à examiner avec une attention particulière, eu égard notamment aux conditions de conservation très variables en fonction des zones climatiques. L'oxygène moléculaire étant un réactif ubiquitaire, difficile à éliminer et susceptible de réagir avec les excipients polymériques (polysorbates, povidone, polyéthylène glycol) en générant des peroxydes, son impact et celui des radicaux générés sont donc à étudier en profondeur (Ha et al., 2002).

D'autres réactions peuvent survenir en raison de la présence d'excipients et de leurs impuretés. Par exemple, certains excipients très employés, comme les oligo ou les polysaccharides (lactose, amidon) ont des propriétés réductrices. La fonction aldéhyde de ces excipients est susceptible de réagir avec les acides aminés primaires et secondaires selon la réaction de Maillard (Fg and Vm, 1989).

Au total, en cours de conservation, les processus majoritaires de dégradation sont ceux discutés dans les paragraphes 1.2.1., 1.2.2. et 1.2.3. à savoir l'hydrolyse et les réactions d'oxydoréduction. En effet, l'exposition à la lumière est généralement très réduite car les solutions sont protégées par un conditionnement secondaire (emballage carton ou autre) et sont généralement conservées à l'obscurité.

2.1.2. Dégradation en cours d'administration : la problématique des médicaments injectables

Les solutions de principes actifs sont généralement administrées per os (solution orale) ou par voie parentérale (solution injectable). Dans le cas d'une solution injectable, une solution ou une poudre de principe actif est diluée ou dissoute dans un contenant plastique renfermant un solvant (solution aqueuse contenant 0,9% de NaCl ou 5% de glucose en fonction des cas). Le contenant plastique étant en général transparent, en plus des processus précédemment mentionnés, le principe actif est susceptible de subir une dégradation sous l'action de la lumière. D'autre part, au cours de la préparation des solutions injectables, de l'air et donc de l'oxygène peut être introduit dans le conditionnement final. Pour les médicaments injectables, et d'autant plus pour ceux reconnus comme photosensibles, une étude approfondie des processus de dégradation par photolyse en présence d'oxygène est nécessaire.

En cours d'administration, par rapport aux conditions de conservation, les processus de dégradation supplémentaires à étudier sont ceux discutés dans le paragraphe 1.-2.4. : processus de dégradation du principe actif sous irradiation lumineuse avec, en principe, une faible contribution des processus photocatalytiques.

2.2. Dégradation du principe actif éliminé dans l'environnement

2.2.1. Devenir du principe actif dans l'environnement

Le devenir du principe actif dans l'environnement est d'évaluation complexe car les systèmes et les eaux qu'il rencontre sont tous indirectement liés (figure 7). Il dépend notamment de ses propriétés physico-chimiques qui sont très diverses, expliquant sa tendance à se concentrer ou à être éliminé par certaines matrices.

Dans une vision simplifiée, les principes actifs utilisés en médecine humaine peuvent être éliminés directement sous forme inchangée ou sous forme de métabolites dans l'urine ou les fèces qui vont ensuite partir au tout-à-l'égout. Les eaux du tout-à-l'égout subissent généralement une étape de traitement dans les stations d'épuration et sont rejetées dans une rivière ou dans un fleuve qui diffusent parfois dans les eaux souterraines. Pour les médicaments à usage vétérinaire, les principes actifs sont éliminés directement ou sous forme de métabolites, et aboutissent dans les eaux souterraines sans prétraitement. Dans les deux cas, le rendement d'élimination des stations d'épuration ou des processus survenant dans les boues étant variable, mais rarement total, les principes actifs ou leurs produits de dégradation, souvent nommés produits de transformation dans le domaine des sciences de l'environnement, pourront se retrouver dans les eaux souterraines où ils sont susceptibles d'induire des dommages sur la faune et la flore aquatiques et contaminer les eaux de boisson.

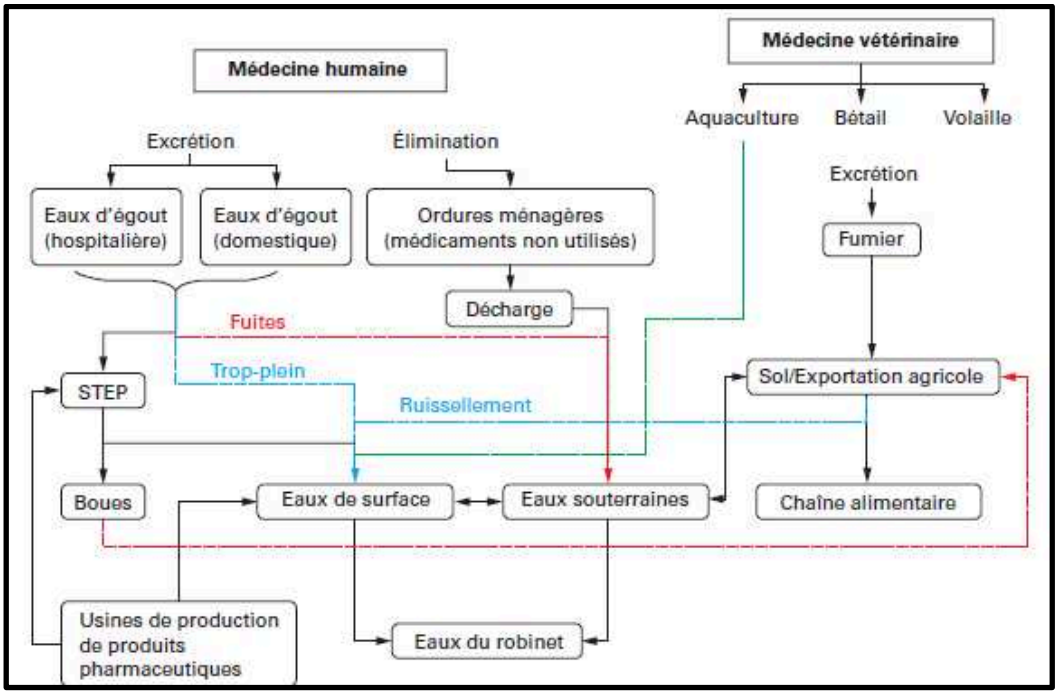


Figure 7 : devenir du principe actif après administration (issu de l'article PhA3010 des techniques de l'ingénieur).

2.2.2. Dégradation du principe actif dans l'environnement aquatique

Dans les eaux de surface, les principes actifs sont soumis aux variables environnementales suivantes : acido-basicité du milieu, exposition solaire et présence de composés dissous, qu'ils soient de nature organique ou inorganique.

De nombreuses études relatives aux processus de transformation des principes actifs utilisés à des fins de médecine humaine ou vétérinaire ont été publiées. Les prochains paragraphes ont pour objectif de donner quelques exemples de classes thérapeutiques et de processus de dégradation bien décrits.

Les principes actifs présentant des fonctions facilement hydrolysables sont par essence sensibles à des pH extrêmes, mais aussi à une température élevée. La cinétique de rupture de la liaison sulfonamide des principes actifs de cette classe thérapeutique (sulfachlorpyridazine, sulfadimethoxine et sulfathiazole) a ainsi été étudiée (Białk-Bielińska et al., 2012).

Comme cela a été indiqué dans la partie relative à la dégradation des principes actifs dans le médicament, les principes actifs ou d'autres substances qui présentent une

absorption à des longueurs d'onde supérieures à 300 nm (cut off des radiations solaires parvenant à la surface terrestre) sont susceptibles d'absorber une certaine quantité d'énergie émanant des radiations solaires. Ils peuvent alors convertir l'énergie qu'ils absorbent en passant à un état excité. Cet état excité peut engendrer la formation d'autres espèces réactives (radicaux) ou d'autres espèces dans un état excité. Les radicaux/espèces excitées ainsi formés vont être principalement à l'origine de la dégradation du principe actif.

Les antibiotiques de la famille des cyclines et des fluoroquinolones, qui présentent une absorption élevée dans le domaine de l'UV-visible ont ainsi été très étudiés et sont des exemples de dégradation par photolyse directe (Sturini et al., 2012).

Des exemples de dégradation induite par des processus de photolyse indirecte médiée par des espèces dissoutes dans l'eau sont aussi décrits.

Ainsi, pour l'atorvastatine, il a été démontré que la dégradation environnementale du principe actif provenait essentiellement de la présence de matière organique dissoute réagissant avec la lumière en formant des espèces réactives (Lam and Mabury, 2005).

Des phénomènes combinés peuvent aussi exister. Il a ainsi été démontré que la présence d'ions hydrogénocarbonate favorise la dégradation du méthotrexate (Lai et al., 2017).

2.3. Dégradation du principe actif par exposition aux conditions de traitement des eaux usées

Le développement et l'optimisation de procédés visant à dégrader rapidement et efficacement les principes actifs constituent un secteur de recherche particulièrement intense. Les processus artificiels d'élimination du principe actif dans l'environnement ont fait l'objet d'une revue (Ahmed et al., 2016.).

On distingue ainsi les procédés conventionnels, couramment utilisés, des procédés non conventionnels, en cours d'évaluation. Les procédés conventionnels font appel à des processus physiques et biologiques de dégradation : charbon activé, réacteurs à microalgues et boues d'épuration. Ces procédés sont parfois inefficaces pour permettre la dégradation de certains composés organiques et sont très variables en termes de rendement (Yang et al., 2017).

Pour cette raison, de nouvelles techniques de traitement des eaux ont été proposées : les procédés non conventionnels. Ils regroupent des procédés chimiques de coagulation et/ou produisant des stress oxydants forts (Deng and Zhao, 2015) ainsi que des procédés physiques, reposant sur des techniques de filtration ou d'osmose inverse. Les procédés d'oxydation avancée ont été définis par Glaze en 1987 (Glaze et al., 1987). Il s'agit de procédés pour traiter l'eau à une température et une pression proches des conditions ambiantes, avec pour objectif d'obtenir des rendements élevés d'élimination par oxydation poussée pour les polluants difficiles à oxyder même en utilisant l'ozone qui est un des réactifs les plus employés à cette fin.

Les techniques d'oxydation avancée envisagées sont nombreuses. De façon générale, ces techniques induisent la formation de radicaux hydroxyle à partir d'ozone, de peroxyde d'hydrogène, d'oxygène ou d'autres composés en utilisant un procédé chimique, photochimique ou catalytique. Les principaux procédés sont présentés dans la figure 8.

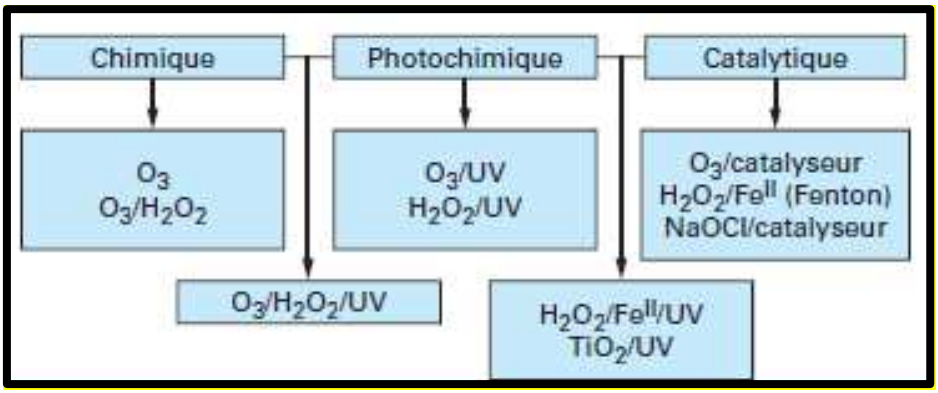


Figure 8 : procédés d'oxydation avancée (issu de l'article W2702 des techniques de l'ingénieur).

Les procédés photocatalytiques : des procédés durables d'élimination par oxydation avancée

Parmi l'ensemble des procédés non conventionnels, les procédés d'élimination par photocatalyse ont fait l'objet d'une attention particulière car ils permettent une dégradation rapide et peu coûteuse des composés organiques (Prieto-Rodriguez et al., 2012). La photocatalyse est basée sur l'aptitude d'un catalyseur solide de type semi-conducteur à convertir l'énergie photonique en énergie chimique. Un semi-conducteur a une structure de bandes caractérisée par deux séries de niveaux d'énergie :

- une première série constituée de niveaux d'énergie très proches correspond à la bande de valence relative aux liaisons entre atomes,

- une seconde série de plus haute énergie constitue la bande de conduction du semi-conducteur.

La différence d'énergie (dénommée gap) entre la bande de valence occupée par des électrons et la bande de conduction électroniquement vacante est un paramètre critique de la réactivité du semi-conducteur. En effet c'est elle qui fixe la valeur de l'énergie photonique permettant de provoquer la transition d'un électron de la bande de valence vers la bande de conduction et, par conséquent, la formation d'une lacune électronique (h^+) au niveau de la bande de valence.

Mais le système ainsi constitué est instable en raison de l'apparition de charges de signes opposés dans la bande de valence et dans la bande de conduction après exposition à un stress lumineux. Les phénomènes de recombinaison sont très faciles et s'accompagnent d'une émission de chaleur. Comme la dégradation des principes actifs que l'on veut éliminer est issue de réactions initiées par la formation de lacunes électroniques et d'électrons, le développement de photocatalyseurs limitant les phénomènes de recombinaison fait l'objet de recherches intenses.

3. Conséquences potentielles de la dégradation

3.1. Sur le plan pharmaceutique

La dégradation du principe actif induit une perte en principe actif qui peut occasionner une moindre efficacité du traitement pour le patient. Elle entraîne aussi l'apparition de produits de dégradation parfois toxiques. Quelques exemples de cas rapportés sont ainsi décrits ci-dessous.

Chez l'homme, un des premiers cas rapportés est celui de la tétracycline, dont le produit de dégradation, formé par épimérisation du principe actif, entraîne un syndrome d'atteinte rénale réversible (Frimpter et al., 1963). De façon plus impressionnante, la dégradation de la pethidine induit la formation de composés responsables d'un syndrome parkinsonien irréversible (Quaglia et al., 2003).

D'autres cas sont décrits chez des modèles animaux ou cellulaires. Il a été démontré que l'oxydation et la photodégradation de l'ibuprofène conduisent à la formation de composés présentant une toxicité pour les fibroblastes (Castell et al., 1987).

En plus de ces études, dans lesquelles une toxicité des produits de dégradation a été établie, d'autres cas rapportés démontrent par des approches informatiques que certains produits de dégradation présentent une toxicité potentiellement supérieure à celle du principe actif (Patel et al., 2015 ; Devrukhakar et al., n.d. ; Pinheiro et al., 2017).

Ces résultats laissent présager que l'état de connaissance actuel de l'impact des produits de dégradation sur l'homme et l'animal est encore très restreint, et que des études complémentaires sont à mener à ce sujet.

L'accès à l'information structurale des produits de dégradation permet non seulement de mieux comprendre les voies de dégradation, ce qui peut conduire à limiter la dégradation de la substance active, mais également d'anticiper certains impacts de la dégradation en termes de sécurité.

Étant donné la complexité des mécanismes à l'origine de la toxicité, il est de plus en plus difficile d'établir un modèle physiologique permettant de prédire la toxicité de

chaque produit de dégradation sur chaque système physiologique. De plus, le coût des études *in vivo* et *in vitro* peut être élevé et peu compatible avec l'évaluation systématique de composés traces ou ultra traces. En outre, ces études nécessitent la synthèse et la purification des composés à étudier, ce qui peut être à l'origine de dépenses contrairement aux études *in silico* qui ne nécessitent que l'achat d'un ordinateur et d'un logiciel (Dearden, 2003).

Avec l'avènement des méthodes de synthèse à haut débit de composés chimiquement définis, des approches ont été développées pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques et la toxicité de principes actifs candidats à un développement pharmaceutique. Ces approches dénommées *in silico* reposent sur des logiciels et exploitent des bases de données. Les approches *in silico* font maintenant partie intégrante des étapes précliniques de développement pharmaceutique (Benfenati, 2016).

3.2. Sur le plan environnemental

L'élimination environnementale du principe actif inchangé induit une exposition des espèces au contact avec le principe actif et, à terme, avec les produits issus de sa dégradation.

En ce qui concerne le principe actif inchangé, il ne fait aucun doute que sa présence dans l'environnement peut avoir des impacts environnementaux très significatifs. Une revue publiée dans le journal Science of the Total Environment compile quelques exemples (Pal et al., 2010). L'un d'eux, dramatique, est celui de la quasi extinction de trois espèces de vautours en Asie du Sud par exposition à du diclofenac contenu dans le foie des cadavres d'ânes, les fièvres de ces derniers étant largement traitées par ce principe actif (Green et al., 2007). La féminisation des poissons par les agents perturbateurs endocriniens tels que les agents contraceptifs et certains additifs plastifiants est une source d'inquiétude majeure (Ankley et al., 2009). D'autres composés à haute activité pharmacologique sont susceptibles d'engendrer des effets délétères même à des doses très faibles. D'après certains auteurs, il est urgent d'évaluer l'impact de l'activité génotoxique des anticancéreux sur la faune et la flore ainsi que l'impact de leurs produits de dégradation (Toolaram et al., 2014).

En ce qui concerne les produits issus de la dégradation du principe actif, des revues indiquent que ceux-ci peuvent présenter une toxicité pour les espèces aquatiques plus grande que le principe actif lui-même (Yin et al., 2017 ; Fatta-Kassinos et al., 2011). À titre d'exemple, dans des situations environnementales simulées, en solution aqueuse et en présence de lumière, le diclofenac forme des produits de dégradation conduisant à une solution aqueuse jusqu'à 6 fois plus toxique que la solution initiale envers l'espèce chlorophyte unicellulaire Scenedesmus vacuolatus (Schmitt-Jansen et al., 2007). De même, il a été démontré que des produits de dégradation de la tétracycline formés sous l'action de la lumière sont plus toxiques que la tétracycline elle-même (Jiao et al., 2008).

C'est dans ce contexte, et compte tenu du faible rendement d'épuration des procédés d'élimination conventionnels, que des procédés d'oxydation avancée sont en cours de développement.

Les procédés d'oxydation avancée permettent de dégrader les principes actifs en peu de temps et avec un coût réduit. Ils constituent donc des méthodes prometteuses pour limiter la présence de principes actifs inchangés dans l'environnement.

Cependant, l'obtention des espèces réactives utilisées dans les procédés d'oxydation avancée nécessite un emploi d'énergie. Cette consommation énergétique peut soulever des problématiques environnementales aussi est-il nécessaire de développer des procédés permettant de générer des espèces réactives en utilisant le moins d'énergie possible. C'est pour cette raison que des travaux sont réalisés afin de définir des conditions et/ou de développer des matériaux composites permettant d'augmenter les rendements d'épuration.

De plus, lorsqu'on emploie ces procédés, un autre aspect à évaluer est la toxicité des composés issus de la dégradation du principe actif par ces procédés. En effet, des phénomènes d'augmentation de la toxicité de la solution ont été décrits dans le cas de l'emploi de procédés d'oxydation avancée. Par exemple, au cours de l'emploi d'un procédé de photocatalyse visant à dégrader la doxorubicine, Calza et al ont démontré que certaines solutions étaient plus toxiques pour *Vibrio fischeri* que la solution initiale de principe actif (Calza et al., 2014). Des résultats similaires ont été retrouvés lorsque une solution d'aciclovir est exposée à des procédés photocatalatytiques (An et al., 2015). Des approches *in silico* ont conduit au même résultat : il est possible que des produits de dégradation soient plus toxiques que le principe actif dont ils sont issus (Trawiński and Skibiński, 2017).

L'anticipation de l'impact des produits de dégradation doit faire partie intégrante du développement et du choix des conditions d'emploi de ces procédés.

4. Conclusion

Dans ce chapitre, les processus de dégradation majoritaires du principe actif en solution aqueuse ont été décrits. Ils ont ensuite été rapportés à chacune des étapes qui constituent le cycle de vie du principe actif en solution.

Les processus de dégradation du principe actif induisent une perte de principe actif et la formation de produits de dégradation. Que ces processus soient de façon involontaire à l'origine de la dégradation du principe actif avant son administration ou employés pour limiter la présence du principe actif dans l'environnement, ils sont susceptibles d'avoir des conséquences néfastes pour le patient et pour tous les organismes qui y sont exposés.

Pour cette raison, la caractérisation des mécanismes de dégradation du principe actif et l'évaluation de l'impact des produits de dégradation, que ce soit dans un contexte de développement pharmaceutique ou de limitation de l'impact environnemental, sont essentielles.

CHAPITRE 2 : APPROCHES MÉTHODOLOGIQUES POUR L'ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DU PRINCIPE ACTIF ET DE SES CONSÉQUENCES POTENTIELLES

1. Choix méthodologiques

Une réflexion sur les performances analytiques nécessaires pour parvenir à l'objectif fixé constitue une étape indispensable pour obtenir des données expérimentales ou théoriques suffisantes. Un examen des performances analytiques (sensibilité, spécificité et capacité à quantifier les analytes) en fonction des étapes du processus de caractérisation des produits de dégradation et d'évaluation de leurs impacts est proposé.

La mise en évidence des produits de dégradation nécessite une méthode d'analyse apte à détecter les produits de dégradation formés et à discriminer le signal de chaque produit de dégradation et du principe actif. Cette méthode doit aussi permettre de suivre leur augmentation et leur diminution. Parmi les techniques couramment employées et disponibles, ces performances analytiques peuvent être obtenues par le couplage de techniques de chromatographie liquide (LC) avec une détection fondée sur la spectroscopie UV-visible, ou la spectroscopie de masse (MS). Ces approches par couplage ont donc été privilégiées.

L'élucidation structurale nécessite l'obtention de signaux spécifiques qui permettent de proposer une structure univoque, et ce, même pour des produits à l'état de traces. Comme cela sera discuté par la suite, le couplage LC-HRMS^n (couplage avec un spectromètre de masse haute résolution avec emploi de gaz de collision) répond à ces besoins analytiques.

Cependant, la connaissance des composés métastables et des espèces réactives formés de durée de vie très limitée (de l'ordre de la fentoseconde pour les états excités) ne peut reposer sur une méthode expérimentale dont le temps d'analyse excède la durée de vie de ces espèces. Les couplages LC-UV ou LC-HRMS (couplage avec un spectromètre de masse haute résolution sans emploi de gaz de collision) ne peuvent donc être utilisés dans ce cas. Pour cette raison, une approche théorique *ab initio* a été choisie pour caractériser les processus à courte durée de vie.

Pour ce qui est des impacts toxicologiques, les éléments à évaluer dépendent du moment du cycle de vie du médicament que l'on souhaite étudier.

Par exemple, dans le cadre de la demande d'autorisation d'un médicament, la mutagénicité des produits de dégradation et des impuretés est un aspect qu'il est obligatoire d'évaluer (guideline ICH M7). Pour documenter cet aspect, en cas d'absence de données expérimentales, cette ligne directrice recommande l'emploi d'une approche informatique.

Les approches d'évaluation d'écotoxicité pour les organismes vivant dans l'eau reposent sur des méthodes permettant d'évaluer la toxicité globale des composés en utilisant des modèles prédictifs de ce qui pourrait survenir sur des espèces aquatiques de taille similaire/ayant la même place dans la chaîne alimentaire (même niveau trophique). C'est ainsi que des approches expérimentales et informatiques ont été conçues pour évaluer la toxicité globale des composés sur les différents niveaux trophiques cellulaires (différentes espèces d'algues), pluricellulaires (différentes espèces de daphnies) et organismes de grande taille (plusieurs poissons).

Pour évaluer le potentiel toxique des processus de dégradation sans avoir recours à l'expérimentation animale, des approches informatiques (*in silico* et *ab initio*) et *in vitro* ont donc été employées en fonction des objectifs.

2. Dégradation en conditions de stress

2.1. Lignes directrices : rappels

Dans le cadre de la demande d'autorisation de mise sur la marché d'un médicament, afin de mettre en évidence les voies de dégradation du principe actif, la ligne directrice ICH Q1A R2 (ICH Guideline, 2003) indique que le médicament doit être exposé à des conditions de stress hydrolytique, thermique, photolytique et oxydant. Cependant, en dehors des conditions de stress photolytique explicitées dans la ligne directive ICH Q1B (ICH Guideline, 1996), il n'existe pas de recommandations spécifiques fixant les conditions d'exposition vis-à-vis des autres facteurs à explorer, ni de recommandations sur les approches analytiques à employer. L'intensité des conditions de stress et la durée d'exposition sont donc à déterminer par l'expérimentateur et ce, en fonction des objectifs prédéfinis, des risques identifiés et des moyens disponibles (Alsante et al., 2003).

Des recommandations sur l'évaluation du devenir environnemental sont aussi données dans le cadre de la mise sur le marché du médicament dans le texte «guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use». Ces règlementations préconisent d'étudier le devenir du principe actif en milieu aqueux en aérobiose et en anaérobiose, milieu aqueux dans lequel sont ajoutées des espèces ayant des potentiels redox définis. Néanmoins, toutes ces conditions préconisées ne permettent pas d'obtenir l'ensemble des mécanismes de dégradation potentiels des principes actifs. Par exemple elles ne permettent pas d'anticiper le devenir du principe actif après l'emploi de procédés d'oxydation avancée. (Ahmed et al., n.d.). Là encore, les conditions de stress vont donc dépendre de ce que l'analyste souhaite évaluer et/ou mettre en évidence.

2.2. Conditions expérimentales utilisées

2.2.1. Dégradation chimique en solution

Les réactions d'hydrolyse sont généralement catalysées par des bases ou des acides. Les conditions d'acido-basicité du milieu doivent être choisies afin de permettre la plupart des réactions d'hydrolyse des différents états d'ionisation du principe actif. Les études de dégradation forcée se font ainsi généralement en milieu aqueux à pH 1 (acide chlorhydrique 0,1 $mol.L^{-1}$) et à pH 13 (hydroxyde de sodium 0,1 $mol.L^{-1}$). Mais, la solubilité du principe actif en milieu aqueux dépendant de son état de charge qui est fonction du pH de la solution, il est possible que le principe actif soit insuffisamment soluble pour évaluer son hydrolyse en milieu aqueux (Alsante et al., 2003). Pour cette raison, il est d'usage d'avoir recours à de l'acétonitrile ou à du méthanol comme co-solvant. Néanmoins, le méthanol étant susceptible d'induire des attaques nucléophiles, il est préférable d'utiliser l'acétonitrile réputé plus inerte. Ce dernier peut cependant induire des époxydations en milieu basique et en présence de peroxydes (Payne et al., 1961).

La dégradation des médicaments sous l'action de la température répond souvent à la loi d'Arrhenius (Waterman, 2009), avec une énergie d'activation généralement supérieure à 50 $kJ.mol^{-1}$. Il est donc d'usage de considérer que si l'on conserve un médicament pendant 1 mois à 80°C on simule *a minima* sa dégradation après 24 mois de conservation à 25 °C. Toutefois, un chauffage de la solution à des températures élevées peut induire la formation de produits de dégradation différents. Par exemple lorsque le Cefaclor® a été exposé à 85 °C les produits de dégradation étaient différents de ceux obtenus à température ambiante (Dorman et al., 1997).

La sensibilité aux oxydants d'un principe actif peut être évaluée en l'exposant au peroxyde d'hydrogène. Les solutions doivent parfois être préparées à des pH différents pour s'assurer que tous les états d'ionisation sont testés (Jung et al., 2009). Ces essais doivent se dérouler à 25°C et à l'obscurité pour éviter la formation de radicaux hydroxyle responsables de réactions concurrentielles (Zang and Farnood, 2005).

2.2.2. Photodégradation en milieu aqueux

L'évaluation de la photodégradation en milieux aqueux dépend elle aussi de l'objectif poursuivi. Par exemple, s'il s'agit d'évaluer le devenir en condition solaire simulée (norme ID 65 et guideline ICH Q1B), le recours à une lampe à spectre continu normalisé est à envisager. La chambre QSUN test (utilisée dans nos essais de photolyse directe) fait partie des instruments couramment employés dans ce type d'expérimentation car ses filtres permettent de reproduire le spectre solaire selon la norme ID65 (figure 9).

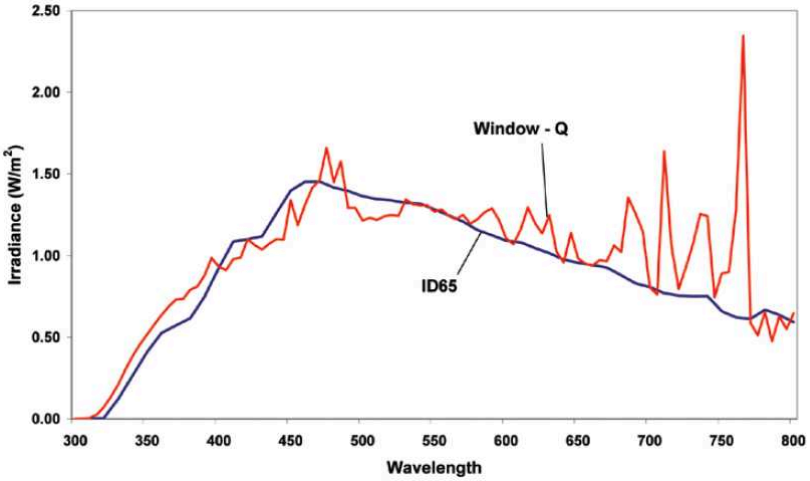


Figure 9 : spectre UV-visible émis par l'appareil QSUN et spectre UV-visible de la norme ID 65.

Le fabricant de cet appareil propose des durées d'exposition permettant d'obtenir des conditions répondant à la norme ICH Q1B (tableau 1).

Tableau 1 : caractéristiques des lampes et durée d'exposition à choisir pour obtenir une exposition correspondant à la norme ICH Q1B.

Set Point @420 nm	UV Irradiance (300-400nm)	Illuminance	Test Duration	UV Dosage	Visible Light Dosage
0.62 W/m²	28.3 W/m²	50.4 klx	24 hours	673 W-hr/m²	1.21 million lux-hr
1.10 W/m²*	49.7 W/m²	89.5 klx	13.5 hours	671 W-hr/m²	1.21 million lux-hr
1.47 W/m²	66.5 W/m²	119.6 klx	10 hours	665 W-hr/m²	1.20 million lux-hr

Afin d'évaluer l'impact du contenant des solutions (verre de type 1) employé lors des études d'exposition, son spectre UV-visible a été obtenu en plaçant des échantillons

de ce verre dans un spectromètre UV-visible. Au-delà de 280 nm le coefficient d'extinction molaire n'était pas différent de celui du vide.

2.2.3. Photocatalyse en milieu aqueux

Pour les conditions de photocatalyse, le dioxyde de titane (TiO_2) sous forme de nanoparticules et de qualité P25, matériau composite constitué de 80% de forme rutile et de 20 % de forme anatase (Ohno et al., 2001), a été choisi.

En effet, parmi l'ensemble des photocatalyseurs existants, le dioxyde de titane (TiO_2) sous forme de nanoparticules et de qualité P25 est l'un des plus utilisés à cause de son efficacité importante dans la dégradation de composés organiques (Carp, 2004). Cela s'explique par :

- sa composition : l'association rutile et anatase permet d'obtenir une synergie d'activité : la différence d'énergie entre la bande de valence et la bande de conduction est faible. La valeur de l'énergie à mettre en œuvre pour obtenir un électron et une lacune électronique est donc réduite si bien qu'une radiation UV-visible (aux alentours de 360 nm) peut permettre d'induire des processus de photocatalyse (Sudha and Sivakumar, 2015).
- ses caractéristiques microscopiques qui lui confèrent une bonne surface disponible (Ohno et al., 2001) et donc une capacité élevée à dégrader les composés sorbés.

3. Analyse structurale

3.1. Séparation chromatographique

Les produits de dégradation étant des substances apparentées au principe actif et minoritaires par rapport à ce dernier, il est nécessaire d'utiliser une méthode séparative performante pour les discriminer.

Qu'il s'agisse d'hydrolyse, d'oxydation, ou de réaction radicalaire, la plupart des réactions impliquées dans la dégradation du principe actif s'accompagnent d'un réarrangement, d'une perte ou d'une oxydation de groupements. Ces changements induisent des modifications des propriétés physico-chimiques, notamment de polarité, qui peuvent être utilisées pour la séparation des produits de dégradation. C'est pour cette raison que le phénomène de partage a été mis à profit en employant des systèmes de chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Les phases stationnaires avec un greffage alkyle (C18) sont à préférer, au moins dans un premier temps. En effet, ces phases stationnaires ont de bonnes performances pour des composés dont le coefficient de partage octanol/eau (P) est tel que log P est compris entre -1 et 5, ce qui est en général le cas des principes actifs. Aussi elles sont les plus employées et constituent plus des deux tiers des phases utilisées sur la période 2008-2012 pour la séparation des produits de dégradation de principes actifs (Jain and Basniwal, 2013). La modification du pH de la phase mobile peut améliorer la rétention de certains composés, comme cela est le cas de ceux qui présentent des fonctions acide carboxylique.

3.2. Couplage chromatographie liquide et spectrométrie de masse multiniveaux à haute résolution (LC-HRMS^n)

Ces dernières années ont vu l'émergence d'un nombre important de travaux montrant la performance du couplage CLHP-HRMS^n dans la caractérisation des produits de dégradation de principes actifs dans un contexte pharmaceutique (Attia et al., 2016 ; Bhandi et al., 2016 ; Lei et al., 2017) ou environnemental (Segalin et al., 2015 ; An et al., 2015 ; Trawiński and Skibiński, 2017). En effet, ce couplage permet, dans la plupart des cas, d'acquérir des données suffisamment caractéristiques pour établir la structure des substances apparentées au principe actif.

Ce niveau d'information sur la structure, apporté par les spectromètres à haute résolution, repose d'une part sur le déploiement du processus de fragmentation à multiples niveaux des ions à caractériser et d'autre part, sur leur aptitude à confirmer la nature des ions produits et des pertes neutres par la mesure directe ou indirecte de leur masse exacte (cf.*infra*). L'accès à la masse exacte conduit à cibler la composition élémentaire des ions analysés et des pertes neutres.

La méthode de détection voit sa performance augmenter quand elle est couplée à une méthode séparative, en l'occurrence la chromatographie liquide à haute performance, à condition que la composition de la phase mobile soit compatible avec le fonctionnement de l'interface de couplage utilisée.

En effet, l'apport de la séparation en amont est utile pour (Niessen and Tinke, 1995) :

- l'étude des composés isobares présents dans le mélange,
- l'obtention d'informations supplémentaires sur les propriétés physico-chimiques (estimation du coefficient de partage en chromatographie à polarité de phases inversée) des produits étudiés via leur rétention chromatographique relative ce qui contribue, dans une certaine mesure, à leur élucidation structurale,
- améliorer la détection des substances apparentées à l'état de traces, dont la détection peut être rendue difficile par le signal du principe actif qui sature le spectromètre de masse.

L'ensemble des caractéristiques analytiques du couplage CLHP-HRMS^n explique donc que cette méthode soit celle de choix pour l'étude de substances apparentées dans le domaine pharmaceutique, en agro-alimentaire et en science de l'environnement (Pedrouzo et al., 2011 ; Petrovic et al., 2007).

Intérêt de l'analyse en mode haute résolution

La définition IUPAC de la résolution en spectrométrie de masse est le rapport entre la masse m de l'ion étudié et Δm, Δm étant la largeur du pic du signal de l'ion. La largeur Δm peut être mesurée à 50%, 5% ou 0,5% de la hauteur du pic. D'après l'IUPAC (Nič et al., 2009), la résolution doit de préférence être déterminée en mesurant Δm à mi-hauteur (50%). La largeur Δm à mi-hauteur est notée par l'acronyme 'FWHM' (Full Width of the peak at Half its Maximum height). Dans le cas d'une mesure de Δm à mi-hauteur on considère que la résolution est élevée lorsqu'elle est supérieure à 10 000, basse dans le cas contraire (Lacorte et al., 2015).

En spectrométrie de masse, l'exactitude relative est le plus souvent calculée et exprimée en partie par million (ppm) suivant cette formule :

Exactitude relative = 10^6 × (masse mesurée-masse théorique)/masse théorique

La résolution élevée des spectromètres de masse combinée à l'emploi de calibrants de haute pureté confère aux mesures une exactitude relative faible en valeur absolue.

Sous réserve que la calibration ait bien été effectuée, la résolution des spectromètres de masse permet d'obtenir des valeurs d'exactitude relative de l'ordre du ppm pour la masse des fragments (Lacorte et al., 2015).

Le nombre de formules brutes possibles est fonction de la masse mesurée et de l'exactitude relative. La figure 10 donne un ordre de grandeur du nombre de formules brutes possibles en fonction de l'évolution de ces deux paramètres. Lorsque l'exactitude relative est faible en valeur absolue, le nombre de formules brutes diminue significativement. Cela peut permettre d'une part de faciliter le travail de l'analyste en limitant le nombre de structures possibles et, d'autre part, d'apporter une meilleure confiance dans l'attribution de la structure des ions précurseurs et des

fragments et donc dans l'élucidation structurale du composé étudié (Bart Emary and Zhang, 2013).

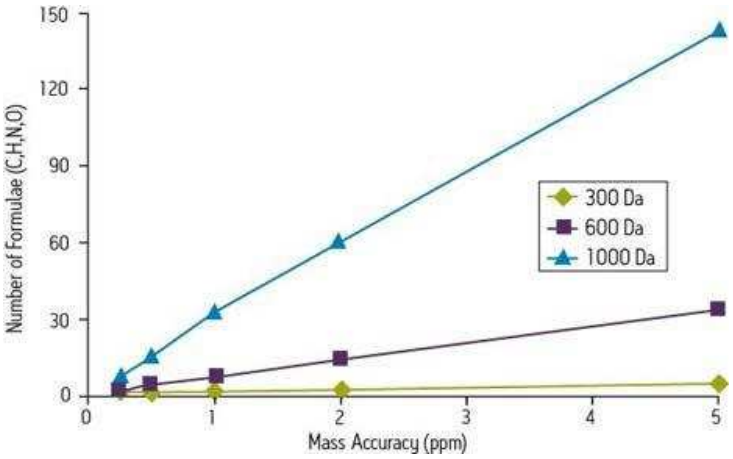


Figure 10 : nombre de formules brutes possibles en fonction de l'exactitude relative et de la masse mesurée exprimée en dalton (Bart Emary and Zhang, 2013).

Une résolution élevée en spectrométrie de masse est obtenue par l'emploi de spectromètres de masse à haute résolution. L'intérêt relatif des différents spectromètres de masse haute résolution utilisés en couplage avec la chromatographie liquide est discuté dans la partie suivante.

Spectromètres de masse à haute résolution

Les capacités de résolution des spectromètres à haute résolution sont étroitement liées à l'analyseur.

Trois analyseurs permettent de réaliser des acquisitions en haute résolution avec un couplage avec la chromatographie liquide : l'analyseur à temps de vol (Time of Flight, ToF), l'orbitrap et l'analyseur à résonance cyclotronique (Milman, 2015). L'emploi de ce dernier étant très anecdotique, il ne sera pas comparé aux deux autres analyseurs.

Trois grandes caractéristiques diffèrent entre les spectromètres de masse à haute résolution existants : la gamme de masse étudiable, la FWHM et la possibilité de réaliser différents niveaux de fragmentation.

Pour les spectromètres à analyseur orbitrap, la résolution est de 100 000 pour une plage du rapport m/z entre la masse m et la charge z du fragment allant de 50 à 4 000. Avec ces analyseurs il est possible de réaliser des fragmentations multi-étapes ($HRMS^n$). Dans le cas d'un analyseur ToF, la résolution est de 60 000 pour les appareils les plus sophistiqués, pour une plage de m/z de 50 à 20 000. Contrairement aux spectromètres à analyseur orbitrap les appareils les plus fréquemment utilisés ne permettent souvent de réaliser qu'un seul niveau de fragmentation (ToF/ToF, MS^2)(Lacorte et al., 2015).

L'emploi de ces deux types de spectromètres de masse est donc différent : il est préférable d'utiliser un spectromètre de masse à analyseur orbitrap pour des composés de masse peu élevée, jusqu'à 4000 Da tandis que les spectromètres de masse à analyseur à temps de vol sont plus adaptés pour des composés de masse plus élevée. Concrètement, pour ce qui est des médicaments, les petites molécules issues de synthèse ou d'hémisynthèse présentent le plus souvent des masses inférieures à 1000 Da et sont donc mieux caractérisées par analyseur orbitrap. Pour les médicaments issus de biotechnologies, dont la masse peut atteindre plusieurs centaines de kDa, il est préférable d'utiliser un analyseur à temps de vol.

Le spectromètre à analyseur orbitrap étant le plus adapté à l'étude des voies de dégradation de principes actifs chimiquement définis, une description de son principe est présentée ci-après.

Principe du spectromètre de masse à analyseur orbitrap

Les spectromètres de masse Orbitrap® sont utilisés pour l'analyse d'échantillons en milieu liquide, sans ou avec séparation en CLHP (Scigelova and Makarov, 2006). Le schéma d'ensemble d'un spectromètre de masse de type Orbitrap® est représenté figure 11 :

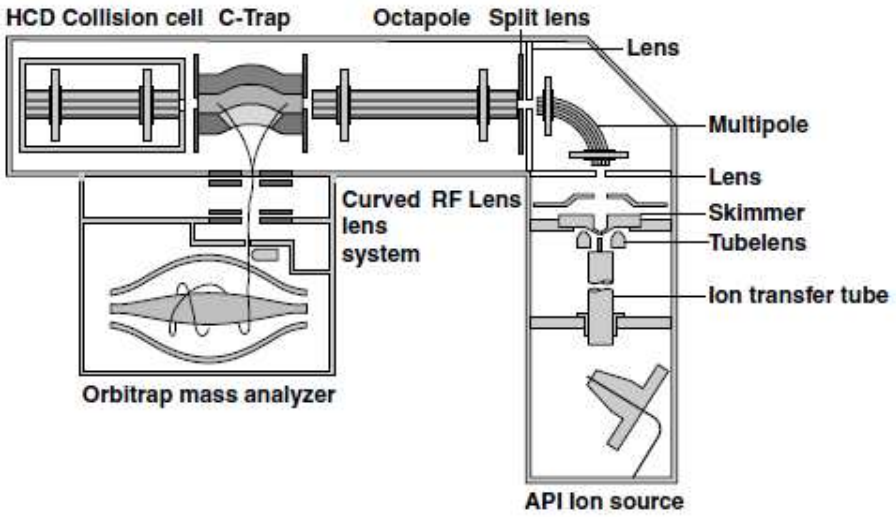


Figure 11 : représentation d'un spectromètre de masse Orbitrap® (Hu et al., 2005).

Comme la plupart des spectromètres de masse fonctionnant en couplage avec la chromatographie liquide (Hopfgartner, 2013), les spectromètres de masse Orbitrap® (Hu et al., 2005) sont composés des éléments suivants (Niessen and Tinke, 1995) :

- un dispositif d'introduction et de nébulisation de l'échantillon,

- une source d'ionisation des molécules,

- une optique électronique pour séparer les ions des espèces non chargées,

- un octopôle pour faire une première sélection des ions en basse résolution (+/- 0,4 Da),

- une trappe d'ions (C-trap) pour augmenter la quantité d'ions étudiés,

- une chambre de collision pour obtenir des fragments d'ions,

- un analyseur, qui constitue la partie spécifique de cet appareil et permet de déterminer la masse des ions avec une résolution élevée.

Dans un premier temps, la solution d'analytes est nébulisée, puis les ions sont formés grâce à deux types de sources : les sources d'ionisation par electrospray (ESI) et les sources d'ionisation par ionisation chimique (APCI). Les ions sont séparés des molécules non chargées et focalisés via des systèmes optiques, jusqu'à

atteindre le premier octopôle. Le signal nécessitant d'être amplifié pour être analysé, les ions sont concentrés dans une trappe d'ions puis sont dirigés soit directement vers l'analyseur de masse à trappe orbitalaire, soit vers la cellule de collision afin d'obtenir des ions fragments dont les masses seront par la suite mesurées dans l'analyseur à trappe orbitalaire (figure 12).

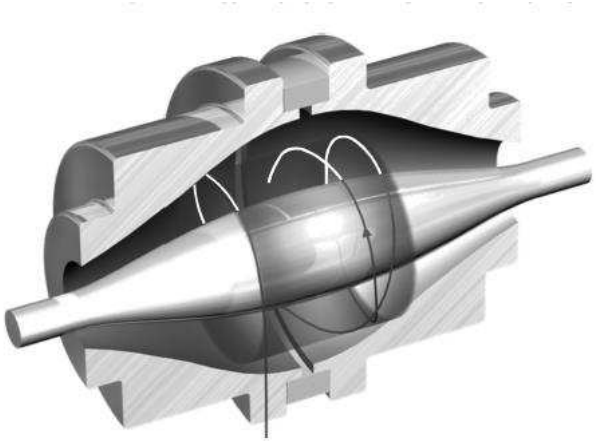


Figure 12 : représentation d'un analyseur orbitrap (Hu et al., 2005).

La trappe orbitalaire est constituée de deux parties : un axe interne et un barillet externe. Un champ électrique est appliqué entre ces deux électrodes, le barillet étant non chargé. La forme de l'analyseur crée un champ électrique de type « quadro-logarithmique » qui induit un mouvement spécifique des ions que l'on peut déconvoluer en deux composantes : un mouvement radial autour de l'axe interne et un mouvement suivant cet axe qui répond à des oscillations de type harmonique. C'est la déconvolution des oscillations harmoniques qui au travers d'outils mathématiques (transformée de Fourier) permet d'obtenir une haute résolution pour la mesure des masses étudiées.

Grâce à cet analyseur orbitalaire, les spectromètres de masse Orbitrap® réalisent des mesures de masse avec une résolution élevée, ce qui justifie leur appellation de spectromètres de masse à haute résolution (Hu et al., 2005).

3.3. Élucidation structurale par LC-HRMS^n

Le processus général de caractérisation des produits de dégradation est présenté dans la figure 13 (Narayanam et al., 2014) et est illustré au travers des chapitres 3, 4 et 5.

Une première étape consiste à optimiser les conditions instrumentales afin d'acquérir le plus possible d'informations structurales. Cela nécessite de choisir une source et des conditions d'ionisation qui permettent de former le plus grand nombre d'ions d'intérêt. Ces optimisations sont réalisées en employant une solution du principe actif qui est soit infusée directement dans le spectromètre de masse via une seringue, soit introduite en utilisant la pompe et l'injecteur du système chromatographique sans colonne (analyse en flux continu). Ce dernier cas présente l'avantage de pouvoir être réalisé en présence de la phase mobile utilisée par la suite en couplage LC-HRMS^n et donc de prendre en compte les impacts éventuels de celle-ci sur les processus d'ionisation. En parallèle des optimisations de la source, les conditions chromatographiques sont développées, soit en couplage LC-UV, soit directement en couplage LC-HRMS^n, de sorte à permettre la séparation des produits de dégradation et du principe actif.

Une fois les paramètres instrumentaux optimisés, les échantillons peuvent être analysés en LC-HRMS^n. Dans un premier temps, l'analyste peut déterminer la formule brute des ions moléculaires des produits de dégradation en examinant les spectres de masse obtenus en fonction des temps d'élution, sans utiliser de processus de fragmentation (LC-HRMS). À partir de ces premiers résultats, il peut demander que les ions moléculaires soient fragmentés (LC-HRMS^2) avec différentes énergies de collision puis que les ions ainsi obtenus le soient de nouveau (LC-HRMS^3) et ce, autant de fois que la sensibilité de l'instrument le permet (LC-HRMS^n). Les données spectrales sont ensuite exploitées pour l'élucidation structurale.

La caractérisation des produits de dégradation est basée sur la recherche et l'interprétation des similitudes et des différences entre leurs spectres de masse et ceux du principe actif. Une première étape consiste à mettre en évidence des processus de fragmentation du principe actif en s'appuyant sur :

- la structure des fragments, proposée à partir des spectres haute résolution qui permettent de connaître la formule brute des fragments,

- la filiation des ions produits, déterminée grâce aux fragmentations multiniveaux,

- la connaissance de processus de fragmentation en phase gazeuse, décrits dans la littérature.

Grâce à cette étape, l'analyste peut identifier des ions fragments et des pertes caractéristiques qui permettront par la suite de déterminer les parties inchangées et celles modifiées de chaque produit de dégradation par rapport au principe actif. Ces premières observations, combinées à la connaissance de la formule brute, vont conduire l'analyste à proposer une structure plausible pour chacun, qui sera confirmée ou infirmée grâce aux résultats des analyses structurales. Ainsi, les données LC-HRMS^n doivent être cohérentes avec la structure des produits de dégradation et permettre, tout comme pour le principe actif, de proposer un schéma de fragmentation.

Une fois que les structures de l'ensemble des produits de dégradation ont été proposées, la pertinence de celles-ci peut être vérifiée en établissant, parfois avec le recours à des données bibliographiques, un mécanisme qui explique l'origine des modifications structurales et les raisons pour lesquelles certains composés apparaissent avant d'autres au cours du processus de dégradation. Ce mécanisme et les données quantitatives obtenues, permettront de renforcer les hypothèses structurales plausibles proposées.

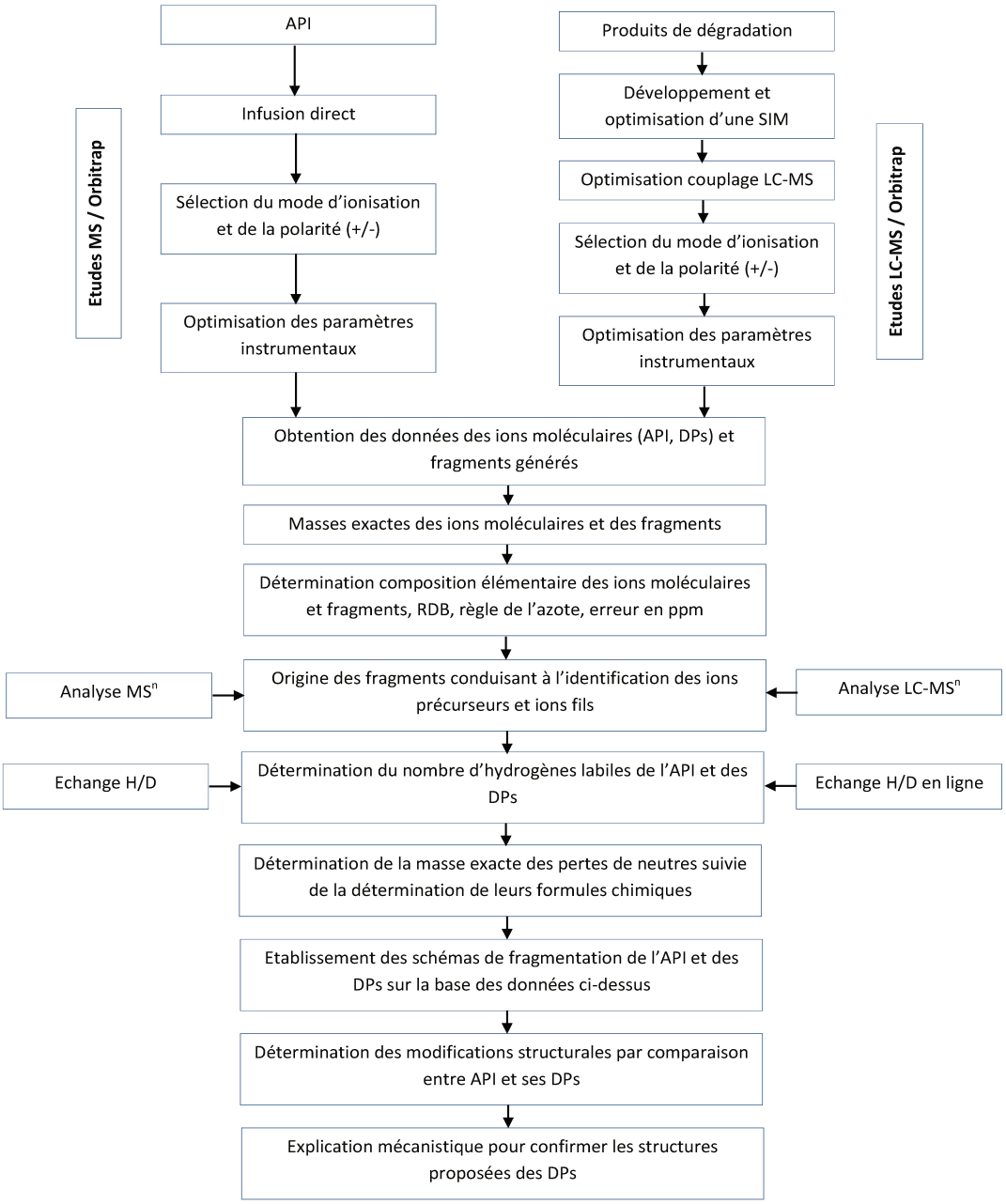


Figure 13 : méthode de caractérisation des produits de dégradation (DPs) par LC-HRMS^n

3.4. Optimisation analytique

La phase mobile et le type de méthode chromatographique ont un impact sur la désolvatation. Leur choix doit donc être réalisé de sorte à optimiser la détection des composés.

Les composés détectables par spectrométrie de masse n'étant que ceux sous forme chargée, le processus d'ionisation est particulièrement important. Les facteurs influençant la détection de l'analyte en ESI sont développés dans une revue (Cech and Enke, 2001). Deux facteurs sont critiques pour la détection en ESI : l'ionisation de l'analyte et son aptitude à se désolvater de la solution avec laquelle il est introduit. Ces deux facteurs dépendent de l'affinité protonique de l'analyte et de sa surface topologique, ainsi que du solvant employé pour l'introduire dans le spectromètre de masse. Puisque les propriétés intrinsèques de l'analyte ne peuvent être modifiées, l'optimisation du processus d'ionisation peut donc être réalisée en modifiant la phase mobile de sorte à faciliter les transferts de protons. Ceux-ci pouvant l'être par l'ajout d'acides (acide formique-acide acétique) ou de bases (hydroxyde d'ammonium) aptes à transférer facilement des protons en phase gazeuse, une pratique courante consiste à ajouter de l'acide formique dans les phases mobiles.

Dans le cadre de la séparation de produits de dégradation, deux méthodes chromatographiques sont fréquemment utilisées : la chromatographie par interaction hydrophile (HILIC) et la chromatographie à polarité de phases inversée (RP-CLHP). Une publication compare l'emploi de ces deux techniques de chromatographie pour l'évaluation de la sensibilité de trois spectromètres de masse (chacun triple quadripôle et analyseur non orbitrap) à géométrie de source différente. Pour cette étude de sensibilité il a été utilisé 53 principes actifs ayant des propriétés physico-chimiques représentatives en termes de pK_a et de log P. Pour un des spectromètres de masse à triple quadripôle, il a été obtenu un gain très significatif (supérieur à 5 fois) du signal en HILIC par rapport à ce qui a été obtenu en RP-CLHP. Pour les deux autres spectromètres de masse à triple quadripôle, les résultats étaient beaucoup plus nuancés. Une autre étude a évalué l'aptitude d'un spectromètre de masse Orbitrap® à détecter des métabolites dans des urines, en fonction des méthodes chromatographiques citées plus haut (Zhang et al., 2012). Globalement, le

couplage HILIC-HRMS^n a permis de détecter 2210 composés, tandis que le couplage RP-HRMS^n a permis d'en détecter 1886. Mais, les métabolites présents dans les urines étant généralement plus hydrophiles que les trois principes actifs étudiés dans la thèse et leurs produits de dégradation, il apparaît délicat de transposer les résultats obtenus pour les métabolites aux produits de dégradation des trois principes actifs.

D'autre part, l'objectif des méthodes développées étant la détection de substances apparentées, souvent à l'état de traces, il convient aussi d'évaluer l'aptitude du spectromètre de masse à détecter ces composés et à obtenir leur masse exacte même lorsque ceux-ci sont à l'état de traces. Dans le cas de la recherche d'impuretés et de produits de dégradation, la méthode doit permettre de détecter des produits de dégradation correspondant à 0,05 % du principe actif (seuil d'identification d'ICH Q3A), c'est-à-dire un rapport de 1 pour 2000 (m/m). Les spectromètres à analyseur orbitrap ayant une gamme dynamique de 5000 (Makarov et al., 2006) pour la mesure de masse exacte avec au maximum 5 ppm d'erreur, ils peuvent permettre de détecter et de mesurer la masse exacte de l'ensemble des composés.

En conséquence le couplage RP-HRMS^n avec l'emploi d'un analyseur orbitrap semble donc présenter les performances analytiques nécessaires à la détection des produits de dégradation de principes actifs. Il a été préféré au couplage HILIC-HRMS^n car la chromatographie par interaction hydrophile (HILIC) semble plus adaptée aux composés à caractère hydrophile plus marqué que celui des principes actifs.

4. Approches computationnelles

4.1. Approche *ab initio* : modélisation moléculaire

Avec l'amélioration des performances des ordinateurs et l'accès à des bases de données informatiques, des approches pour prédire, expliquer ou interpréter des résultats expérimentaux, ont été développées sans avoir recours à des expériences.

Ces approches reposent sur des extrapolations réalisées à partir de l'exploitation de modèles théoriques et de résultats expérimentaux. Les résultats obtenus par ces approches sont donc à interpréter avec précaution car dépendant (i) du choix du modèle et de la possibilité de transposer les données existantes au problème posé (ii) de la validité/applicabilité des données expérimentales et des règles empiriques sur lesquelles repose le modèle.

La modélisation moléculaire peut constituer une aide précieuse pour comprendre la réactivité d'une molécule (Chermette, 1999) (Reid et al., 2004). En effet, la modélisation permet de visualiser et de quantifier des informations moléculaires, et d'établir des données sur la structure électronique susceptibles d'aider à anticiper/expliquer la réactivité de molécules.

Les principes de modélisation moléculaire par approche *ab initio* ont fait l'objet d'intenses recherches et de prix Nobel. Le terme *ab initio* signifie « au commencement » et fait référence au fait que les calculs *ab initio* reposent sur des constantes physiques.

Les calculs *ab initio* ont pour objectif de proposer des solutions à l'équation de Schrödinger. L'équation de Schrödinger décrit un système de façon complète. Cependant elle est bien souvent insoluble et des approximations doivent être effectuées. Les choix des approximations sont à l'origine d'une multitude de modèles utilisés en chimie computationnelle.

Les principes de ces approches et les choix de modèles seront présentés. Puis des exemples d'applications dans le contexte de l'étude de la réactivité des principes actifs seront discutés.

4.1.1. Exemples de modèles et de leurs limites

Méthode de Hartree-Fock et méthodes dérivées

La méthode de Hartree-Fock a été introduite en 1927 peu de temps après que l'équation de Schrödinger ait été établie. La simplification proposée par Hartree-Fock a été de calculer la fonction d'onde en la considérant comme une combinaison d'orbitales ne contenant chacune qu'un seul électron soumis à un champ composite produit par tous les autres électrons et les noyaux.

Cette méthode présente deux écueils majeurs :

- les résultats obtenus peuvent être insuffisamment précis par rapport à l'objectif car la corrélation électronique, c'est-à-dire les interactions entre les électrons, n'est pas prise en compte,

- cette approche peut nécessiter de nombreuses heures voire des jours de calculs lorsque la taille des systèmes grandit.

Pour ces raisons des variantes de cette méthode ont été développées : les méthodes semi-empiriques et les méthodes post Hartree-Fock.

Les méthodes semi-empiriques s'appuient sur des données expérimentales supplémentaires par rapport à celles utilisées dans la méthode de Hartree-Fock et qui permettent de diminuer le temps de calcul. Elles sont utilisées pour des molécules de grande taille (masse molaire supérieure à 1000 $g.mol^{-1}$) pour lesquelles les temps de calcul seraient trop longs. Il s'agit par exemple des méthodes MINDO, MNDO, AM1, PM3 et PM6.

Les méthodes post Hartree-Fock reposent sur les mêmes principes que la méthode de Hartree-Fock mais prennent davantage en compte les effets de corrélation électronique. Elles sont très exigeantes en temps de calcul et ne peuvent donc s'utiliser que pour des systèmes de taille très réduite. Il s'agit par exemple de méthodes s'appuyant sur la théorie de la perturbation de Møller-Plesset : MP2, MP3 et MP4.

Théorie de la fonctionnelle de la densité

À la différence de la méthode Hartree-Fock, dans laquelle l'énergie totale du système est une fonctionnelle de la fonction d'onde, l'énergie totale du système à l'état fondamental est définie dans la théorie de la fonctionnelle de la densité (density functional theory, DFT) comme une fonctionnelle de la densité électronique de l'état fondamental.

Cette approche a pour intérêt d'offrir une bonne précision des résultats sur des systèmes de taille intermédiaire (masse molaire de plusieurs centaines de $g.mol^{-1}$) et de nécessiter un temps de calcul acceptable sur des ordinateurs de calcul scientifique.

Au sein des méthodes reposant sur la théorie de la fonctionnelle de la densité, l'une des plus utilisées est la B(BECKE)3(Version 3)L(LEE)Y(YOUNG)P(PAR) qui est une méthode hybride, reposant aussi partiellement sur la méthode de Hartree-Fock.

Bases de calcul

En plus du choix de la méthode, la base de calcul est un autre facteur qui va influer sur le temps de calcul et la précision des résultats. En effet, en chimie quantique, une base de calcul est un ensemble de fonctions utilisées afin de modéliser des orbitales moléculaires.

On distingue ainsi les bases dites minimales et les bases à valences séparées.

Les bases minimales ne considèrent pas les effets émanant des valences et ne doivent donc être utilisées que pour des systèmes très complexes.

Les bases à valences séparées donnent une représentation plus précise des orbitales. Ce sont les plus utilisées pour les systèmes complexes. Par exemple, les bases 6-31G (d,p) et 6,31 G+(d,p) permettent respectivement de réaliser des calculs très précis dans le contexte de molécules et d'anions ne contenant pas d'atomes lourds.

4.1.2. Exemples de calculs réalisables

Réactivité des molécules

Les travaux de recherche du Professeur Fukui (Fukui et al., 1952) sur le rôle des orbitales frontières lui ont valu d'obtenir le prix Nobel de chimie en 1981. Il a démontré que les électrons les plus faiblement liés, ceux des orbitales frontières, jouent un rôle important dans la réactivité des molécules. Plus précisément, dans ses travaux qui ont été à l'origine de l'obtention du prix Nobel, le Professeur Fukui a démontré en prenant l'exemple d'une série d'hydrocarbures, que si l'on distinguait les électrons de l'orbitale moléculaire la plus élevée des autres, on obtenait l'explication de la réactivité préférentielle d'un carbone par rapport à un autre.

La théorie formulée par le Professeur Fukui est ainsi toujours utilisée pour expliquer la réactivité de composés chimiques ou formuler des hypothèses structurales lorsque les données analytiques sont équivoques, en employant des logiciels de chimie quantique (He et al., 2017 ; An et al., 2015).

Calcul de l'énergie à différents niveaux d'excitation

Comme cela a été évoqué dans le chapitre 1 du manuscrit, sous l'influence de la lumière ou suite à des transferts énergétiques, un principe actif peut se retrouver sous différents états excités. L'approche *ab initio* permet de calculer l'énergie d'une molécule dans différents états d'excitation (singulet ou triplet), de sorte que l'on peut évaluer quelles transitions du diagramme de Jablonski (décrit dans le chapitre 1) sont possibles.

4.1.3. Conditions de calcul choisies

Tous les calculs ont été effectués avec le logiciel Gaussian (version 9.0) et l'interface graphique associée Gaussianview (version 5.0) en utilisant un ordinateur scientifique présentant une capacité de calcul (32 cœurs) et une mémoire vive élevées (32 Go).

Modèles choisis pour évaluer les sites de réactivité moléculaire

La plupart des auteurs réalisant des calculs de chimie quantique pour l'étude de principes actifs dont la masse est de plusieurs centaines de $g.mol^{-1}$, emploient des approches *ab initio* reposant sur la DFT, en utilisant le modèle B3LYP et la base de calcul 6,31 G+(d,p). Ces méthodes ayant une précision similaire aux approches post

Hartree-Fock sans nécessiter autant de temps computationnel, semblent être à l'heure actuelle, pour des systèmes de ce type, d'un très bon rapport précision/temps computationnel (Tirado-Rives and Jorgensen, 2008). Elles ont donc été choisies pour modéliser les principes actifs étudiés.

Par ailleurs, des logiciels permettent de prendre en compte la solvatation. Les modèles les plus utilisés sont les modèles implicites (comme le modèle IEFPCM, cf. infra) dans lesquels on considère que le soluté est placé dans une cavité au sein du solvant assimilé à un milieu continu polarisable. Ce type d'approche a pour avantage de présenter un bon rapport précision de calcul/temps de calcul nécessaire (Roux and Simonson, 1999).

Modélisation des états excités

La modélisation des états excités peut être réalisée par l'emploi de la théorie de la fonctionnelle de la densité dépendant du temps (Time Dependant Density Functional Theory, TD-DFT). Ainsi, dans le chapitre relatif à l'argatroban (chapitre 4), les énergies des états excités ont été obtenues en effectuant :

- une optimisation de la structure de l'argatroban à l'état fondamental en utilisant le modèle B3LYP 6,31 G+(d,p) et en prenant en compte l'effet de l'eau (en utilisant une modélisation de type IEFPCM),

- à partir de la structure optimisée à l'état fondamental, les calculs d'énergie en employant le même modèle qu'à l'état fondamental.

4.2. Approche *in silico* : évaluation toxicologique

4.2.1. Principe

Avec la quantité grandissante des données expérimentales de toxicité et d'écotoxicité, des scientifiques se sont interrogés sur la possibilité de développer des stratégies ne recourant à aucune nouvelle expérience. Il a ainsi été proposé d'employer des approches basées sur la création de modèles utilisant les connaissances déjà existantes de la toxicité de certains composés. Ces approches, reposant uniquement sur des calculs bien souvent effectués par des microprocesseurs informatiques dont le composant principal est le silicium, ont été ainsi dénommées approches *in silico.*

Il existe deux types d'approches *in silico* :

- l'approche qualitative fonctionnant selon un mode utilisant des règles construites à partir des groupements connus pour avoir un potentiel à induire une toxicité

- l'approche quantitative par construction de modèles élaborés à partir de données quantitatives, QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship). (cf. *infra).*

La première catégorie de logiciels, dénommée par les anglophones « rule-based systems », s'appuie sur des connaissances que l'on a des mécanismes de génération de toxicités. Ils reposent essentiellement sur la recherche au sein de la molécule étudiée de groupements fonctionnels reconnus pour leur potentiel toxique. Ces logiciels apportent des données qualitatives (figure 14).

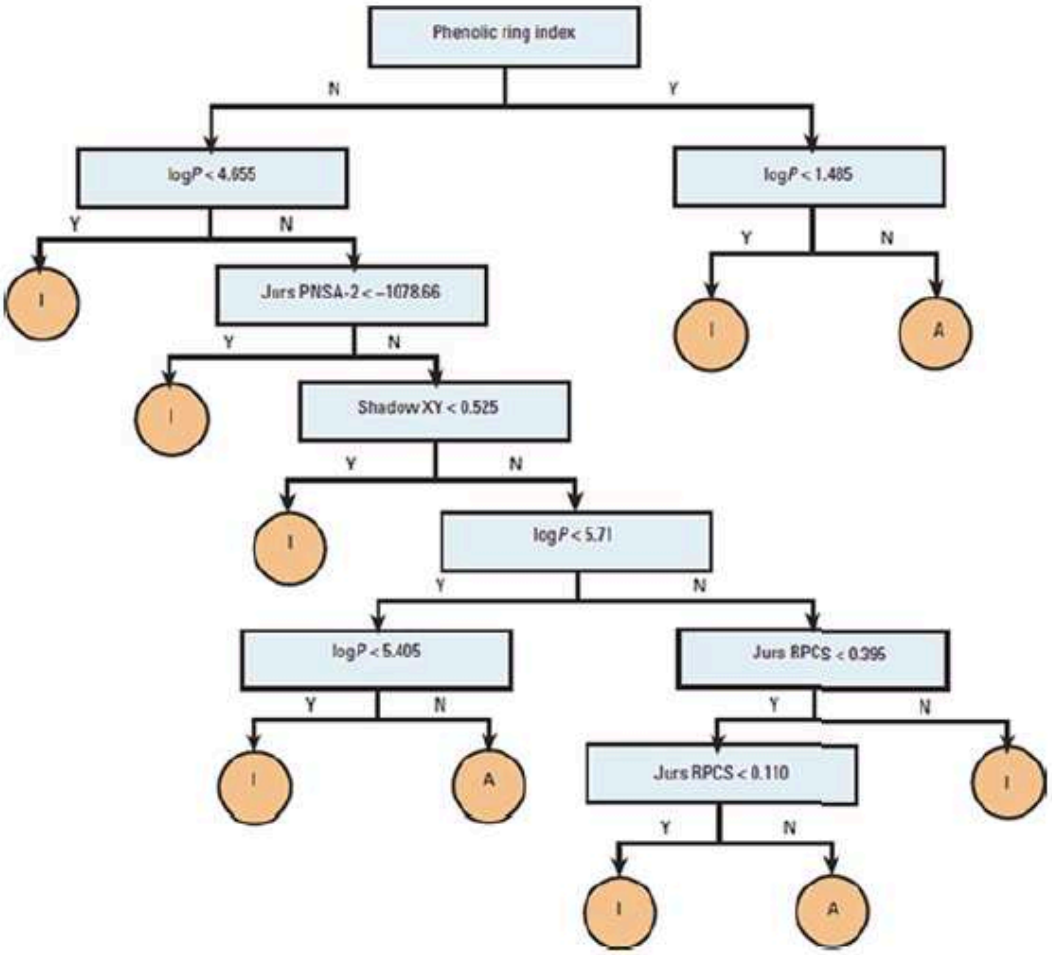


Figure 14 : exemple de modèle basé sur des règles : modèle de type arborescent. En fonction de l'application d'une règle oui (Y) ou non (N), le composé est évalué comme actif (A) ou inactif (I). (Benfenati, 2016).

La deuxième catégorie de logiciels, s'appuyant sur une approche de type QSAR, fournit des données quantitatives. Le logiciel recherche dans sa base de données des composés similaires à celui étudié et dont la toxicité a été évaluée expérimentalement. Il propose alors un modèle pour évaluer quantitativement la toxicité du composé étudié (figure 15). Ce modèle est basé généralement sur des corrélations entre une toxicité donnée et différentes propriétés physico-chimiques : nombre des cycles dans la structure, masse molaire, coefficient de partage octanol-eau et pK_a par exemple (Doucet and Panaye, 2010).

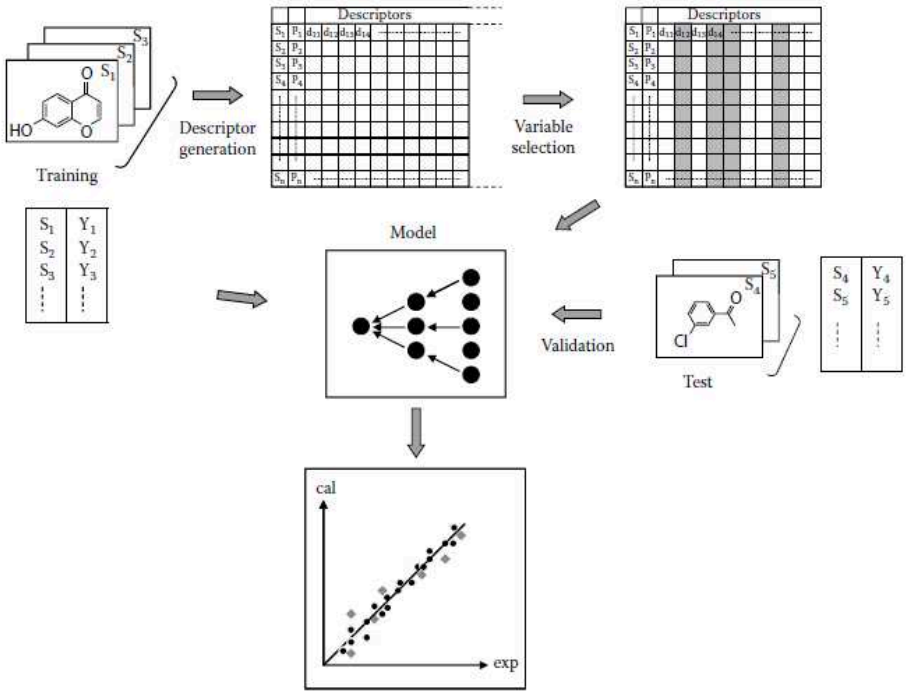


Figure 15 : étapes de modélisation selon l'approche QSAR

(Doucet and Panaye, 2010).

L'emploi d'une combinaison d'une approche qualitative basée sur des règles et d'une approche quantitative QSAR est un moyen de criblage « screening » tout à fait admis et a même été proposé dans la ligne directrice ICH M7 pour l'évaluation du risque génotoxique des impuretés et des produits de dégradation (Sutter et al., 2013) dont une synthèse est proposée sous la forme d'un logigramme dans la figure 16.

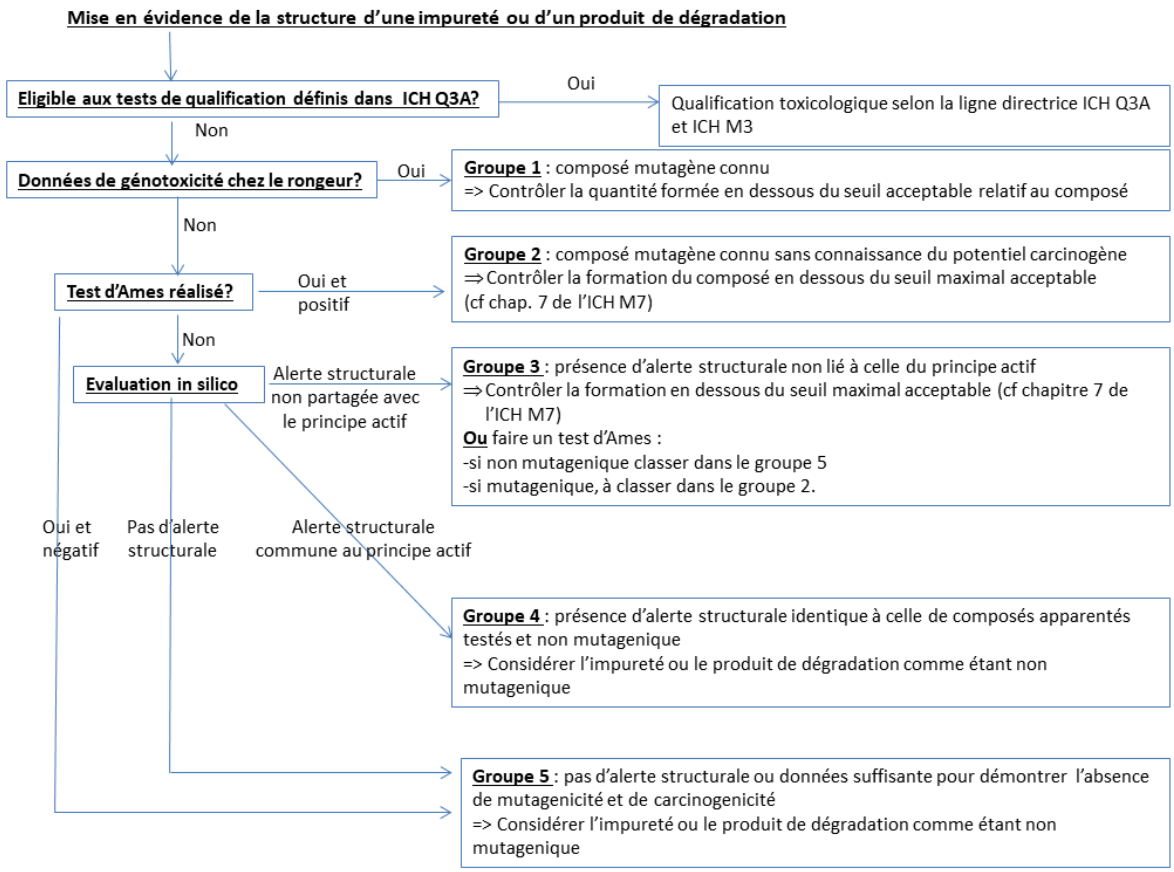


Figure 16 : résumé de l'approche d'évaluation de la mutagénicité d'impuretés ou de produits de dégradation selon ICH M7.

De nombreux logiciels existent pour évaluer le potentiel toxique des produits de dégradation. Citons deux d'entre eux : le logiciel Derek Nexus (système expert d'évaluation toxicologique *in silico* de Lhasa Limited, Leeds, Angleterre), basé sur une approche de type règles d'exclusion et le logiciel TEST (Toxicity Software Estimation Tool) développé par l'agence de l'environnement des États-Unis, proposant une approche de type QSAR. Une revue traite des logiciels existants et de leurs emplois possibles (Raies and Bajic, 2016).

4.2.2. Approches utilisées

En fonction du contexte pharmaceutique ou environnemental, les critères choisis sont très différents.

Dans un contexte pharmaceutique, la quantité de la substance à laquelle le patient est exposé est plus importante que dans l'environnement mais le principe actif a été

développé pour avoir une certaine innocuité vis-à-vis des patients. La problématique provient donc surtout de la formation de produits de dégradation à haute toxicité. C'est pour cette raison que l'évaluation de la toxicité a été centrée sur une évaluation de la génotoxicité des produits de dégradation par une approche *in silico*, comme cela est préconisé dans la guideline ICH M7.

Dans un contexte environnemental, il est possible que le principe actif lui-même présente un pouvoir toxique sur différentes espèces. Pour cette raison, les approches doivent permettre d'évaluer la toxicité du mélange du principe actif et des produits de dégradation. Dans le cadre de la thèse, pour avoir à la fois des données relatives à la toxicité de chaque produit et aussi du mélange, les études suivantes ont été menées :

- étude de la toxicité du mélange du principe actif et de ses produits de dégradation par approche *in vitro* (test de bioluminescence avec *V. fischeri*),

- évaluation de la toxicité du principe actif et des produits de dégradation isolés sur trois espèces appartenant à des niveaux trophiques différents par approches QSAR,

- évolution de la toxicité du mélange du principe actif et des produits de dégradation en utilisant les données QSAR et en pondérant avec les concentrations relatives,

- évaluation de la réactivité de chacun des composés par approche *ab initio.*

CHAPITRE 3 : DÉGRADATION DE L'APIXABAN EN CONDITIONS HYDROLYTIQUES ET IMPLICATIONS POTENTIELLES

1. Contexte de l'étude

Si les formes orales solides d'un médicament présentent l'avantage considérable de permettre un transport et une conservation plus faciles que les solutions destinées à la voie orale, il n'en demeure pas moins que dans certains tableaux cliniques l'emploi d'une solution orale est nécessaire.

Plus précisément, les solutions orales ont un intérêt élevé car elles offrent les avantages suivants :

- adaptation facilitée de la dose par mesure d'un volume, ce qui permet d'administrer la dose exacte par rapport au poids du patient,

- administration plus aisée du traitement chez des patients présentant un trouble de la déglutition ou une sonde naso-gastrique,

- meilleure acceptation du médicament par les patients par ajout d'édulcorant dans la solution.

Pour l'heure, lorsqu'une solution orale commerciale n'existe pas, il est d'usage d'avoir recours soit à un broyage des formes solides dans le service de soins, soit à la préparation d'une solution orale par la pharmacie. Cependant, le risque d'erreur de calcul et la difficulté de maîtrise des conditions de broyage en font une pratique à risque pour le patient. Il est donc préférable d'avoir recours à des solutions orales déjà préparées. Étant préparées à l'avance pour les services de soins, ces solutions orales sont susceptibles de se dégrader.

En plus des situations cliniques évoquées, dans le cadre d'un développement pharmaceutique, même si la forme finale commercialisée sera une forme orale solide, il est usuel, pour les études précliniques et les études cliniques de phase 1, d'avoir recours à une solution orale afin de s'assurer d'obtenir l'exposition la plus constante et la plus élevée possible pour mettre en évidence le plus grand nombre d'effets indésirables.

L'étude du devenir du principe actif en solution constitue donc une étape obligatoire avant le développement de solutions orales qui seront utilisées dans les phases

précoces du développement pharmaceutique. Cela peut aussi être une étape nécessaire pour permettre le développement de formes adaptées au contexte clinique.

La solubilisation d'un principe actif l'expose à des interactions avec le solvant utilisé et d'autres substances dissoutes pouvant initier des réactions chimiques en solution susceptibles de conduire à sa dégradation. C'est pourquoi, bien que la stabilité des principes actifs ait déjà été caractérisée à l'état solide en raison de leur forme commerciale actuelle, il est important d'explorer leur comportement dans un état et un environnement différents.

Pour contribuer à anticiper l'impact d'un tel changement vis-à-vis des principes actifs étudiés, il convient dans un premier temps de déterminer :

- l'influence du solvant vis-à-vis de l'hydrolyse des principes actifs impliquant la catalyse thermique et/ou acido-basique,
- l'influence liée à la présence d'autres composés dissous, qu'il s'agisse de gaz dissous, d'impuretés ou d'excipients,
- l'influence de l'irradiation lumineuse impliquant le domaine spectral correspondant aux UV-A et au visible.

Ces études sont souvent réalisées en mode multivarié avec comme critères, la cinétique de dégradation et la caractérisation structurale des produits de dégradation formés. À partir de ces données, les voies majoritaires de dégradation peuvent être établies et les conséquences en termes de sécurité d'emploi évaluées.

L'avènement des nouveaux anticoagulants oraux a permis de diminuer les accidents hémorragiques qui survenaient lors de la prise des anticoagulants alors existants. Dans la classe des nouveaux anticoagulants, trois disposent d'une autorisation de mise sur le marché : le rivaroxaban, le dabigatran etexilate et l'apixaban. Les présentations disponibles de ces trois principes actifs sont des formes orales solides à libération immédiate telles que gélules ou comprimés. Présentant une plus faible iatrogénie par rapport aux anciens anticoagulants, le développement d'une solution orale de nouveaux anticoagulants serait donc d'un grand intérêt pour certains terrains cliniques.

Parmi les trois anticoagulants cités des travaux portant sur le rivaroxaban ont déjà été réalisés par (Ramisetti and Kuntamukkala, 2014) et ont montré une sensibilité du

rivaroxaban aux stress acide et basique. Deux des trois produits de dégradation majoritaires ont été caractérisés. En revanche, l'apixaban et le dabigatran etexilate ont été retenus pour nos travaux dans la mesure où aucune étude n'était publiée sur la stabilité de ces principes actifs. L'équipe s'est intéressée aux processus de dégradation en solution de ces deux principes actifs et les résultats de ses recherches ont fait l'objet de deux publications dans un journal de chimie édité par la Royal Society of Chemistry, RSC Advances (Secrétan et al., 2015 ; Amrani et al., 2015).

La publication des travaux menés sur le dabigatran etexilate est rapportée en annexe du manuscrit. Ceux sur l'apixaban font l'objet de ce chapitre.

Au moment où les travaux sur l'apixaban ont été initiés, ses processus de dégradation en solution étaient non publiés et donc indisponibles. Il n'existait alors qu'une seule publication ayant pour objectif de développer une méthode indicatrice de stabilité et dans laquelle il a été démontré que l'apixaban était sensible en solution à des milieux très acides (Prabhune et al., 2014). Cependant, cette étude ne contenant aucune information sur la structure des produits de dégradation, les processus de dégradation de l'apixaban en solution aqueuse et leurs implications étaient non accessibles lorsque nos travaux ont été initiés.

La structure de l'apixaban (figure 17) présente deux fonctions lactame et une fonction amide portée par un cycle pyrazole (appelée par la suite carboxamide) susceptibles de s'hydrolyser (cf. chapitre 1). Afin d'évaluer si les deux cycles lactame sont hydrolysables en conditions acido-basiques, une étude de dégradation forcée a été menée afin d'en déduire l'impact des variations d'acido-basicité du milieu dans lequel le principe actif est solubilisé.

En plus des conditions hydrolytiques, il était également intéressant de s'interroger sur la résistance chimique de l'apixaban aux autres conditions de stress à savoir l'irradiation lumineuse et la présence d'un agent oxydant.

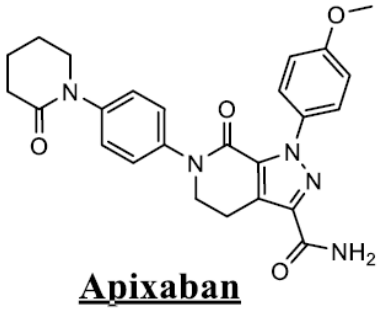


Figure 17 : structure de l'apixaban

La détermination des mécanismes de dégradation de l'apixaban et l'évaluation de la toxicité des produits en solution reposent sur les informations issues de :

- l'approche expérimentale portant sur la décroissance de la quantité de principe actif et la caractérisation des produits néoformés,
- l'approche *ab initio* qui permet de conforter les hypothèses issues de l'expérimentation,
- l'approche d'évaluation *in silico* de la toxicité potentielle de chaque produit de dégradation par rapport à l'apixaban.

Afin d'étudier le comportement de l'apixaban au regard des conditions de stress, le suivi de la teneur en principe actif ainsi que celui de l'apparition des produits de dégradation a été réalisé par CLHP-UV. Pour cela il était important de développer une méthode présentant une capacité indicatrice de stabilité, c'est-à-dire capable d'analyser sélectivement les produits en présence. Néanmoins, un tel développement devait prendre en compte les conditions de fonctionnement de la spectrométrie de masse ultérieurement utilisée. Autrement dit, la méthode séparative développée en CLHP-UV devait être transposable au couplage CLHP-spectrométrie de masse utilisé pour la caractérisation des produits néoformés.

Or la méthode actuellement recensée dans la littérature ne correspond pas à ces critères, dans la mesure où la phase mobile est constituée d'un tampon phosphate (Landge et al, 2015) incompatible avec un spectromètre de masse.

Ainsi, une nouvelle méthode CLHP-UV sans tampon phosphate a été développée puis transposée dans le cadre d'un couplage CLHP-spectromètre de masse à analyseur de type orbitrap pour permettre de réaliser l'analyse élémentaire (analyse en mode HRMS) et structurale (analyse en mode $HRMS^n$) et d'en déduire la structure des produits de dégradation.

À partir de la structure des produits de dégradation, une évaluation de leur toxicité a été effectuée par approche *in silico*. Les mécanismes de formation ont pu aussi être proposés et la régiospécificité des réactions en fonction du pH a été confortée par approche *ab initio*. La synthèse des études réalisées est proposée dans la figure 18.

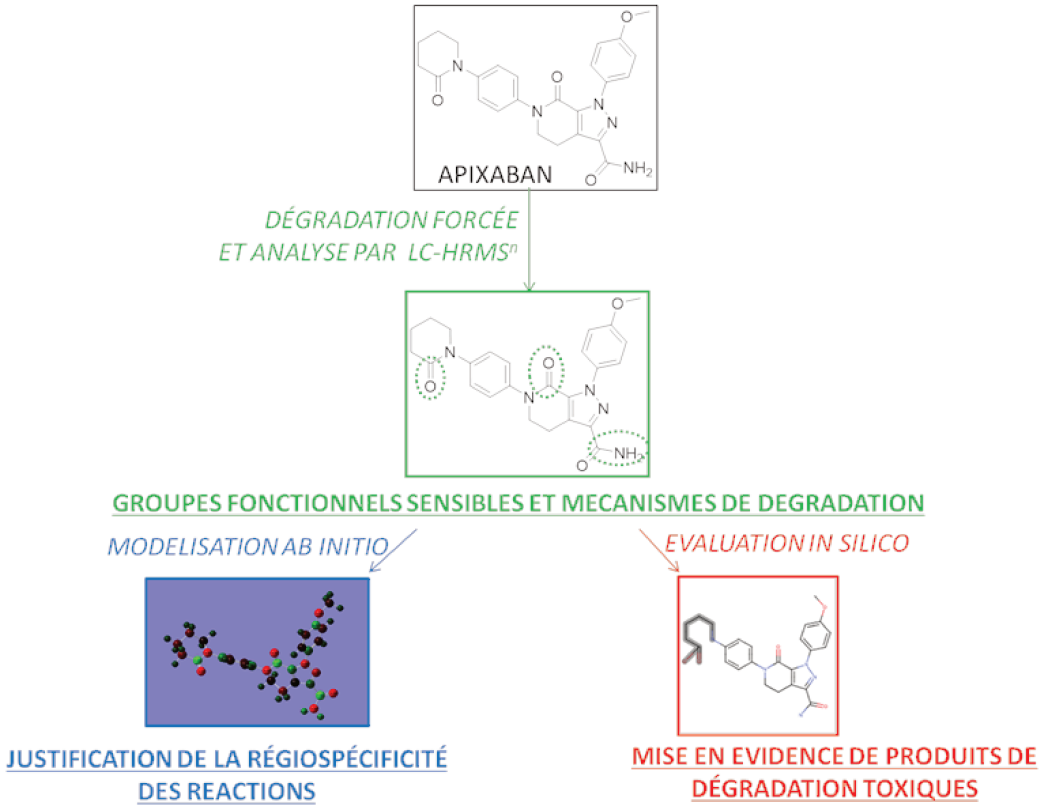


Figure 18 : éléments étudiés dans le chapitre 3.

2. Méthodes et protocole d'essai

Pour caractériser les processus de dégradation majoritaires de l'apixaban, une étude de dégradation forcée a été menée en exposant l'apixaban à des stress hydrolytique, oxydant, lumineux et thermique. Pour cela une solution d'apixaban (200 $mg.L^{-1}$ dans un mélange eau/méthanol 50/50) a été mélangée à parts égales avec des solutions acide (acide chlorhydrique 0,1 $mol.L^{-1}$, 40°C), basique (hydroxyde de sodium 0,1 $mol.L^{-1}$, 40°C), oxydante (eau oxygénée H_2O_2 3%, 40°C) et avec de l'eau dans le cas des expériences de thermolyse (menée à 80°C) et de photolyse (emploi d'une lampe répondant à la guideline ICH Q1B, 25°C, cf. chapitre 2).

À partir des différentes solutions dégradées, une méthode CLHP-UV a été optimisée de sorte à séparer les produits de dégradation. Compte tenu de la valeur de log P de l'apixaban (2,22, d'après DrugBank®) et de l'absence de formes dont les états de charge différent de pH 2 à 10 (pKa_1 (apixaban) = -1,6 ; pKa_2 (apixaban) = 13,1, d'après DrugBank®), une phase stationnaire greffée de chaînes alkyles (C18) et une phase mobile constituée d'eau et d'acétonitrile ont été choisies *a priori*. La longueur d'onde de détection retenue était 220 nm car cette longueur d'onde constitue souvent un bon compromis entre la détection des analytes et les interférences dues à l'absorption du solvant.

3. Résultats

3.1. Performances analytiques : évaluation de la capacité indicatrice de stabilité de la méthode séparative

Dans les conditions de gradient optimisées, les valeurs des facteurs de résolution chromatographique étaient acceptables (R_s supérieure à 1,5 en moyenne sur 6 déterminations) sauf pour DP-4 pour lequel R_s avec l'apixaban était en moyenne de 1,32 sur 6 injections. L'absence de co-élution de l'apixaban avec d'autres produits a été vérifiée par analyse en composante principale (CODA).

La linéarité de la méthode a été étudiée dans un domaine de concentrations de 25 à 150 $\mu g.mL^{-1}$. Le coefficient de corrélation avait pour valeur 0,9978 ; la valeur de l'ordonnée à l'origine ne différait pas significativement de zéro. En appliquant un modèle linéaire, les résidus étant normalement distribués, ce modèle était utilisable sur cet intervalle de concentrations.

Pour évaluer si les conditions instrumentales permettaient de détecter tout ou majeure partie des analytes, une balance de masse a été calculée entre les échantillons dégradés et ceux de l'apixaban non dégradé (valeur comprise entre 98,2% et 99,5%) et les limites de détection et de quantification ont été estimées (0,4 et 1,3 $\mu g.mL^{-1}$). Compte tenu de la concentration des solutions analysées (125 $\mu g.mL^{-1}$), les limites de détection et de quantification relatives sont de 0,3% et de 1%, ce qui est proche des seuils d'action ICH Q3A.

Au total, la méthode développée était donc satisfaisante au regard des objectifs de l'étude à savoir séparer les produits de dégradation et le principe actif, quantifier le principe actif et détecter les produits de dégradation.

3.2. Dégradation en fonction des conditions de stress

Après un délai d'exposition suffisant pour évaluer l'inertie ou la réactivité de l'apixaban à ces différents stress (3 fois le temps d'exposition recommandé d'après la norme ICH Q1B, 1 mois pour les expériences de thermolyse, 1 semaine pour les autres expériences), l'apixaban n'a été dégradé qu'en conditions hydrolytiques.

Les études des échantillons en CLHP-HRMS sans fragmentation ont permis de détecter sept produits de dégradation : deux issus de l'action de la base forte et six de l'acide fort (tableau 2) ; DP-2 se forme dans les deux cas. Deux produits de dégradation étant isobariques (DP-1 et DP-4), les spectres de masse spécifiques de chaque ion produit isobarique ont été obtenus par une séparation chromatographique en amont du détecteur.

Tableau 2 : conditions d'obtention, temps de rétention et composition élémentaire des produits de dégradation.

Products	rT (min)	Conditions	$[M + H]^+$	Elemental compositions	Theoretical masses	Accurate masses with error in ppm	Relevant MS/MS product ions assigned (*m/z*)
DP-1	8.7	Basic	478	$C_{25}H_{28}N_5O_5^+$	478.20849	478.20755 (−1.97)	461; 460; 417; 288; 271; 244; 227; 203; 199; 191
DP-2	9.7	Acidic/basic	461	$C_{25}H_{25}N_4O_5^+$	461.18195	461.18090 (−2.28)	443; 415; 387; 282; 254; 227; 199; 185; 172
DP-3	12.8	Acidic	379	$C_{20}H_{18}N_4O_4^+$	379.14008	379.13883 (−3.30)	361; 333; 303; 241; 200; 199; 185; 172
Apixaban	13.3	—	460	$C_{25}H_{26}N_5O_4^+$	460.19793	460.19674 (−2.59)	See Table 1
DP-4	13.6	Acidic	478	$C_{25}H_{28}N_5O_5^+$	478.20849	478.20702 (−3.07)	461; 460; 443; 432; 416; 404; 390; 378; 361; 333; 300; 282; 199; 185; 101
DP-5	14.6	Acidic	393	$C_{21}H_{21}N_4O_4^+$	393.15573	393.15436 (−3.48)	393; 379; 361; 333; 241; 200; 199; 185; 172; 156
DP-6	15.6	Acidic	475	$C_{26}H_{27}N_4O_5^+$	475.19760	475.19621 (−2.93)	475; 461; 443; 282; 254; 241; 227; 199; 185; 172; 156
DP-7	16.2	Acidic	492	$C_{26}H_{30}N_5O_5^+$	492.22415	492.22257 (−3.21)	475; 432; 416; 404; 390; 378; 377; 371; 333; 314; 282; 227; 199; 185; 115

Par l'interprétation des études en CLHP-HRMS, la formule brute de chaque DP a pu être déterminée et il a été établi que les composés sont formés à partir de l'apixaban par :

- gain d'eau pour DP-1 et DP-4 et de méthanol pour DP-7, s'expliquant par la présence de méthanol dans le milieu,

- perte d'ammoniac et gain d'eau pour DP-2,

- perte d'ammoniac et gain de méthanol pour DP-6,

- pertes significatives pour DP-3 et DP-5 : C_5H_8N et C_4H_5N respectivement.

Les structures de DP-2 (461) et DP-6 (475) ont été facilement élucidées, dans la mesure où ils conduisent à des ions produits que l'on observe en mode $HRMS^2$ et $HRMS^3$ pour l'apixaban. La formation de DP-2 peut facilement s'expliquer par l'hydrolyse de la fonction carboxamide de l'apixaban, celle-ci étant largement décrite dans ces deux milieux. DP-6 est issu de l'estérification par le méthanol (contenu dans le solvant) de la fonction acide provenant de l'hydrolyse de la fonction carboxamide de l'apixaban.

En ce qui concerne DP-1, DP-4 et DP-7, il a été envisagé que leur formation est la conséquence de l'hydrolyse de la fonction amide d'un des cycles lactame qui engendre la formation d'un acide carboxylique (suivie d'une estérification pour DP-7), ce mécanisme d'hydrolyse étant connu (cf. chapitre 1). Comme cela sera décrit par la suite, les expériences de $HRMS^2$ et $HRMS^3$ ont permis de distinguer quel cycle est préférentiellement hydrolysé en fonction des conditions acides ou basiques. Notamment, la présence d'un ion produit (carbocation dérivant de l'acide pentanoïque) caractéristique de l'ouverture du cycle lactame non fusionné, a permis d'établir que ce cycle était préférentiellement hydrolysé en milieu acide (formation de DP-4 et DP-7), l'autre cycle lactame étant plus facilement hydrolysé en milieu alcalin (DP-1).

Les spectres $HRMS^2$ de DP-3 et DP-5 sont très similaires. Comme cela sera décrit en détail, l'ensemble des résultats a permis d'établir que ces deux composés sont issus de l'ouverture du cycle lactame non fusionné suivie d'une N-déalkylation.

3.3. Élucidation structurale des produits de dégradation

3.3.1. Processus de fragmentation de l'apixaban

Les processus de fragmentation de l'apixaban (1H-Pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide,4,5,6,7-tétrahydro-1-(4-méthoxyphényl)-7-oxo-6-[4-(2-oxo-1-pipéridinyl)phényl]) ont été étudiés en $HRMS^n$ en utilisant une source ESI en mode positif, ce mode d'ionisation ayant permis d'obtenir le plus de fragments caractéristiques.

Dans ces conditions, l'ion protoné de l'apixaban ($C_{25}H_{26}N_5O_4^+$, masse théorique 460,1979) a été exposé à un premier processus de fragmentation et a donné naissance à deux ions produits de masses 461,1805 et 443,1701 (figure 19).

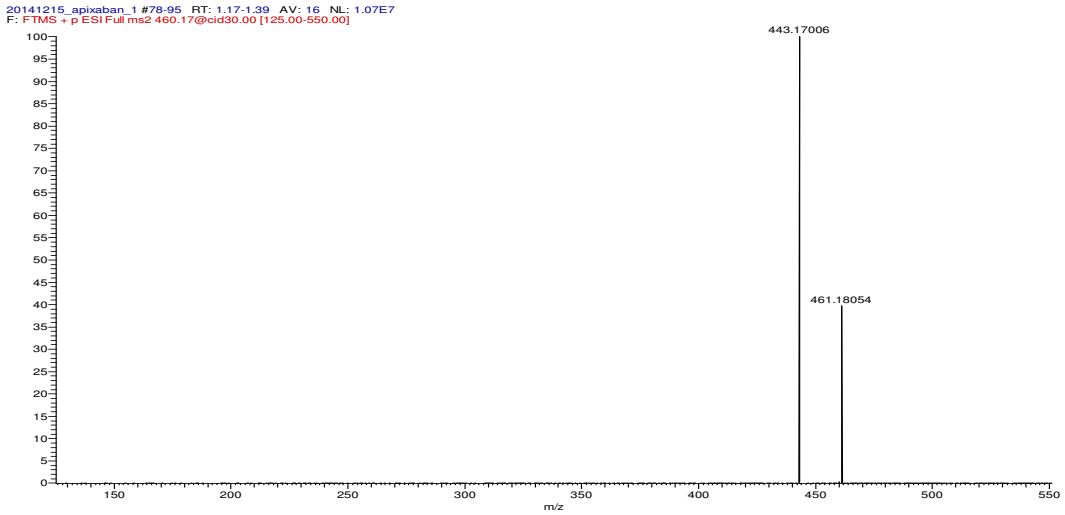


Figure 19 : spectre HRMS² de l'apixaban.

Un calculateur a été employé pour déterminer les formules élémentaires les plus probables des ions produits : $C_{25}H_{25}N_4O_5^+$ (461) et $C_{25}H_{23}N_4O_4^+$ (443). Ces ions correspondent respectivement à une hydrolyse de la fonction carboxamide en phase gazeuse (voie rouge) et à une perte d'ammoniac (voie bleue) comme cela est représenté sur la figure 20.

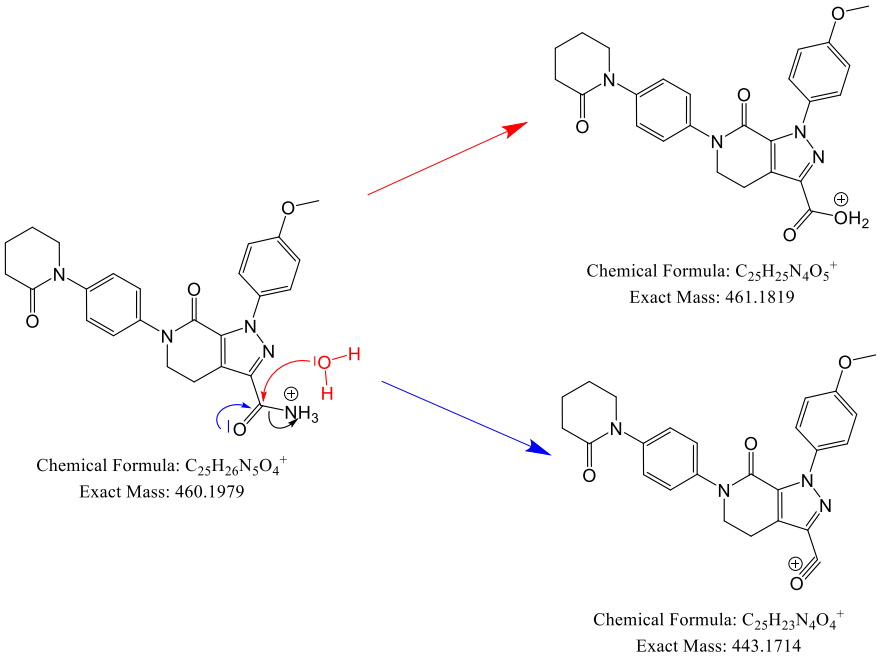


Figure 20 : voies de fragmentation de l'apixaban en HRMS².

Afin d'obtenir plus d'informations sur les processus de fragmentation, l'ion produit 443 a été étudié plus en détail en mode HRMS^3 et le spectre de masse obtenu est présenté dans la figure 21.

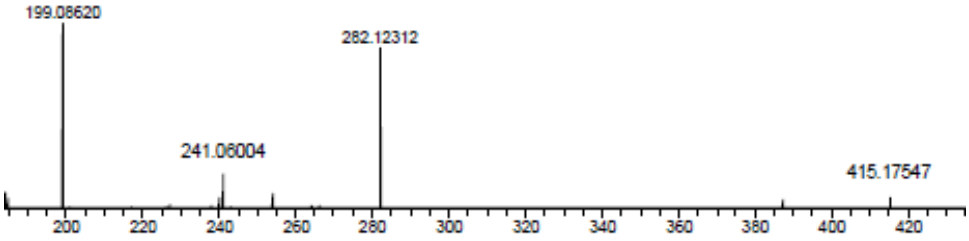


Figure 21 : spectre HRMS^3 de l'apixaban (460->443->).

Les formules élémentaires attribuées aux ions produits de la figure 21 sont par ordre décroissant de masse : $C_{24}H_{23}N_4O_3^+$ (415,1754), $C_{16}H_{16}N_3O_2^+$ (282,1231), $C_{13}H_9N_2O_3^+$ (241,06004) et $C_{12}H_{11}N_2O^+$(199,0602). Étant donné la lacune électronique laissée sur le groupe carbonyle lors du départ d'ammoniac, ces ions sont issus de réarrangements électroniques internes qui facilitent le départ de certaines parties de l'apixaban. Les processus de formation de ces ions produits sont discutés dans les prochaines lignes.

L'ion produit de m/z 415 correspond à une perte de monoxyde de carbone par rapport à son précurseur. Étant donné la lacune électronique laissée sur le groupe carbonyle lors du départ d'ammoniac, l'ion produit de m/z 415 est issu d'un départ de monoxyde de carbone de la fonction reliée au cycle pyrazole (figure 22).

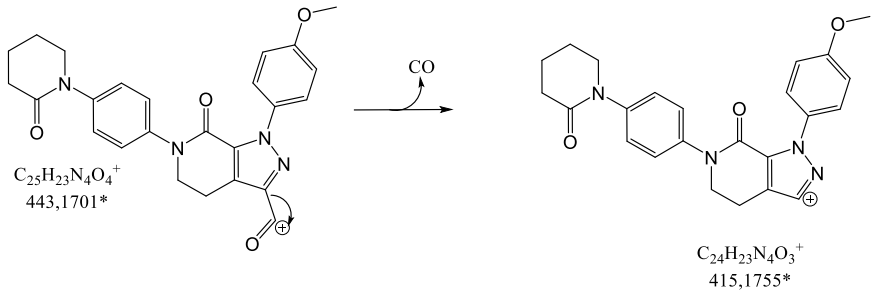


Figure 22 : voie de fragmentation en HRMS^3 (460->443->415).

L'ion produit $C_{16}H_{16}N_3O_2^+$ (282,1231), coïncide avec une perte neutre de $C_9H_7NO_2$. Cet ion produit (m/z 282) n'est pas obtenu en mode MS^4 à partir de l'ion produit 415 (apixaban->443->415->) mais uniquement en mode MS^3 à partir de l'ion 443 (apixaban->443->). D'autre part lorsque l'ion m/z 282 est exposé à des processus MS^4 (apixaban->443->282->), la perte de monoxyde de carbone n'est pas retrouvée. La formation de l'ion produit m/z 282 est donc accompagnée d'une perte d'une partie importante du principe actif qui comporte aussi le groupe carbonyle initialement relié au cycle pyrazole. Compte tenu de ces informations et de la structure de l'ion précurseur, il a pu être proposé que la perte de neutre observée $C_9H_7NO_2$ correspond au [(4-méthoxyphényl)imino]éthènone. Cette perte de neutre peut s'expliquer par deux processus successifs. La première étape consiste en la migration du groupe méthoxyphényle d'un atome d'azote du cycle pyrazole sur l'autre atome d'azote de ce cycle. Dans un deuxième temps, un transfert d'hydrogène interne induit une migration d'électrons responsable de la cassure de la liaison entre les 2 atomes d'azote du cycle pyrazole. De là, la perte de 2-(4-méthoxyphénylimino)éthènone peut facilement avoir lieu et donner naissance à l'ion produit 282 (figure 23).

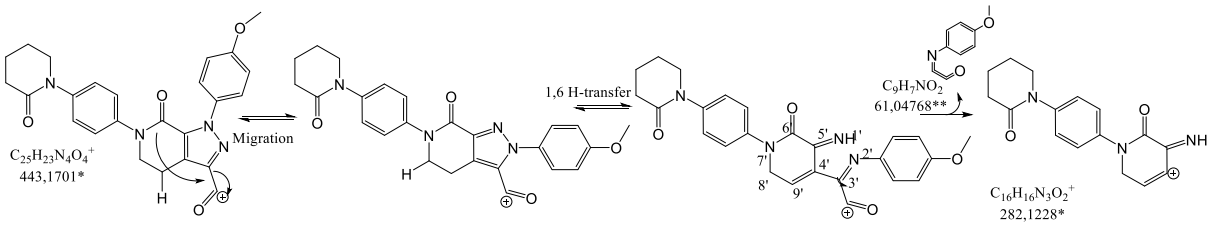


Figure 23 : voie de fragmentation en HRMS^3 (460->443->282).

À partir de m/z 443 on observe aussi un ion produit très intense de m/z 199, correspondant à la formule brute $C_{12}H_{11}N_2O^+$ et à une perte globale de neutre $C_{13}H_{12}N_2O_3$. La perte de neutre conduisant à cet ion produit étant importante en termes de masse, il a été envisagé qu'il est la résultante de réarrangements successifs d'ions moins stables donc plus faiblement détectés. Des ions précurseurs de l'ion produit de m/z 199 ont donc été recherchés dans le spectre MS^3. Il a ainsi été détecté un ion produit beaucoup moins intense de m/z 227 ($C_{13}H_{11}N_2O_2^+$) qui, lorsqu'il est soumis à un processus de fragmentation supplémentaire (HRMS^4), conduit à la formation de l'ion produit de m/z 199 *via* une perte de monoxyde de carbone. Cette perte de neutre permet d'établir que l'ion produit de m/z 199 correspond à une partie de l'apixaban comportant le cycle pyrazole, le monoxyde de carbone provient du groupe carbonyle qui était lié à ce cycle dans l'ion m/z 227 (figure 24). Pour cette raison, il a été proposé que l'ion produit de m/z 199 est issu d'une perte séquentielle de 1-(4-isocyanatophényl)pipéridin-2-one (correspondant aux cycles phényle et lactame non lié au cycle pyrazole) menant à l'obtention de l'ion produit intermédiaire de m/z 227 suivie d'une perte de monoxyde de carbone menant à la formation de l'ion produit m/z 199. Le mécanisme permettant d'expliquer le départ de 1- (4-isocyanatophényl)pipéridin-2-one est un transfert 1-4 d'hydrogène qui induit une migration d'une insaturation du cycle pyrazole et un appauvrissement en électrons de la région située entre l'azote du cycle pyrazole et le groupe carbonyle du cycle lactame (figure 24).

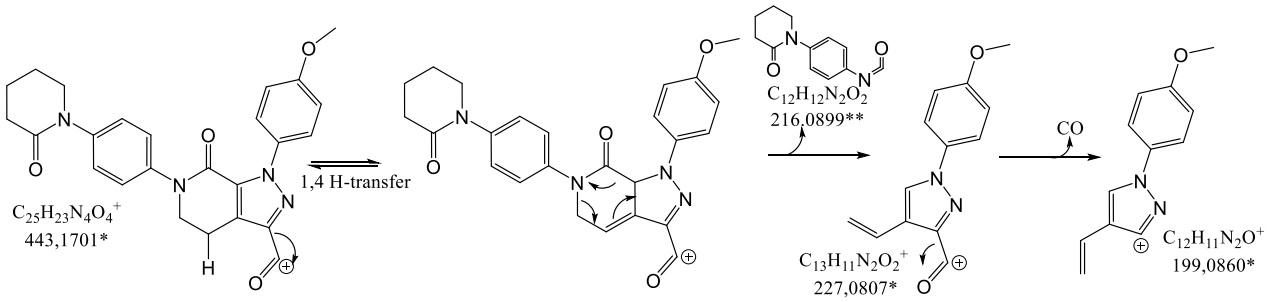


Figure 24 : voie de fragmentation en HRMS^3 (460->443->227).

La dernière voie de fragmentation observée en mode HRMS^3 de l'ion produit m/z 443 est celle relative à la formation de l'ion produit 241, correspondant à une perte de neutre de formule brute $C_{12}H_{14}N_2O$. Lorsqu'il est soumis au mode HRMS^4, cet ion produit peut perdre deux molécules de monoxyde de carbone ce qui permet d'envisager que l'ion produit 241 comporte deux groupes carbonyle. Puisque l'apixaban peut perdre facilement du monoxyde de carbone à partir du groupe carbonyle rattaché au cycle pyrazole, il est probable que ce cycle soit toujours présent dans l'ion produit 241 (figure 25). Compte tenu de la structure de l'apixaban, l'autre groupe carbonyle est vraisemblablement celui du cycle lactame fusionné avec le cycle pyrazole. Étant donné la structure de l'apixaban, il a été émis l'hypothèse que l'ion produit 241 a conservé la partie pyrazole et méthoxyphényle, et que le site de modification/cassure se situe entre le carbone et l'azote de la fonction lactame. Cette perte neutre correspond donc vraisemblablement à la perte de [4-(méthylidèneamino)phényl]pipéridin-2-one issue d'un réarrangement interne correspondant à un transfert d'hydrogène (figure 25).

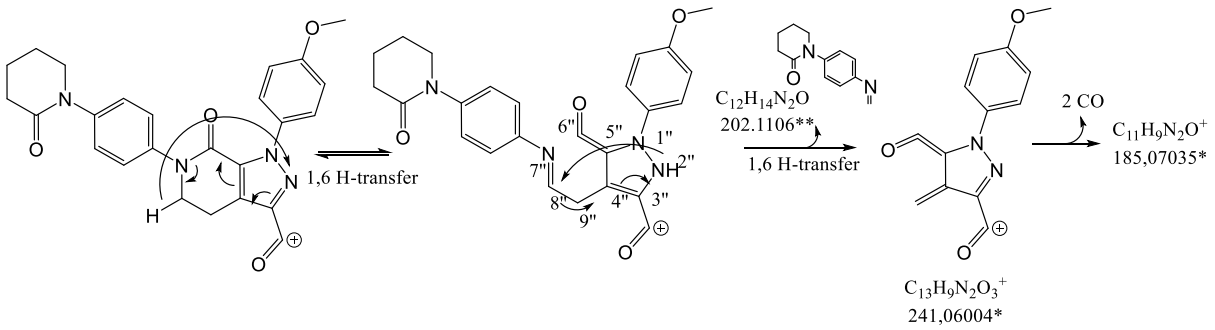


Figure 25 : voie de fragmentation en HRMS^3 (460->443->241).

La compréhension de l'ensemble des voies de fragmentation de l'apixaban a permis d'établir son schéma de fragmentation qui est produit dans la publication (figure 26).

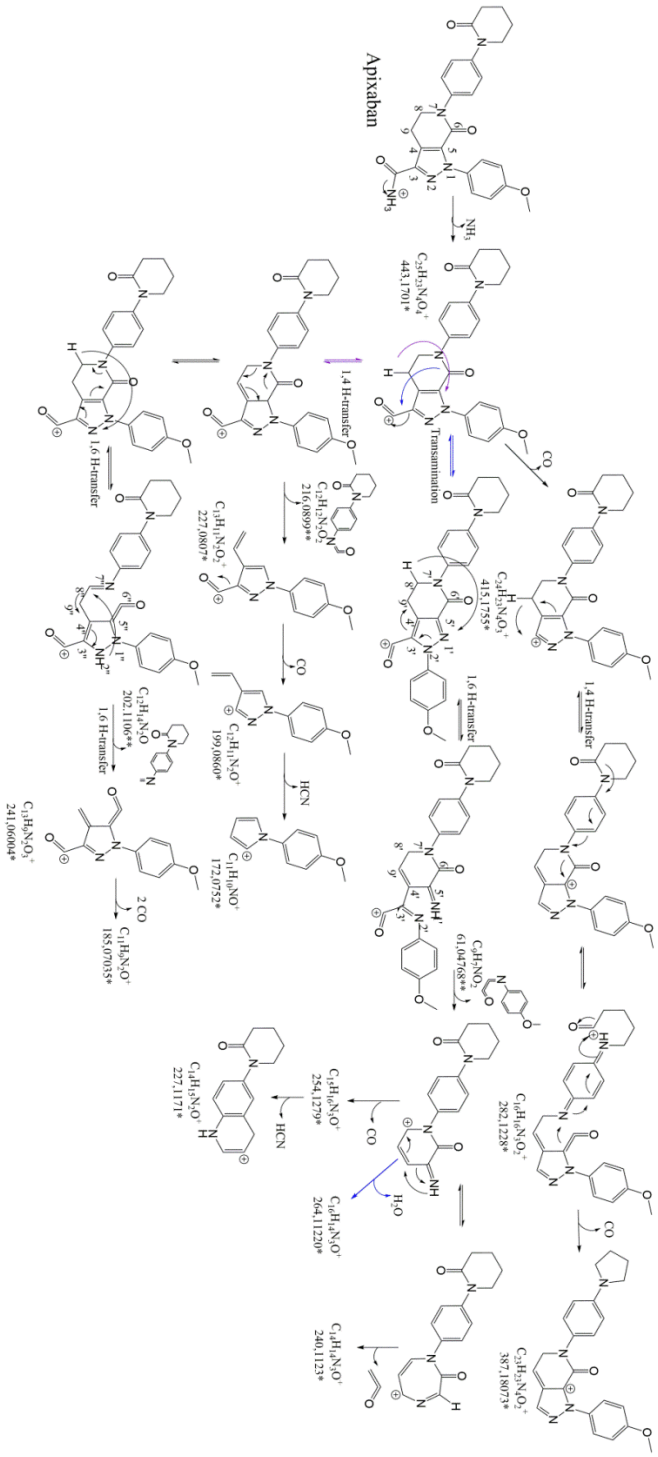


Figure 26 : schéma de fragmentation de l'apixaban.

3.3.2. Structure des produits de dégradation de l'apixaban

Produits de dégradation issus de l'hydrolyse du groupe carboxamide : DP-2 et DP-6

Les produits de dégradation DP-2 et DP-6 correspondent respectivement aux formules élémentaires $C_{25}H_{25}N_4O_5^+$ et $C_{26}H_{27}N_4O_5^+$. Les spectres LC-HRMS² de DP-2 (m/z=461) et DP-6 (m/z=475) sont quasiment identiques à celui de l'apixaban. L'ion produit de m/z 443, caractéristique de la désamination du groupe carboxamide observée pour l'apixaban est aussi retrouvé pour DP-2 et DP-6. Son existence est attribuée à une perte d'eau pour DP-2 (figure 27) et une perte de méthanol pour DP-6 (figure 28). Lorsqu'il est soumis à des processus supplémentaires de fragmentation, l'ion produit de m/z 443 donne naissance aux mêmes ions produits qu'il soit issu de DP-6, de DP-2 ou de l'apixaban.

Par conséquent, la structure de DP-2 correspond à l'acide 1-(4-méthoxyphényl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopipéridine-1-yl)phényl)-4,5,6,7-tétrahydro-1H-pyrazolo[3,4,c]pyridine-3-carboxylique et celle de DP-6 au 6 méthyl-1-(4-méthoxyphényl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopipéridine-1-yl)phényl)-4,5,6,7-tétrahydro-1H-pyrazolo[3,4,c]pyridine-3-carboxylate.

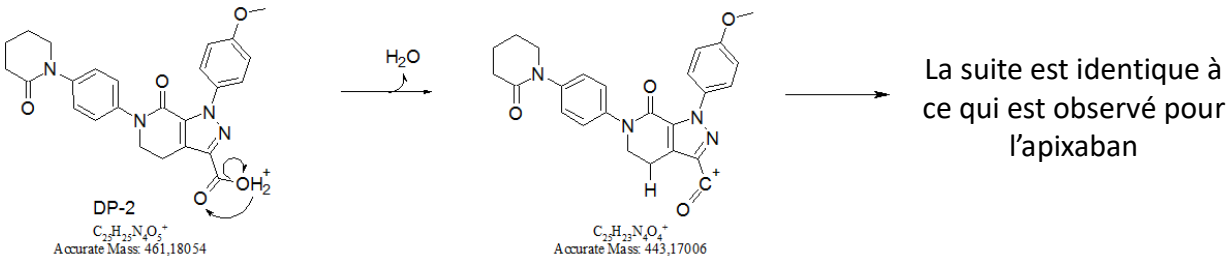


Figure 27 : fragmentation de DP-2.

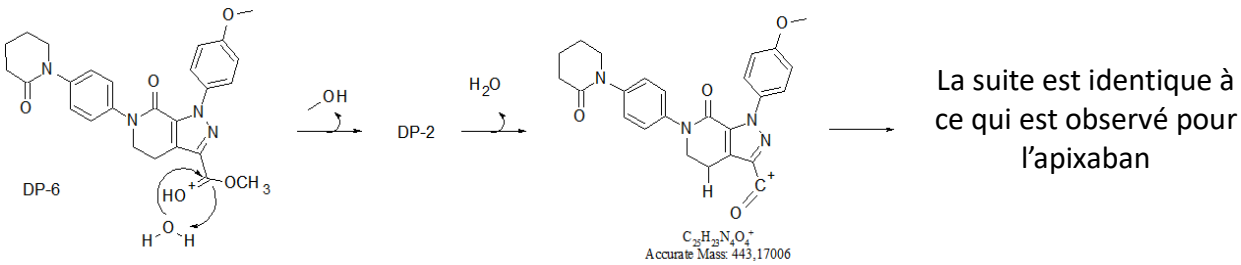


Figure 28 : fragmentation de DP-6.

Produit de dégradation issu de l'hydrolyse du cycle lactame fusionné au cycle pyrazole : DP-1

Le produit de dégradation DP-1 (m/z 478) a une masse mesurée correspondant à une composition élémentaire $C_{25}H_{28}N_5O_5^+$. Le gain de 2 atomes d'hydrogène et d'un atome d'oxygène par rapport à l'apixaban suggère un mécanisme d'hydrolyse qui sera par la suite confirmé. Le spectre $HRMS^2$ de DP-1 contient un ion produit de m/z 460 ainsi que d'autres ions déjà rencontrés dans le spectre de masse de l'apixaban : 227, 199, 185 et 172. En dehors de ces ions, le spectre de masse de DP-1 contient aussi les ions m/z 461, 417, 288, 271, 217, 203 et 191.

L'ion produit m/z 460 suggère que l'ion moléculaire ($[M+H]^+$) de DP-1 m/z 478 peut perdre facilement de l'eau. La transition caractéristique : 461->417 (417 apparaissant en MS^3 : 478->461->), correspond à une élimination de dioxyde de carbone inexistante pour l'apixaban. Ceci indique qu'une fonction acide carboxylique a été formée dans DP-1. Compte tenu de la structure de l'apixaban, la formation de la fonction acide carboxylique dans DP-1 provient d'une modification au niveau d'un carbonyle situé soit dans le groupe carboxamide soit dans l'un des cycles lactame de l'apixaban.

La présence de l'ion produit de m/z 461, s'expliquant par une perte de NH_3, reflète la persistance de la fonction carboxamide dans DP-1, ce qui montre que DP-1 est bien formé par hydrolyse d'une fonction amide d'un des cycles lactame.

La présence de l'ion produit de m/z 288 ($C_{14}H_{14}N_30_4^+$) peut s'expliquer par un processus de N-déalkylation au niveau du groupement oxopipéridine-aniline. Ceci

indique que l'hydrolyse de la fonction amide s'est effectuée au niveau du cycle lactame fusionné (figure 29).

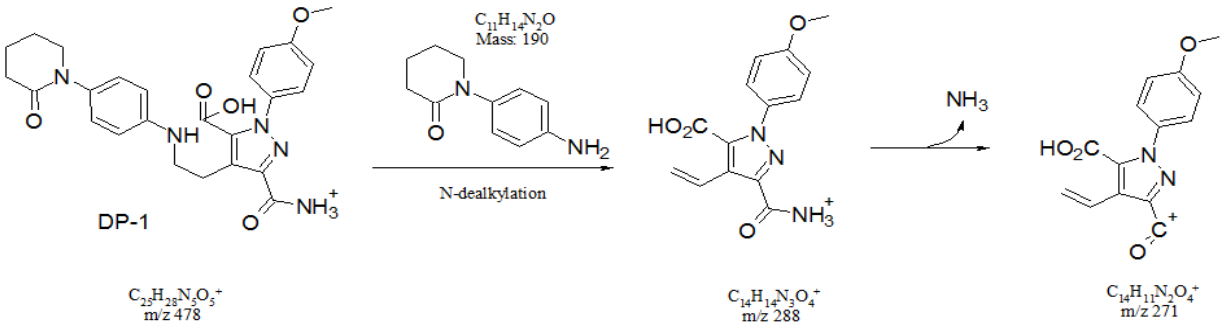


Figure 29 : voie de fragmentation de DP-1(1).

Les autres ions produits (m/z 203 et 191) confirment cette hypothèse. Ils s'expliquent par la protonation d'un autre groupe que précédemment, c'est-à-dire au niveau de l'azote du groupement aniline (figure 30).

Ainsi, l'ion produit de m/z 191 est obtenu par le biais d'une N-déalkylation, alors que l'ion de m/z 203, provient d'un réarrangement de type Mac-Lafferty (figure 30). Ceux-ci confirment que l'hydrolyse de la fonction amide a bien lieu au niveau du cycle lactame fusionné.

DP-1 a donc pu être identifié comme étant l'acide 3-carbamoyl-1-(4-méthoxyphényl)-4-(2-(4-(2-oxopipéridin-1-yl)phénylamino)éthyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxylique (figure 30).

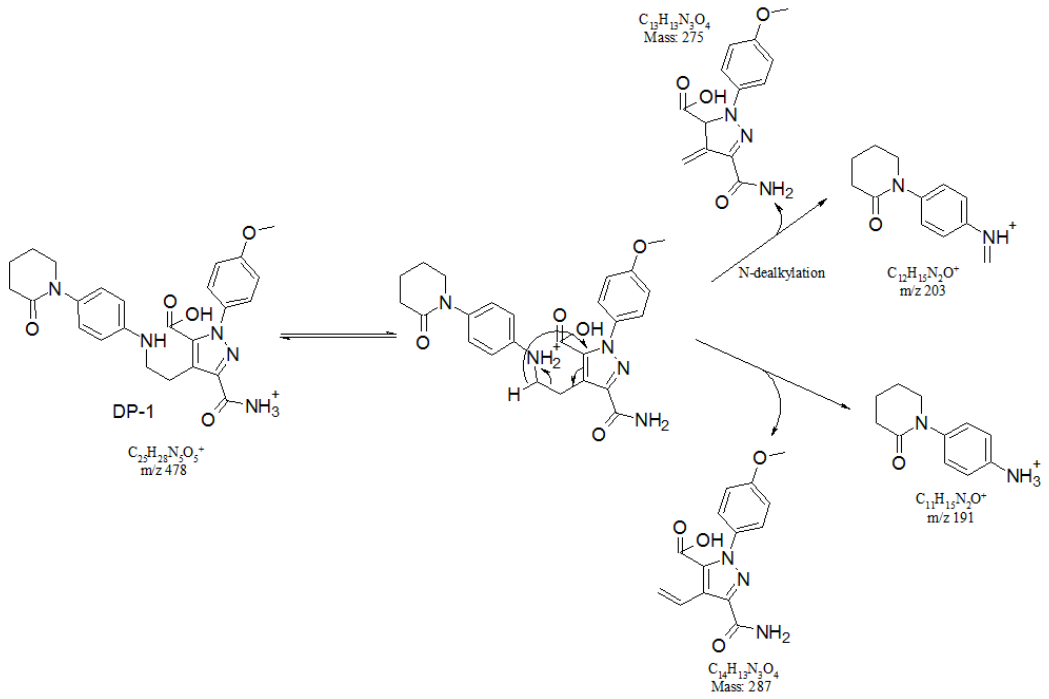


Figure 30 : voie de fragmentation de DP-1 (2).

Produits de dégradation issus de l'hydrolyse du cycle lactame non fusionné au cycle pyrazole : DP-4 et DP-7.

Comme DP-1, DP-4 présente un ion protoné de m/z 478, en faveur de l'hydrolyse d'une des fonctions lactame. Son spectre de fragmentation HR-MS² inclut des ions en commun avec l'apixaban ainsi que des ions produits de m/z 461, 432, 416, 404, 390, 378, 361, 333 et 101. La présence de ces derniers confirme l'ouverture du cycle lactame non fusionné par hydrolyse de la fonction amide. De nouveau, l'ion produit de m/z 461 s'expliquant par une perte de NH_3, reflète la persistance de la fonction carboxamide dans DP-4.

L'ion produit intense de m/z 378 est formé par N-déalkylation consécutivement à la protonation de l'azote du cycle lactame non fusionné. Ce dérivé acidium peut ensuite perdre successivement de l'ammoniac et du monoxyde de carbone pour générer respectivement les ions m/z 361 et 333 (figure 31).

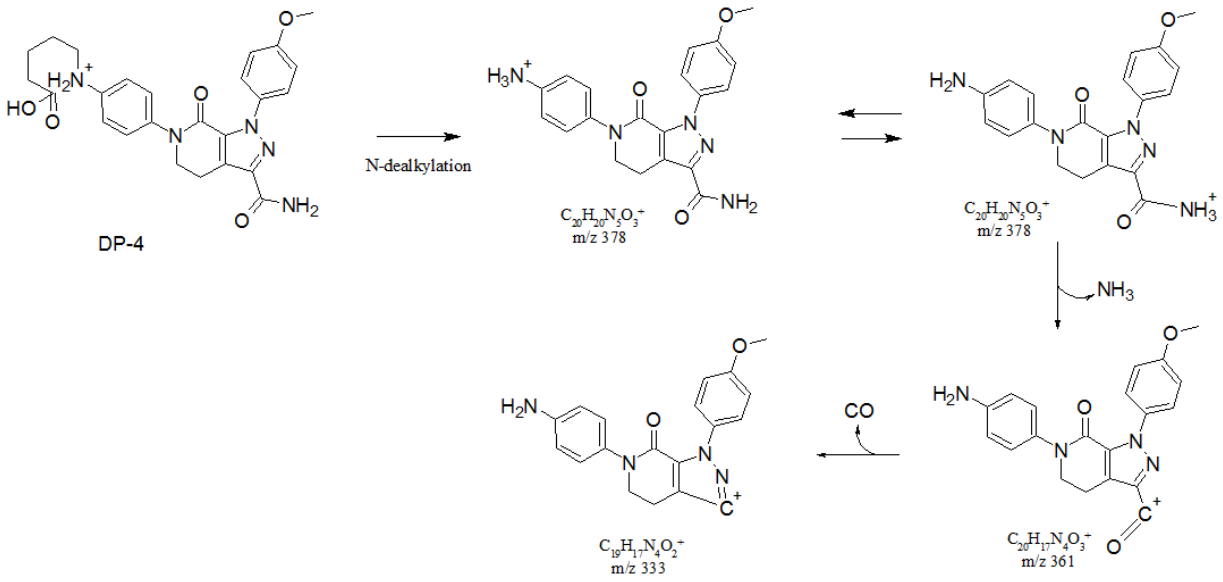


Figure 31 : voie de fragmentation de DP-4 (1).

L'existence de certains ions fragments s'explique par des ruptures séquentielles de liaisons carbone-carbone sur la chaîne latérale formée par hydrolyse du cycle 2-oxo-1-pipéridinyl (cycle lactame non fusionné). Ce mécanisme se rapporte aux ions de m/z 432 et 404 ainsi que 416, et 390 dont la formation correspond à deux voies distinctes. Après une perte d'eau par DP-4, l'ion produit résultant (m/z 460) peut conduire (LC-HRMS^3) à la formation des ions produits de m/z 432 et 416 par perte de monoxyde de carbone et d'éthanal respectivement (figure 32). Les expériences LC-HRMS^4 menées sur ces deux ions produits conduisent à la formation de deux autres ions produits en fonction de l'ion précurseur choisi. Ainsi, les expériences LC-HRMS^4 : DP-4->460->432-> et DP4->460->416-> ont mené respectivement à la formation des ions produits de m/z 404 et m/z 390 par perte d'éthylène et d'acétylène (figure 32).

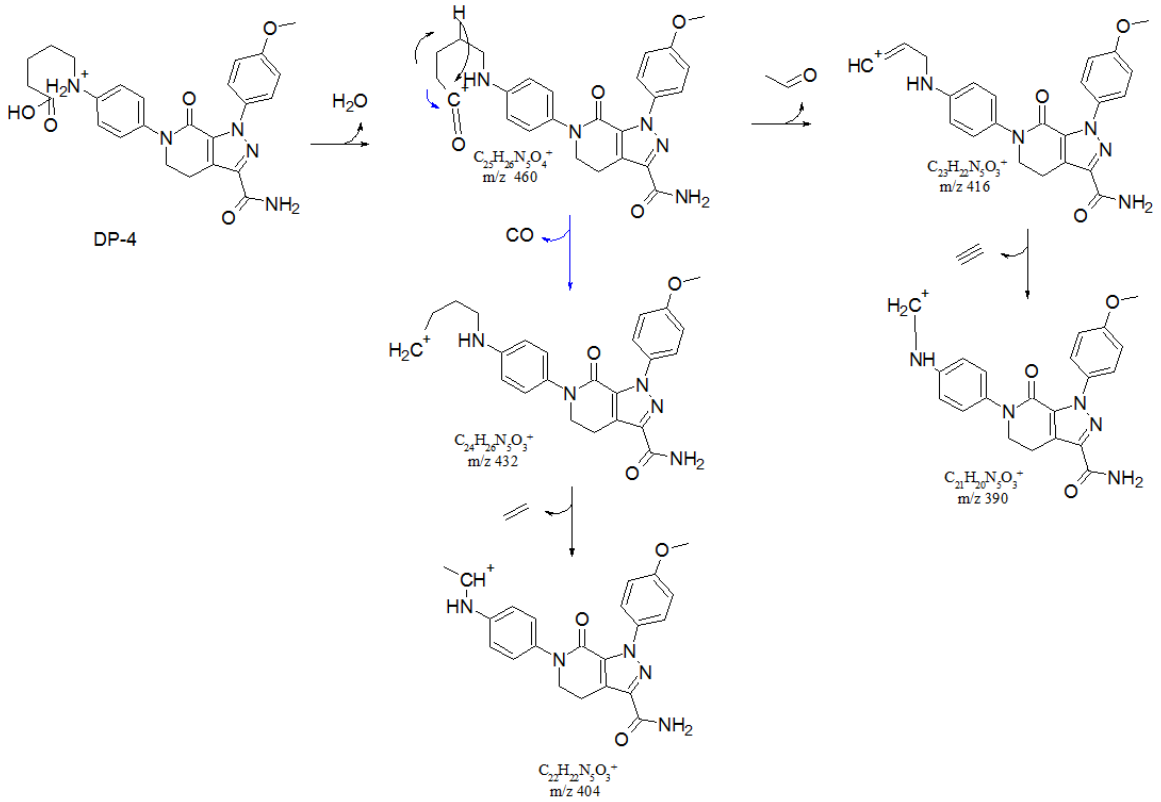


Figure 32 : voie de fragmentation de DP-4(2).

La présence de l'ion produit intense de m/z 101 est due à une rupture de la liaison N-C, à l'origine du départ du carbocation dérivé de l'acide n-pentanoïque. Ce type de départ ne peut survenir que si l'hydrolyse a lieu au niveau du cycle 2-oxo-1-pipéridinyl (figure 33).

Par conséquent, DP-4 correspond à l'acide 5-(4-(3-carbamoyl-1-(4-méthoxyphényl)-7-oxo-4,5-hydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridin-6(7H)-yl)phénylamino)pentanoïque.

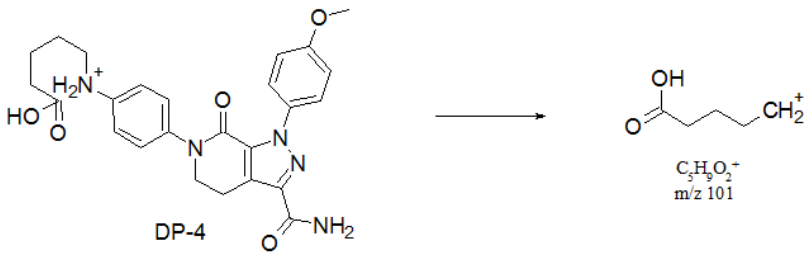


Figure 33 : voie de fragmentation de DP-4(3).

L'ion protoné de DP-7 a une masse exacte qui correspond à la formule élémentaire $C_{26}H_{30}N_5O_5^+$. Il présente de nombreux ions en commun avec DP-4. Toutefois, l'ion

m/z 101 caractéristique de l'acide pentanoïque est absent de son spectre de masse. En contrepartie, un autre ion à m/z 115 identifié comme l'ester méthylique de l'acide pentanoïque est détecté (figure 34).

Étant donné le parallèle observé en termes de perte de neutre pour les spectres de masse de DP-4 et de DP-7, DP-7 peut être identifié comme étant le méthyl 5-(4-(3-carbamoyl-1-(4-méthoxyphényl)-7-oxo-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-c]pyridin-6(7H)-yl)phénylamino)pentanoate.

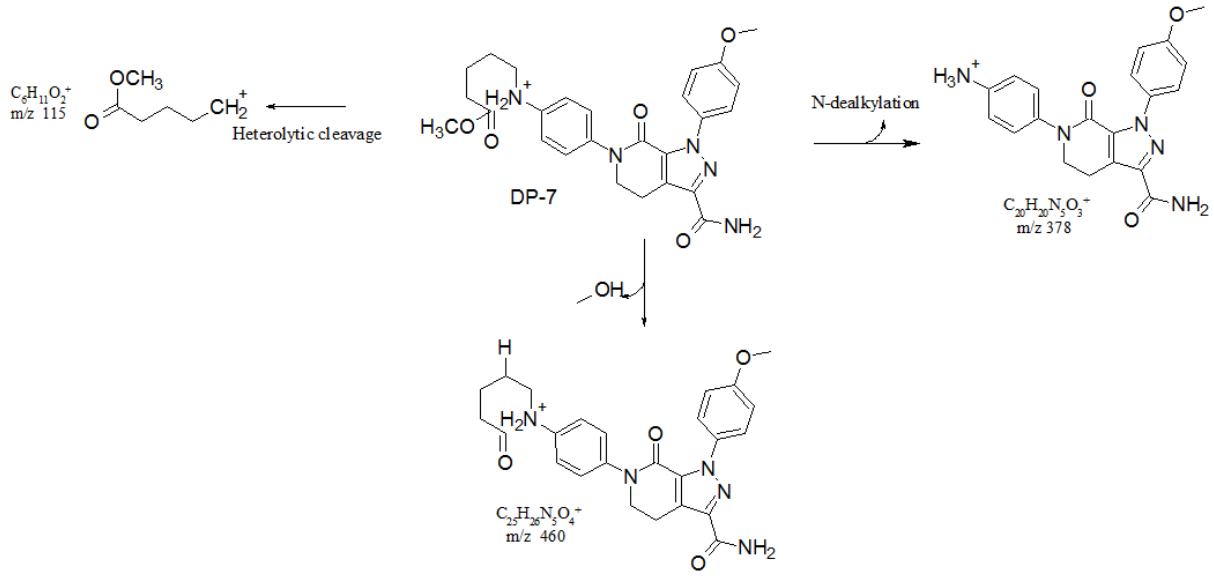


Figure 34 : voies de fragmentation de DP-7.

Produits de dégradation issus de l'hydrolyse du cycle lactame non fusionné au cycle pyrazole suivie d'une N-déalkylation : DP-3 et DP-5

En comparant les formules élémentaires de DP-3 ($C_{20}H_{18}N_4O_4^+$) et de DP-5 ($C_{21}H_{21}N_4O_4^+$) à celle de l'apixaban ($C_{25}H_{26}N_5O_4^+$), on peut supposer qu'ils correspondent à des dérivés ayant perdu le cycle lactame non fusionné suite à l'hydrolyse de la fonction lactame suivie d'une N-déalkylation.

Ces deux produits de dégradation incluent dans leurs spectres $HRMS^2$ des ions produits caractéristiques de m/z 361 ($C_{20}H_{17}N_4O_3^+$) et 333 ($C_{19}H_{17}N_4O_2^+$) (figure 35) de mêmes formules brutes que ceux retrouvés pour DP-4, ce qui indique que DP-3 et DP-5 ont ces parties communes avec DP-4.

De plus, à la place du groupement carboxamide de l'apixaban, DP-3 semble présenter une fonction acide carboxylique et DP-5 une fonction ester carboxyméthyle.

En effet, la présence de l'ion produit commun de m/z 361 indique qu'une perte d'eau peut se produire pour DP-3 (m/z 379) et une perte de méthanol pour DP-5 (m/z 393) comme cela est indiqué dans la figure 35.

La perte du groupement 2-(4-méthoxyphénylimino)éthènone (361->200) est obtenue comme dans le cas de la fragmentation de l'apixaban (figure 23), ce qui confirme le fait que les produits de dégradation ont conservé l'ensemble tétrahydropyridine-pyrazolo-méthoxyphényle.

Les ions produits observés pour DP-3 et DP-5 de m/z 241 et 199, quant à eux, sont issus de l'ion produit de m/z 361 selon les mêmes mécanismes de fragmentation que ceux décrits pour l'apixaban (figure 25 et 24).

Par conséquent, la structure de DP-3 correspond à l'acide 6-(4-aminophényl)-1-(4-méthoxyphényl)-7-oxo-4,5,6,7-tétrahydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxylique et celle de DP-5 au méthyl-6-(4-aminophényl)-1-(4-méthoxyphényl)-7-oxo-4,5,6,7-tétrahydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxylate.

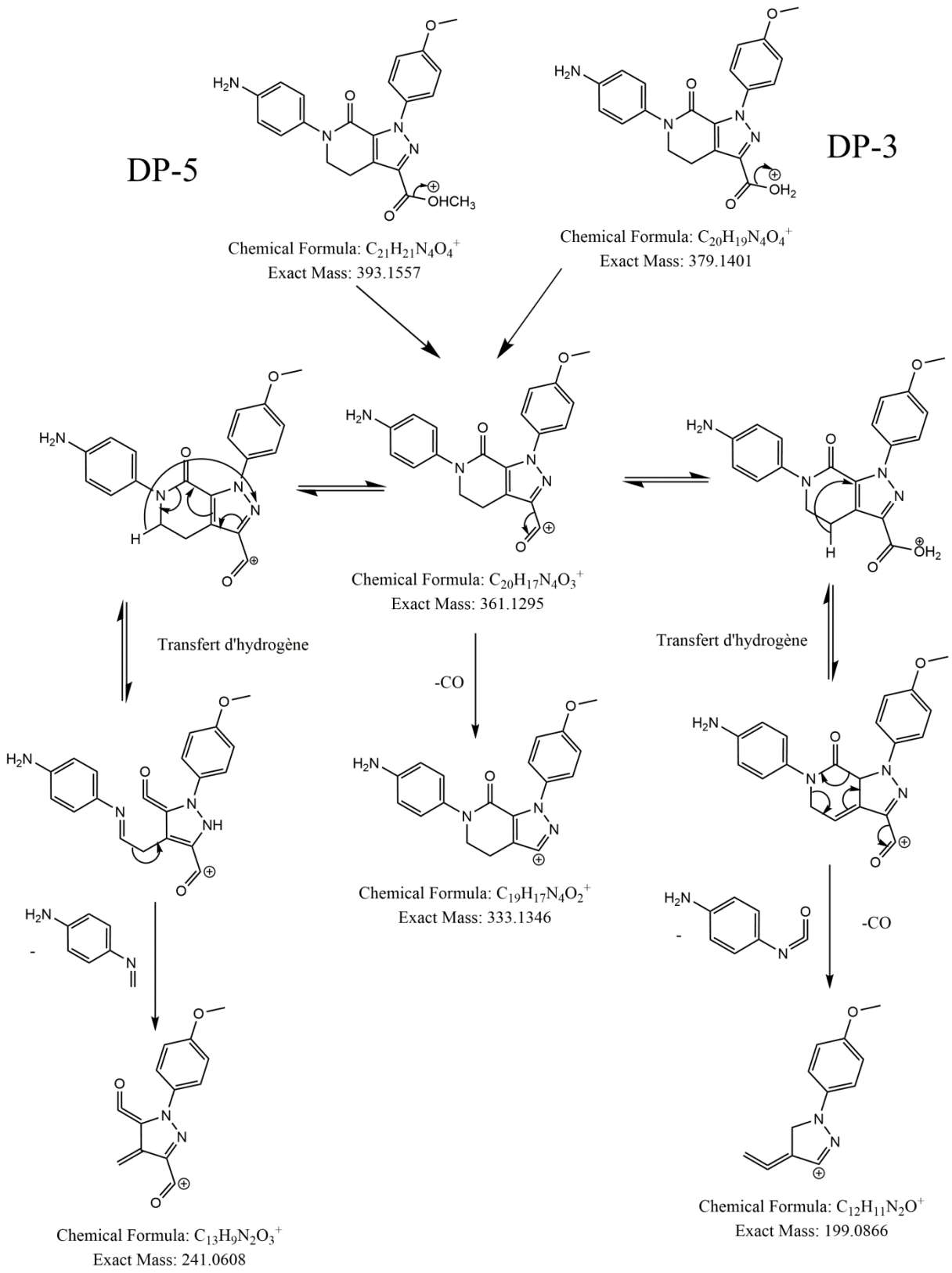


Figure 35 : schéma de fragmentation de DP-3 et DP-5.

3.4. Voies majoritaires de dégradation de l'apixaban

À partir de l'ensemble des données expérimentales, les voies de dégradation de l'apixaban ont pu être établies.

Deux produits de dégradation sont formés en milieu basique : DP-1 et DP-2. Étant donné leur structure, ils correspondent respectivement à une hydrolyse du cycle lactame fusionné et de la fonction carboxamide par attaque nucléophile de l'ion hydroxyde. Le mécanisme de dégradation proposé est représenté en figure 36.

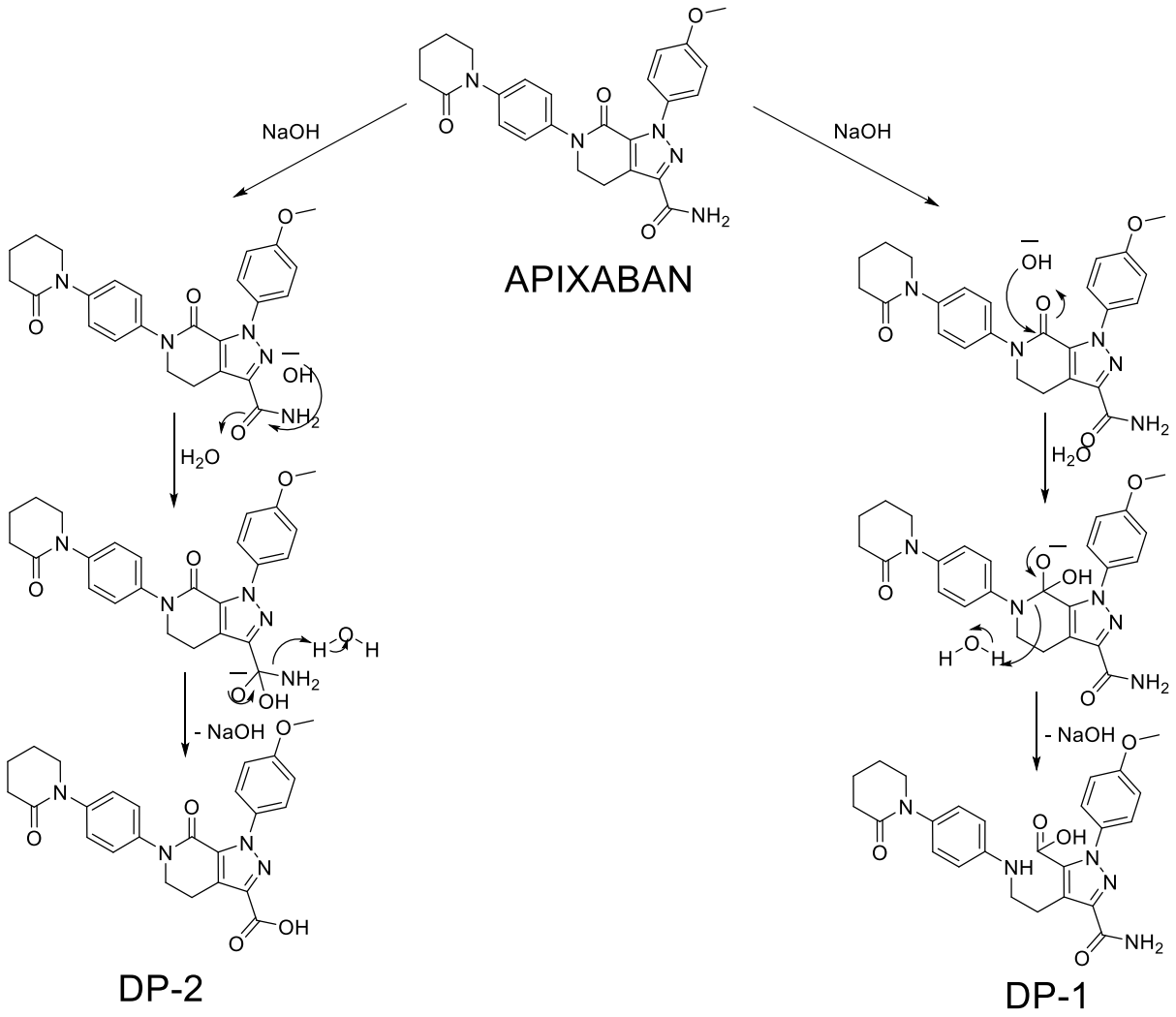


Figure 36 : mécanismes de dégradation de l'apixaban en milieu basique.

En milieu acide, six produits de dégradation sont formés dont DP-2 déjà observé en milieu basique. DP-4, et DP-7 sont issus de l'ouverture du cycle lactame non fusionné. Dans un second temps une N-déalkylation de DP-4 induit la formation de DP-3 et de DP-5. DP-6 résulte de l'hydrolyse de la fonction carboxamide conduisant à la formation d'une fonction acide, suivie de l'estérification de celle-ci par le méthanol présent dans la solution mère d'apixaban (figure 37).

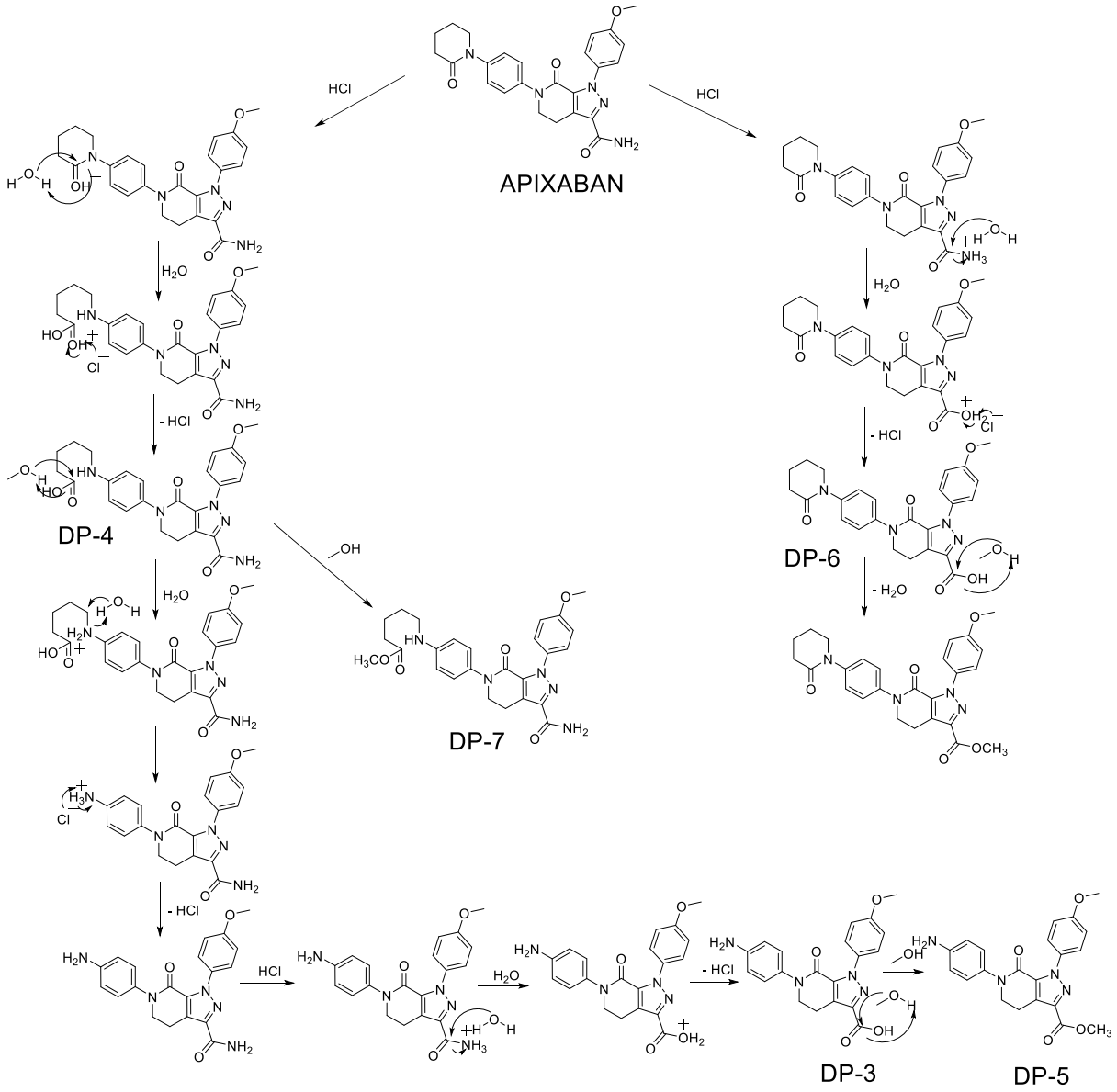


Figure 37 : mécanismes de dégradation de l'apixaban en milieu acide.

Au cours de nos études, l'apixaban est apparu comme étant très peu sensible à l'action d'oxydants et à l'irradiation lumineuse contrairement aux conditions de stress hydrolytiques. Ces résultats expérimentaux ont été observés auparavant (Landge et al., 2015).

D'un point de vue théorique, l'absence de réactivité de l'apixaban en présence de lumière solaire simulée (norme ICH Q1B) peut s'expliquer par sa faible absorption dans le domaine de l'UV-A et du visible et de son très faible rendement quantique (Yassine et al., 2018).

La réactivité des fonctions lactame à l'hydrolyse acide ou basique retrouvée au cours des expériences est aussi largement rapportée pour de nombreux médicaments. L'hydrolyse de ces fonctions engendre une ouverture des cycles par attaque du groupe carbonyle et la formation d'une fonction acide carboxylique avec comme conséquence une diminution de l'activité thérapeutique. De plus, la présence d'une fonction acide carboxylique formée à l'issue de l'hydrolyse peut être précurseur d'autres produits dus à l'estérification d'impuretés alcooliques. C'est notamment le cas de DP-5, DP-6 et DP-7.

Un aspect mis en évidence par les résultats expérimentaux est la différence de sensibilité des deux cycles lactame en fonction du pH du milieu. Ainsi, le cycle **a** est plus à même de s'ouvrir en condition acide, tandis que le cycle **b** a davantage tendance à s'ouvrir en milieu basique (figure 38).

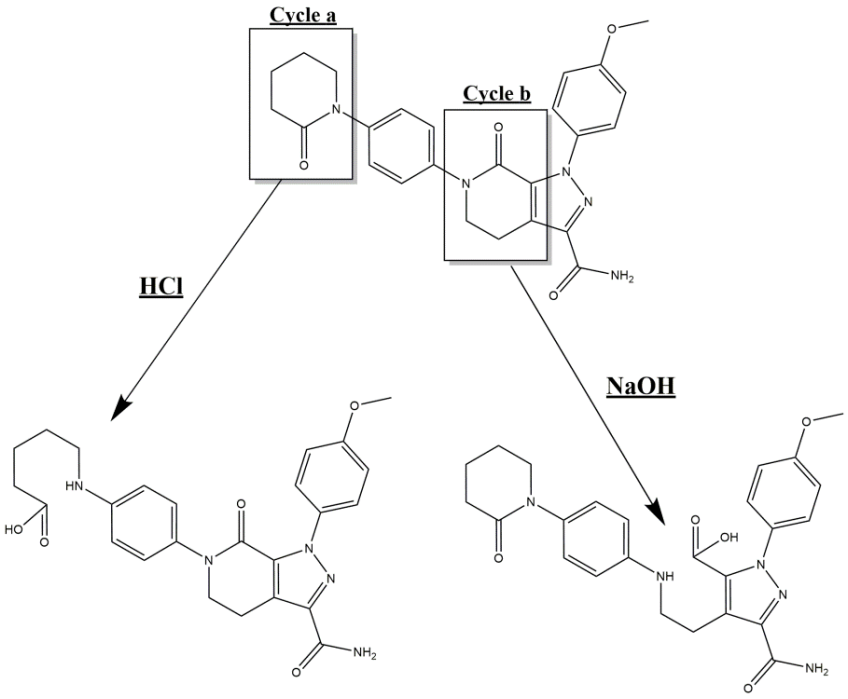


Figure 38 : différence de réactivité de l'apixaban en fonction des conditions hydrolytiques.

Cette différence de réactivité a été étudiée par approche *ab initio*, en examinant la répartition des charges de Mulliken de l'apixaban qui a été optimisé selon le modèle DFT B3LYP 6,31 G (d,p) (figure 39).

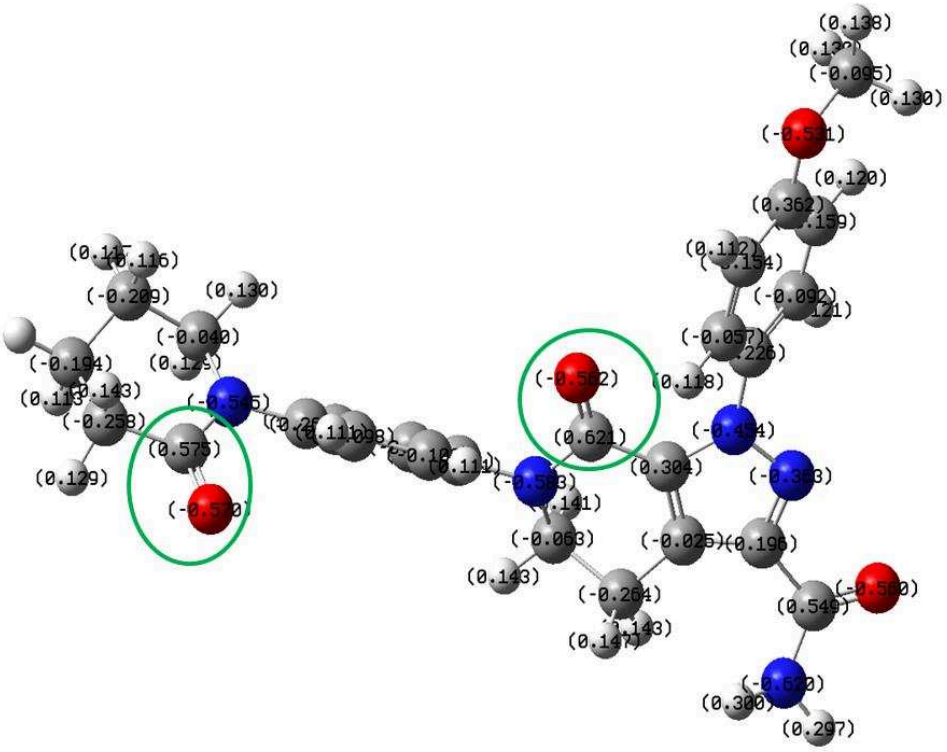


Figure 39 : charges de Mulliken de chacun des atomes de l'apixaban.

Comme le montre la figure 39, l'atome portant la charge de Mulliken la plus élevée serait l'atome de carbone du carbonyle du cycle **b** (+0,621) tandis que celui du cycle **a** aurait une charge inférieure (+0,575). Par conséquent, le carbone du carbonyle du cycle **b** apparaît plus électrophile ce qui le rend plus sensible aux attaques par l'ion hydroxyde conformément aux résultats expérimentaux.

Sur la même base, l'atome d'oxygène du cycle **a** (-0,570) semble un peu plus nucléophile que celui du cycle **b** (-0,562). L'oxygène du cycle **a** capturerait donc plus facilement un proton, ce qui induit une ouverture préférentielle de ce cycle en milieu acide.

La cohérence entre les données expérimentales et théoriques conforte la régiospécificité de l'ouverture des cycles lactame en fonction du pH, si l'on considère que la distribution et les valeurs des charges de Mulliken sont indépendantes du pH.

3.5. Toxicité potentielle des produits de dégradation de l'apixaban

La connaissance de la structure des produits de dégradation peut permettre d'effectuer une première évaluation de l'impact de leur formation. L'apixaban étant un principe actif à marge thérapeutique étroite (une anticoagulation trop élevée pouvant engendrer des accidents hémorragiques), en plus du pouvoir toxique potentiel des produits de dégradation, l'augmentation de l'activité pharmacologique et le devenir des produits de dégradation (autrement dit la pharmacocinétique des produits de dégradation) sont à étudier en profondeur.

Deux logiciels ont été employés pour évaluer le potentiel toxique de l'apixaban et des produits de dégradation détectés lors de la dégradation forcée de l'apixaban : le logiciel Derek Nexus (système expert d'évaluation toxicologique *in silico* de Lhasa Limited, Leeds, Angleterre ; tableau 3) et le logiciel Toxtree dont l'ensemble des critères d'évaluation proposés a été exploité (tableau 4).

L'évaluation de caractéristiques pharmacocinétiques de l'apixaban et des produits de dégradation a été réalisée en utilisant le logiciel I-Labs 2.0 (ACD/Labs, Toronto, Canada ; tableau 5). En plus des données de biodisponibilité *per os* et de distribution, les données de risque de diffusion et d'activité dans le système nerveux central sont produites car un des effets indésirables majeurs des anticoagulants est le risque de saignement intracrânien qu'il convient d'évaluer.

Enfin, la recherche d'activité pharmacologique des produits de dégradation a été conduite selon une approche *in silico* en utilisant le logiciel I-Lab 2.0 (tableau 6). Puisque l'apixaban présente une activité anticoagulante, les données recherchées ont été la probabilité d'effet pharmacologique des DPs sur le sang et sur le système cardiovasculaire par rapport à celle du principe actif.

Tableau 3 : résultats obtenus avec le logiciel Derek Nexus. Ouvert* : inexistence de données.

Derek Nexus				
Dénomination	Carcinogenicité (C)/ Genotoxicité (G)	Toxicité organique	Irritation, sensibilisation respiratoire	Mutagenicité bactérienne (Ames test)
Apixaban	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte
DP-1	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte
DP-2	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte
DP-3	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Pas d'alerte	Sensibilisation cutanée plausible	Pas d'alerte
DP-4	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Hepatotoxicité plausible	Pas d'alerte	Pas d'alerte
DP-5	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Pas d'alerte	Sensibilisation cutanée plausible	Pas d'alerte
DP-6	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte
DP-7	C: ouvert* ; G : pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte	Pas d'alerte

Tableau 4 : résultats obtenus avec le logiciel Toxtree

Toxtree			
Dénomination	Carcinogenicité / Mutagenicité	Irritation ou corrosion cutanée	Mutagenicité selon le test d'Ames
Apixaban	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale
DP1	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale
DP2	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale
DP3	Alerte structurale : carcinogenicité par genotoxicité	Pas d'alerte structurale	Alerte structurale
DP4	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale
DP5	Alerte structurale : carcinogenicité par genotoxicité	Pas d'alerte structurale	Alerte structurale
DP6	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale
DP7	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale	Pas d'alerte structurale

Tableau 5 : données pharmacocinétiques obtenues avec le logiciel ACD/I-Labs.

Dénomination	Biodisponibilité	Volume de distribution (l/kg)	Diffusion dans le système nerveux central suffisante pour exercer une activité pharmacologique eventuelle?
Apixaban	30 à 70%	1.29	Non
DP-1	Inférieure à 30%	0.35	Non
DP-2	30 à 70%	0.30	Non
DP-3	30 à 70%	0.28	Non
DP-4	Inférieure à 30%	0.26	Non
DP-5	30 à 70%	1.15	Non
DP-6	30 à 70%	**1.85**	**Oui**
DP-7	Inférieure à 30%	1.31	Non

Tableau 6 : données pharmacologiques obtenues avec le logiciel ACD/I-Labs.

Dénomination	Probabilité d'effet sur le sang	Probabilité d'effet sur le système cardiovasculaire
Apixaban	0.78	0.86
DP-1	0.12	0.83
DP-2	0.62	0.84
DP-3	0.20	0.15
DP-4	0.18	0.82
DP-5	0.23	0.70
DP-6	**0.84**	**0.89**
DP-7	0.40	0.87

Contrairement à ses produits de dégradation, les données *in silico* obtenues pour l'apixaban peuvent être confrontées aux résultats publics des études cliniques et précliniques, résumées dans son évaluation européenne publiée dans le cadre de la

demande d'AMM (European Public Assessment Report EPAR ; Committee for Medicinal Products for Human Use, Assessment Report For Eliquis, (2011)).

D'après l'EPAR, aucun risque toxicologique n'a été décelé au cours des études précliniques conventionnelles (pharmacologie de sécurité, doses répétées, génotoxicité, carcinogénicité, reprotoxicité, embryotoxicité). Au cours des études cliniques, 11% des patients ont présenté un effet indésirable. Les effets indésirables étaient largement dominés par des saignements (hémorragie, contusion, épistaxis, hématurie). Concernant les paramètres pharmacocinétiques, une biodisponibilité de 50%, un volume de distribution moyen de 21 litres et un efflux du médicament hors du cerveau favorisé par le fait qu'il soit un substrat de la P-glycoproteine (P-gp) et de la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) ont été observés. Les résultats obtenus en employant les logiciels d'étude *in silico* (tableaux 3 à 6) sont donc proches de ceux obtenus *in vitro* et *in vivo*. Comme ces données possèdent une certaine valeur prédictive pour l'apixaban, il est possible qu'il en soit de même pour les composés de structures apparentées.

Comparativement à la substance active, les résultats obtenus au cours des études *in silico* des produits de dégradation DP-1, DP-2 et DP-7 ne laissent pas présumer qu'ils présentent un risque de toxicité supérieur (tableaux 3 et 4).

Pour DP-3 et DP-5, des alertes structurales de génotoxicité ont été révélées par le logiciel Toxtree (tableau 4). Ces alertes ont été soulevées suite à la présence d'une amine primaire aromatique (figure 40). Il est à remarquer que le logiciel Derek Nexus n'a pas soulevé de problématique à ce niveau. Cela tient sans doute au fait que la carcinotoxicité de l'aniline et des dérivés de type amine primaire aromatique font toujours l'objet de controverses, comme en témoigne le rapport toxicologique de l'EPA à ce sujet (US EPA, CAS 62-53).

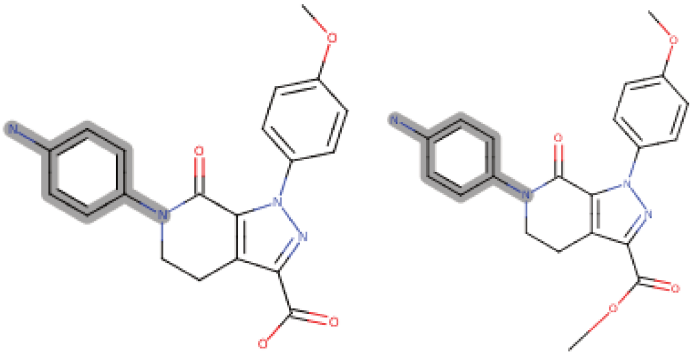


Figure 40 : alertes structurales (en gris) pour DP-3 (à gauche) et DP-5 (à droite).

Pour DP-4 une alerte structurale de toxicité hépatique a été mise en évidence avec un niveau de probabilité évalué comme plausible par Derek Nexus (tableau 3). Celle-ci est due à la présence d'un groupement acide carboxylique à chaîne courte (figure 41). Le modèle utilisé pour justifier l'éventuelle toxicité est celui du valproate de sodium, connu pour sa toxicité hépatique. Néanmoins, puisqu'il s'agit d'une toxicité dose dépendante et que la posologie usuelle de l'acide valproïque est de l'ordre du gramme par jour c'est-à-dire 100 fois supérieure à celle de l'apixaban, il semble peu probable que DP-4, présent en quantité encore inférieure à l'apixaban, puisse générer des effets indésirables cliniquement significatifs sur le foie. Le risque est d'autant plus faible que contrairement à l'acide valproïque qui présente une biodisponibilité orale de 100%, d'après les résultats du logiciel l/c-labs, DP-4 présenterait une biodisponibilité inférieure à 30%.

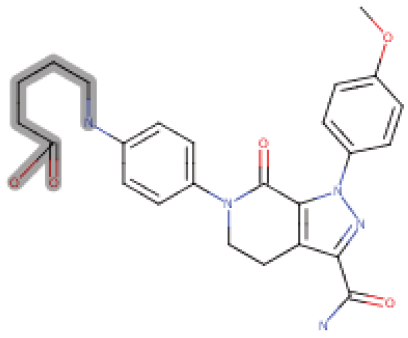


Figure 41 : alerte structurale(en gris) pour DP-4

Par contre, le produit de dégradation DP-6, qui correspond à l'hydrolyse de la fonction carboxamide de l'apixaban puis à l'estérification de la fonction acide formée

conduisant à un ester méthylique, présente, d'après les études *in silico* un profil pharmacocinétique et pharmacologique à risque (tableaux 5 et 6).

En effet, contrairement aux autres produits de dégradation et à l'apixaban, d'après les résultats obtenus avec le logiciel I/c-labs, DP-6 est susceptible de traverser la barrière hémato-encéphalique (tableau 5), probablement en raison de son caractère plus lipophile (log P (DP-6) = 2,89 ; log P (apixaban) = 2,55) d'après les données calculées avec le logiciel Marvinsketch®). De plus il présente une probabilité d'effet sur le système cardiovasculaire et le sang supérieure à l'apixaban (tableau 6).

Si cela s'avère vérifié *in vivo* et que DP-6 présente une activité anticoagulante, les conséquences de sa formation pourraient être très dommageables. Par analogie structurale et mécanistique, si l'on remplaçait le méthanol utilisé dans l'étude par de l'éthanol, la formation d'ester éthylique pourrait s'avérer dangereuse comme l'est celle de l'ester méthylique (risque similaire de passage au travers de la barrière hémato-encéphalique). Dès lors une formulation contenant de l'éthanol comme solubilisant semble être à éviter car elle pourrait aussi induire la formation d'un ester éthylique à la place de l'ester méthylique de DP-6 (figure 42) et ainsi engendrer une majoration du risque d'hémorragie cérébrale.

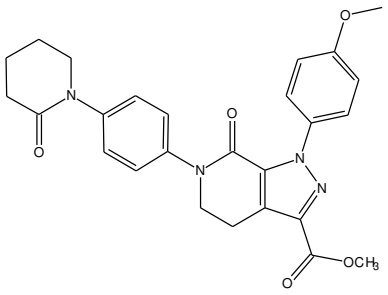


Figure 42 : structure de DP-6.

Au total, mis à part la prudence qu'il faut avoir en raison de la présence du produit de dégradation DP-6, il apparaît donc qu'au niveau toxicologique, la problématique inhérente à la dégradation de l'apixaban semble peu inquiétante au regard des résultats des études *in silico*.

Néanmoins, à l'heure actuelle, ces études *in silico* ne peuvent se substituer à des études *in vitro*/*in vivo*. En effet, l'état des connaissances et donc des bases de

données sur lesquelles reposent les modèles des logiciels est encore très restreint et le risque de faux positifs ou de faux négatifs est encore très élevé.

4. Conclusion

Il a été mis en évidence que l'apixaban est sensible aux stress hydrolytiques tandis qu'il résiste aux stress oxydant et photolytique. Face à ces résultats, la diminution du risque de dégradation nécessiterait des études plus détaillées pour définir la zone de pH permettant une conservation optimale du principe actif.

La caractérisation des structures des produits de dégradation a permis de proposer un mécanisme de dégradation. Les deux cycles lactame de l'apixaban réagissent différemment en fonction du pH. Cette régiospécificité de réactivité est en accord avec les répartitions de charge de Mulliken différentes, comme cela a été montré par l'approche *ab initio*.

Grâce à l'élucidation structurale et à l'étude *in silico*, des données complémentaires permettant d'appréhender partiellement le risque émanant d'une exposition aux produits de dégradation de l'apixaban ont aussi été apportées. Ces données devraient être confortées par des essais *in vitro* notamment pour documenter le risque d'hémorragie intracrânienne soulevé.

Complétés d'autres données de stabilité et de toxicité sur des lots pilotes, ces éléments fondamentaux devraient permettre la mise en place de solutions orales d'efficacité et de sécurité maîtrisées.

Article 1 : a comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry

Philippe-Henri Secrétan, Hassane Sadou-Yayé, Caroline Aymes-Chodur, Mélisande Bernard, Audrey Solgadi, Fatma Amrani, Najet Yagoubi and Bernard Do. RSC Advances, avril 2015. DOI:10.1039/C5RA00171D

RSC Advances

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

CrossMark click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, **5**, 35586

A comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry

Philippe-Henri Secrétan,†[a] Hassane Sadou-Yayé,†[ab] Caroline Aymes-Chodur,[a] Mélisande Bernard,[ac] Audrey Solgadi,[d] Fatma Amrani,[c] Najet Yagoubi[a] and Bernard Do*[ace]

Apixaban is a novel anticoagulant drug acting as a direct, selective and reversible inhibitor of the coagulation factor Xa. Forced degradation under stress conditions were carried out in order to establish its stability profile. The drug was shown to be stable under photolytic, thermolytic and oxidative conditions, while under hydrolytic conditions, up to seven degradation products were generated for about 15% of drug degradation. The degradation products have been detected by linear gradient reversed phase high-performance liquid chromatography coupled with a photo diode array and with electrospray ionization tandem mass spectrometry. A combination of multistage mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry (HR-MS) allowed the structural elucidation. The product ions of the degradation products were compared to those of the apixaban protonated ion so as to assign the most structures possible. This required a study in depth of the drug's fragmentation pattern, which has not been reported so far. In view of the products formed, it appears that hydrolysis of the oxopiperidine moiety of apixaban occurred in acidic medium, whereas that of the tetrahydro-oxo-pyridine moiety would further happen under alkaline conditions. Asides from characterization, the LC method was shown to indicate stability and validated as per the criteria described by the ICH guidelines.

Received 5th January 2015
Accepted 7th April 2015

DOI: 10.1039/c5ra00171d

www.rsc.org/advances

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

Introduction

Apixaban (1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-[4-(2-oxopiperidin-1-yl)-phenyl]-4,5-dihydropyrazolo[5,4-*c*]pyridine-3-carboxamide) is a novel anticoagulant drug acting as a direct, selective and reversible inhibitor of the coagulation factor Xa.[1–4] It is prescribed as treatment of venous thromboembolism, which includes deep vein thrombosis and pulmonary embolism. A large scale randomized double blind study comparing the conventional therapy (subcutaneous enoxaparin, followed by warfarin) to apixaban, showed the non-inferiority of apixaban with significantly less bleeding.[5,6]

LC-MS/MS methods were developed to determine apixaban alone in plasma or in the presence of its major metabolites[7–11] to support clinical uses. Assay in tablets and simultaneous determination with other drugs using HPLC was also described.[12,13] A literature survey, however, did not reveal any further information about the stability profile of apixaban or about its potential degradation products likely to form in time and/or under stress conditions. As drug may undergo degradations, leading potentially to activity loss or to occurrence of adverse effects associated with the appearance of degradation products, thorough knowledge of drug's stability profile is one of the key factors to prevent those risks during manufacturing, transportation and storage.

In this paper, we have focused on the identification and the characterization of degradation products generated in solution. Liquid chromatography combined with mass spectrometry has been well established and found to be a very useful technique for the identification and characterization of DPs.[14–17] That's why high performance liquid chromatography coupled with multistage mass spectrometry (HPLC-MS^n) was used. Different stress

[a]*Université Paris Sud, UFR de Pharmacie, Groupe Matériaux et Santé, Institut d'Innovation Thérapeutique, 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France*

[b]*Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Pharmacie, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France*

[c]*Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Agence Générale des Equipements et Produits de Santé, Département de Contrôle Qualité et Développement Analytique, 7 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France*

[d]*Université Paris-Sud, UFR de Pharmacie, SAMM – Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites, Institut d'Innovation Thérapeutique, 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France*

[e]*Université Paris-Descartes, UFR de Pharmacie, 4 Avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. E-mail: bernard.do@parisdescartes.fr; Fax: +33 146691492; Tel: +33 662306275*

† The first 2 authors contributed equally to this study and are therefore considered as first authors.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

conditions were applied in order to simulate the degradation of active pharmaceutical substances, for which degradation can occur *via* many pathways such as basic and acidic hydrolysis, oxidation, photo-degradation or thermal degradation. The structures of observed degradation products were elucidated using multistage mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry (HR-MS). A study in depth of apixaban fragmentation pattern was also achieved in order to help assign, by comparison, the structures of the major product ions coming from the degradation products ions. In addition, LC-UV method for quantitative determinations of apixaban in the presence of its degradation products has been validated as per ICH.[18]

Experimental

Chemicals, reagents and stock standard solution

Apixaban (MW: 459.4971 g mol^{-1}) tablets (Eliquis®) are marketed by Bristol-Myers Squibb (Rueil Malmaison, France)/Pfizer (Paris, France). A stock standard solution of apixaban was prepared by extracting apixaban from crushed tablets using water/methanol 50/50 to get a final concentration of 250 μg mL^{-1}. Analytical grade acetonitrile came from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Ultrapure water was produced by the Q-Pod Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Hydrogen peroxide (H_2O_2) 30% v/v was supplied by Carlo Erba SDS (Val de Reuil, France).

Instrumentation

LC-MS^n analyses were performed using a Dionex Ultimate 3000 system (DIONEX, Ulis, France) coupled to a triple quadrupole linear ion trap HybridQtrap 3200 MS (ABSciex Framingham, USA) system. LC-HR-MS was performed coupling this same LC system to an LTQ-Orbitrap Velos Pro system, composed of a double linear trap and an orbital trap (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). LC system consisted of a quaternary pump, a degasser, a thermostated autosampler with a 100 μL – injection syringe and a thermostated column compartment. Separation was achieved using Zorbax® column SB-C18 (4.6 mm × 250 mm, i.d., 3.5 μm) kept at 25 °C in a thermostated compartment. The flow rate was set at 1.0 mL min^{-1}. A multistage gradient mobile phase (acetonitrile/water) was applied (Table 1).

Detection and characterization were performed by mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry. In both cases, an electro-spray ionisation (ESI) source operated in positive ion mode. In MS, the ionization conditions were set as following: ion spray-voltage was set at 5.5 kV, curtain gas (N_2) flow rate at 40 psi, nebulizer gas (air) flow rate at 30 psi and heater gas (air) flow rate at 50 psi. Temperature was set at 500 °C. Nitrogen was used as collision and damping gas. Acquisition in full scan mode over the mass range of 50–550 Da was performed for the detection of the degradation products. MS^n experiments for structural elucidation were carried out using 30% (arbitrary units) collision energy level (CEL). MS data were treated with Analyst® software version 1.5.2 and MS Manager® software version 12 (ACD Labs, Toronto, Canada). In HR-MS, the ionization conditions were set as follows: the source voltage was set at 3.4 kV and the temperatures were fixed at 53 °C (source) and 300 °C (capillary). S-Lens was set at 60%. Acquisition in full scan mode over the mass range of 300–550 Da was performed for the determination of the degradation products accurate masses. Data were treated with Xcalibur® software (version 2.2 SP 1.48).

A Q-SUN XE-1 Xenon test chamber (LX 5080 Q-Lab Westlake, California, USA) was used for photo-degradation studies.

Table 1 HPLC gradient

Time (min)	A: water (% v/v)	B: acetonitrile (% v/v)
0 → 2	95	5
2 → 13	95 → 40	5 → 60
13 → 19	40	60
19→ 20	40 → 95	60 → 5

Stress-testing protocol

The forced degradation solutions were prepared by diluting apixaban stock standard solution in water or with reagent solutions as to obtain a final concentration of 125 μg mL^{-1} of apixaban in each of them (working solutions). Four stress conditions were tested: thermal, hydrolytic, photolytic and

Table 2 Forced degradation outcome ($n = 3$)

Stress condition	Time	Average assay of API (% w/w, $n = 3$)	Average total impurities (% w/w, $n = 3$)	Average mass balance (assay + total impurities %, $n = 3$)	Commentaries
Acid hydrolysis (0.1 M HCl)	24 hours	84.9	14.6	99.5	Degradation accompanied by appearance of DP-2, DP-3, DP-4, DP-5, DP-6 and DP-7
Base hydrolysis (0.1 M NaOH)	3 hours	88.1	10.8	98.9	Degradation accompanied by appearance of DP-1 and DP-2
Oxidation (3% H_2O_2)	72 hours	99.3	N.D.	99.3	No degradation occurred
Thermal (80 °C)	7 days	99.5	N.D.	99.5	No degradation occurred
Photolysis (UV light)	36 hours	98.6	N.D.	98.6	No degradation occurred

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

oxidative conditions. Each experiment was performed in triplicate and the working solutions were allocated in 5 mL hermetically sealed glass vials. Thermal stress was achieved at 80 °C up to 7 days. Hydrolysis was studied at room temperature over a period of 72 hours, using HCl 0.1 M or NaOH 0.1 M. Oxidation was tested in the presence of an equivalent of 3% (v/v) H_2O_2, at room temperature for 72 h. Photo-degradation consisted in exposing working solutions to light for 36 h using a xenon test chamber (Q-SUN Xe-1). Emitted wavelengths ranged from 300 to 800 nm. The light intensity was delivered at 1.50 W m^{-2}.

Validation protocol

An RP-HPLC-UV with stability indicating capability was implemented and validated according to ICH Q2 (R1).[18] Specificity was established based on good chromatographic separation and UV detection at 220 nm. The system suitability tests were conducted throughout the validation studies by injecting 125 μg mL^{-1} of apixaban solution. Peak tailing as well as peak efficacy was systematically assessed. Linearity and accuracy were studied across concentration range 25–150 μg mL^{-1} of apixaban, through three series of samples independently prepared. Intermediate precision and repeatability were tested by injection of six individual solutions of 75 and of 125 μg mL^{-1} apixaban on three consecutive days. Limits of quantitation (LOQ) and detection (LOD) were determined considering the level of dilution leading to signal to noise ratios of 10 : 1 and 3 : 1, respectively.

Results and discussion

Optimised chromatographic conditions and method validation

Implementing a stability indicating method (SIAM) relies on its capacity to separate apixaban from its degradation products. After several optimization steps, the method described above was found suitable for the separation of apixaban from most of the other analytes, in gradient mode, using water/acetonitrile mobile phase (Table 2, Fig. 1). In such conditions, apixaban eluted at 13.3 min. The peak-tailing factor (A_s) for apixaban was systematically inferior to 1.2 (average of six determinations = 1.15) and the theoretical plates (N) was at around 4500 (average of six determinations = 4498). A component detection algorithm (CODA) analysis also allowed examining the main peak purity, showing that it uniquely contained signals from apixaban regardless of the sample. Three of the degradation products eluted ahead of the drug and the rest came after. But the resolution factor (R_s) between apixaban and one of the degradation products (DP-4) was below 1.5 (average of six determinations = 1.32). Mass balance (% assay + % total degradation products) of all the stressed samples of apixaban was obtained in the range of 98.2–99.5%. The regression analysis using a linear model expressing apixaban concentrations as a function of UV chromatogram signals within a range 25–150 μg mL^{-1}, resulted in a determination coefficient R^2 of 0.9978 and a y-intercept of the linear equation which was statistically insignificant ($p = 0.205$). The distribution of the residuals can well be

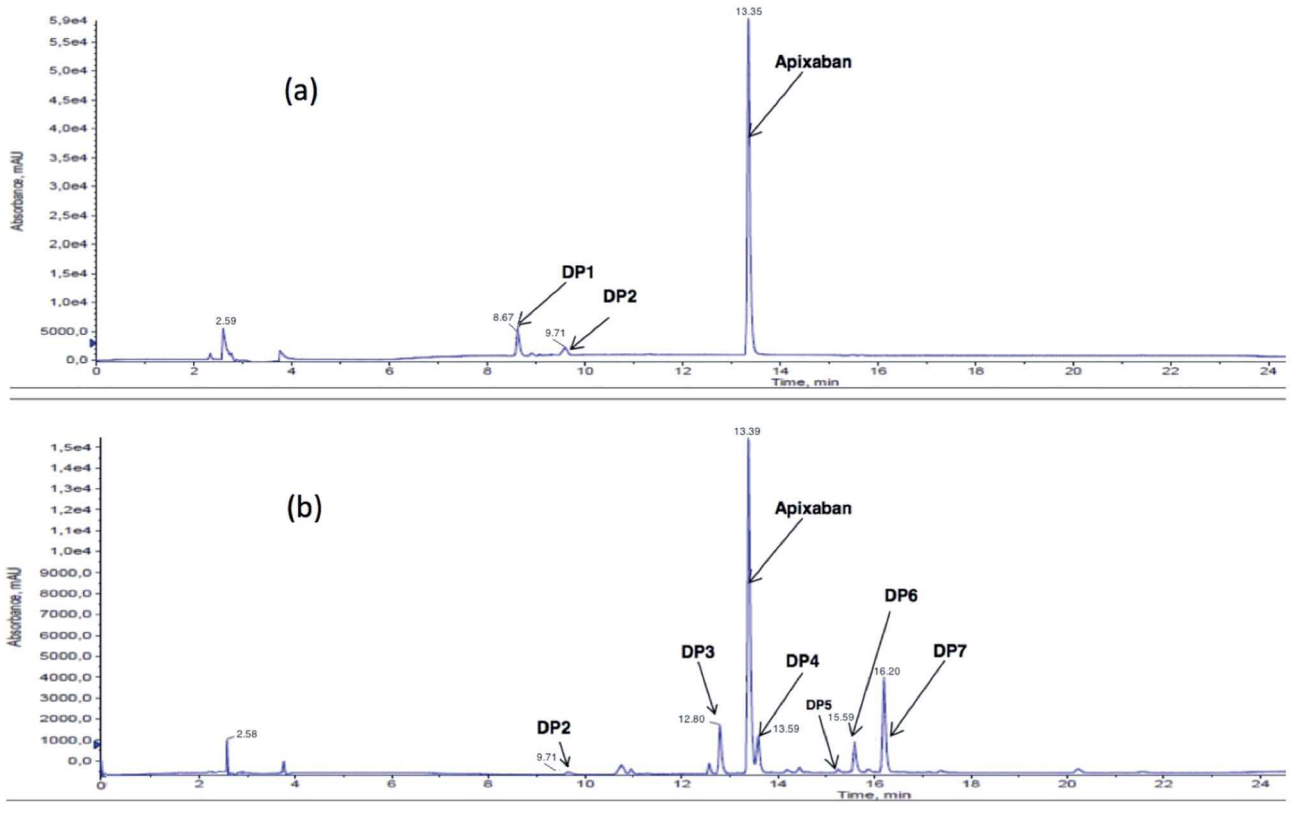


Fig. 1 Chromatograms of (a) basic stress sample and (b) acidic stress sample.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

approximated with a normal distribution according to the *p*-value of the Shapiro–Wilk normality test ($p = 0.198$), so that it could be safely assumed that the calibration data fitted to a linear model. The LOD and LOQ were of 0.4 and 1.3 μg mL^{-1}, respectively. The repeatability verified by a six-fold analysis of the concentration level 75 μg mL^{-1} yielded a RSD inferior to 1.50%, and the intermediate precision studied over three different days following the same protocol, led to a RSD equal to 2.09%.

Table 3 MS^n and high-resolution MS^n data of apixaban

Product ions *m*/*z*	Origin	Best possible elemental formula	Theorical masses *m*/*z*	Accurate masses *m*/*z*	Error (ppm)
460	$[M + H]^+$	$C_{25}H_{26}N_5O_4^+$	460.19793	460.19655	−3.00
461	MS^2 (460 →)	$C_{25}H_{25}N_4O_5^+$	461.18195	461.18054	−3.06
443	MS^2 (460 →)	$C_{25}H_{23}N_4O_4^+$	443.171382	443.17006	−2.98
415	MS^3 (460 → 443 →)	$C_{24}H_{23}N_4O_3^+$	415.176467	415.17547	−2.40
387	MS^4 (460 → 443 → 415 →)	$C_{23}H_{23}N_4O_2^+$	387.18155	387.18073	−2.12
282	MS^3 (460 → 443 →)	$C_{16}H_{16}N_3O_2^+$	282.123703	282.12279	−3.24
264	MS^4 (460 → 443 → 282 →)	$C_{16}H_{14}N_3O^+$	264.11370	264.1122	−5.68
254	MS^4 (460 → 443 → 282 →)	$C_{15}H_{16}N_3O^+$	254.128789	254.12791	−3.46
241	MS^3 (460 → 443 →)	$C_{13}H_9N_2O_3^+$	241.06077	241.06004	−3.03
240	MS^4 (460 → 443 → 282 →)	$C_{14}H_{14}N_3O^+$	240.11314	240.11228	−3.58
227	MS^4 (460 → 443 → 282 →)	$C_{14}H_{15}N_2O^+$	227.11789	227.11711	−3.43
199	MS^3 (460 → 443 →)	$C_{12}H_{11}N_2O^+$	199.086589	199.08620	−1.95
185	MS^4 (460 → 443 → 241 →)	$C_{11}H_9N_2O^+$	185.070939	185.07035	−3.18
172	MS^4 (460 → 443 → 199 →)	$C_{11}H_{10}NO^+$	172.07569	172.07516	−3.08

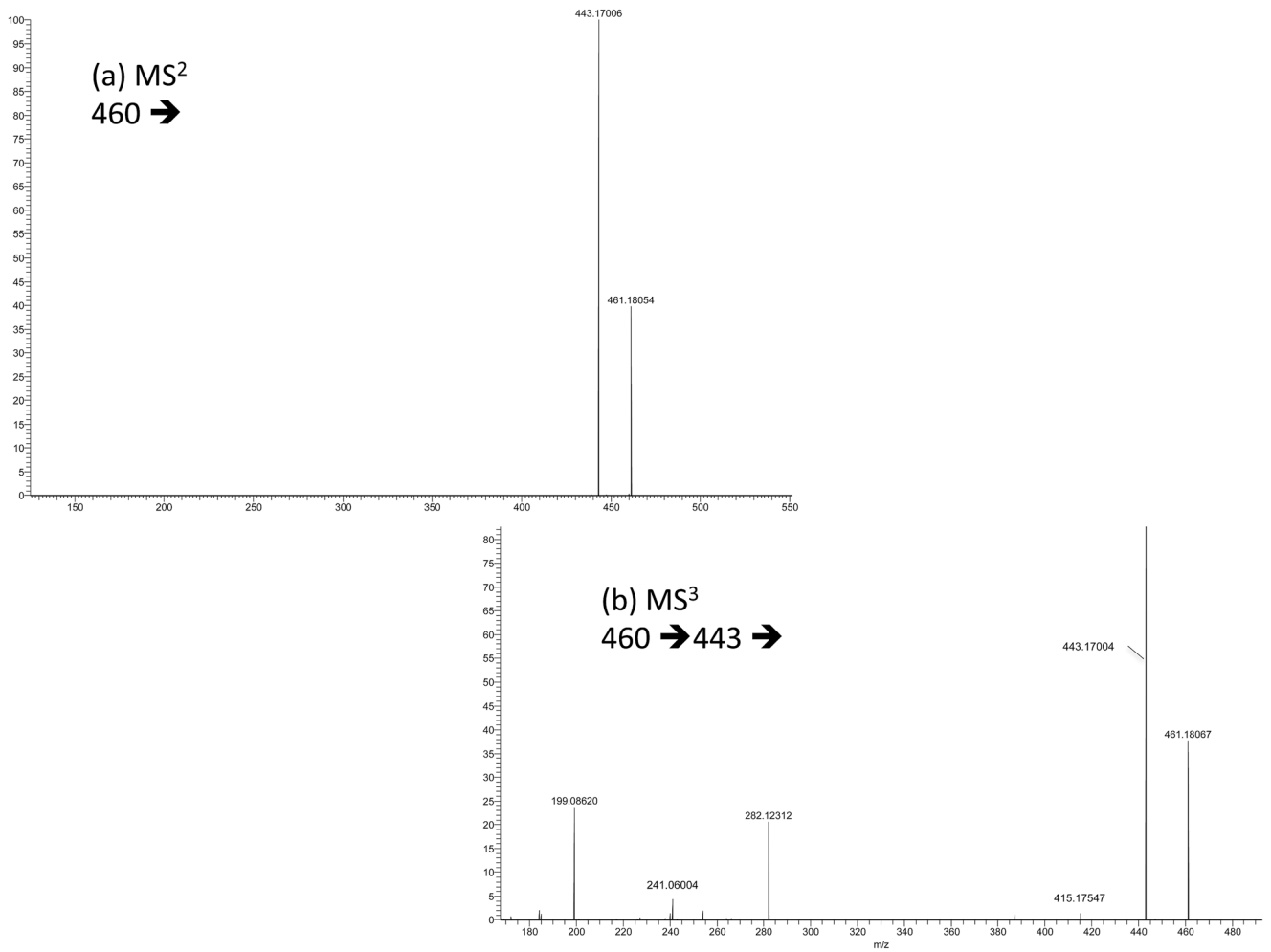


Fig. 2 High-resolution MS^2 spectrum of (a) the protonated ion of apixaban and (b) high-resolution MS^3 spectrum of the product ion at *m*/*z* 443.

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

As a result, the method could be used for the assay determination with implementation of system suitability testing criteria, *i.e.* R_s (apixaban/DP-4, $\geq$1.3), A_s ($\leq$1.2) and N ($\approx$4500).

Same chromatographic conditions were applied for the characterization of the degradation products by LC-ESI-HR-MS^n (Table 1).

Degradation behaviour of apixaban

Under oxidation, thermal and photolytic stress conditions, neither loss of apixaban nor appearance of degradation products was detected, which was consistent with what has been reported recently.[12] Conversely, apixaban was very prone to degradation under hydrolytic stress. As shown in Table 2, loss of 15% of apixaban was observed after 24 hours in acidic conditions, while 11% was highlighted only after 3 hours in basic conditions.

In total, seven degradation products were detected in the solutions subjected to hydrolysis, when taken at a degradation rate still inferior to 15%. Even if degradation continued beyond 15%, we have limited the present study to that of the degradation products formed precociously in the stress conditions, insofar as the others, sometimes secondarily formed, can be considered as less likely with respect to real-storage conditions.[19] The studied degradation products are named "DPn", where n accounts for the elution order. Base hydrolysis resulted DP-1 and DP-2 with relative retention times of 0.65 and 0.73, whereas acidic degradation chromatograms showed DP-2, DP-3, DP-4, DP-5, DP-6 and DP-7 with relative retention times of 0.73, 0.96, 1.01, 1.07, 1.16 and 1.21 (Fig. 1, Table 2). Aside from these DPs, the acidic degradation chromatogram also highlighted the presence of two other but much less intense compounds, eluted about 10.9 min. But unlike the other ones, they were not detected in mass spectrometry and therefore, cannot be studied or structurally elucidated.

Characterization of apixaban and DPs

ESI-MS^n and ESI-HR-MS^n fragmentation studies of apixaban. The drug was initially subjected to LC-MS^n and to HR-MS^n analyses to establish its complete fragmentation pattern, which has not been reported so far. Table 3 lists the precursor and product ions along with errors (ppm) and elemental compositions obtained from HR-Orbitrap-MS instrument.

Under positive ESI-MS conditions, $[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$ ions were detected at m/z 460 and 482, respectively. Among the nitrogen functions apixaban is composed of, only carboxamide-amine function exhibits basic properties with a pK_a of 13.1. It is

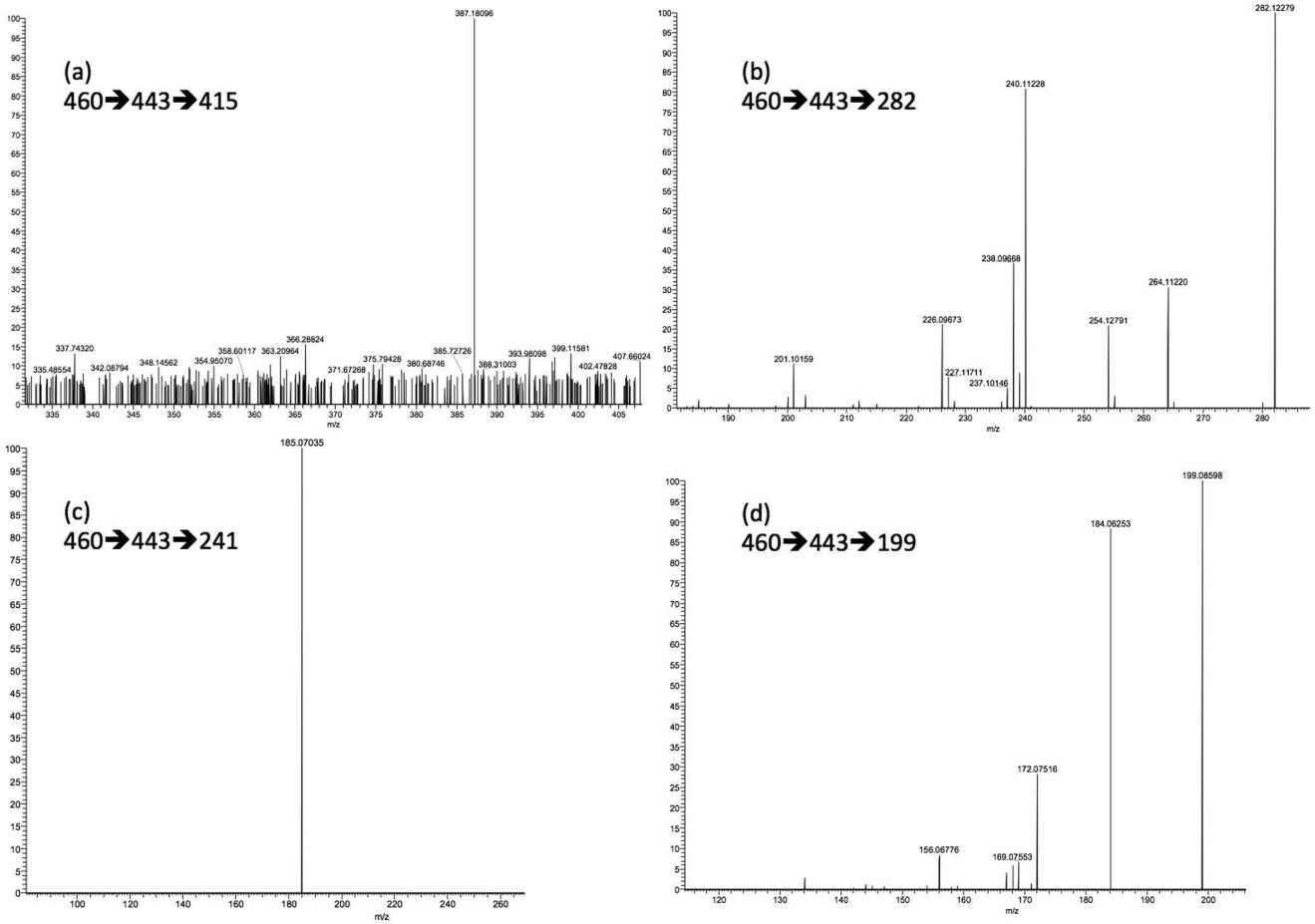


Fig. 3 High-resolution MS^4 spectra of the product ions at (a) m/z 415, (b) m/z 282, (c) m/z 241 and (d) m/z 199.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

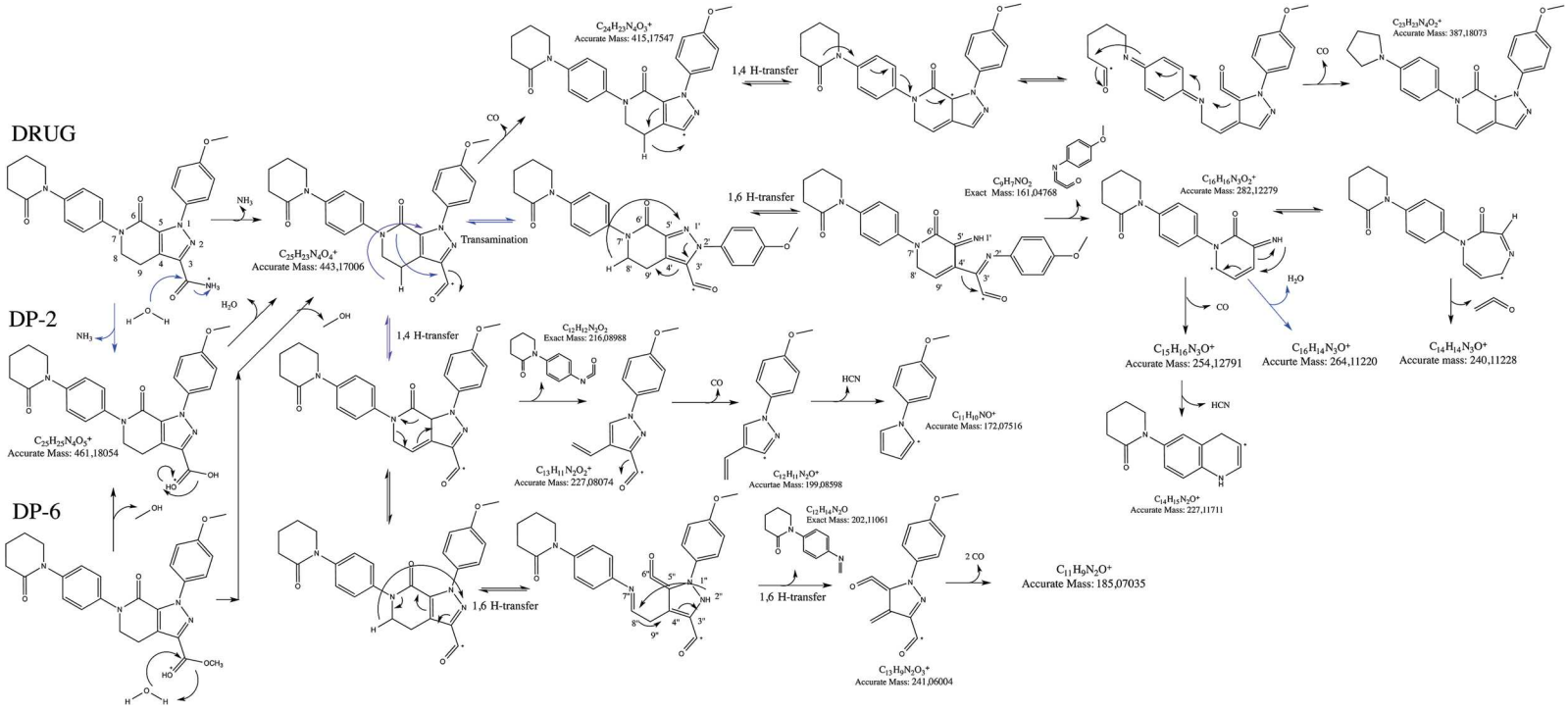


Fig. 4 Proposed fragmentation patterns of the protonated ions of apixaban, DP-2 and DP-6.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

therefore more amenable to protonation than are the others regarding the ionization process. The ESI-HRMS^2 spectrum of $(M + H)^+$ ion yielded 2 product ions with *m/z* of 461 and 443 (Table 3, Fig. 2a). The first ion would have been formed by hydrolysis affording a carboxylate derivative ($C_{25}H_{25}N_4O_5^+$), while the second would be derived from deamination. Acylium derivative $C_{25}H_{23}N_4O_4^+$ was also shown to have been produced from *m/z* 461 ion by loss of H_2O when this one was taken as precursor during MS^3 study (data not shown). Subjected to the MS^3 process, $C_{25}H_{23}N_4O_4^+$ (*m/z* 443) gave rise to the formation of four major product ions with *m/z* of 415, 282, 241 and 199 (Table 3, Fig. 2b). The other product ions were detected at a much lower intensity and as discussed later, they turn out to have originated from the previous ones (Fig. 3).

Transition 443 → 415 may be related to CO departure by heterolytic cleavage of 3C and the acyl carbon bond. Carbocation $C_{24}H_{23}N_4O_3^+$ was formed. In turn, $C_{24}H_{23}N_4O_3^+$ only generated one significantly intense MS^4 product ion ($C_{23}H_{23}N_4O_2^+$) at *m/z* 387, by loss of CO (Table 3, Fig. 3a). According to the scheme (Fig. 4), it was proposed that such a neutral loss would come from the oxo-piperidin moiety through a rearrangements cascade, triggered by migration of a hydrogen atom from 9C to 3C through 1,4 H-transfer. The conformation of $C_{24}H_{23}N_4O_3^+$ is such that thereof would be quite stable by resonance.

Elimination of 2-(4-methoxyphenylimino)ethenone was proposed to explain the formation of *m/z* 282 ion (Fig. 4). The premise here was that another intermediate (2-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carbonyl ion) was formed through a rearrangement such as transamination, as illustrated in Fig. 4. From there, hydrogen migration from 8′C to the H-bond acceptor 1′N, through 1,6 H-transfer, would have led to the pyrazole ring opening by 1′N–2′N bond cleavage, to the formation of a π bond between 2′N and 3′C, and to the switch of the adjacent double bond. Eventually, the 161 Da moiety would have been released by heterolytic rupture of 4′C–3′C bond. When taken as precursor for MS^4 study, $C_{16}H_{16}N_3O_2^+$ (*m/z* 282) yielded the product ions at *m/z* 264, 254 and 240 (Table 1, Fig. 3b), likely by dehydration, CO elimination and by loss of $H_2C{=}C{=}O$, respectively. Furthermore, as stated in the proposed fragmentation scheme of apixaban (Fig. 4), the product ion at *m/z* 227 would have been generated from *m/z* 254 ion by expulsion of HCN.

As for the MS^3 product ion detected at *m/z* 241 (Fig. 2b), it seemed to have been formed by loss of a 202 Da moiety, which could in all likelihood be attributed to 1-(4-(methyleneamino) phenyl)piperidin-2-one. As shown in Fig. 4, hydrogen atom migration from 8C to the H-bond acceptor 1N through 1,6 H-transfer, accompanied by a switch of 2N–3C single bond and of the adjacent double bonds, might have led in the first stage, to the opening of tetrahydropyridine ring. Next, a similar H-transfer process, that took place between 2″N and electron-deficient 8″C, would have ended up releasing the aforementioned neutral fragment by heterolytic cleavage of 8″C–9″C bond. Under the MS^4 conditions (Fig. 3c), $C_{25}H_{23}N_4O_4^+$ appeared to lose two CO to afford the product ion at *m/z* 185 ($C_{11}H_9N_2O^+$).

The last other important fragmentation route of $C_{25}H_{23}N_4O_4^+$ (*m/z* 443) was represented by transition 443 → 199. Thereof would be formed by loss of a 216 Da moiety and of CO. 1-(4-Isocyanatophenyl)piperidin-2-one could possibly account for the so-called 216 Da moiety. Indeed, it was proposed that by tautomery, electron-deficient 5C had withdrawn a hydrogen atom to 9C, leading to the formation of a π bond between 4C and 9C. From there, switch of C9–C8 and 7N–8C single bonds would have allowed generating a metastable ion with *m/z* of 227, which in turn, would have undergone CO loss to afford *m/z* 199 ion (Fig. 4). When taken as precursor for MS^4 study, *m/z* 199 ion could notably produce *m/z* 172 ion by elimination of HCN (Fig. 3d).

Throughout this study, the product ions presented in Fig. 4 were all confirmed by accurate mass measurement.

Identification of the degradation products by LC-HR-MS and LC-MS^n. DP-1 gave a protonated ion with *m/z* of 478. Having 18 Da greater than that of apixaban, it could be considered as a hydrolysis product (Table 4). Indeed, its MS^2 spectrum also includes *m/z* 460 ion and some of the major product ions described above, *i.e.* *m/z* 227, 199, 184 and 172 ions, suggesting

Table 4 Retention times, accurate masses with errors, elemental compositions and MS^2 relevant product ions of the degradation product

Products	rT (min)	Conditions	$[M + H]^+$	Elemental compositions	Theoretical masses	Accurate masses with error in ppm	Relevant MS/MS product ions assigned (*m/z*)
DP-1	8.7	Basic	478	$C_{25}H_{28}N_5O_5^+$	478.20849	478.20755 (−1.97)	461; 460; 417; 288; 271; 244; 227; 203; 199; 191
DP-2	9.7	Acidic/basic	461	$C_{25}H_{25}N_4O_5^+$	461.18195	461.18090 (−2.28)	443; 415; 387; 282; 254; 227; 199; 185; 172
DP-3	12.8	Acidic	379	$C_{20}H_{18}N_4O_4^+$	379.14008	379.13883 (−3.30)	361; 333; 303; 241; 200; 199; 185; 172
Apixaban	13.3	—	460	$C_{25}H_{26}N_5O_4^+$	460.19793	460.19674 (−2.59)	See Table 1
DP-4	13.6	Acidic	478	$C_{25}H_{28}N_5O_5^+$	478.20849	478.20702 (−3.07)	461; 460; 443; 432; 416; 404; 390; 378; 361; 333; 300; 282; 199; 185; 101
DP-5	14.6	Acidic	393	$C_{21}H_{21}N_4O_4^+$	393.15573	393.15436 (−3.48)	393; 379; 361; 333; 241; 200; 199; 185; 172; 156
DP-6	15.6	Acidic	475	$C_{26}H_{27}N_4O_5^+$	475.19760	475.19621 (−2.93)	475; 461; 443; 282; 254; 241; 227; 199; 185; 172; 156
DP-7	16.2	Acidic	492	$C_{26}H_{30}N_5O_5^+$	492.22415	492.22257 (−3.21)	475; 432; 416; 404; 390; 378; 377; 371; 333; 314; 282; 227; 199; 185; 115

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

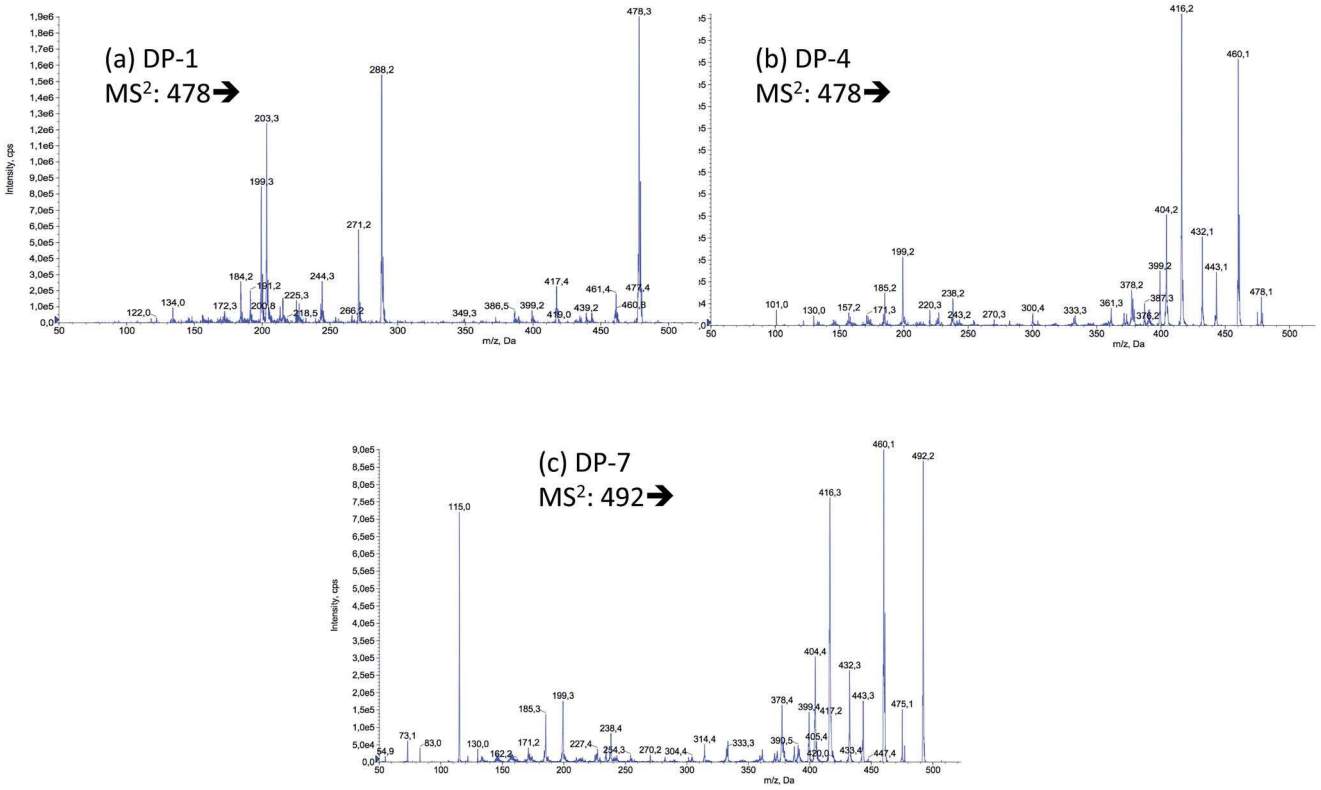


Fig. 5 MS^2 spectra of the protonated ions of (a) DP-1, (b) DP-4 and (c) DP-7.

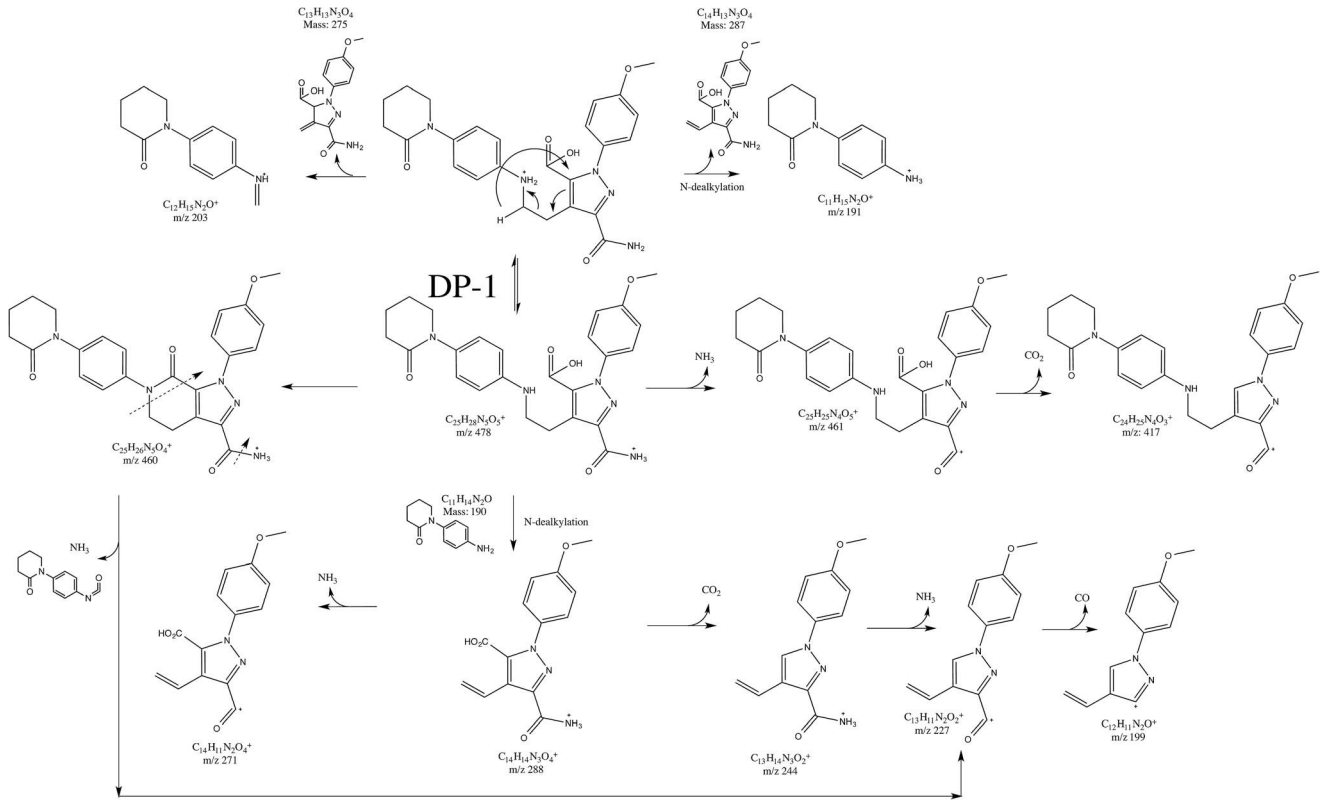


Fig. 6 Proposed fragmentation pattern of the protonated ion of DP-1.

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

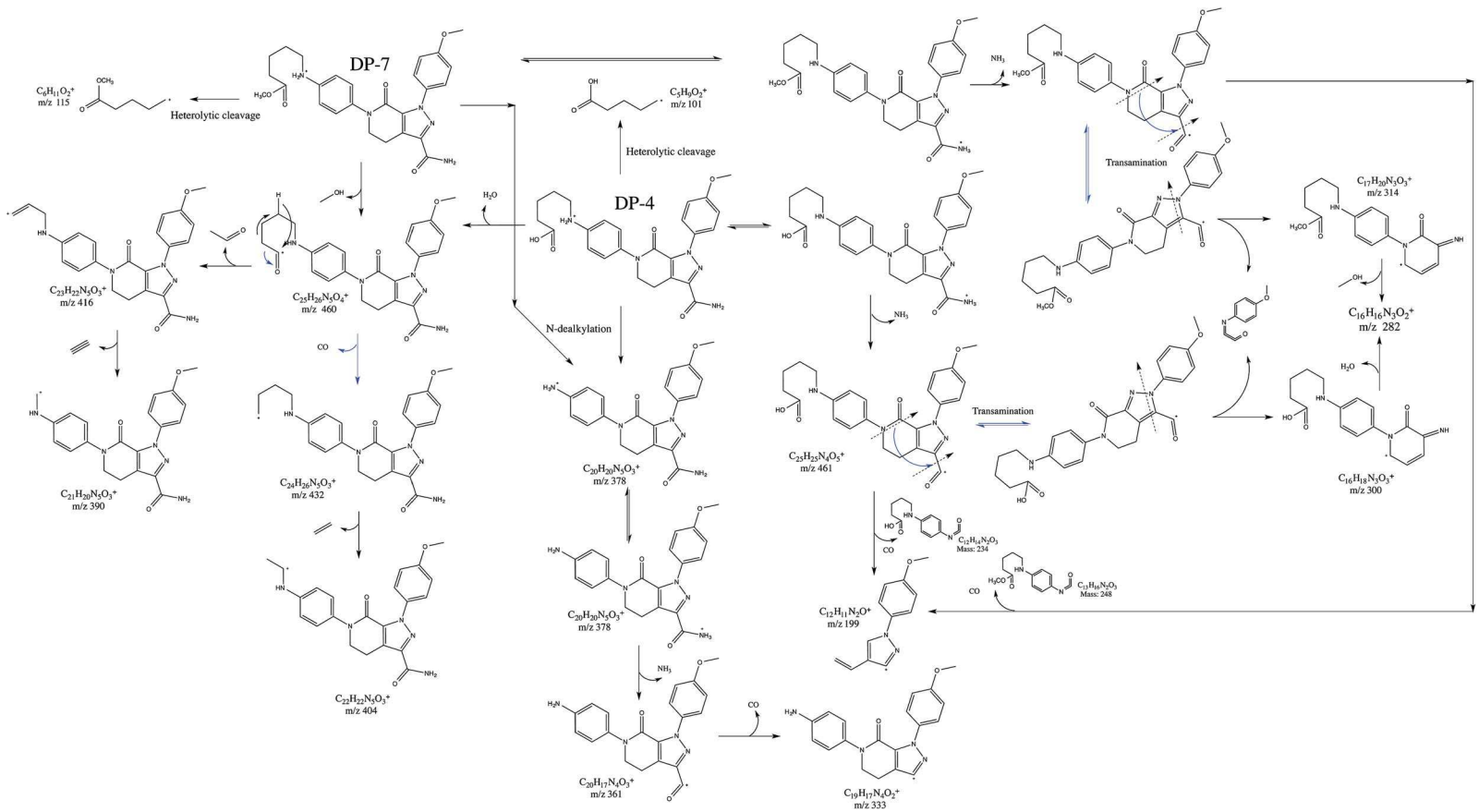


Fig. 7 Proposed fragmentation patterns of the protonated ions of DP-4 and DP-7.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

that the protonated ion of DP-1 could lose H_2O to afford apixaban $[M + H]^+$ ion, thus restoring the amide bond. Aside from this fragmentation path, the mass spectrum also exhibited abundant product ions at *m*/*z* 461, 417, 288, 271, 203 and 217 (Table 2, Fig. 5a). The ion at *m*/*z* 461 may be due to NH_3 expulsion revealing the presence of carboxamide function. Transition 461 → 417 would correspond to CO_2 elimination caused by the presence of carboxylate function, demonstrating that DP-1 was well been formed by hydrolysis of an amide bond. In addition, opening of the oxopiperidin ring by hydrolysis of the amide bond could easily explain the formation of *m*/*z* 288 ion by loss of oxopiperidinylaniline group through *N*-dealkylation (Fig. 6). Such a characteristic product ion could in turn lose NH_3 to generate *m*/*z* 271 ion. The other abundant product ions would have been formed from the protonation of aniline–amine function as shown in Fig. 6. The ion at *m*/*z* 191 would be produced through *N*-dealkylation, while *m*/*z* 203 ion would be the result of the Mac-Lafferty rearrangement. As a result, DP-1 could be identified as 3-carbamoyl-1-(4-methoxyphenyl)-4-(2-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenylamino)ethyl)-1*H*-pyrazole-5-carboxylic acid. This structure was also confirmed by the accurate mass measure of DP-1 (Table 4).

MS/MS product ions of DP-2 and DP-6 were almost all the same as that of apixaban. Only the protonated precursor ions were different (Table 4). Instead of transition 460 → 443 corresponding to loss of NH_3, transitions 461 → 443 and 475 → 443 took place for DP-2 and DP-6, respectively. They might correspond to dehydration and loss of methanol (Fig. 4). As a result, DP-2 and DP-6 might correspond to 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxylic acid and to methyl-1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxylate, respectively. These structures were also confirmed by the accurate mass measure of DP-2 and DP-6 (Table 4).

As DP-1, DP-4 yielded a protonated ion with *m*/*z* of 478. Therefore, it could equally be considered as a hydrolysis product (Table 4). Its MS^2 spectrum includes common ions with

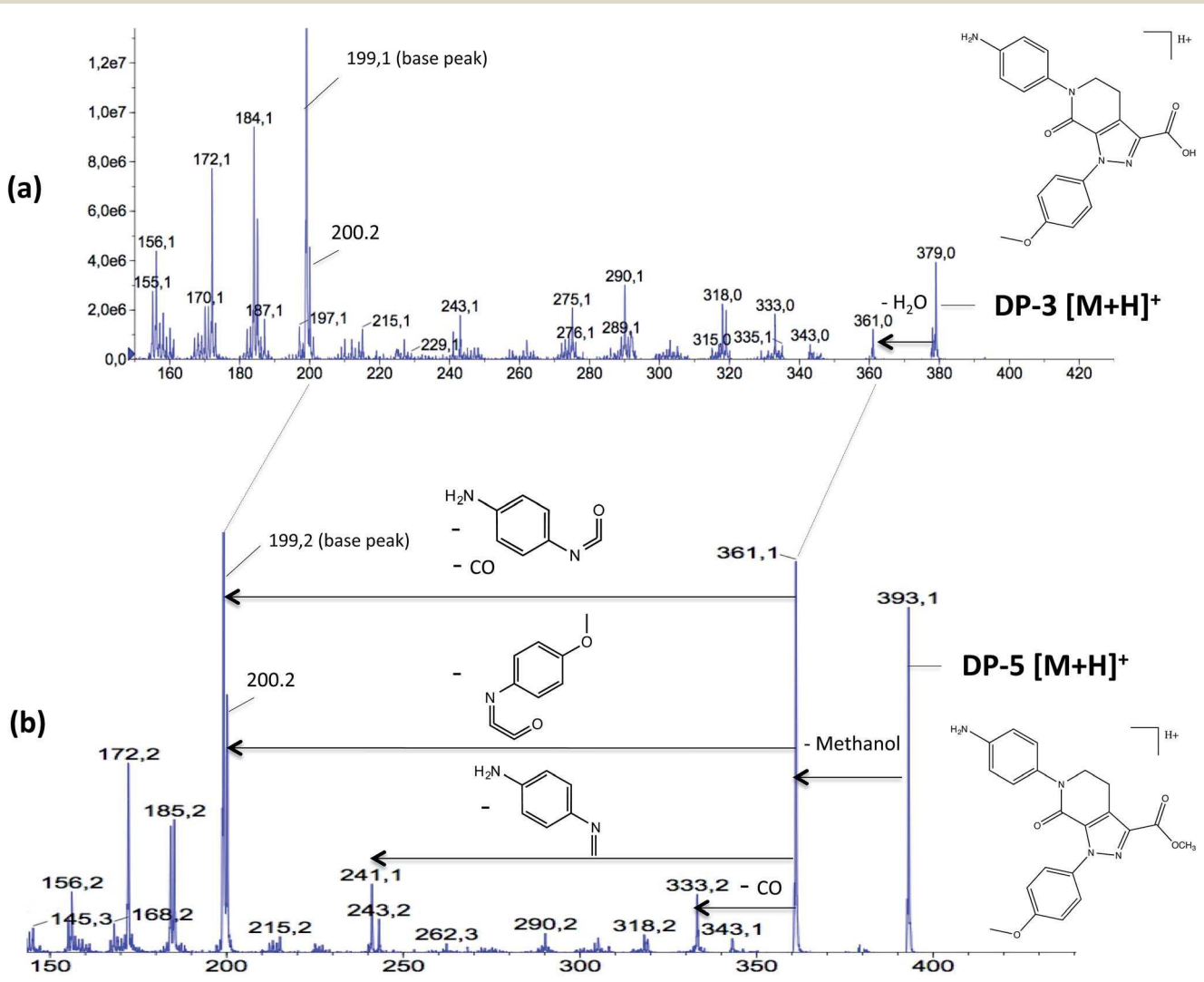


Fig. 8 MS^2 mass spectrum of the protonated ions of DP-3 (a) and DP-5 (b) and their corresponding fragmentation patterns. Some common remarkable transitions are featured on the MS/MS spectrum of DP-5 (b).

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

that of apixaban as was already mentioned for DP-1. It also displays extra product ions with *m*/*z* of 432, 416, 404, 390, 378, 361, 333, 300 and 101 (Fig. 5b). The presence of some of them confirmed that the oxo-piperidin ring opening had occurred by hydrolysis of the amide bond. The ion at *m*/*z* 101 may be due to N–C bond heterolytic cleavage releasing *n*-pentanoic acid carbocation. The product ion at *m*/*z* 378 would have been formed through *N*-dealkylation after the protonation of aniline–amine function. The anilinium derivative could in turn successively lose NH_3 and CO to yield *m*/*z* 361 and *m*/*z* 333 ions, respectively. As shown in Fig. 7, existence of some of the product ions could be related to the C–C bonds rupture on the lateral chain. This seems to concern the product ions at *m*/*z* 432, 416 and 404. Aside from the fragmentation paths involving the lateral chain, elimination of 2-(4-methoxyphenylimino)ethenone that was already described for apixaban, would have generated *m*/*z* 300 ion, which in turn, would have lost a water molecule to afford *m*/*z* 282 ion. Similarly, loss of an isocyanatophenyl derivative along with CO would have formed *m*/*z* 199 ion. Therefore, such a fragmentation pattern is entirely consistent with the protonated ion of 5-(4-(3-carbamoyl-1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)phenylamino)pentanoic acid, as precursor.

DP-7 protonated ion was detected at *m*/*z* 492. Its accurate mass, measured by HR-MS, is consistent with $C_{30}H_{26}N_5O_5^+$ elemental formula (Table 4, Fig. 5c). Given a perfect parallelism between the fragmentation patterns of DP-4 and DP-7 (Table 2, Fig. 5 and 7), DP-7 was identified as methyl 5-(4-(3-carbamoyl-1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridin-6(7*H*)-yl)phenylamino)pentanoate.

DP-3 and DP-5 were also found to include the characteristic fragments *m*/*z* 361 and *m*/*z* 333 within their ESI-MS/MS spectra. Moreover, by comparing the elemental formula of protonated DP-3 and of DP-5 to that of the drug (Table 4), it was easy to demonstrate that they corresponded to aniline derivatives having lost the oxo-piperidin group. In addition, it seems that DP-3 would carry a carboxylate group and DP-5 a carboxymethyl group instead of the initial carboxamide function (Table 4). These assumptions were further supported by the determination of their fragmentation pattern such described by Fig. 8. Loss of water and of methanol from protonated DP-3 and DP-5, respectively, was observed through the presence of *m*/*z* 361 ion on both MS^2 spectra. The protonated ion of DP-3 also corresponds to a product ion of the protonated ion of DP-5 after demethylation. As the degradation products structure had preserved the tetrahydropyridine–pyrazolo–methoxyphenyl

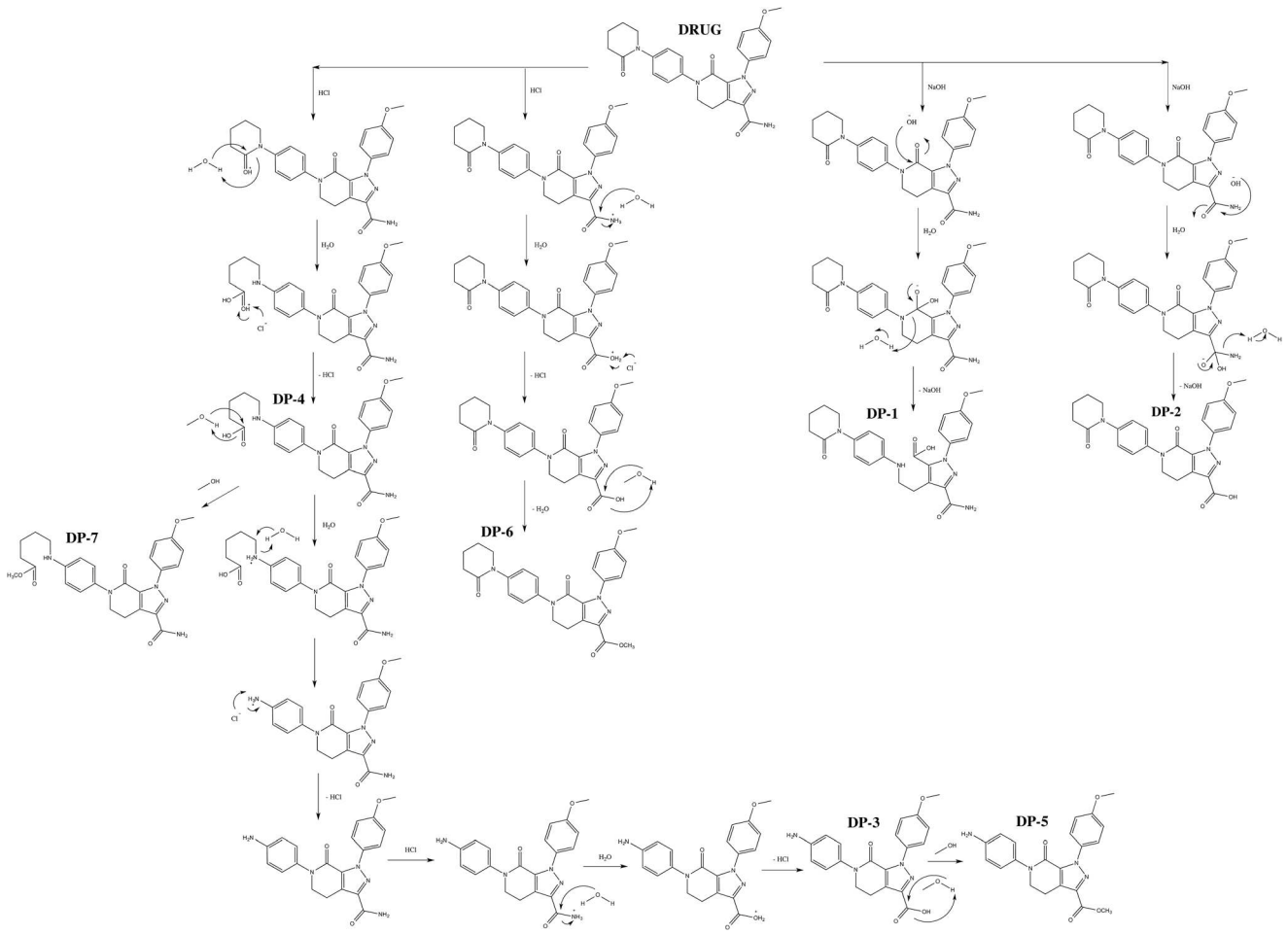


Fig. 9 Proposed degradation patterns of apixaban under stress conditions.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 09 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 04/02/2016 22:44:42.

core, it was logical that the transition involving loss of 2-(4-methoxyphenylimino)ethenone (361 → 200) was one more time detected. Always from the product ion at *m*/*z* 361, *m*/*z* 241 and *m*/*z* 199 ions would have been produced according to the same mechanisms as those described for apixaban, as shown in Fig. 8. As a result, DP-3 might correspond to 6-(4-aminophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxylic acid and DP-5, to methyl-6-(4-aminophenyl)-1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-4,5,6,7-tetrahydro-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridine-3-carboxylate.

Proposed degradation pathways of apixaban

Given the outcome from the stress studies, it was clear that apixaban was more susceptible to acidic and alkali conditions than to the other tested conditions. It seems that the oxo-piperidin group was more amenable to acidic hydrolysis and that the oxo-tetrahydropyridine was more sensible to alkali conditions, according to the study conditions. Hydrolysis of the caboxamide function seemed to occur under one or the other condition. The carboxymethyl derivatives would have been formed in the presence of methanol, used for dissolution of apixaban API prior to being subjected to stress conditions. But under the alkali conditions, esterification should not occur or if it were the case, then the esters formed would have been saponified. The schematic representations of mechanism of formation of the degradation products under hydrolytic stress are depicted in Fig. 9.

Conclusion

The degradation behaviour of apixaban under hydrolytic (acid, base), oxidative, photolytic and thermal stress conditions was studied as per ICH guidelines. Degradation studies demonstrated that apixaban was more fragile with respect to hydrolysis conditions. Its MS^n fragmentation scheme was studied in depth in order to help assign, by comparison, the structures of the product ions formed from the degradation products. A total of seven degradation products were highlighted in the samples exposed to hydrolysis conditions, having reached a degradation rate at maximum of 15%. Based on their identification, it was possible to deduct major degradation mechanisms in the context of stress testing.

A stability-indicating LC method was developed and it has shown suitable for the drug quantification as well as for the impurity determination.

References

1 P. C. Wong, E. J. Crain, B. Xin, R. R. Wexler, P. Y. Lam, D. J. Pinto, J. M. Luettgen and R. M. Knabb, *J. Thromb. Haemostasis*, 2008, **6**, 820–829.
2 P. C. Wong, C. A. Watson and E. J. Crain, *J. Thromb. Haemostasis*, 2008, **6**, 1736–1741.
3 P. C. Wong, E. J. Crain, C. A. Watson and B. Xin, *J. Thromb. Haemostasis*, 2009, **7**, 1313–1320.
4 B. I. Eriksson, D. J. Quinlan and J. I. Weitz, *Clin. Pharmacokinet.*, 2009, **48**, 1–22.
5 M. R. Lassen, G. E. Raskob, A. Gallus, G. Pineo, D. Chen and P. Hornick, *Lancet*, 2010, **375**, 807–815.
6 M. R. Lassen, A. Gallus, G. E. Raskob, G. Pineo, D. Chen and L. M. Ramirez, *N. Engl. J. Med.*, 2010, **363**, 2487–2498.
7 K. He, J. M. Luettgen, D. Zhang, B. He, J. E. Grace Jr, B. Xin, D. J. P. Pinto, P. C. Wong, R. M. Knabb, P. Y. S. Lam, R. R. Wexler and S. J. Grossman, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2011, **36**, 129–139.
8 E. M. Schmitz, K. Boonen, D. J. van den Heuvel, J. L. van Dongen, M. W. Schellings, J. M. Emmen, F. van der Graaf, L. Brunsveld and D. van de Kerkhof, *J. Thromb. Haemostasis*, 2014, **12**(10), 1636–1646.
9 D. Zhang, K. He, N. Raghavan, L. Wang, E. J. Crain, B. He, B. Xin, J. M. Luettge and P. C. Wong, *J. Thromb. Thrombolysis*, 2010, **29**, 70–80.
10 X. Delavenne, P. Mismetti and T. Basset, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013, **78–79**, 150–153.
11 P. C. Wong and D. Zhang, *Drug Metab. Dispos.*, 2009, **37**, 74–81.
12 S. S. Prabhune, R. S. Jaguste, P. L. Kondalkar and N. S. Pradhan, *Sci. Pharm.*, 2014, **82**, 777–785.
13 P. Lebel, J. Gagnon, A. Furtos and K. C. Waldron, *J. Chromatogr. A*, 2014, **1343**, 143–151.
14 S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal and S. Gorog, *Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 755–757.
15 R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **69**, 148–173.
16 R. N. Rao and A. N. Raju, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 2733–2744.
17 R. N. Rao, K. Ramakrishna, B. Sravan and K. Santhakumar, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013, **77**, 49–54.
18 ICH Guideline Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures, Text and Methodology, November 2005.
19 M. Blessy, D. R. Patel, P. N. Prajapati and Y. K. Agrawal, *J. Pharm. Anal.*, 2014, **4**, 159–165.

CHAPITRE 4 : PHOTODÉGRADATION DE L'ARGATROBAN ET IMPLICATIONS POTENTIELLES

1. Contexte de l'étude

Toujours dans la problématique relative au comportement et au devenir des nouveaux anticoagulants en solution, un intérêt particulier a été porté sur la réactivité de l'argatroban en solution en présence d'irradiation lumineuse.

En effet, la sensibilité de l'argatroban à l'irradiation lumineuse est clairement attendue compte tenu de son absorption dans le domaine UV-A, seul domaine spectral dans l'UV des rayonnements présents dans les lieux de travail intérieurs (figure 43).

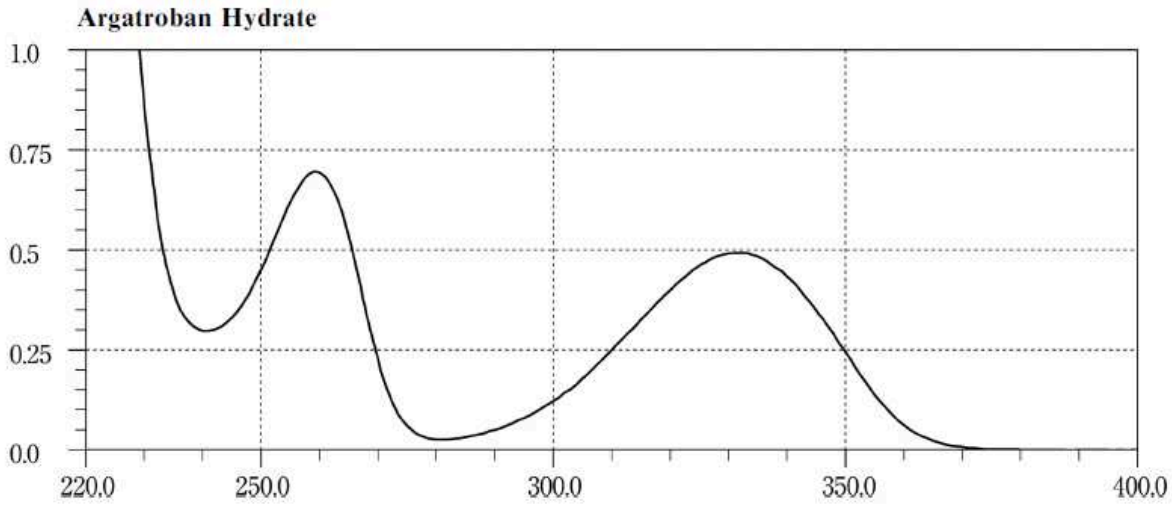


Figure 43 : spectre UV de l'argatroban (20 mg.L^{-1} dans l'éthanol) issu de la Pharmacopée japonaise.

En ce qui concerne la spécialité pharmaceutique en elle-même, le résumé des caractéristiques du produit recommande très clairement d'éviter l'exposition des solutions à la lumière, en particulier lorsque ces dernières sont administrées à l'état dilué en perfusion lente.

Face à l'absence de données scientifiques permettant d'anticiper les écarts d'exposition, nous avons entrepris d'explorer le comportement de l'argatroban (figure 44) en solution aqueuse en conditions photolytiques et les conséquences en termes de ratio bénéfice/risque pour le patient.

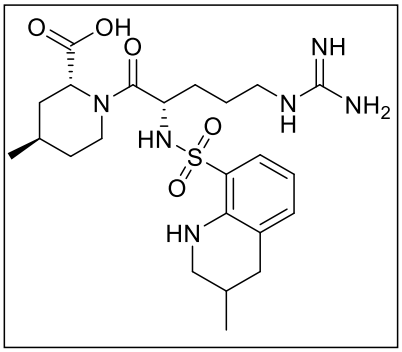


Figure 44 : structure de l'argatroban

Ce travail avait donc pour finalité :

- l'identification de la nature des photoproduits majoritaires de l'argatroban,

- l'évaluation de leur potentiel toxique par approche *in silico*,

- la proposition de mesures susceptibles de réduire leur apparition grâce aux mécanismes élucidés.

Les différentes approches méthodologiques pour obtenir ces informations ont été similaires à celles utilisées pour l'apixaban.

2. Méthodes et protocole d'essai

Une solution aqueuse d'argatroban a été préparée de sorte à obtenir une concentration finale de 80 $mg.L^{-1}$. Cette solution a ensuite été exposée à des conditions de lumière simulée par l'emploi d'une lampe Q-SUN Xe-1 (utilisée en mode fenêtre) qui émet un spectre allant de 300 à 800 nm avec une irradiance de 1.50 $W.m^{-2}$ à 420 nm (irradiance UV de 300 à 400 nm: 66.5 $W.m^{-2}$; éclairement : 119.6 klx).

Pour évaluer l'influence de l'oxygène, la teneur en oxygène dissous a été diminuée en le remplaçant par de l'azote. Dans les deux cas, les échantillons ont été exposés pendant différentes durées (15–30–60–90–120 min).

Chaque solution a ensuite été analysée par une méthode CLHP-UV (détection et quantification à 260 nm, gamme de concentration : 40 à 100 $mg.L^{-1}$) qui avait été validée en amont en termes de linéarité (r^2 = 0,997), d'exactitude (RSD intra-jour <2%) et de limite de détection (0,1 $mg.L^{-1}$).

L'analyse des chromatogrammes obtenus en utilisant la barette de diodes a permis de vérifier que cette méthode pemettait bien de doser spécifiquement l'argatroban (index de pureté de pic >99%).

3. Résultats

3.1. Photodégradation de l'argatroban : aspects quantitatifs

Avec ou sans réduction de la teneur en oxygène dissous, une diminution rapide de la teneur en argatroban a été observée. Dans les deux cas, la cinétique de dégradation suit un ordre zéro, avec une pente plus importante lorsqu'il n'y a pas de réduction de la teneur d'oxygène dissous (figure 45).

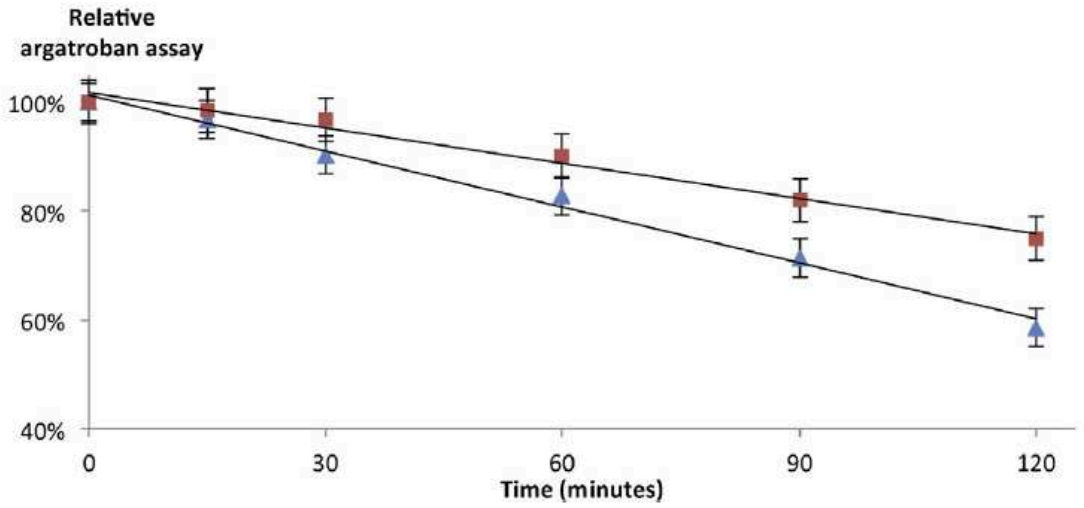


Figure 45 : concentration en argatroban en fonction du temps sans (triangles) ou avec réduction (carrés) de la teneur en oxygène dissous.

Après 1 heure d'exposition en présence d'oxygène, une perte de 17% d'argatroban a été observée. Cet échantillon correspond à un compromis et a été choisi pour réaliser les analyses LC-HRMS^n visant à la caractérisation des photoproduits. En effet, celui-ci contient les produits de photodégradation majoritaires et un nombre restreint de produits de dégradation ne pouvant apparaître que dans des conditions non réalistes.

Ainsi, l'analyse de cet échantillon conduit à la détection de 8 produits issus de la photodégradation de l'argatroban (notés P_n en fonction de l'ordre d'élution ; figure 46).

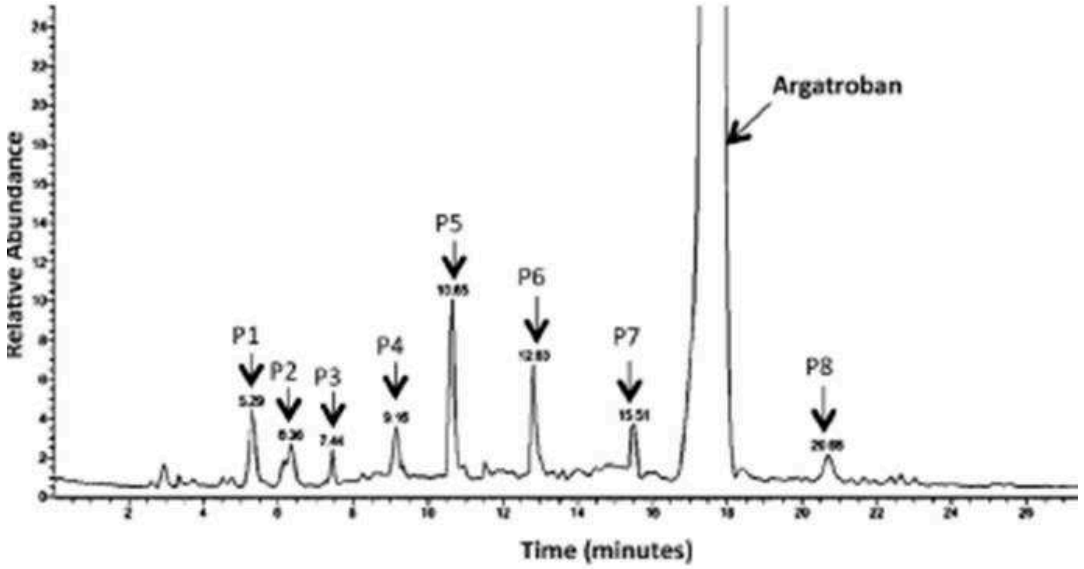


Figure 46 : chromatogramme total d'ions après exposition de l'argatroban à la lumière.

3.2. Élucidation structurale des produits de photodégradation

3.2.1. Processus de fragmentation de l'argatroban

Le processus de fragmentation de l'argatroban a été étudié en $HRMS^n$ avec une source ESI en mode d'ionisation positif.

Trois ions produits ont été retrouvés pour ce principe actif (masse exacte : 509,2541 formule brute correspondante : $C_{23}H_{37}N_6O_5S^+$) en mode $HRMS^2$. Les masses exactes déterminées pour ces trois ions : 384,1700 362,1493 et 148,1121 correspondent aux formules brutes $C_{16}H_{26}N_5O_4S^+$, $C_{13}H_{24}N_5O_5S^+$ et $C_{10}H_{14}N^+$.

L'ion produit de m/z 384 donne un pic très intense et correspond à une perte globale de $C_7H_{11}NO$. Étant donné la structure de l'argatroban, cette perte facile (le pic étant intense) est très probablement issue d'un réarrangement interne entre une fonction acide carboxylique et une fonction carboxamide aboutissant à la formation d'un cycle à 5. En effet ce réarrangement explique que l'on observe un départ de 4-méthyl-2,3,4,5-tétrahydropyridine et de monoxyde de carbone, et non un départ du cycle tétrahydropyridine avec son substituant méthyle et son substituant acide carboxylique car la perte serait $C_7H_{11}NO_2$ (figure 47).

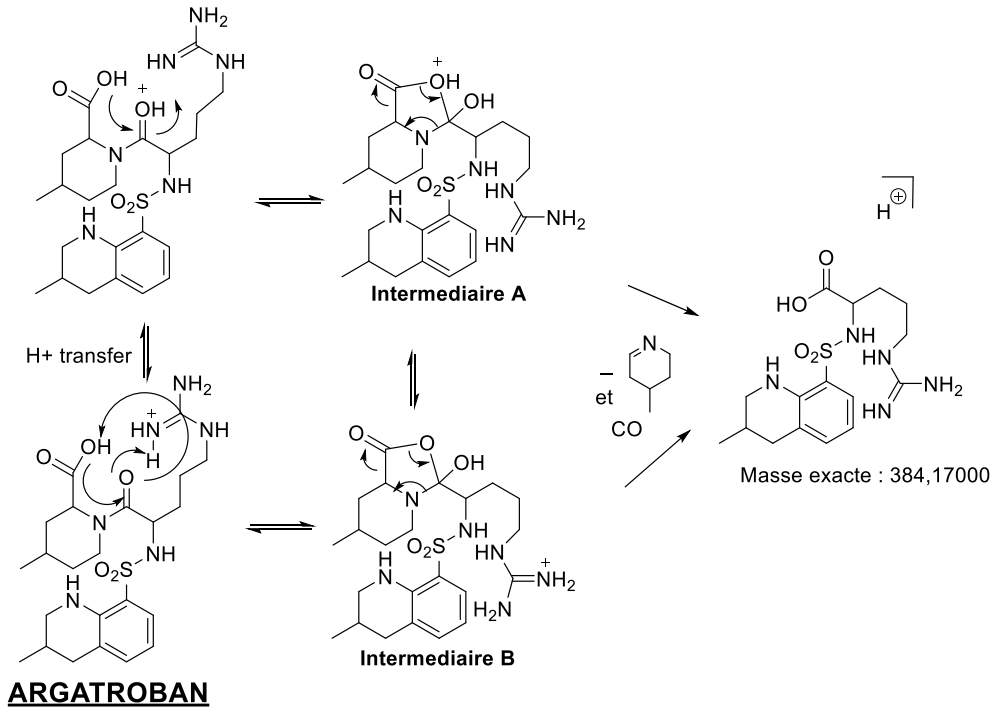


Figure 47 : processus de fragmentation de l'argatroban en HRMS².

La structure de l'ion m/z 384 a été confirmée en mode HRMS^3 par l'obtention des ions produits m/z 237, m/z 157 et m/z 129. En effet, la formation de l'ion produit de masse exacte : 237,0652 (formule brute $C_6H_{13}N_4O_4S^+$) s'explique par un départ de 3-méthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline (M = 147 Da) comme celui indiqué dans le paragraphe suivant. La formation des deux autres ions produits est consécutive à des pertes de SO_3 et de CO, processus retrouvés dans d'autres voies de fragmentation (figure 50). La structure de l'ion de m/z 237 est d'autant plus probable qu'elle est retrouvée lors de la fragmentation en HRMS^3 de l'ion produit m/z 362 (figure 50).

L'ion produit obtenu en HRMS^2 (362,1493 ; $C_{13}H_{24}N_5O_5S^+$) est formé à partir de l'argatroban par départ direct de 3-méthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline suite à la coupure de la liaison entre l'atome de soufre et le groupe aromatique (figure 48). Comme cela a été rapporté pour les sulfonamides aromatiques une coupure directe de la liaison entre le cycle aromatique et le soufre peut survenir (Sun et al., 2008).

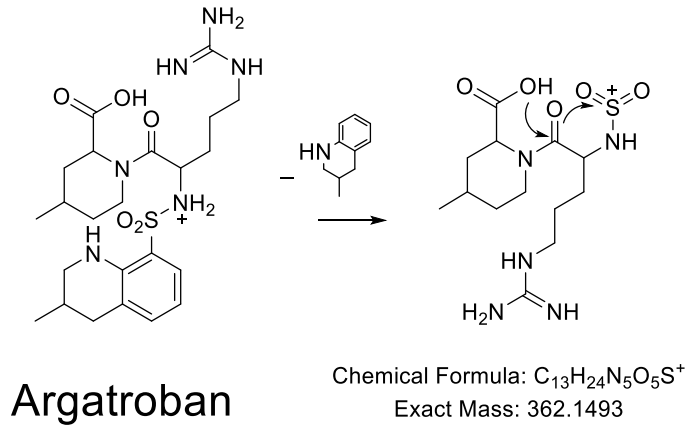


Figure 48 : deuxième voie de fragmentation de l'argatroban.

Le dernier ion produit très intense obtenu en HRMS^2 (148,1121 ; $C_{10}H_{14}N^+$), correspond à un départ issu de la majeure partie de l'argatroban et à l'obtention de l'ion 3-méthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline (figure 49).

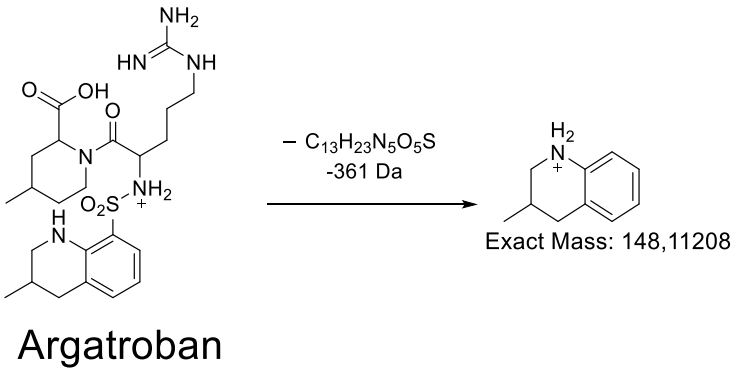


Figure 49 : troisième voie de fragmentation en HRMS²

La fragmentation en mode HRMS^3 de l'ion m/z 362 conduit à l'obtention d'ions fragments qui ne peuvent s'expliquer que par des formations de cycles internes à 5 ou d'autres réarrangements aboutissant à des pertes de neutre identiques à celles obtenues dans d'autres voies de fragmentation : de SO_3 (362->282), CO (362-> 334) et de $C_6H_{11}N$ + CO (362->237) (figure 50).

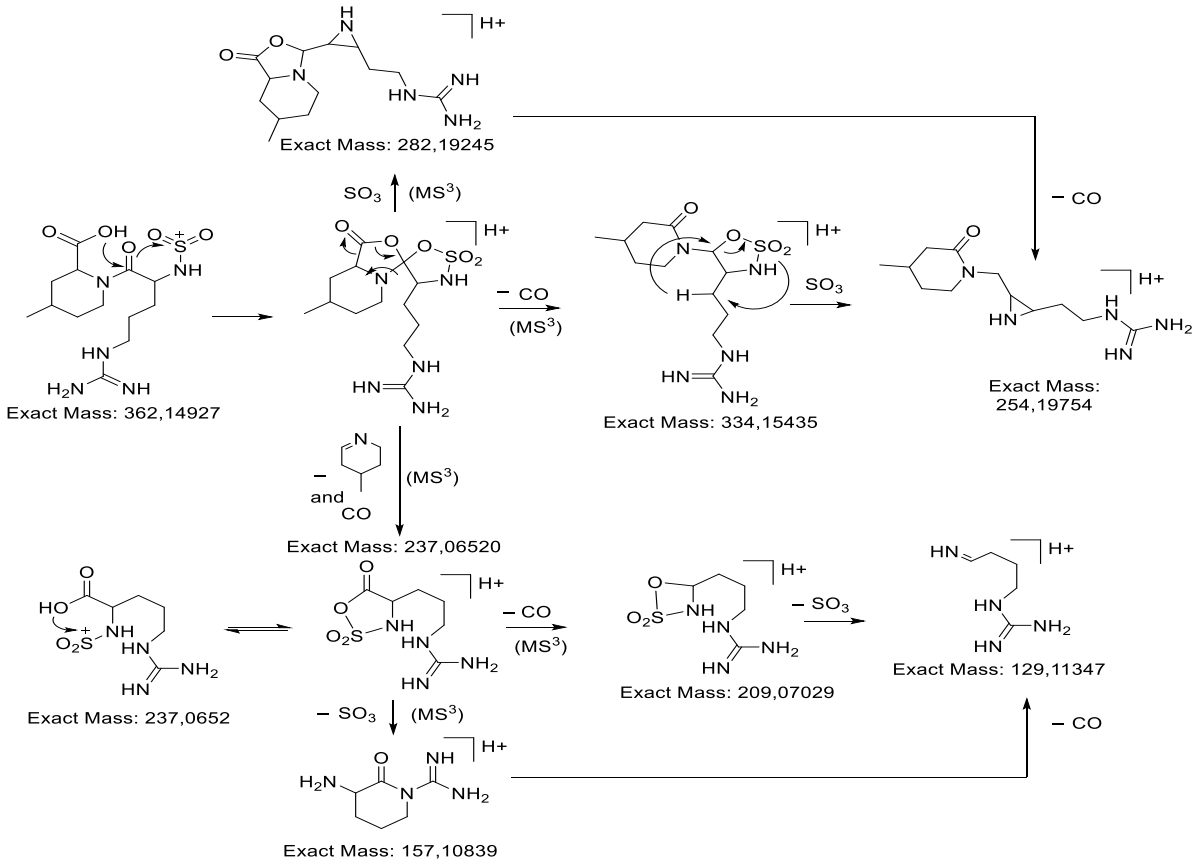


Figure 50 : processus de fragmentation HRMS^3 (509->362->).

3.2.2. Caractérisation des produits de photodégradation

Comme cela sera développé par la suite, une première analyse des spectres $HRMS^2$ a permis d'établir que 2 produits ont conservé la structure de la partie méthyltétrahydroquinoline (P_2 et P_5), tandis que 3 ont conservé la partie méthylpipéridine (P_1, P_3 et P_4) et 3 l'ensemble des 2 parties (P_6, P_7 et P_8).

Produits de photodégradation ayant conservé la structure de la partie méthyltétrahydroquinoline : P_2 et P_5.

Comparativement à l'argatroban ($C_{23}H_{37}N_6O_5S^+$), les ions protonés P_2 ($C_{10}H_{10}NO_4S^+$) et P_5 ($C_{10}H_{14}N^+$) présentent un nombre réduit d'atomes d'azote, en faveur de la perte de la partie guanidine, et le même nombre d'atomes de carbone que la partie méthyltétrahydroquinoline, ce qui laisse à penser que ces composés ont conservé cette partie de l'argatroban.

P_5 présente une masse exacte identique à celle d'un des ions produits de l'argatroban : 148,112 ($C_{10}H_{14}N^+$), ion provenant de la partie méthyltétrahydroquinoline de l'argatroban. L'exposition de l'ion protoné P_5 à des processus de collision (mode $HRMS^2$) a abouti à la perte de neutre C_3H_6 (M = 42 Da) et à un ion produit que l'on met aussi en évidence dans la fragmentation de l'argatroban : $C_7H_8N^+$.

La structure attribuée à P_5 est donc celle de la 3-méthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline (figure 51).

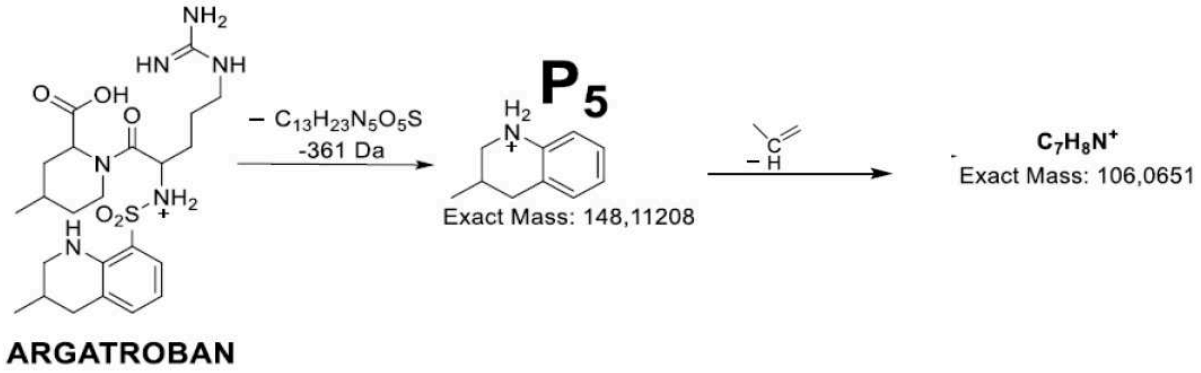


Figure 51 : structure de P_5.

Pour P_2, l'élucidation structurale s'est avérée plus complexe. La formule élémentaire la plus probable selon sa masse mesurée (240,0325) en mode HRMS : $C_{10}H_{10}NO_4S^+$ suggère que P_2 est un produit issu de l'oxydation du groupe 3-méthyl-8-sulfonyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline. En mode $HRMS^2$, les deux ions produits majoritaires de P_2 ont une masse de 222,019 et de 174,055 correspondant respectivement aux formules brutes $C_{10}H_8NO_3S^+$ et $C_{10}H_8NO_2^+$. Elles s'expliquent pour le premier ion par une perte d'eau et pour le second par une perte d'acide sulfoxylique (H_2SO_2).

La perte d'une molécule d'eau observée suggère que le groupe OH n'est pas lié à un carbone sp^2 du cycle phényle (Demarque et al., 2016). Il apparaît donc probable qu'il y a eu fixation d'un groupe OH sur l'azote du groupe tétrahydroquinoline. La protonation de l'oxygène du groupe hydroxylamine explique le départ d'eau conduisant à l'ion m/z 222. La présence de la transition 240 -> 222, absente dans le schéma de fragmentation de l'argatroban, suggère aussi que l'environnement de l'atome d'azote est différent dans P_2 et dans l'argatroban.

La perte d'eau dans la transition 240 - > 222 permet d'expliquer la formation d'un cycle à 5 dans l'ion 222 conduisant aux pertes de neutre de SO, SO_2, SO_2CH_2 observées en MS^3.

Au total, pour les quatre atomes d'oxygène de P2, l'un appartient au groupement hydroxylamine, deux au groupement sulfonyle et le quatrième à un groupement oxo.

Mais, aucun fragment obtenu en spectrométrie de masse, quel que soit le mode choisi, n'a permis de discriminer sur lequel des deux carbones saturés le groupement oxo se situe (figure 52).

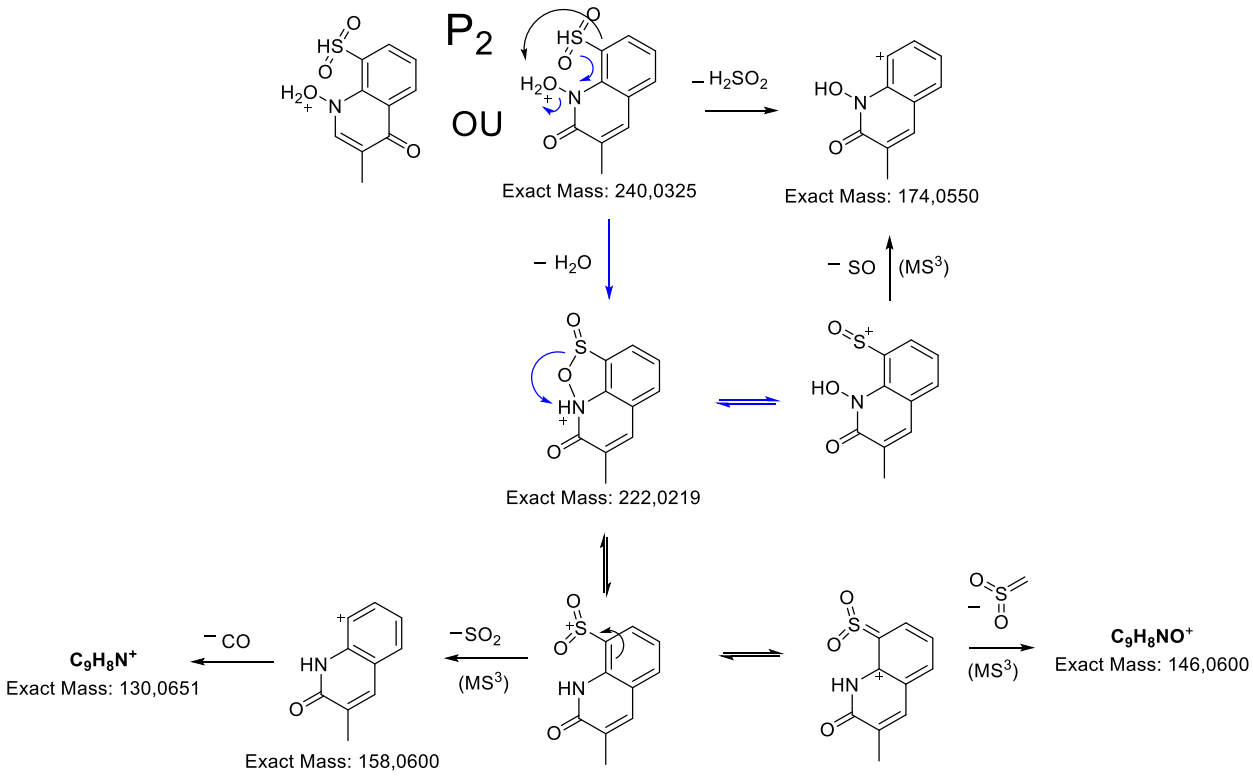


Figure 52 : processus de fragmentation de P_2.

Produits de photodégradation ayant conservé la structure de la partie méthylpipéridine : P_1, P_3 et P_4

Ces photoproduits ont des ions produits de masses exactes correspondant aux formules brutes $C_{13}H_{26}N_5O_3^+$ (P_1), $C_{12}H_{20}N_5O^+$ (P_3) et $C_{13}H_{23}N_4O_4^+$ (P_4). Par rapport à l'ion de l'argatroban ($C_{23}H_{37}N_6O_5S^+$), ces composés ont donc perdu l'atome de soufre, un nombre important d'atomes de carbone et un nombre réduit d'atomes d'azote, ce qui s'explique par la perte de la partie méthyltétrahydroquinoline et du groupement sulfonyle lié à celle-ci ainsi que par la conservation de tout ou d'une partie du groupement guanidine.

Les spectres de masse en mode HRMS² des ions protonés de P_1 et P_4 indiquent qu'ils peuvent tous les deux subir une perte de neutre $C_6H_{11}N$ et de monoxyde de carbone, de façon identique à ce qui est observé pour l'argatroban (cf. processus de fragmentation de l'argatroban en m/z 384). Cela indique que les parties méthylpipéridine et acide carboxylique n'ont pas été modifiées : elles sont présentes dans P_1 et P_4. Compte tenu de ce qui précède, de la structure de l'argatroban et de la formule élémentaire de P_1 ($C_{13}H_{26}N_5O_3^+$), la structure de P_1 a été identifiée comme étant celle de l'acide 1-(2-amino-5-carbamimidamidopentanoyl)-4-méthylpipéridine-2-carboxylique (figure 53).

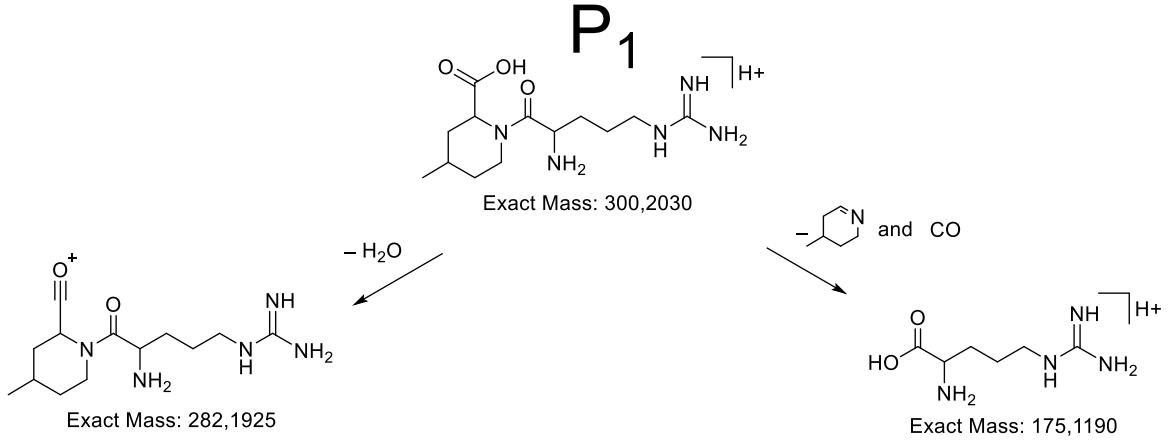


Figure 53 : structure et ions produits caractéristiques de P_1.

En ce qui concerne P_4 (299,171 ; $C_{13}H_{23}N_4O_4^+$), une perte directe d'acide carbamimidique (transition 299,171->239,139) ou succédant à la perte de la 4-méthyl-2,3,4,5-tétrahydropyridine et de monoxyde de carbone (299,171->174,087-

>114,0550) ont été observées. Pour justifier celles-ci, la formation d'un dérivé diazinane-carboxamide par formation d'un cycle interne a été proposée. P_4 est identifié comme étant l'acide 1-[1-(C-hydroxycarbonimidoyl)-1,2-diazinane-3-carbonyl]-4-méthylpipéridine-2-carboxylique. (figure 54).

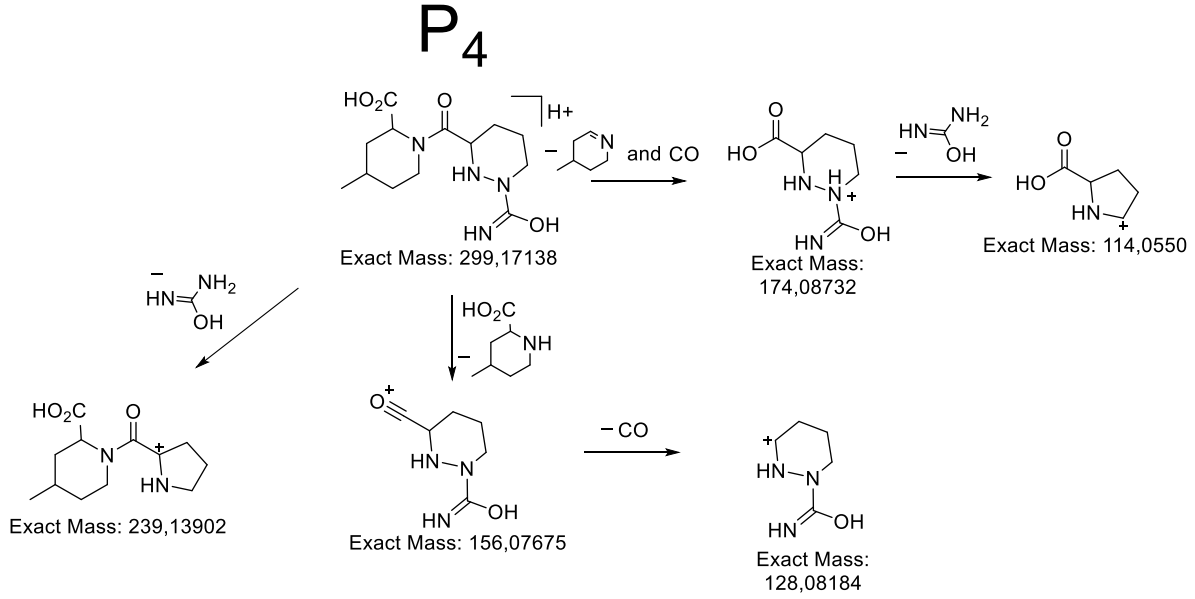


Figure 54 : structure et fragments caractéristiques de P_4.

En revanche, pour P_3, la perte simultanée de $C_6H_{11}N$ et de CO n'a pas été observée, laissant supposer que des changements substantiels sont survenus sur la partie acide carboxylique-méthylpipéridine. Son ion protoné ($C_{12}H_{20}N_5O^+$) ne comporte qu'un oxygène. En mode HRMS² cet ion protoné conduit à un ion fragment ($C_{11}H_{20}N_5^+$, m/z 222) accompagné d'une perte de neutre de monoxyde de carbone. La perte directe de CO est attribuée à la présence d'un groupe carbonyle dans un cycle saturé, processus décrit par ailleurs (Demarque et al., 2016).

Un autre ion produit ($C_{12}H_{17}N_4O^+$, m/z 233) issu de la fragmentation en mode HRMS² de P_3 correspond à la perte d'ammoniac. Après cette perte l'ion produit a été soumis à un niveau supérieur de fragmentation (mode $HRMS^3$). Celle-ci a conduit à une perte de neutre O=C=N-H, indiquant la présence d'une fonction amide dans un cycle de P_3. Une perte d'acide carbamimidique déjà constatée dans la fragmentation de P_4 suggère la présence d'un groupe de structure diazinane dans P_3. En mode HRMS², la présence d'un ion protoné de masse exacte 191,118 correspondant à une perte de neutre de guanidine indique que P_3 contient cette partie. L'étude des spectres de

masse obtenus en mode HRMS[3] a permis par les pertes observées de localiser l'insaturation dans P_3.

Au total, P_3 a pu être identifié comme étant le 9-méthyl-5-oxo-4a,5,8,9,10,10a-hexahydro-7*H*-pyrido[2',1':2,3]imidazo[1,5-*b*]pyridazine-1(4*H*)-carboximidamide (figure 55).

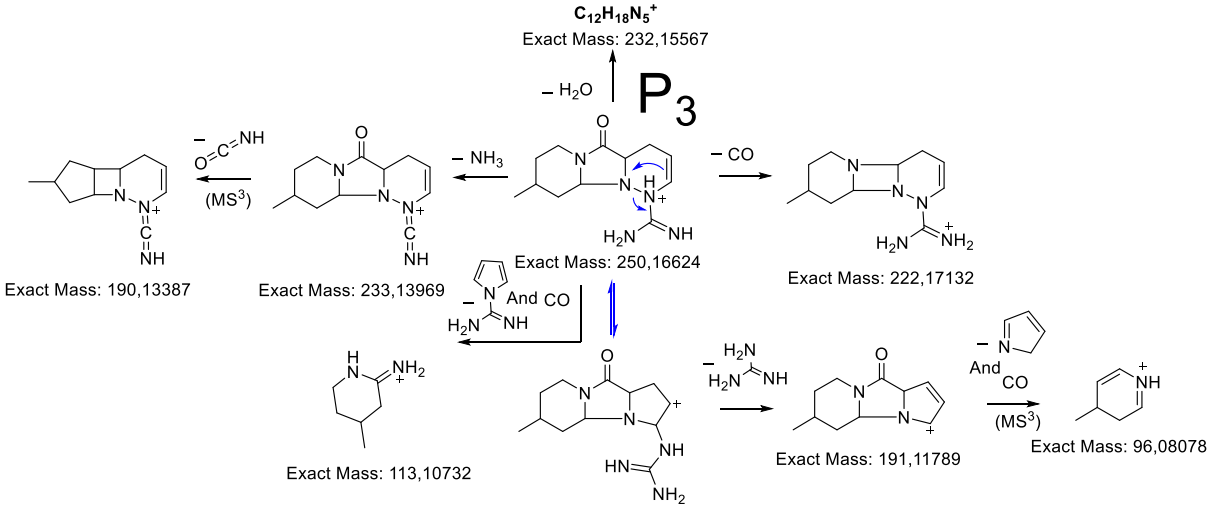


Figure 55 : structure de P_3 et formation des ions produits caractéristiques.

Produits de photodégradation ayant conservé la structure des parties méthylpipéridine et méthyltétrahydroquinoline : P_6, P_7 et P_8

Les ions protonés (mode HRMS) de P_6 (m/z 459,271), P_7 (m/z 507,238) et P_8 (m/z 445,292), ont des valeurs de masse exacte qui correspondent aux formules élémentaires respectives $C_{23}H_{35}N_6O_4^+$, $C_{23}H_{35}N_6O_5S^+$ et $C_{23}H_{37}N_6O_3^+$. Les spectres de masse obtenus en mode HRMS² comportent des ions produits consécutifs à des pertes de neutre identiques à celles de la transition argatroban->384, ce qui indique que ces trois photoproduits conservent la partie acide carboxylique-méthylpipéridine.

Les spectres de masse en mode HRMS[2] de P_6 et de P_7 présentent des ions produits communs : 281,161 (formule brute : $C_{13}H_{21}N_40_3^+$) et 239,139 (formule brute : $C_{12}H_{19}N_20_3^+$). Les pertes de neutre nécessaires à l'obtention de l'ion produit 281 sont pour P_6 : $C_{10}H_{14}N_2O$ et pour P_7 : $C_{10}H_{14}N_2O_2S$. Elles contiennent chacune la partie méthyltétrahydroquinoline, ce qui indique que cette partie était encore présente dans P_6 et P_7. L'ion produit 281 à partir de P6 (transition 459 -> 281) permet aussi de

comprendre que la partie méthyltétrahydroquinoline a certainement subi une hydroxylation dans P_6 car la perte de neutre : $C_{10}H_{14}N_2O$ contient un atome d'oxygène absent dans la partie méthyltétrahydroquinoline de l'argatroban. Pour P_7, le groupe sulfonyle que l'on trouve dans la perte indique qu'il était présent dans P_7.

L'ion produit 239,139 est obtenu directement à partir de P_6 et P_7 en mode $HRMS^2$ ou par fragmentation de l'ion produit de masse 281,161 en mode $HRMS^3$ par une perte de méthanediimine. Cela suggère que ce groupe lie la partie méthyltétrahydroquinoline au reste de P_6 et P_7 (figure 56).

L'ion 239 a déjà été observé dans la transition 299 ->239 lors de la fragmentation de P_4. La formation de l'ion 239 a été justifiée par la présence d'un cycle diazinane dans P_4. L'obtention directe de l'ion 239 à partir de P_6 et P_7 s'interprète aussi par la présence d'un cycle diazinane dans P_6 et P_7.

P_7 ayant conservé l'atome de soufre, compte tenu de l'ensemble des données recueillies par ailleurs, il doit présenter une fonction de type sulfonylguanidine et la structure qui lui a été attribuée est celle de l'acide 4-méthyl-1-(1-{N-[(3-méthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinolin-8-yl)sulfonyl]carbamimidoyl}-1,2-diazinane-3-carbonyl)pipéridine-2-carboxylique (figure 56).

Lorsque l'on compare les spectres de masse ($HRMS^n$) de P_6 et P_7, ceux-ci présentent de nombreux ions produits et des pertes de neutre communs (figure 56). Compte tenu aussi de la formule élémentaire de P_6 ($C_{23}H_{35}N_6O_4^+$), celui-ci peut être assimilé à P_7 sans la partie sulfonyle mais avec un groupe hydroxyle supplémentaire sur un cycle aromatique. En effet, aucun fragment relatif à une perte d'eau spontanée n'ayant été retrouvé, le groupe hydroxyle doit être relié à un carbone sp^2 sur le cycle aromatique, ce type de liaison étant reconnu comme stable dans le procédé de dissociation par collision avec des systèmes LC-$HRMS^n$. P_6 doit donc être un composé ayant une partie de type méthyltétrahydroquinolinol (figure 56).

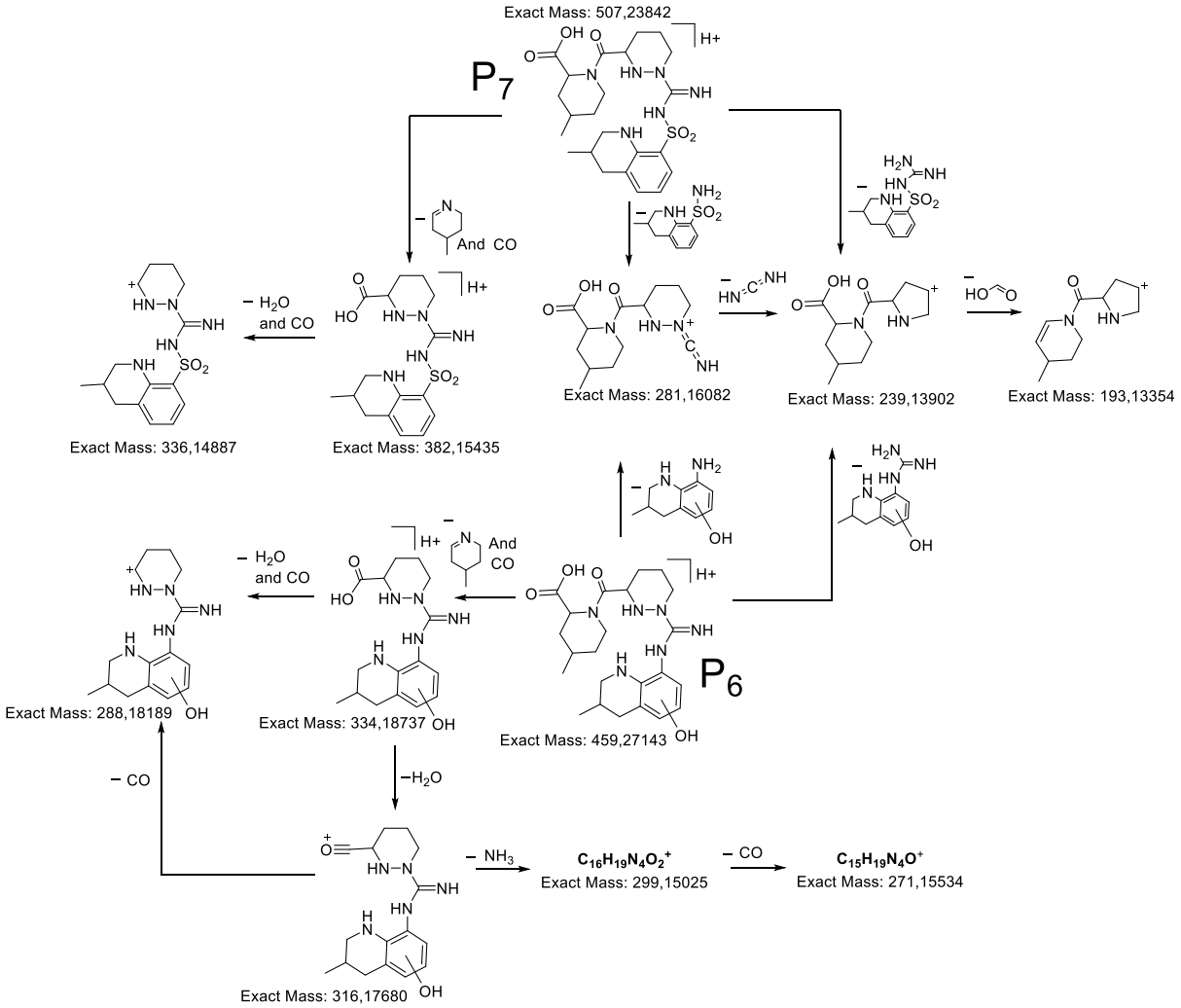


Figure 56 : structures et voies de fragmentation de P_6 et P_7.

Pour déterminer la position du groupe hydroxyle la plus probable dans le cycle aromatique de P_6, les densités des électrons frontières (Frontier Electron Density, FED) ont été calculées pour chaque atome de l'argatroban, précurseur de P_6 (figure 57). En effet, la plus haute valeur de la somme des carrés de FED_{HOMO} et de FED_{LUMO} : $FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}$ indique le site d'attaque le plus probable par un radical hydroxyle.

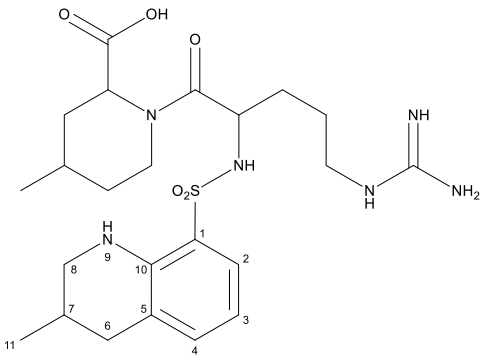


Figure 57 : numérotation des atomes pour les calculs de FED

Tableau 7 : résultats des calculs de FED pour les atomes ; la numérotation arbitraire est indiquée en figure 57.

Atome (numéro)	FED^2_{LUMO}	FED^2_{HOMO}	$FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}$
C(1)	0.25480	0.07792	0.33273
C(2)	0.21666	0.02579	0.24244
C(3)	0.00500	0.11430	0.11930
C(4)	0.26725	0.00210	**0.26935**
C(5)	0.17838	0.09551	0.27389
C(6)	0.01671	0.00557	0.02228
C(7)	0.02056	0.01558	0.03614
C(8)	0.02038	0.00882	0.02920
N(9)	0.01698	0.29103	0.30801
C(10)	0.03228	0.04581	0.07810
C(11)	0.00582	0.00239	0.00821

La figure 57 montre que seulement les carbones 2, 3 et 4 peuvent donner lieu à la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupe hydroxyle sans destruction du squelette de la molécule. Les résultats surlignés dans le tableau 7 indiquent qu'entre les trois carbones le carbone 4 est le carbone sp^2 privilégié pour l'attaque. La structure proposée pour P_6 est donc celle de l'acide 1-{1-[N-(5-hydroxy-3-méthyl-

1,2,3,4-tétrahydroquinolin-8-yl)carbamimidoyl]-1,2-diazinane-3-carbonyl}-4-méthylpipéridine-2-carboxylique (figure 58).

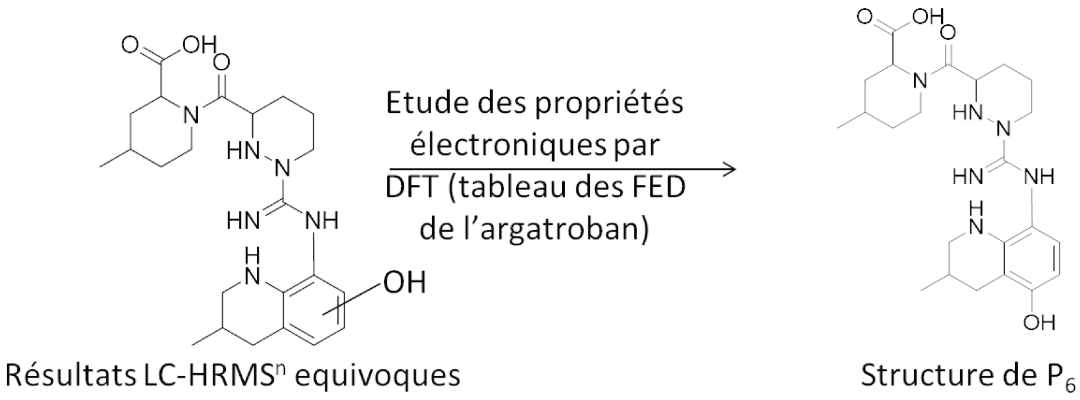


Figure 58 : structure de P_6 obtenue d'après la combinaison des approches expérimentales *et ab initio*

P_8 (figure 59) présente un spectre de masse très différent de celui de P_6 et P_7. Par exemple, les pertes de méthyltétrahydropyridine et de monoxyde de carbone, auparavant facilement détectées pour les autres photoproduits, le sont faiblement pour P_8. En revanche, une perte d'eau est l'une des transitions les plus privilégiées pour P_8 suggérant que la présence d'une amine primaire rend possible la formation d'un cycle à 6 centres à partir duquel un départ d'eau est favorisé par une diminution de l'encombrement stérique. Étant plus basique qu'un azote appartenant à un groupe diazinane, l'azote de l'amine primaire a davantage tendance à recevoir un proton, ce qui permet de promouvoir le départ d'acide 4-méthylpipéridine-2-carboxylique, comme cela est démontré par l'apparition d'un pic de base à 302 pour P_8. Le pic correspondant au départ d'acide 4-méthylpipéridine-2-carboxylique est absent pour P_6 et P_7 qui ne renferment pas d'amine primaire mais un cycle diazinane. P_8 a été identifié comme étant l'acide 1-{2-amino-5-[1-(3-méthyl-1,2,3,4-tétrahydroquinolin-8-yl)carbamimidamido]pentanoyl}-4-méthylpipéridine-2-carboxylique (figure 59).

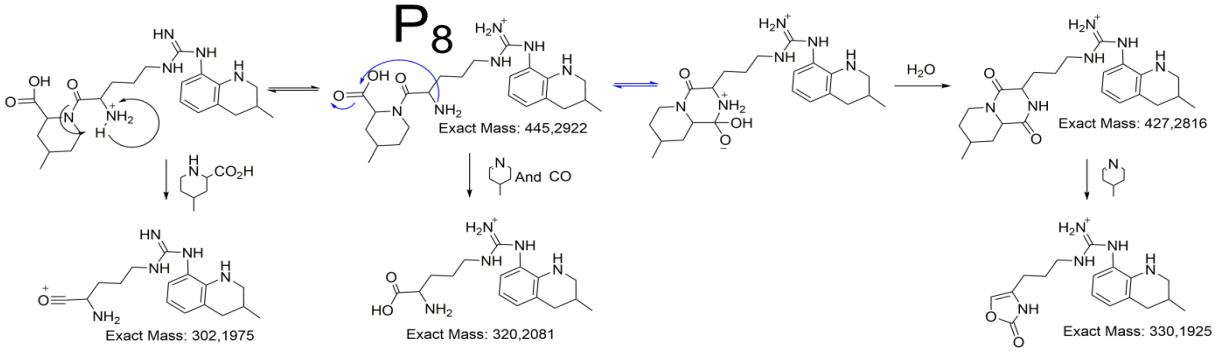


Figure 59 : structure et fragmentation de P_8.

3.3. Processus de photodégradation de l'argatroban

L'élucidation structurale des produits de photodégradation de l'argatroban a permis de proposer des mécanismes responsables de sa dégradation en présence de lumière.

L'initiation du processus de dégradation serait due à l'excitation par la lumière des molécules d'argatroban suivie de leur autoionisation conduisant à la formation de radicaux.

Étant donné les structures identifiées, il apparaît que l'azote de la partie méthyltétrahydroquinoline est le site préférentiel de formation de radicaux à l'origine des réarrangements observés par la suite.

La formation de P_1, P_3 et P_4 pourrait ainsi s'expliquer par la perte d'un proton sur l'atome d'azote de la partie tétrahydroquinoline, accompagnée d'un transfert d'électrons qui conduit à la présence du carbone radicalaire relié au sulfonyle (figure 60). Le carbone radicalaire ainsi formé peut favoriser une réaction de cassure en α aboutissant soit à la formation de P_1 (après capture d'un atome d'hydrogène au milieu), soit à un intermédiaire cyclisé (intermédiaire 1) qui peut subir une hydrolyse du groupement guanidine (formation de P_4) ou une décarboxylation radicalaire, induisant la formation d'un cycle supplémentaire (formation de P_3).

La présence des autres produits de dégradation pourrait s'expliquer par la formation d'un ion radicalaire au niveau de l'atome d'azote de la fonction amine secondaire de la partie guanidine. La perte d'un proton sur cet atome d'azote accompagnée d'un transfert d'électrons conduit à l'intermédiaire 2 qui peut se réarranger et induire :

- (i) une perte de SO_2, qui explique la formation de P_8 après capture d'un des hydrogènes du solvant et de P_5 selon le processus de migration de charge exposé dans la figure 61,
- (ii) la formation d'un cycle supplémentaire suivie d'un réarrangement qui explique la formation de P_7.

La formation de P_2 et P_6 est vraisemblablement issue de réarrangements de P_7. En effet, en solution aqueuse, la partie guanidine de P_7 peut facilement récupérer un proton. L'azote électrodéficient peut se réarranger de sorte à favoriser un départ de SO_2 conduisant au composé intermédiaire 3 à partir duquel on obtient le dérivé phénolique correspondant à P_6. P_2 est aussi formé à partir de la forme acide de P_7

qui induit des réarrangements internes menant à un clivage conduisant à la formation de l'intermédiaire 1 et de 3-méthyl-8-sulfonyl-1,2,3,4-tétrahydroquinoline. L'oxydation de cette dernière conduit à la formation de P_2.

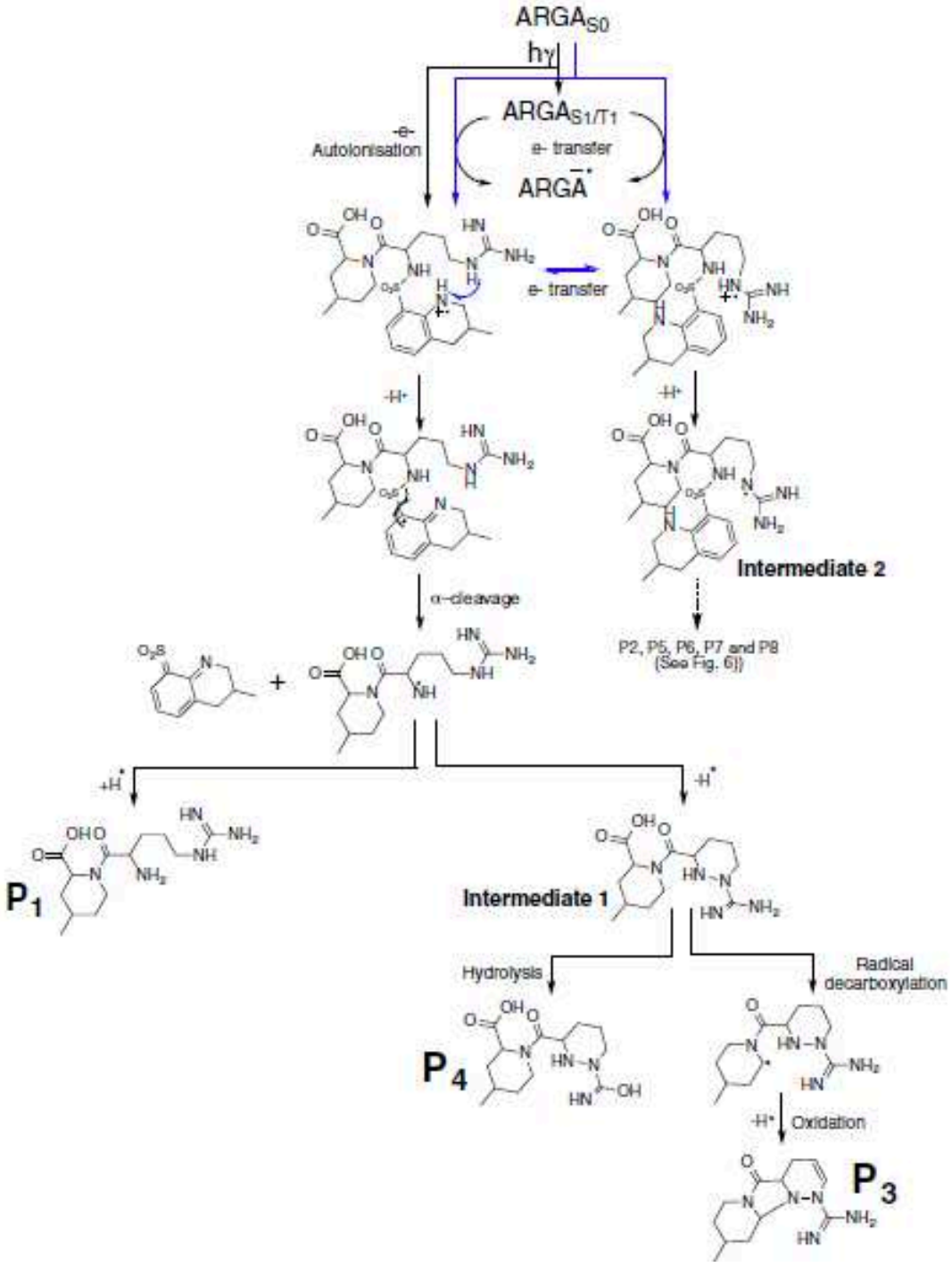


Figure 60 : processus de photodégradation de l'argatroban en solution aqueuse (1).

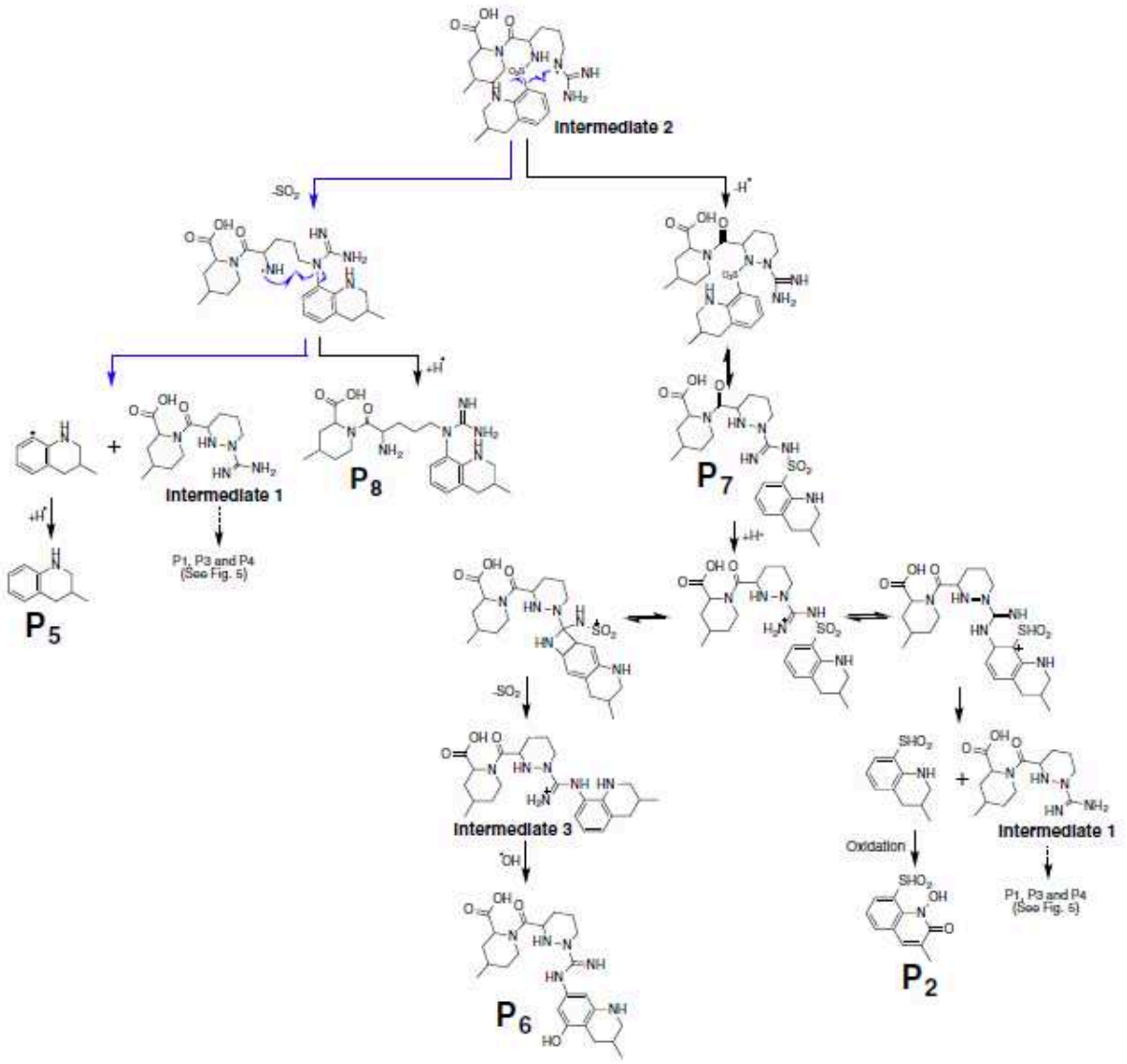


Figure 61 : processus de photodégradation de l'argatroban en solution aqueuse (2).

3.4. Processus initiant la dégradation de l'argatroban selon une approche *ab initio*

Pour évaluer les réactions énergétiquement possibles en présence de lumière, une étude *ab initio* a été menée. Les espèces engagées dans les réactions ($DRUG_{S0}$, $DRUG_{S1/T1}$ et oxygène triplet $^3O_2$), les espèces à haut pouvoir réactif (les radicaux : $DRUG^{+\bullet}$, $DRUG^{-\bullet}$, $O_2^{-\bullet}$ et l'oxygène singulet $^1O_2$) ainsi que les réactions susceptibles de survenir, par transferts électroniques et par transferts énergétiques, en milieu aqueux en présence du composé et d'oxygène sont résumées ci-dessous (figure 62).

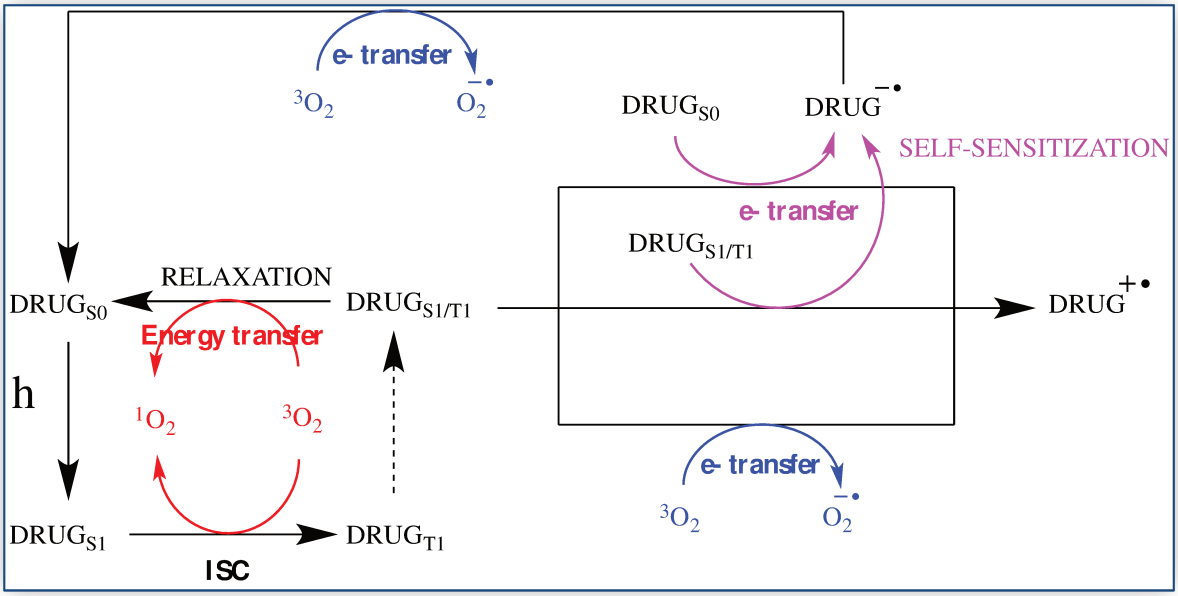


Figure 62 : devenir du principe actif (DRUG) en solution aqueuse, en présence d'oxygène et exposé à la lumière

Les énergies de chacun des réactants et des produits ont été calculées grâce au logiciel Gaussian 9.0. La théorie de la fonctionnelle de la densité et le modèle B3LYP/6-31G(d,p) ont été employés pour calculer les énergies des différents états énergétiques de l'argatroban conformément aux données du chapitre 2.

Les réactions thermodynamiquement possibles telles que les transferts d'électrons et d'énergie ont été déterminées en appliquant la méthodologie employée pour étudier la photochimie de composés organiques utilisés comme écrans solaires (Zhang et al., 2010 ; Zhou et al., 2013).

3.4.1. Réactions par transfert d'électrons

Ce mécanisme est rapporté sur la figure 62 et correspond aux transferts bleus et violets. Pour connaître les transferts d'électrons possibles, les énergies d'ionisation (E_i) et d'affinité électronique (E_a) des niveaux énergétiques de l'argatroban (S_0, S_1 et T_1) ont été calculées.

Les résultats obtenus sont portés dans le tableau 8.

Tableau 8 : énergies d'ionisation (E_i) et d'affinité électronique (E_a) des différents niveaux énergétiques de l'argatroban exprimées en eV.

$E_{i,S0}$(ARGA)	$E_{a,S0}$(ARGA)	$E_{i,S1}$(ARGA)	$E_{a,S1}$(ARGA)	$E_{i,T1}$(ARGA)	$E_{a,T1}$(ARGA)
6.951	0.836	2.970	-3.144	3.725	-2.389

Hormis la réaction de transfert électronique entre deux $ARGA_{S1,}$ les autres réactions semblent beaucoup moins probables dans la mesure où les valeurs de variation d'enthalpie libre sont supérieures à zéro (tableau 9).

La possibilité de transfert d'électron entre des molécules portées à l'état excité (2 états S_1) de l'argatroban confirme son aptitude à s'auto-ioniser et donc à se dégrader (figure 60) sans l'intervention d'autres espèces jouant le rôle de photosensibilisants (tableau 9).

Tableau 9 : variations d'enthalpie libre (en eV) de transferts électroniques.

Réaction évaluée	Critères d'évaluations et résultats
$ARGA^*_{S1/T1} + ARGA_{S0} \rightarrow ARGA^{+\cdot} + ARGA^{-\cdot}$	$\Delta G_3 = E_{a,S0}(ARGA) + E_{i,S1/T1}(ARGA)$ = 3,806(S1) ; 4,561(T1) $\Delta G_4 = E_{a,S1/T1}(ARGA) + E_{i,S0}(ARGA)$ =3,707(S1) ; 4,562(T1)
$ARGA^*_{S1/T1} + ARGA^*_{S1/T1} \rightarrow ARGA^{+\cdot} + ARGA^{-\cdot}$	$\Delta G_5 = E_{a,S1}(ARGA) + E_{i,S1}(ARGA) =$ **- 0,174** $\Delta G_6 = E_{a,T1}(ARGA) + E_{i,T1}(ARGA) = 1,336$ $\Delta G_7 = E_{a,S1}(ARGA) + E_{i,T1}(ARGA) = 0,581$ $\Delta G_8 = E_{a,T1}(ARGA) + E_{i,S1}(ARGA) = 1,336$

3.4.2. Réactions par transfert d'énergie

Les réactions par transfert d'énergie sont présentées sur la figure 62. Pour déterminer les transferts énergétiques possibles dans le cadre des interactions bimoléculaires décrites dans la figure 62, il était nécessaire de déterminer les énergies de transfert mises en jeu selon ce qui est décrit dans le tableau 10. Les valeurs de l'énergie des différents états des molécules d'argatroban et de dioxygène ont été obtenues soit avec l'approche *ab initio* (mêmes conditions de modélisation que celles mentionnées ci-dessus) pour l'argatroban : E_{S1} = 3,981 eV ; E_{T1} = 3,226 eV, (par rapport à E_{S0} pris égal à 0) soit à partir des valeurs extraites de la littérature pour les énergies des deux états d'excitation du dioxygène (E_{Σ} = 1,627 eV ; E_{Δ} = 0,974 eV) par rapport à l'énergie de l'état fondamental prise égale à 0 (tableau 10).

Tableau 10 : évaluation des réactions possibles par transfert d'énergie.

Réaction évaluée	Critère d'évaluation et résultat
$ARGA^{*}_{S1} + {}^{3}O_2({}^{3}\Sigma_g^{-}) \rightarrow ARGA^{*}_{T1} + {}^{1}O_2({}^{1}\Sigma_g^{+})$	$E_{\Sigma} - E_{S1} + E_{T1} = 0,872$
$ARGA^{*}_{S1} + {}^{3}O_2({}^{3}\Sigma_g^{-}) \rightarrow ARGA^{*}_{T1} + {}^{1}O_2({}^{1}\Delta_g)$	$E_{\Delta} - E_{S1} + E_{T1} = 0,119$
$ARGA^{*}_{T1} + {}^{3}O_2({}^{3}\Sigma_g^{-}) \rightarrow ARGA_{S0} + {}^{1}O_2({}^{1}\Sigma_g^{+})$	$E_{\Sigma} - E_{T1} =$ **-1,599**
$ARGA^{*}_{T1} + {}^{3}O_2({}^{3}\Sigma_g^{-}) \rightarrow ARGA_{S0} + {}^{1}O_2({}^{1}\Delta_g)$	$E_{\Delta} - E_{T1} =$ **-2,252**

Compte tenu des valeurs négatives correspondant aux réactions impliquant l'oxygène, le rôle de ce dernier dans le processus de photooxydation est thermodynamiquement possible ce qui conforte les résultats expérimentaux obtenus. En d'autres termes, l'oxygène triplet $^{3}O_2$ est excité en oxygène singulet $^{1}O_2$ par transfert énergétique de l'argatroban à l'état triplet.

Par contre la quantité d'énergie issue de la conversion intersystème c'est-à-dire le passage de l'argatroban de l'état excité singulet $ARGA^{*}_{S1}$ à l'état triplet $ARGA^{*}_{T1}$ n'est pas suffisante pour faire passer l'oxygène de son état triplet $^{3}O_2$ vers un état singulet $^{1}O_2$ réactif.

3.5. Étude *in silico* de la toxicité potentielle des produits de photodégradation de l'argatroban

Comme cela a été discuté dans l'article 2, au regard des structures obtenues, un des produits de dégradation de l'argatroban (P_2, figure 63) pourrait présenter des propriétés pro-oncogènes en induisant des dommages sur l'ADN. En effet P_2 présente un groupe hydroxylamine faisant partie d'un cycle aromatique reconnu pour favoriser la formation de radicaux libres (Evelo et al., 1998). Cependant, le risque semble réduit étant donné la faible durée de traitement prévue pour cet anticoagulant injectable puisqu'un relai par voie orale doit en général être mis en place rapidement.

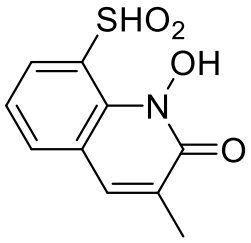


Figure 63 : structure de P_2.

En complément de ces données, en raison de l'activité anticoagulante de l'argatroban, nous avons considéré qu'il était aussi intéressant de déterminer si les produits de photodégradation ont d'une part conservé cette activité pharmacologique et présentent, par ailleurs, une aptitude à traverser la barrière hémato-encéphalique(BHE), auquel cas il est à craindre des effets indésirables de type saignements intracrâniens. Dans le cadre de cette thèse, seule une étude *in silico* a été réalisée en première approche en utilisant un ensemble de logiciels proposé par l'Institut Suisse de bioinformatique (Gfeller et al., 2014).

Dans un premier temps, l'activité pharmacologique de l'argatroban et des produits de dégradation a été évaluée via le logiciel Swiss Target Prediction accessible en ligne. Le site permet de déterminer les cibles pharmacologiques d'une petite molécule au travers de la recherche de similitudes structurales (2D et 3D) avec une librairie de 280 000 molécules reconnues comme actives sur 2000 cibles.

L'aptitude à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) des produits a aussi été estimée par le logiciel Swiss ADME qui propose de déterminer des propriétés pharmacocinétiques au regard des propriétés physico-chimiques.

Les résultats obtenus sont produits ci-dessous.

Tableau 11 : résultats obtenus avec les logiciels Swiss Target Prediction et Swiss ADME. * : plus de 50% de chance que le composé passe la BHE.

Composé évalué	Passage de la BHE	Cibles pharmacologiques probables
Argatroban	Non	Protéines à activité sérine protéases : chaîne 1 de l'alpha trypsine, trypsine 2 et 3, plasmine
P_1	Non	Nombreuses et différentes de celles de l'argatroban
P_2	Non	Aucune
P_3	Non	
P_4	Non	
P_5	**Oui***	
P_6	Non	
P_7	Non	Identiques à l'argatroban
P_8	Non	

Parmi les produits de dégradation, tout comme l'argatroban seuls P_7 et P_8 sont susceptibles d'avoir une activité sur la thrombine, il est donc probable que ces derniers restent actifs. Néanmoins, eux non plus ne traversent pas la BHE, ce qui suggèrerait que la formation de ces composés n'induit pas de risque d'hémorragie intracrânienne (tableau 11).

Inversement, P_5 (figure 64) traverserait la barrière hémato-encéphalique mais est dépourvu d'activité anticoagulante (tableau 11). Il est donc très probable qu'il n'induise pas d'effet au niveau cérébral.

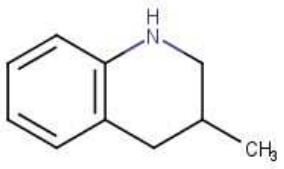


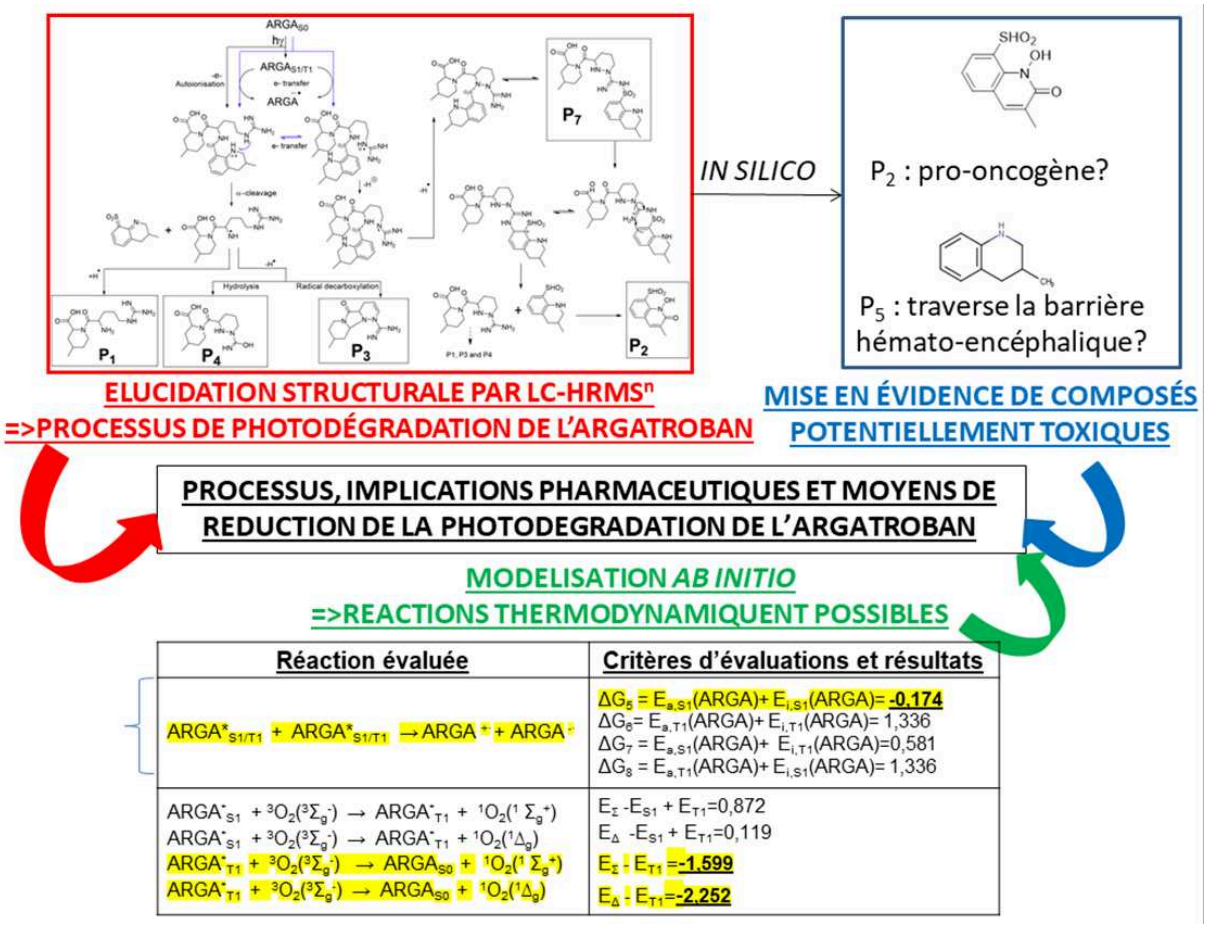
Figure 64 : structure de P_5

4. Conclusion

L'élucidation de la structure des huit produits de photodégradation majoritaires combinée à des études *in silico* a donné de premiers éléments sur les impacts pharmaco-toxicologiques potentiels des produits de dégradation. Certains produits de dégradation présenteraient un potentiel mutagène ou seraient à risque de traverser la barrière hémato-encéphalique, de sorte que ceux-ci nécessiteraient une évaluation plus approfondie de leurs potentiels toxiques, seul ou en mélange, et éventuellement, une évaluation complémentaire par d'autres approches (*in vitro*).

La caractérisation des processus de photodégradation obtenue par approche expérimentale et théorique a montré, qu'après excitation, l'argatroban serait capable de s'auto-ioniser mais aussi de conduire à la formation d'oxygène singulet, ces deux processus pouvant faciliter la dégradation de l'argatroban. Ainsi, l'emploi de substances capables d'entrer en compétition avec les phénomènes de transfert électronique entre deux molécules d'argatroban est un moyen de protection à évaluer. D'autre part, l'ajout de substances limitant les transferts d'énergie entre l'argatroban et l'oxygène et/ou limitant l'action de l'oxygène singulet pourrait permettre de limiter la dégradation de l'argatroban. (Janga et al., 2018).

Les résultats obtenus permettront des optimisations visant à réduire la photodégradation de l'argatroban et son impact sur les patients, dans un contexte d'erreur possible de manipulation ou de mésusage de la solution injectable existante (figure 65). Cependant, d'autres approches expérimentales devront être employées pour vérifier ces hypothèses et l'impact de ces préconisations.



Réaction évaluée	Critères d'évaluations et résultats
$ARGA^{*}_{S1/T1} + ARGA^{*}_{S1/T1} \rightarrow ARGA^{+} + ARGA^{-}$	$\Delta G_5 = E_{a,S1}(ARGA) + E_{i,S1}(ARGA) = \underline{-0,174}$ $\Delta G_6 = E_{a,T1}(ARGA) + E_{i,T1}(ARGA) = 1,336$ $\Delta G_7 = E_{a,S1}(ARGA) + E_{i,T1}(ARGA) = 0,581$ $\Delta G_8 = E_{a,T1}(ARGA) + E_{i,S1}(ARGA) = 1,336$
$ARGA^{\cdot}_{S1} + {}^3O_2({}^3\Sigma_g^-) \rightarrow ARGA^{\cdot}_{T1} + {}^1O_2({}^1\Sigma_g^+)$ $ARGA^{\cdot}_{S1} + {}^3O_2({}^3\Sigma_g^-) \rightarrow ARGA^{\cdot}_{T1} + {}^1O_2({}^1\Delta_g)$ $ARGA^{\cdot}_{T1} + {}^3O_2({}^3\Sigma_g^-) \rightarrow ARGA_{S0} + {}^1O_2({}^1\Sigma_g^+)$ $ARGA^{\cdot}_{T1} + {}^3O_2({}^3\Sigma_g^-) \rightarrow ARGA_{S0} + {}^1O_2({}^1\Delta_g)$	$E_\Sigma - E_{S1} + E_{T1} = 0,872$ $E_\Delta - E_{S1} + E_{T1} = 0,119$ $E_\Sigma - E_{T1} = \underline{-1,599}$ $E_\Delta - E_{T1} = \underline{-2,252}$

Figure 65 : synthèse des résultats et des implications de la photodégradation de l'argatroban.

Article 2 : photodegradation of aqueous argatroban investigated by LC/MS^n : photoproducts, transformation processes and potential implications.

Philippe-Henri Secrétan, Maher Karoui, Mélisande Bernard, Najet Yagoubi and Bernard Do. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, aout 2016. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.08.033.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 131 (2016) 223–232

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpba

Photodegradation of aqueous argatroban investigated by *LC/MS*^{n}: Photoproducts, transformation processes and potential implications

Philippe-Henri Secrétan[a,*,1], Maher Karoui[a,b,1], Mélisande Bernard[a,c], Noureddine Ghermani[d], Fathi Safta[b], Najet Yagoubi[a], Bernard Do[a,e]

[a] University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, Laboratory "Matériaux et Santé" EA 401, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France
[b] University of Monastir, Department of Pharmacy, Analytical Chemistry Laboratory, rue Ibn Sina, 5000 Monastir, Tunisie
[c] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Agence Générale des Equipements et Produits de Santé, Quality Control and Analytical Development Laboratory, 7 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France
[d] University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, CNRS UMR 8612 Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France
[e] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Henri Mondor, Department of Pharmacy, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 June 2016
Received in revised form 25 August 2016
Accepted 27 August 2016
Available online 29 August 2016

Keywords:
Argatroban
LC–MS^n
Radical initiation sites
Fragmentation pattern
Drug degradation
Photodegradation pathways

ABSTRACT

Argatroban (ARGA), used as intravenous anticoagulant drug, has been reported to photodegrade under light exposure, requiring specific precautions at handling, storage and administration. Thus, for the first time, aqueous ARGA photodegradation under aerobic conditions has been described in terms of photoproducts, phototransformation processes and potential implications. ARGA significant photoproducts were successfully separated and characterized by gradient reversed-phase liquid chromatography coupled with high-resolution multistage mass spectrometry (LC/HR–MS^n). Hitherto still not available in literature, ARGA in-depth fragmentation study was conducted so as to thoroughly sort out the main mechanisms specific to the molecule and therefore, to propose a fragmentation pattern relevant to the identification of ARGA related substances. Thereafter, in view of the structural characteristics of the photoproducts formed, ARGA photodegradation pathways could be worked out, showing that whether by direct photolysis or through photosensitization, the methyltetrahydroquinoline nitrogen and that of guanidine group would be mainly involved in photolysis initiation reactions, through one-electron oxidation along with proton loss. Desulfonation, cyclisation affording compounds of diazinane type, and/or rearrangements with transfer of the methyltetrahydroquinoline group toward the guanidine function were observed accordingly. Having a good insight into ARGA photodegradation pathways allows for consistent measures in view of mitigating or avoiding the drug decay and the related potential effects.
© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Argatroban, ((2*R*,4*R*)-1-[(2*S*)-5-(diaminomethylideneamino)-2-[[(3*R*)-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-8-yl]sulfonylamino]pentanoyl]-4-methyl-piperidine-2-carboxylic acid) is a powerful anticoagulant and antithrombotic agent [1,2]. In view of the specific recommendations regarding light exposure during handling, storage and manufacturing, it seems obvious that ARGA, formulated as injectable solution, may decompose under light exposition [3,4]. The drug decay was notably evidenced through experimental studies and this, with respect to two tested wavelengths, i.e. 282 and 308 nm [5]. Outside quantitative information describing ARGA decrease as a function of time, one can regret lack of data relating to ARGA photoproducts, being the other side of ARGA photodegradation and usefully contributing to toxicological risk assessment [6–9]. Using a piecemeal approach, it was possible to get a brief, but not necessarily relevant, insight into how some of the chemical groups ARGA is composed of, may react over light exposition. The molecule, in overall, is made of 4 parts: oxopiperidine, arylsulfonamide, tetrahydroquinoline and alkylguanidine (Fig. 1a).

Photoreactivity upon light exposure of guanidine-based and oxopiperidine-based derivatives are not well described in literature. By contrast, reactivity of those made of sulfonamides

* Corresponding author.
E-mail address: philippe-henri.secretan@u-psud.fr (P.-H. Secrétan).
[1] The first 2 authors contributed equally to this study and are therefore considered as first authors.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.033
0731-7085/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

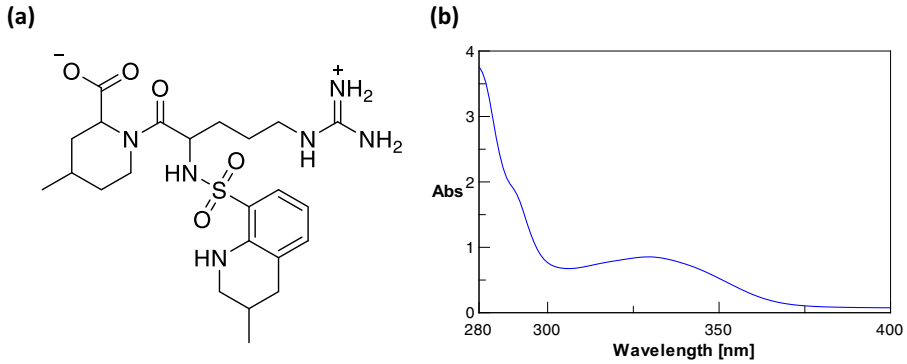


Fig. 1. ARGA major protonation state at pH 6.40 (a) along with absorption spectrum recorded in aqueous solution (b).

and quinoline groups, with respect to light, has been reported. Sulfonamides were shown to photodegrade by various ways leading to desulfonation, dimerization or hydrolysis [10]. Quinoline derivatives may undergo hydroxyl radical attacks notably due to photocatalysts [11]. However, whether some of these data may allow to make preliminary assumptions related to ARGA, one still needs to have in mind that photodegradation reactivity is strongly dependent upon the idiosyncratic electronic cloud, i.e. conformation of the molecule structure.

As a result, the aim of this study was to investigate ARGA's behaviour in aqueous solution exposed to an artificial solar light source. The photoproducts formed were detected and characterized using LC/HR-MS^n, method being increasingly and successfully used for structural characterization of degradation products [12–16]. Frontier electron density was determined as complementary element of the characterization process for the cases where the mass data are not sufficient to allow pinpointing any substitution on the aromatic ring. From the possible structures thus established, ARGA's photodegradation pathways were elucidated and accordingly, some relevant measures aiming at mitigating the drug decay were proposed.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

Argatroban monohydrate (purity > 98%) and analytical grade acetonitrile came from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Ultrapure water was produced by the Q-Pod Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

2.2. Preparation of samples

Stock standard solution was prepared by dissolving ARGA in water so as to obtain a final concentration of 80 μg mL^{-1} and allocated in Pyrex glass vials (working samples), hermetically sealed. The corresponding pH, measured by pH meter 1140 (Mettler Toledo, Switzerland) ranged from 6.31 to 6.52.

To generate photodegradation products, working samples were exposed to artificial weathering light, using a xenon test chamber Q-SUN Xe-1 operating in window mode. The light beam, presenting a characteristic spectrum ranging from 300 to 800 nm, was delivered at an intensity of 1.50 W/m^2 at 420 nm (UV irradiance from 300 to 400 nm: 66.5 W/m^2; illuminance: 119.6 klx). Samples were withdrawn at various intervals of time (15–30–60–90–120 min) and analysed using LC/HR–MS^n.

2.3. Separation conditions

Chromatographic separations were achieved using a Dionex UltiMate 3000 HPLC system (Les Ulis, France) controlled by Chromeleon® software version 6.80 SR11 (Dionex, Les Ulis, France). The analytical column was a Kinetex™ C18, LC Column (250 × 4.6 mm i.d, 5 μm) maintained at 30 °C. The flow-rate and the injection volume were set at 1 mL min^{-1} and 100 μL, respectively. In order to separate and detect compounds over a wide range of polarity, the mobile phase, composed of water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), was set in gradient mode (0–2 min: 95% A; 2–30 min: 95 → 0% A; 30–35 min: 0 → 95% A; followed by equilibration for 2 min). The flow-rate entering the mass spectrometer was decreased down to 0.3 mL min^{-1} using a 1/3 T split. The photoproducts accurate mass was determined using HRMS in full scan mode in the absence of collision induced dissociation. Quantification of the drug, as to it, was carried out using UV spectrometer as detector at 260 nm. Kinetics order, the rate constant (k) of degradation and half-life ($t_{1/2}$) of ARGA were determined from experimental data.

2.4. Mass detection conditions

LC/HR-MS^n was performed by coupling the same LC system to an electrospray-LTQ-Orbitrap Velos Pro system. Thereof is composed of a double linear trap and an orbital trap (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Source conditions were optimised so to obtain the best signal to noise ratio using native stock solution. Analyses were carried out in positive ion mode (ESI$^+$) as per the following conditions: the source voltage was set at 3.4 kV, the source and the capillary temperatures were fixed at 300 °C and 350 °C, respectively. Sheath gas and auxiliary gas nitrogen flows were set at 35 and 15 arbitrary units, respectively. S-lens was set at 60%. Normalized collision was set at 35 for high-resolution fragmentation studies. The mass range of 100–1200 amu was used for preliminary HRMS studies and that of 50–600 amu, for HRMS^n studies. The MS data were processed using Xcalibur® software (version 2.2 SP 1.48).

Table 1 Relative retention times (rRTs), accurate masses with errors, elemental compositions, MS^n modes and structures for relevant product ions of argatroban and photoproducts.

3. Results and discussion

3.1. Kinetics of argatroban photodegradation

Photostability of ARGA at 80 μg mL^{-1} was studied over the spectrum range of 300–800 nm. As aqueous ARGA absorbs light in this area with a maximum at 333 nm (Fig. 1b), the drug may undergo direct photolysis as well as self-sensitization [17]. A total of eight photoproducts were highlighted after 60 min time, corresponding

Table 1
Relative retention times (rRTs), accurate masses with errors, elemental compositions, MS^n modes and structures for relevant product ions of argatroban and photoproducts.

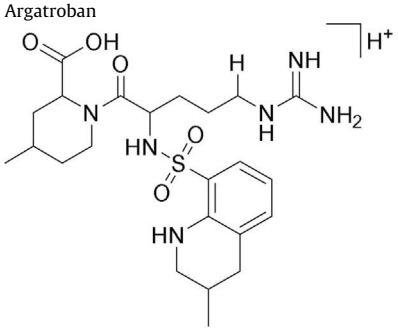
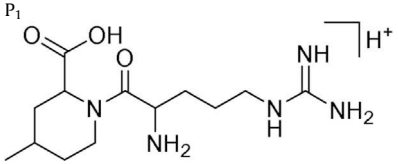
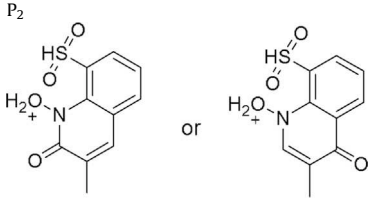
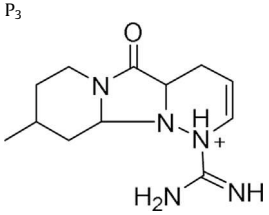
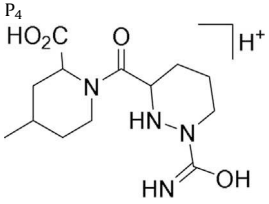
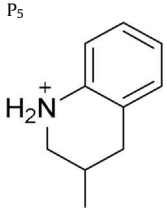
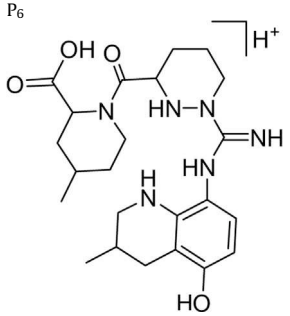
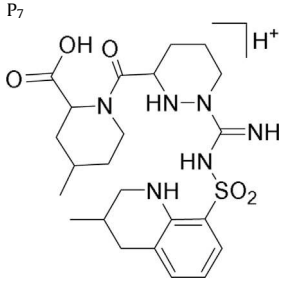
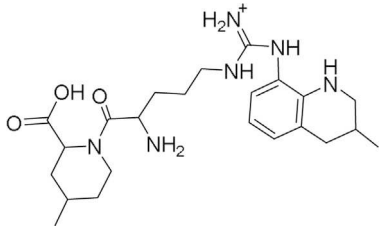
Compound	MS^n mode	Best possible elemental formula	Accurate mass *m/z*	Relativeerror (ppm)	rRT[a]
Argatroban 	Precursor ion	$C_{23}H_{37}N_6O_5S^+$	509.25220	−3.67	1
	MS^2 (509 →)	$C_{16}H_{26}N_5O_4S^+$	384.16996	−0.10	
		$C_{13}H_{24}N_5O_5S^+$	362.14932	0.14	
		$C_{10}H_{14}N^+$	148.11178	−2.03	
	MS^3 (509 → 384 →)	$C_6H_{13}N_4O_4S^+$	237.06488	−1.35	
		$C_5H_{13}N_4O_3S$+	209.07021	−0.38	
		$C_6H_{13}N_4O^+$	157.10823	−1.02	
		$C_5H_{13}N_4^+$	129.11327	−1.55	
	MS^3 (509 → 362 →)	$C_{12}H_{24}N_5O_4S^+$	334.15410	−0.75	
		$C_{13}H_{24}N_5O_2^+$	282.19200	−1.59	
		$C_{12}H_{24}N_5O^+$	254.19733	−0.83	
		$C_6H_{13}N_4O_4S^+$	237.06507	−0.55	
P_1 	Precursor ion	$C_{13}H_{26}N_5O_3^+$	300.20212	−3.00	0.3
	MS^2 (300 →)	$C_{13}H_{24}N_5O_2^+$	282.19284	1.38	
		$C_6H_{15}N_4O_2^+$	175.11897	0.11	
P_2 	Precursor ion	$C_{10}H_{10}NO_4S^+$	240.03194	−2.33	0.36
	MS^2 (240 →)	$C_{10}H_8NO_3S^+$	222.02187	−0.32	
		$C_{10}H_8NO_2^+$	174.05498	0.17	
		$C_{10}H_8NO^+$	158.06001	−0.19	
		$C_9H_8NO^+$	146.06038	2.33	
		$C_9H_8N^+$	130.06502	−0.85	
P_3 	Precursor ion	$C_{12}H_{20}N_5O^+$	250.16518	−4.24	0.42
	MS^2 (250 →)	$C_{12}H_{17}N_4O^+$	233.13976	0.30	
		$C_{12}H_{18}N_5^+$	232.15592	1.08	
		$C_{11}H_{20}N_5^+$	222.17144	0.54	
		$C_{11}H_{15}N_2O^+$	191.11809	1.05	
		$C_{11}H_{16}N_3^+$	190.13417	1.58	
		$C_6H_{13}N_2^+$	113.10727	−0.44	
	MS^3 (250 → 191 →)	$C_6H_{10}N^+$	96.08064	−1.46	
P_4 	Precursor ion	$C_{13}H_{23}N_4O_4^+$	299.17042	−3.21	0.52
	MS^2 (299 →)	$C_{12}H_{19}N_2O_3^+$	239.13919	0.71	
		$C_6H_{12}N_3O_3^+$	174.08733	0.06	
		$C_6H_{10}N_3O_2^+$	156.07689	0.90	
		$C_5H_{10}N_3O^+$	128.08182	−0.16	
		$C_5H_8NO_2^+$	114.05490	−0.88	

Table 1 (*Continued*)

Compound	MS^n mode	Best possible elemental formula	Accurate mass *m/z*	Relativeerror (ppm)	rRT[a]
P_5 	Precursor ion MS^2 (148 →)	$C_{10}H_{14}N^+$ $C_7H_8N^+$	148.11178 106.06506	−2.03 −0.38	0.6
P_6 	Precursor ion MS^2 (459 →)	$C_{23}H_{35}N_6O_4^+$ $C_{16}H_{24}N_5O_3^+$ $C_{16}H_{22}N_5O_2^+$ $C_{16}H_{19}N_4O_2^+$ $C_{15}H_{22}N_5O^+$ $C_{13}H_{21}N_4O_3^+$ $C_{15}H_{19}N_4O^+$ $C_{12}H_{19}N_2O_3^+$ $C_6H_{10}N_3O_2^+$ $C_{11}H_{17}N_2O^+$	459.27081 334.18784 316.17728 299.15079 288.18237 281.16113 271.15543 239.13919 156.07695 193.13394	−1.35 1.41 1.52 1.81 1.67 1.10 0.33 0.71 0.96 2.07	0.73
P_7 	Precursor ion MS^2 (507 →)	$C_{23}H_{35}N_6O_5S^+$ $C_{16}H_{24}N_5O_4S^+$ $C_{15}H_{22}N_5O_2S^+$ $C_{13}H_{21}N_4O_3^+$ $C_{12}H_{19}N_2O_3^+$ $C_{11}H_{17}N_2O^+$ $C_{10}H_{15}N_2O_2S^+$	507.23679 382.15475 336.14938 281.16132 239.13931 193.13405 227.08516	−3.21 1.05 1.52 1.78 1.21 0.67 1.28	0.88
P_8 	Precursor ion MS^2 (445 →)	$C_{23}H_{37}N_6O_3^+$ $C_{23}H_{35}N_6O_2^+$ $C_{17}H_{24}N_5O_2^+$ $C_{16}H_{26}N_5O_2^+$ $C_{16}H_{24}N_5O^+$ $C_{16}H_{21}N_4O^+$ $C_{15}H_{19}N_2O^+$	445.29053 427.28217 330.19319 320.20867 302.19821 285.17135 243.14949	−3.68 1.33 2.24 1.78 2.22 1.26 1.23	1.17

[a] Argatroban's retention time: 17.6 min.

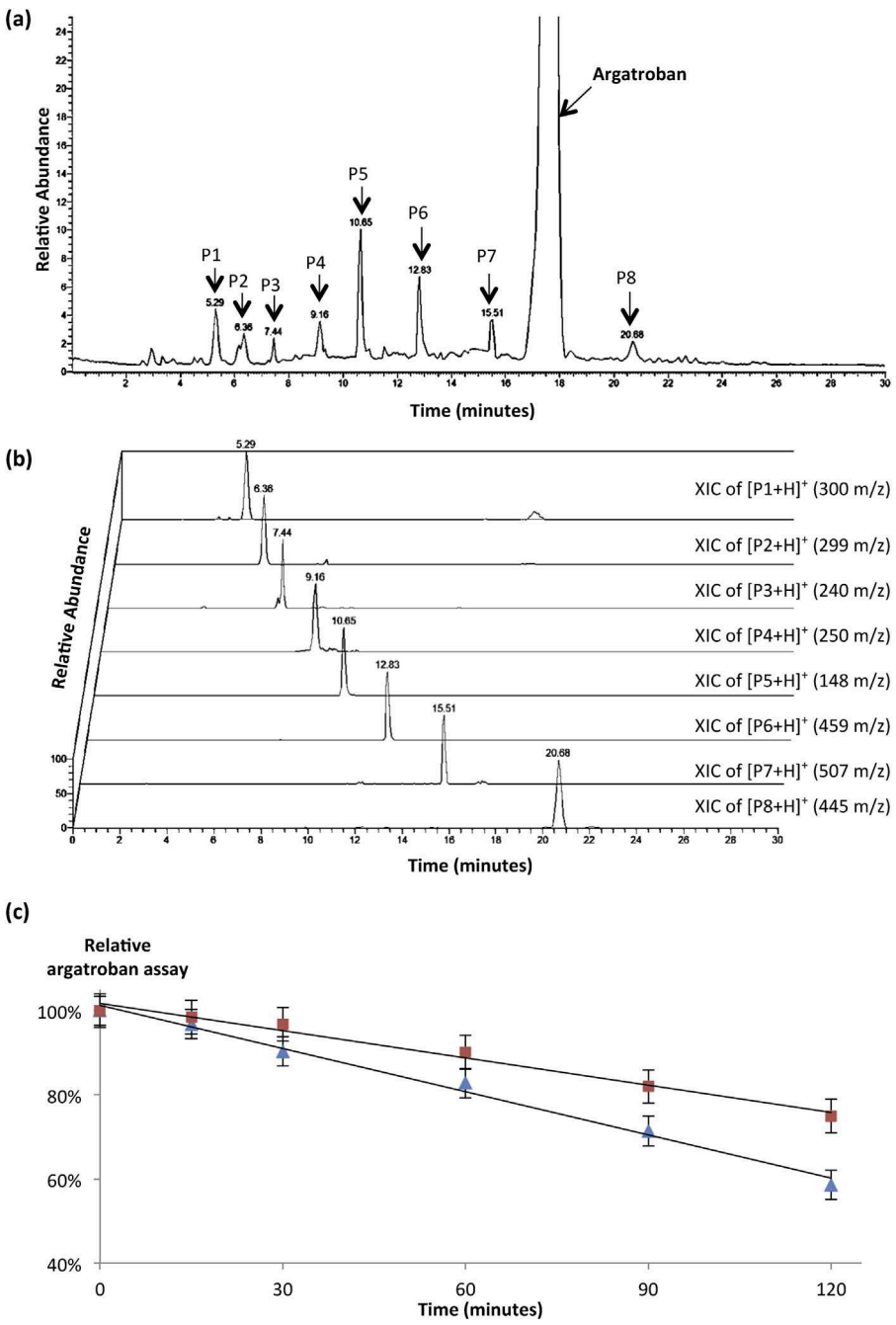


Fig. 2. ARGA photodegradation: (a) Total ion chromatogram at 60 min time of exposition to simulated sunlight; (b) Extracted ion chromatograms (XIC) of the detected photoproducts; (c) Drug decay as a function of time with (■) and without (▲) oxygen depletion.

to 17% ARGA loss. These latter were arbitrarily named "P_n" and numbering was made according to their elution order (Fig. 2a and b).

Based upon the experimental data (Fig. 2c), it seems that aqueous ARGA photodegraded as per a zero order kinetic. Under these weathering conditions, the constant rate of degradation and the half-life of drug were 0.0401 μmol L^{-1} h^{-1} and 3.40 h, respectively.

3.2. Argatroban fragmentation pattern

Hitherto not available in literature, a comprehensive study of the drug fragmentation pattern was carried out, being a key part of the photoproducts identification process. The product ions' structures were systematically confirmed through the elemental composition determination based upon accurate mass measurement. These data were reported in Table 1 and the proposed fragmentation pattern for ARGA has been built from multistage ESI^+/$HR\text{-}MS^n$ data (Fig. 3).

The MS^2 spectrum of protonated ARGA mainly exhibits a base peak at m/z 384 corresponding to $(ARGA{+}H\text{-}C_6H_{11}N\text{-}CO)^+$. The latter is much more intense than the other product ions. As shown in Fig. 3, it would be formed through transfer of the hydroxyl group from the carboxylic acid carbon atom linked to methylpiperidine to the carbonyl carbon atom of the amide bond, leading to a five-centered transition state. This process depends on protonation of the amide oxygen atom, followed by a concerted hydroxyl group transfer to the amide carbonyl carbon with elimination of methyltetrahydropyridin and carbon monoxide. Given the relative proton affinities of the six nitrogen-containing functional groups

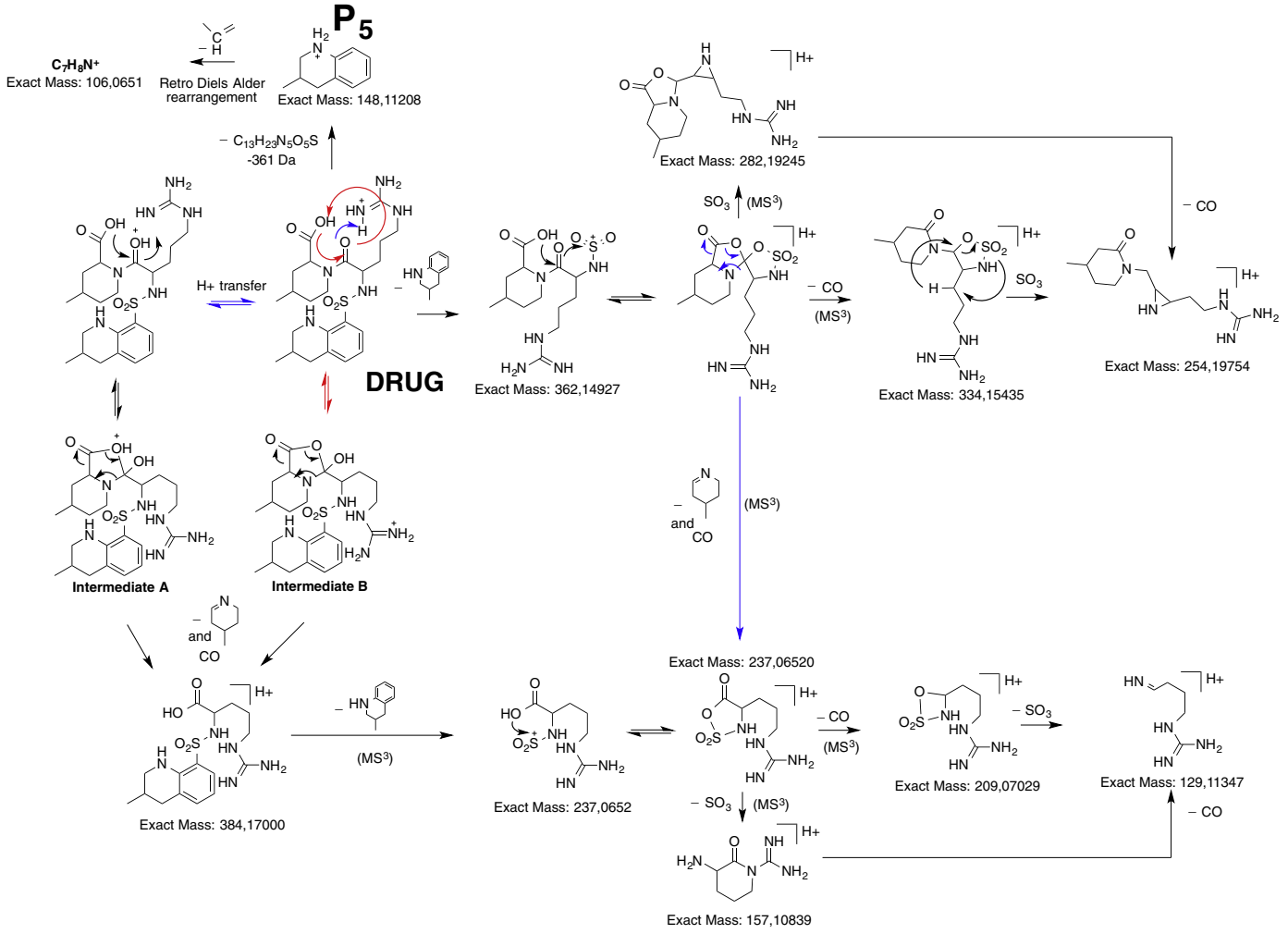


Fig. 3. Proposed fragmentation patterns for protonated ARGA and P_5.

in the molecule, assumed to the most probable sites of protonation, it seemed quite unlikely that a large enough portion of the $[M+H]^+$ ion population attained the necessary structure to initiate the fragmentation scheme leading to the base peak ion at *m/z* 384 (Fig. 3). Actually, the imine nitrogen of the guanidine group would be the predominate site of protonation, then some considerable degree of proton mobility would need to precede fragmentation in order to produce the requisite protonated amide ion structure leading to Intermediate A (Fig. 3). However, a ten-centered transition state geometry would still make possible the proton transfer between the imine nitrogen and the amide oxygen atom, although the respective proton affinities of these two functional groups do not greatly favour the transfer process. Another possible explanation for the elimination of tetrahydropyridin and carbon monoxide would invoke a charge-remote mechanism. This mechanism depends neither on the initial location of the ionizing proton nor its mobility. It could be due to electrophilic attack of the amide carbonyl carbon on the lone pair electrons of the carboxylic acid hydroxyl oxygen atom through a five-centered transition state (Intermediate B, Fig. 3). A similar mechanism was also proposed to explain the departure of dihydropyrrole and CO from protonated lisinopril [18].

Aside from this rearrangement-elimination process, protonated ARGA can also undergo loss of NH_3 or again of methyltetrahydroquinoline $(ARGA+H-C_{10}H_{13}N)^+$. As it has been reported for aromatic sulfonamides [19], a direct cleavage of the Ar-S bond can occur, thus releasing an aminodioxo-sulfanylium ion at *m/z* 362, seat of further nucleophile attacks, as shown in Fig. 3. These attacks led to an intermediate state as per which, it was possible to consider elimination of sulphur trioxide (362 → 282), CO (362 → 334) or $C_6H_{11}N$ plus CO (362 → 237), observed when *m/z* 362 ion was taken as precursor for MS^3 studies. The ion at *m/z* 237 $[(ARGA+H-C_6H_{11}N-CO)-C_{10}H_{13}N]^+$ is also a product ion of the aforementioned *m/z* 384 ion, being generated in MS^3 conditions.

3.3. Photoproducts characterization

On the whole, a detailed comprehension of the main ARGA fragmentation mechanisms have allowed to pinpoint any change occurred on the methyltetrahydropiperidine and/or the methyltetrahydroquinoline parts of the molecule. Thus, any absence of the corresponding neutral losses would be useful and important clues for the characterisation of the photoproducts structure. Thereafter, structurally speaking, the mainly detected photoproducts can be broken down into three categories: the derivatives only comprising the methyltetrahydroquinoline residue, those only comprising the methylpiperidine residue and those still carrying these two chemical groups. However, to lighten the reading of the article, only the description of the approach used to characterize the photoproducts belonging to the first of the three categories is presented here. For the two others, the explanation is given in the Supplementary material (see chapter 1, Figs. S_1–S_3 of the Supplementary material).

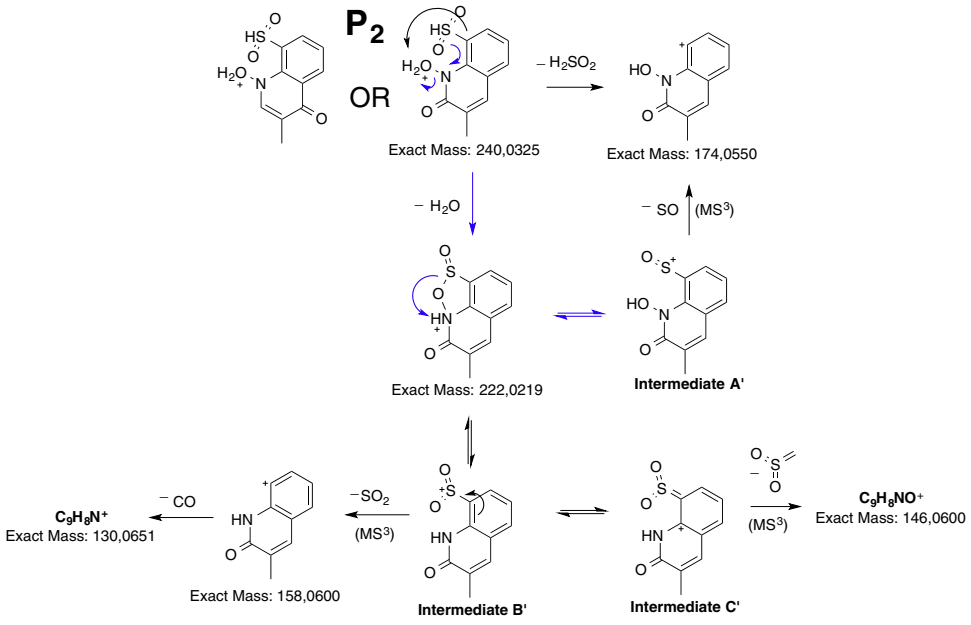


Fig. 4. Proposed fragmentation pattern for protonated P_2.

3.4. The photoproducts derived from methyltetrahydroquinoline residue

P_2 (*m*/*z* 240) and P_5 (*m*/*z* 148) are part of this category of photoproducts, presenting a gap of $-C_{13}H_{27}N_5O$ and $-C_{13}H_{23}N_5O_5S$, respectively, with respect to ARGA elemental composition (Table 1).

Being part of ARGA MS^2 product ions, notably due to cleavage of the Ar-S bond, the ion at *m*/*z* 148 was assumed to present the same structure as that of protonated P_5 (Fig. 3) and this was confirmed based upon elemental composition and the presence of *m*/*z* 106 ($C_7H_8N^+$) product ion within the MS^2 spectrum of protonated P_5. The formation of $C_7H_8N^+$ was attributed to elimination of C_3H_6, likely as per the Diels-Alder rearrangement process. As a result, P_5 may be identified as 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline.

As to P_2, its elemental composition ($C_{10}H_9NO_4S$) suggests it be an oxidation product of 3-methyl-8-sulfonyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline. A loss of H_2SO_2 to afford the ion at *m*/*z* 174 implies that one be no longer in the presence of a sulfonamide derivative. Parallel to this fragmentation process, water loss was also detected (240 → 222) suggesting that OH be not linked to sp^2 carbon. Under MS^3 conditions, three main product ions were produced from the dehydrated ion and all, of complementary way, have brought information as per which, the hydroxyl group would be most likely linked to the tetrahydroquinoline nitrogen. Protonation of the hydroxylamine oxygen atom would facilitate water loss, hence paving the way to a certain number of rearrangements allowing figuring out the departures of SO (from Intermediate A'), SO_2 (from Intermediate B') or sulfonylidenemethane (from Intermediate C'), as shown in Fig. 4. Beyond these structural elements, no valuable information had enabled to locate the oxo function and the extra double bond, except that they cannot be elsewhere than on the part formerly represented by the methyltetrahydropyridine group. However, to be the most consistent possible with the photodegradation pathway proposed downstream of this study resulting in the formation of P_2, the compound named 1-hydroxy-3-methyl-8-sulfonyl-1,2-dihydroquinolin-2-one was considered as the most likely (see below).

3.5. Plausible photodegradation pathways

The structural study of ARGA photoproducts has allowed shedding light on the main phototransformation mechanisms responsible for the drug degradation in aqueous solution and under aerobic condition. Some possible degradation pathways leading to their onset were depicted in Figs. 5 and 6. In the light of the structures elucidated, it seems manifest that the methyltetrahydroquinoline nitrogen atom along with that of the secondary guanidine amine, were the place where one-electron oxidation may occur preferentially, leading in the wake of this, to various radical rearrangements and/or radical reactions [20]. Linked to the chromophore group absorbing light in the spectrum ranging from 300 to 800 nm of the molecule, one can expect that the methyltetrahydroquinoline nitrogen atom can undergo electron loss as a result of excitation/autoionisation to afford aminium ion. Electron removal on the other site, as to it, would rather be sparked through autosensitization of type [$2ARGA_{S1/T1} \rightarrow ARGA^{\bullet+} + ARGA^{\bullet-}$], since passage of $ARGA_{S0}$ to singlet or triplet excited state made the molecule more oxidizing or reducing [21], or merely via internal electron-transfer, i.e. electron-transfer from one site to the other as shown in Fig. 5.

Electron-transfer along with proton loss from the methyltetrahydroquinoline nitrogen atom would bring about migration of one adjacent π electron to afford an intermediate radical carbon. Such a configuration may be amenable to α-cleavage leading to the formation of P_1 after H-abstraction from solvent, or, to Intermediate 1 after a radical hydrogen loss [22]. P_4 would be a hydrolysis product of Intermediate 1 and P_3 would be formed, successively, through radical decarboxylation and oxidation of the same intermediate (Fig. 5).

The configuration left by the radical compound resulting from the secondary guanidine amine (Intermediate 2), would be able to help figure out the origin formation of the other photoproducts (Fig. 6). Loss of the dioxide sulphur group along with transfer of the methyltetraquinoline moiety to the guanidine amine radical nitrogen may generate two other possible issues. Either this elimination/rearrangement process is followed by radical hydrogen abstraction, or it is going to trigger ejection of radical methyltetraquinoline. The first path leads to the formation of P_8, while the second one results in Intermediate 1 (and therefore P_3 and

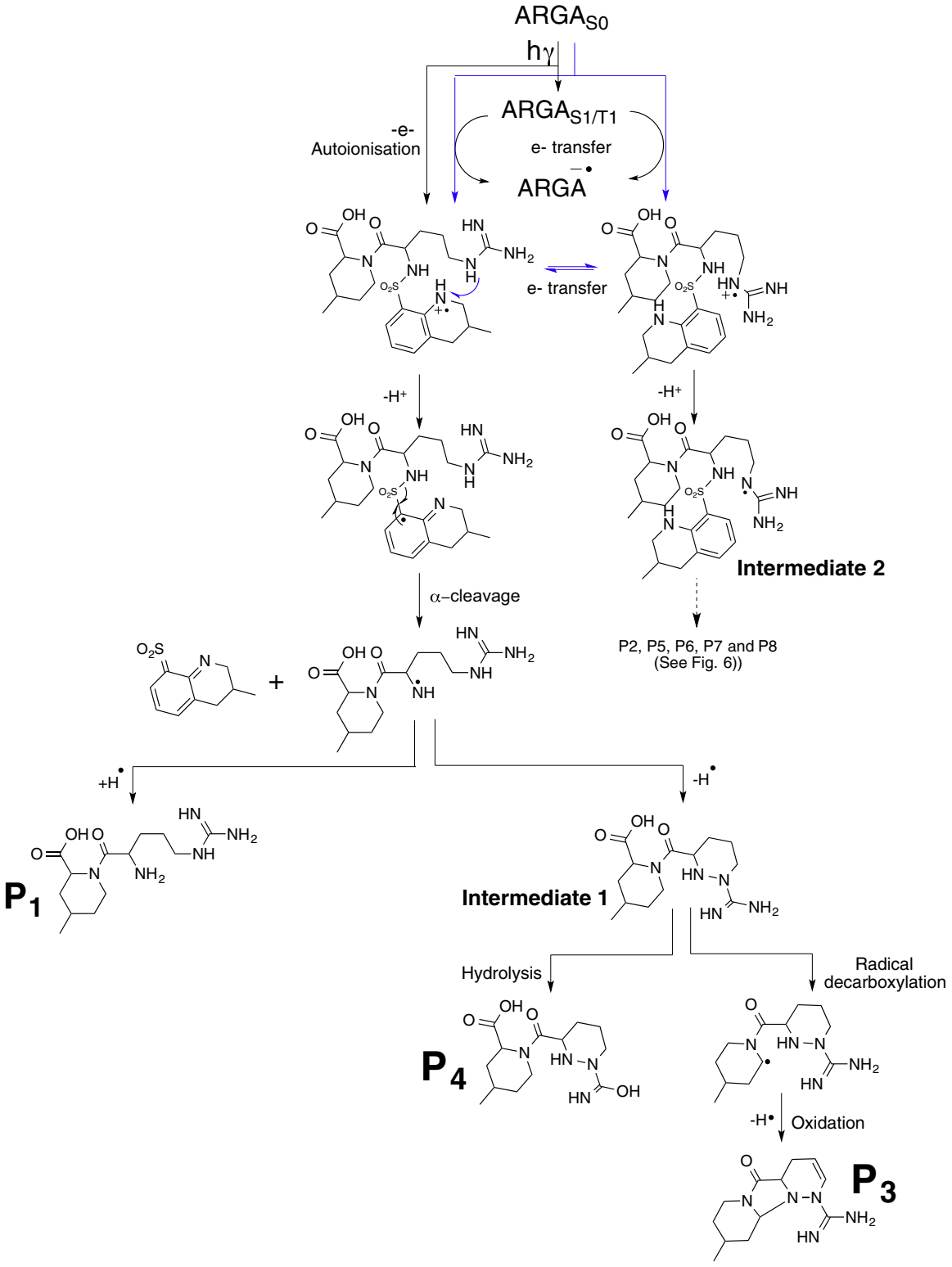


Fig. 5. Proposed photodegradation pathways of ARGA leading to the formation of P_1, P_3, P_4 and Intermediate 2.

P_4 as presented above) as well as P_5 after hydrogen abstraction (Figs. 5 and 6).

Parallel to this, radical Intermediate 2 may just as simply lose radical hydrogen to give a compound of diazinane type, whose geometry may favour nucleophile attacks due to rapprochement of functional groups and whose outcome would be the formation of a sulfonylguanidine derivative, P_7. Coming to P_2 and P_6, these latter would be secondary products of protonated P_7, as proposed in Fig. 6.

3.6. Possible implications of ARGA photolysis

Getting access to the photoproducts structure and figuring out the mechanisms responsible for their formation provide consistent

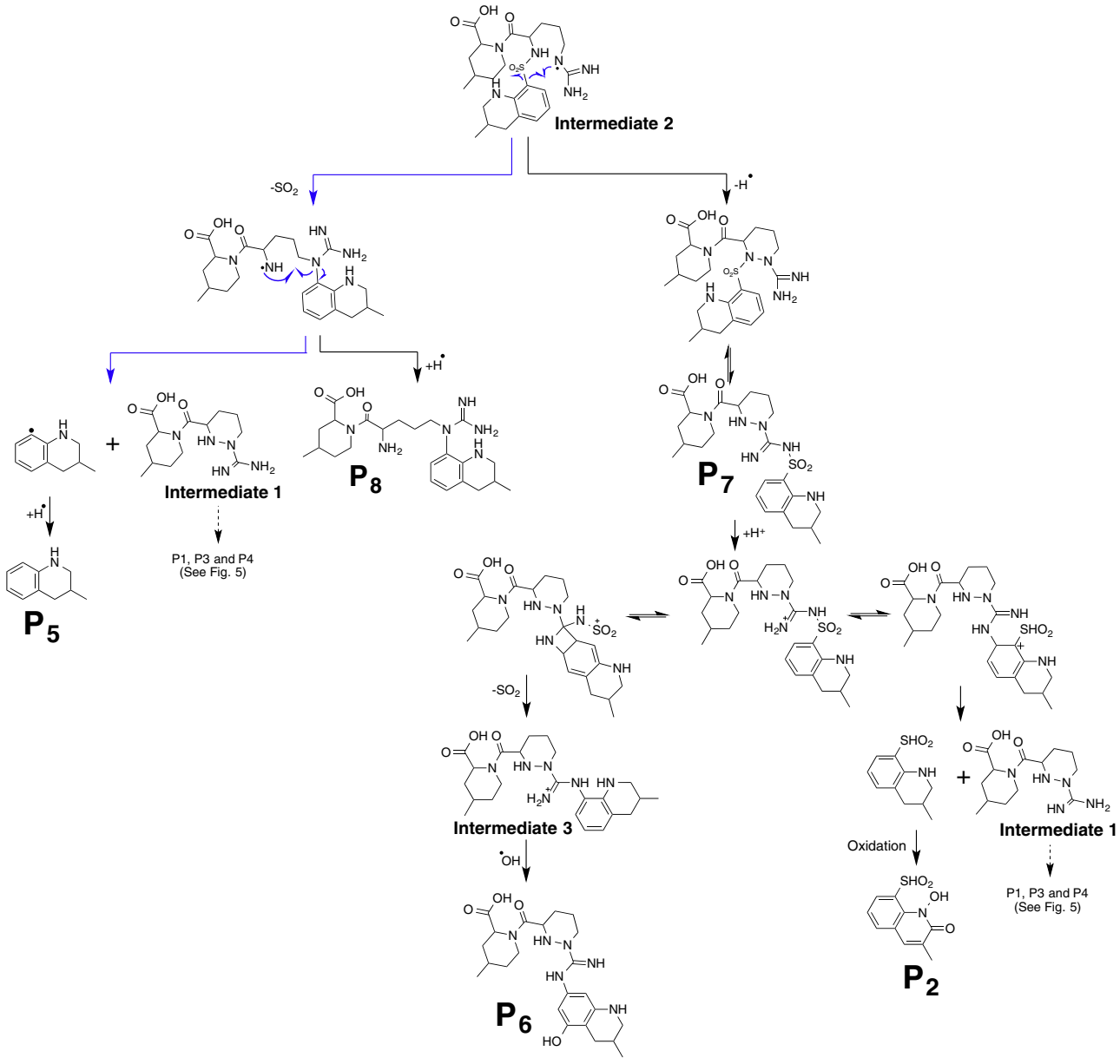


Fig. 6. Proposed photodegradation pathways for P_2, P_5–P_8 from Intermediate 2.

information to anticipate ARGA degradation and allow toxicological assessment in case the issue occurs.

Hence, as shown previously, absorbing light at wavelengths corresponding to the emission range, ARGA may be excited to singlet or triplet state, then becoming more susceptible to one-electron oxidation (type I). In view of the photoproducts structure, one can also assume the important role of oxygen. Beyond the fact that energy may be transferred to triplet oxygen (type II) to afford more reactive singlet oxygen (type I), electron transfer to oxygen may occur, generating other reactive oxygen species playing substantial role in ARGA photoxidation. Electron transfer between two $ARGA_{S1/T1}$, i.e. autoxidation (type I), may also be part of the initiation process. Therefore, an obvious way to keep the product safe during manufacturing/storage/administration would be to make light exposure minimal.

In addition, according to the proposed degradation mechanism, it turns out that electron-transfer would take place, to a large extent, at the methyltetrahydroquinoline nitrogen and that of guanidine. As a result, one may in the first instance consider protonation of these nitrogen functions as a good basis to help prevent ARGA from photodegradation, in addition to the aforementioned protective measures. At pH 6.4 ± 0.1, none of the key functions shown to be involved in the one electron-oxidation process are protected by protonation. Indeed, the pKa value associated to the methyltetrahydroquinoline nitrogen (1.72) and that to the guanidine nitrogen, the one linked to the alkyl chain (< 0), show that their respective protonation can only be achieved, or partially achieved, at the cost of a strong acidification of the solution, which is basically unsuitable for ARGA storage and administration to patients. Failing to use such protective measure, the oxygen depletion could result in a better stability of ARGA, in decreasing the entities likely to participate to the electron transfer mechanism. Experiments conducted after oxygen depletion obtained by nitrogen bubbling (Fig. 2c) has confirmed this statement. Relevant formulation can also be part of the protection process, such the introduction of excipients acting as radical scavengers [23].

In addition to these pharmaceutical implications, structural information on the photoproducts formed is also conducive to

risk assessment in terms of drug toxicity alteration. Among the photoproducts formed, P_2 would raise some toxicological concern owing to the presence of an aromatic hydroxylamine group in its structure [24]. Indeed, alkylanilines have been described to induce carcinogenic effects through DNA damage. However, formation of photoproducts that are, or may be DNA-reactive (genotoxic), is to be considered whether the patient is chronically exposed to the treatment, which does not strictly apply to ARGA, since the drug is used in the treatment of thrombosis in patients with heparin-induced thrombocytopenia.

4. Conclusion

Through this study, a certain number of elements that have been highlighted are to be outlined. The structure of the mainly detected photoproducts has been successfully characterized using LC/HR-MS^n technique. Frontier electron density has enabled locating OH radical attack on the aromatic fraction, where fragmentation studies failed. A comprehensive study of ARGA behaviour in collision induced dissociation fashion was carried out and it is the first time that ARGA fragmentation mechanisms are elucidated, bringing into light rearrangement/elimination processes specific to the molecule. In association with the photoproducts structure, a detailed phototransformation pattern of the drug in aqueous and aerobic condition was proposed. Eventually, the formation of a photoproduct including an aromatic hydroxylamine has shown that there is a potential risk to photodegrade ARGA, thus suggesting that precautions with respect to the drug stability are to be well observed.

Acknowledgements

The authors want to thank K. Manerlax for her very appreciable contribution to this work. They are also thankful to Ile de France Region for financial support in the acquisition of the Orbitrap Velos Pro mass spectrometer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.033.

References

[1] W.P. Jeske, J. Fareed, D.A. Hoppensteadt, B. Lewis, J.M. Walenga, Pharmacology of argatroban, Expert Rev. Hematol. 3 (2010) 527–539, http://dx.doi.org/10.1586/ehm.10.53.
[2] B.E. Lewis, D.E. Wallis, S.D. Berkowitz, W.H. Matthai, J. Fareed, J.M. Walenga, J. Bartholomew, R. Sham, R.G. Lerner, Z.R. Zeigler, P.K. Rustagi, I.K. Jang, S.D. Rifkin, J. Moran, M.J. Hursting, J.G. Kelton, For the A.–911 S. investigators, argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-Induced thrombocytopenia, Circulation 103 (2001) 1838–1843, http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.103.14.1838.
[3] Argatroban hydrate, in: Jpn. Pharmacop. XVI, n.d.: pp. 392–393.
[4] G. Owoo, R.A. Burgos, Argatroban Formulation US7642271 B2, 2010, http://www.google.ch/patents/US7642271 (accessed 10.06.16).
[5] Device and method for removing additives in the blood products, n.d http://www.google.com/patents/WO2014051537A1 (accessed 10.06.16).
[6] D.J. Snodin, Genotoxic impurities: from structural alerts to qualification, Org. Process Res. Dev. 14 (2010) 960–976, http://dx.doi.org/10.1021/op100118e.
[7] G. Miolo, C. Marzano, V. Gandin, A.C. Palozzo, D. Dalzoppo, A. Salvador, S. Caffieri, Photoreactivity of 5-fluorouracil under UVB light: photolysis and cytotoxicity studies, Chem. Res. Toxicol. 24 (2011) 1319–1326, http://dx.doi.org/10.1021/tx200212z.
[8] X.-H. Wang, A.Y.-C. Lin, Phototransformation of cephalosporin antibiotics in an aqueous environment results in higher toxicity, Environ. Sci. Technol. 46 (2012) 12417–12426, http://dx.doi.org/10.1021/es301929e.
[9] S. Montanaro, V. Lhiaubet-Vallet, M. Iesce, L. Previtera, M.A. Miranda, A mechanistic study on the phototoxicity of atorvastatin: singlet oxygen generation by a phenanthrene-like photoproduct, Chem. Res. Toxicol. 22 (2009) 173–178, http://dx.doi.org/10.1021/tx800294z.
[10] Y. Li, X. Wei, J. Chen, H. Xie, Y. Zhang, Photodegradation mechanism of sulfonamides with excited triplet state dissolved organic matter: a case of sulfadiazine with 4-carboxybenzophenone as a proxy, J. Hazard. Mater. 290 (2015) 9–15, http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.040.
[11] J. Kochany, R.J. Maguire, Photodegradation of quinoline in water, Chemosphere 28 (1994) 1097–1110, http://dx.doi.org/10.1016/0045-6535(94)90328-X.
[12] S. Görög, Identification in drug quality control and drug research, TrAC Trends Anal, Chem 69 (2015) 114–122, http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.020.
[13] T. Henriet, P.-H. Secrétan, F. Amrani, H. Sadou-Yayé, M. Bernard, A. Solgadi, N. Yagoubi, B. Do, Phototransformation patterns of the antiplatelet drug tirofiban in aqueous solution, relevant to drug delivery and storage, N. J. Chem. 40 (2016) 1182–1194, http://dx.doi.org/10.1039/C5NJ01826A.
[14] H. Sadou Yaye, P.-H. Secrétan, T. Henriet, M. Bernard, F. Amrani, W. Akrout, P. Tilleul, N. Yagoubi, B. Do, Identification of the major degradation pathways of ticagrelor, J. Pharm. Biomed. Anal. 105 (2015) 74–83, http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.046.
[15] P.-H. Secrétan, H. Sadou-Yayé, C. Aymes-Chodur, M. Bernard, A. Solgadi, F. Amrani, N. Yagoubi, B. Do, A comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry, RSC Adv. 5 (2015) 35586–35597, http://dx.doi.org/10.1039/C5RA00171D.
[16] F. Amrani, P.-H. Secrétan, H. Sadou-Yayé, C. Aymes-Chodur, M. Bernard, A. Solgadi, N. Yagoubi, B. Do, Identification of dabigatran etexilate major degradation pathways by liquid chromatography coupled to multi stage high-resolution mass spectrometry, RSC Adv. 5 (2015) 45068–45081, http://dx.doi.org/10.1039/C5RA04251H.
[17] I.H.T. Guideline, Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals S10, 2013, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S10/S10_Step_4.pdf (accessed 12.05.16).
[18] D.J. Burinsky, S.L. Sides, Mass spectral fragmentation reactions of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15 (2004) 1300–1314, http://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2004.05.010.
[19] M. Sun, W. Dai, D.Q. Liu, Fragmentation of aromatic sulfonamides in electrospray ionization mass spectrometry: elimination of SO2 via rearrangement, J. Mass Spectrom. 43 (2008) 383–393, http://dx.doi.org/10.1002/jms.1335.
[20] S. Maity, N. Zheng, A photo touch on amines: new synthetic adventures of nitrogen radical cations, Synlett 23 (2012) 1851–1856, http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1316592.
[21] J. Hu, J. Wang, T.H. Nguyen, N. Zheng, The chemistry of amine radical cations produced by visible light photoredox catalysis, Beilstein J. Org, Chem 9 (2013) 1977–2001, http://dx.doi.org/10.3762/bjoc.9.234.
[22] C. Guo, J. Xu, Y. Zhang, Y. He, Hierarchical mesoporous TiO2 microspheres for the enhanced photocatalytic oxidation of sulfonamides and their mechanism, RSC Adv. 2 (2012) 4720–4727, http://dx.doi.org/10.1039/C2RA01164F.
[23] Y. Wu, J. Levons, A.S. Narang, K. Raghavan, V.M. Rao, Reactive impurities in excipients: profiling, identification and mitigation of drug-Excipient incompatibility, AAPS PharmSciTech 12 (2011) 1248–1263, http://dx.doi.org/10.1208/s12249-011-9677-z.
[24] P.L. Skipper, M.Y. Kim, H.-L.P. Sun, G.N. Wogan, S.R. Tannenbaum, Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: old is new again, Carcinogenesis 31 (2010) 50–58, http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgp267.

Supplementary Material

PHOTODEGRADATION OF AQUEOUS ARGATROBAN INVESTIGATED BY *LC/MS^n*: PHOTOPRODUCTS, TRANSFORMATION PROCESSES AND POTENTIAL IMPLICATIONS.

Philippe-Henri Secrétan[1a*], Maher Karoui[1,2a], Mélisande Bernard[1,3], Noureddine Ghermani[4], Fathi Safta[2], Najet Yagoubi[1] and Bernard Do[1,5].

[1] University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, Laboratory "Matériaux et Santé". 401 EA, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

[2] University of Monastir, Department of Pharmacy, Analytical Chemistry Laboratory, rue Ibn Sina, 5000 Monastir, Tunisia.

[3] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Agence Générale des Equipements et Produits de Santé, Quality Control and Analytical Development Laboratory, 7 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France.

[4] University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, CNRS UMR 8612 Institut Galien Paris-Sud, LabEx LERMIT, 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

[5] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Henri Mondor, Department of Pharmacy, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France.

[a] The first 2 authors contributed equally to this study and are therefore considered as first authors.

*Corresponding author. Email: philippe-henri.secretan@u-psud.fr ; Tel: +33146835789.

1. CHARACTERIZATION OF THE PHOTOPRODUCTS DERIVED FROM THE METHYLPIPERIDINE RESIDUE AND OF THOSE DERIVED FROM THE ARGA BACKBONE.

The photoproducts derived from methylpiperidine residue.

Protonated P_1 (m/z 300), P_3 (m/z 250) and P_4 (m/z 299) are consistent with elemental formulae $C_{13}H_{26}N_5O_3^+$, $C_{12}H_{20}N_5O^+$ and $C_{13}H_{23}N_4O_4^+$, respectively (Table 1). Protonated P_1 and P_4 both undergo loss of $C_6H_{11}N$ and CO, implying that the methylpiperidine carboxylic acid group had remained unchanged (Fig. S1). Crossing this information with its elemental formula, P_1 may be identified as 1-(2-amino-5-carbamimidamidopentanoyl)-4-methylpiperidine-2-carboxylic acid. After loss of $C_6H_{11}N$ and CO from protonated P_4 to result the ion at m/z 174, the departure of carbamimidic acid was observed (174→114). The same neutral loss was also directly visualized from protonated P_4 (299→239). Its elemental formula points out the presence of an additional unsaturation or that of a ring. That's why a diazinane-carboxamide derivative was proposed to explain the elimination of carbamimidic acid (Fig. S1). As a result, 1-[1-(C-hydroxycarbonimidoyl)-1,2-diazinane-3-carbonyl]-4-methylpiperidine-2-carboxylic acid was proposed as structure for P_4.

As to P_3, loss of $C_6H_{11}N$ and CO did not occur, outlining that substantial changes are to be expected. The protonated molecular ion only carries one oxygen atom, but it could loss either water (250→232) or CO (250→222), which means that one would be in the presence of a carbonyl function integrated within an aliphatic and cyclic system. After loss of ammoniac, the corresponding fragment (m/z 233) was subjected to another stage of fragmentation leading to the departure of O=C=NH (233→190), confirming by this the retention of the amide function. Loss of carbamimidic acid also put on the path of a diazinane-carboxamide derivative. But in view of the formation of

m/z 113 $(M+H-C_5H_7N_3-CO)^+$, the double bond cannot be attributed to the system represented by the methylpiperidine moiety. The location of the double bond was then chosen such to be compatible with the in-depth study of the fragmentation pattern of protonated P_3 as shown in Fig. S1. As a result, P_3 can be identified as 9-methyl-5-oxo-4a,5,8,9,10,10a-hexahydro-7*H*-pyrido[2',1':2,3]imidazo[1,5-*b*]pyridazine-1(4*H*)-carboximidamide.

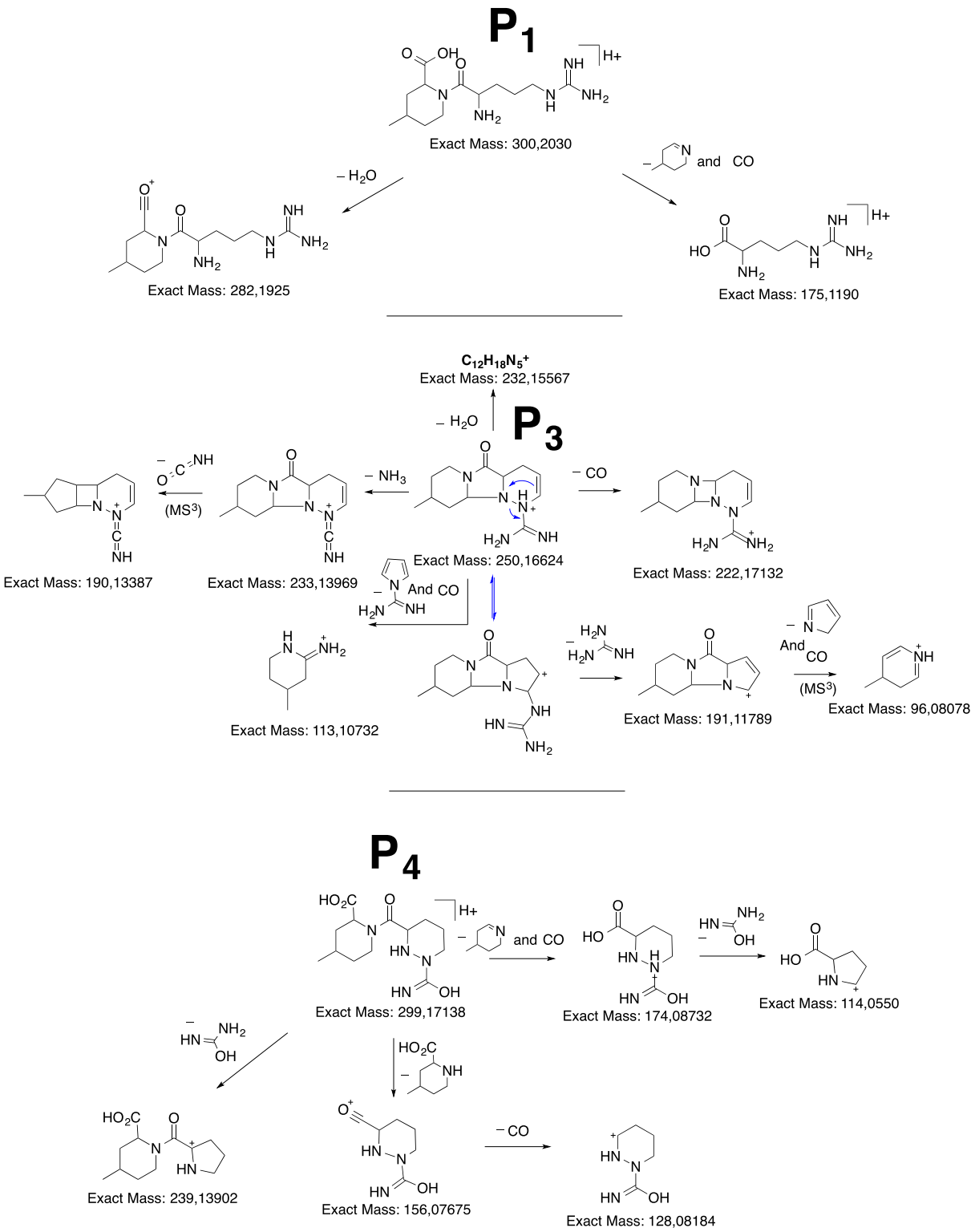


Fig. S1. Proposed fragmentation patterns for protonated P1, P3 and P4.

The photoproducts derived from ARGA "backbone".

Protonated P_6 (m/z 459), P_7 (m/z 507) and P_8 (m/z 445), whose mass values match

with elemental formulae $C_{23}H_{34}N_6O_4^+$, $C_{23}H_{34}N_6O_5S^+$ and $C_{23}H_{37}N_6O_3^+$, respectively, still conserve the methylpiperidine carboxylic acid group for the same reasons as what was previously put forward (Fig. S2 and Table 1). By cons, none of them has presented the neutral loss characteristic of the Ar-S bond cleavage ($-C_{10}H_{13}N$).

The MS^2 spectra of P_6 and P_7 exhibit common product ions, among which, the ion at m/z 239 is distinguished from the others by its great intensity, coming right after that of the two respective base peaks. The same way than protonated P_4 had lost carbamimidic acid, protonated P_6 and P_7 produced m/z 239 ion by elimination of $C_{11}H_{16}N_4O$ and $C_{11}H_{16}N_4O_2S$, respectively (Fig. S2 and Table 1). Therefore, it seems plausible, on the one hand that P_7 be a sulfonylguanidine derivative and on the other hand, one be still dealing with a compound of diazinane type. As a result, P_7 can be identified as 4-methyl-1-(1-{N-[(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-8-yl)sulfonyl]carbamimidoyl}-1,2-diazinane-3-carbonyl)piperidine-2-carboxylic acid. As to P_6, thereof can be identified as a hydroxylated counterpart of P_7 having lost the sulphur dioxide moiety. Coming to the location of OH, as none of the OH-fragments detected are spontaneously dehydrated (Fig. S2 and Table 1), the hydroxyl group would be most likely linked to sp^2 carbon and therefore, P_6 would be a methyltetrahydroquinolinol derivative. Frontier electron density of the intermediate preceding the formation of P6 (Intermediate 3) was determined to locate the most likely oxidation position. It is worth mentioning that the highest FED value indicates the most reactive position, i.e., that most likely to be attacked by a radical [1]. In view of the data provided in Fig. S3 and Table S1, it is possible to go for 1-{1-[N-(5-hydroxy-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-8-yl)carbamimidoyl]-1,2-diazinane-3-carbonyl}-4-methylpiperidine-2-carboxylic acid.

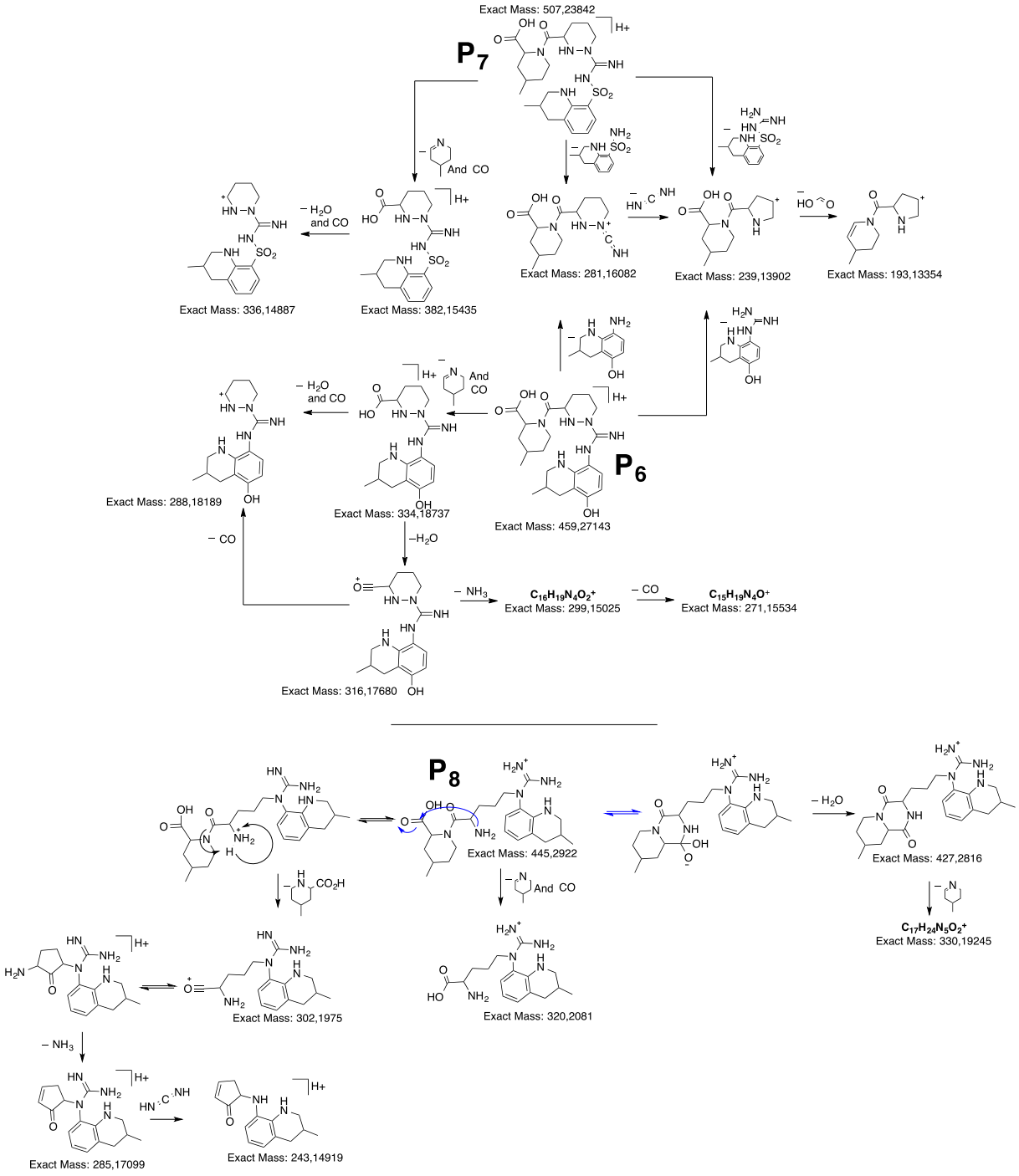


Fig. S2. Proposed fragmentation patterns for protonated P6, P7 and P8.

P_8 displays no intense common ions with the two other photoproducts (Table 1). Loss of methyltetrahydropyridine and carbon monoxide (445→320), so far almost always materialised as the base peak for the concerned photoproducts, was detected but to a much lesser extent. Actually, loss of water by condensation more favourably occurred, in view of the reduction of the steric hindrance, suggesting that the neighbourhood be a primary amine. More basic than sulfonamide nitrogen or diazinane nitrogen, the primary amine is more prone to protonation, thereby promoting the departure of methylpiperidine carboxylic acid as shown in Fig. S2 (445→302). The base peak- at m/z 302 characterises this process. Being linked to the guanidine primary amine nitrogen, the methyltetrahydropyrine moiety would be involved in a five-centered rearrangement process after which, the ion at m/z 173 could be formed (Fig. S2). As a result, P_8 structure may be 1-{2-amino-5-[1-(3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-8-yl)carbamimidamido]pentanoyl}-4-methylpiperidine-2-carboxylic acid.

2. COMPUTATIONAL STUDY TO SUPPORT THE STRUCTURAL ELUCIDATION OF P6.

Quantum chemical calculations were performed using the Gaussian 09 program [2]. Stationary point geometries were optimized using the hybrid density functional B3LYP method with the 6-31G(d,p) basis set, B3LYP/6-31G(d,p). Harmonic vibrational frequencies were calculated at the same level to identify all stationary points as minima (zero imaginary frequency). The solvent effect of water was considered by using the integral equation formalism polarized continuum model (IEFPCM) based on the self-consistent-reaction-field (SCRF) method [3].

The frontier electron densities (FEDs) of the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) were also determined

to predict the initial attack position by reactive species. Values of (FED^2_{HOMO} + FED^2_{LUMO}) were used to predict the reaction sites for the OH radical addition positions [4-6].

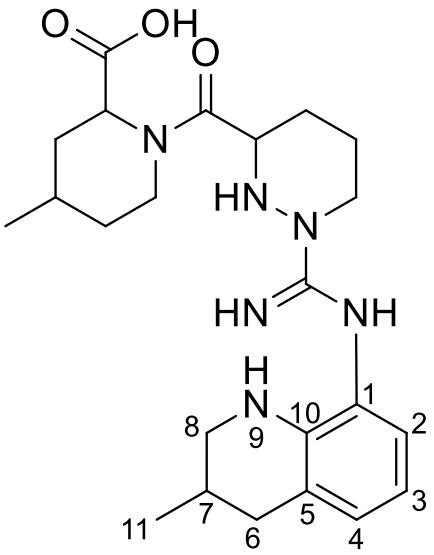


Fig. S3. Intermediate 3 structure, the intermediate preceding the formation of P6. Arbitrary numbering was set to help interpret FED values on atoms.

Table S1. Frontier electron densities on atoms of Intermediate 3 calculated using the Gaussian 09 program at B3LYP/6-31G(d,p).

Atom (number)	FED^2_{LUMO}	FED^2_{HOMO}	FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}
C(1)	0.25480	0.07792	0.33273
C(2)	0.21666	0.02579	0.24244
C(3)	0.00500	0.11430	0.11930
C(4)	0.26725	0.00210	0.26935
C(5)	0.17838	0.09551	0.27389
C(6)	0.01671	0.00557	0.02228
C(7)	0.02056	0.01558	0.03614
C(8)	0.02038	0.00882	0.02920
N(9)	0.01698	0.29103	0.30801
C(10)	0.03228	0.04581	0.07810
C(11)	0.00582	0.00239	0.00821

REFERENCES

[1] B.D. Lee, M. Iso, M. Hosomi, Prediction of Fenton oxidation positions in polycyclic aromatic hydrocarbons by Frontier electron density, Chemosphere. 42 (2001) 431–435. doi:10.1016/S0045-6535(00)00061-8.

[2] M. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, Ga. Petersson, others, Gaussian 09, Revision A. 02, Gaussian, Inc Wallingford CT. 200 (2009).

[3] J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi, Quantum Mechanical Continuum Solvation Models, Chem. Rev. 105 (2005) 2999–3094. doi:10.1021/cr9904009.

[4] K. Fukui, T. Yonezawa, H. Shingu, A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons, J. Chem. Phys. 20 (1952) 722. doi:10.1063/1.1700523.

[5] T. An, J. An, Y. Gao, G. Li, H. Fang, W. Song, Photocatalytic degradation and mineralization mechanism and toxicity assessment of antivirus drug acyclovir: Experimental and theoretical studies, Appl. Catal. B Environ. 164 (2015) 279–287. doi:10.1016/j.apcatb.2014.09.009.

[6] H. Yang, S. Zhou, H. Liu, W. Yan, L. Yang, B. Yi, Photocatalytic degradation of carbofuran in TiO2 aqueous solution: Kinetics using design of experiments and mechanism by HPLC/MS/MS, J. Environ. Sci. 25 (2013) 1680–1686. doi:10.1016/S1001-0742(12)60217-4.

CHAPITRE 5 : DÉGRADATION PHOTOCATALYTIQUE DU PÉMÉTREXED ET IMPLICATIONS ENVIRONNEMENTALES

1. Contexte de l'étude

Les composés retrouvés dans les effluents des eaux des stations d'épuration sont parfois des sources de contamination de l'environnement. Parmi ces composés, les principes actifs rémanents et résistants aux procédés d'élimination classiques constituent une problématique particulièrement importante (Rivera-Utrilla et al., 2013). En effet, ceux-ci sont susceptibles de rejoindre différents compartiments environnementaux comme les eaux de surface, les eaux profondes ou les sédiments, et d'induire des effets sur les humains et sur des écosystèmes.

C'est pour cette raison que des procédés d'élimination non conventionnels reposant sur l'emploi d'oxydants forts, les procédés d'oxydation avancée, ont été développés (Trawiński and Skibiński, 2017 ; Velazquez-Peña et al., 2013). Ceux-ci ont démontré une grande efficacité dans le traitement des contaminants organiques par rapport aux procédés classiques.

Les procédés d'oxydation avancée (AOP pour Advanced oxydation process) font référence à l'ensemble des procédés de traitement des eaux par la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour Reactive Oxygen Species, tels que le radical hydroxyle •OH) générés par électrolyse et par photocatalyse entre autres. Comme cela a été discuté dans le chapitre 2, l'un des photocatalyseurs les plus employés est le dioxyde de titane (TiO_2) de qualité P25, qui contient un mélange de formes anatase et rutile de TiO_2 à l'état de nanoparticules. Cette composition et cet état lui confèrent un rendement photocatalytique élevé (Hurum et al., 2003). Les ROS sont générés lors de l'interaction de radiations UV–visible avec la surface du semi-conducteur, ce qui induit la formation de paires électron-lacune électronique (cf. chapitre 2).

L'efficacité des AOP étant propre à chaque principe actif, la cinétique de sa dégradation est souvent le paramètre le plus observé. Cependant, le suivi et l'identification des produits de phototransformation sont nécessaires, notamment pour évaluer leur persistance et leur toxicité, puisqu'ils sont susceptibles d'être retrouvés dans les effluents et d'engendrer des effets toxiques plus importants que le composé dont ils sont issus (Sturini et al., 2012 ; Miolo et al., 2011 ; An et al., 2015).

De plus, la connaissance de la toxicité des produits de transformation permet d'éviter de poursuivre l'exposition à des procédés d'oxydation avancée alors que les produits restants ne sont plus toxiques, ce qui conduit à réduire les dépenses énergétiques (Cavalcante et al., 2015 ; Vogna et al., 2004).

Parmi les principes actifs actuellement employés, le pémétrexed (PEME, figure 66) fait partie des composés anti-néoplasiques selon la classification anatomique thérapeutique (ATC Therapeutic Classification system).

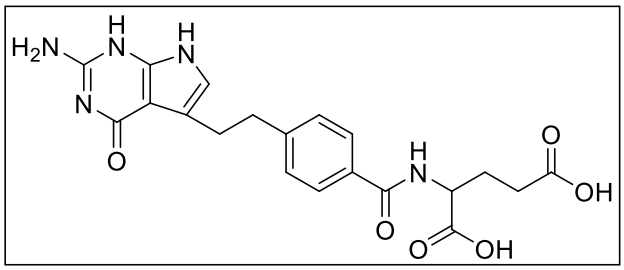


Figure 66 : structure du pémétrexed.

Ce principe actif agit en bloquant une enzyme à l'origine de composés entrant dans la synthèse de l'ADN. En raison de son mécanisme d'action, le PEME est donc susceptible d'engendrer des effets cytotoxiques, génotoxiques ou carcinogéniques sur des espèces aquatiques exposées (Johnson et al., 2008 ; Rowney et al., 2009). Les études relatives à son devenir démontrent que sa consommation est en perpétuelle augmentation, sans doute car il est prescrit en tant que première ligne du traitement du cancer du poumon, un cancer dont l'incidence augmente continuellement (Franquet-Griell et al., 2015). À cause d'une part de ses propriétés physico-chimiques : polarité, solubilité élevée dans l'eau et volatilité nulle (Adjei, 2004), et d'autre part de son faible métabolisme, le PEME est susceptible d'être retrouvé dans les effluents hospitaliers et urbains. Des auteurs ayant estimé que les traitements conventionnels de l'eau n'éliminent que 22% du PEME (Singer et al., 2016), il est très probable qu'il soit retrouvé dans l'environnement à des concentrations non négligeables.

Malgré son risque toxique élevé et l'augmentation de ses concentrations environnementales prédites (Besse et al., 2012 ; Booker et al., 2014) aucune étude n'a été menée sur la toxicité de ses produits de dégradation potentiels dans l'environnement, qu'ils soient formés avec ou sans l'emploi d'un procédé d'oxydation

avancée (Calza et al., 2014). Pourtant, pour un composé de structure et de mécanisme d'action pharmacologique similaires, le méthotrexate, il a été démontré que des produits de dégradation obtenus suite à l'emploi de la photocatalyse présentent une écotoxicité (Lai et al., 2017).

L'objectif de la présente étude a été de caractériser les processus de dégradation du PEME en présence de TiO_2 de qualité P25 et de lumière et d'évaluer l'impact de l'emploi de ce procédé photocatalytique pour le traitement d'une eau contenant du PEME. L'influence des ROS a été suivie en mesurant la perte en PEME en présence de molécules piégeant certains ROS. Les mécanismes de formation des produits de transformation et leur cinétique ainsi que l'ordre d'apparition des produits de transformation ont été obtenus par des analyses en CLHP-UV et en CLHP-$HRMS^n$. L'emploi de l'approche *ab initio* a apporté des informations additionnelles pour comprendre ces processus de transformation. Les données *in silico* et *in vitro* ont permis d'évaluer le risque environnemental potentiel de l'emploi de la photocatalyse pour éliminer le PEME.

2. Méthodes et protocole d'essai

Pour évaluer les processus de transformation du PEME obtenus par photocatalyse, des solutions aqueuses de PEME (concentration initiale 400 $mg.L^{-1}$) dans lesquelles ont été ajoutées des nanoparticules de dioxyde de titane (1 $g.L^{-1}$ de TiO_2 de qualité P25) et, quand cela a été mentionné, de l'isopropanol ou du méthanol (dans les deux cas de sorte à obtenir une concentration de 0,1 $mol.L^{-1}$) ont été exposées à de la lumière simulée (300-800 nm, emploi de la chambre QSUN avec une lampe permettant d'obtenir une exposition de 240,000 lux visible et 130 $W.m^{-2}$ en UV-A) et analysées après différentes durées d'exposition.

Une fois les conditions chromatographiques développées de sorte à séparer le pémétrexed et ses produits de transformation (évaluation de la pureté du pic de pémétrexed), la gamme retenue a permis de suivre la concentration du pémétrexed et l'évolution de la quantité de produits de dégradation au cours du processus de photodégradation en choisissant une détection à 220 nm. Les résultats de la validation sont rappelés ci-dessous (tableau 12) et semblent acceptables dans un domaine de concentration étendu de 40 à 450 $mg.L^{-1}$ en termes de linéarité (coefficient de corrélation : 0,998), de répétabilité (variations standards résiduelles inférieures à 1,5%) et d'exactitude (recouvrements moyens supérieurs à 98,5%) pour l'objectif poursuivi. On remarque que la limite de quantification (LOQ : 0,37 $mg.L^{-1}$) est inférieure à 0,1% de la concentration en pémétrexed des solutions avant exposition (400 $mg.L^{-1}$), ce qui laisse présager une bonne quantification des composés apparentés, sous réserve de l'hypothèse d'un facteur de réponse proche.

Tableau 12 : résultats de la validation de la méthode de dosage du pémétrexed.

Paramètre	Résultat
Gamme de linéarité (µg.mL^{-1})	40 – 450
Pente	0,4718
Ordonnée à l'origine	5,31
Coefficient de corrélation (r^2)	0,998
Variation standard résiduelle (intrajour)	1,3%
Variation standard résiduelle (interjour)	0,4%
Recouvrements % (n=6, 300 µg.mL^{-1})	99,5%
Recouvrements % (n=6, 100 µg.mL^{-1})	98,7%
LOQ (µg.mL^{-1})	0,37
Temps de rétention du pemetrexed (min)	10.72-10.81

Une fois cette méthode validée, les concentrations de pémétrexed dans les solutions destinées à être irradiées contenant TiO_2 ont été évaluées pour déterminer le temps nécessaire à l'obtention de l'équilibre sorption/désorption. On constate que cet équilibre est rapidement atteint, après 15 minutes de mise en contact (tableau 13). Aussi, pour être certains que cet équilibre était obtenu au moment de l'exposition, nous avons systématiquement attendu 1 heure avant l'exposition des échantillons.

Tableau 13 : pourcentage moyen de recouvrement du pémétrexed (400 mg.L^{-1}) en fonction du temps de mise en contact avec le dioxyde de titane P25 (1 mg.L^{-1}).

Time (min)	Mean PEME recovery rate (% C/C_0x100) and standard deviation (n = 3)
0	100 (±2.0)
15	92 (±1.86)
30	91 (±2.73)
60	91 (±3.64)

3. Résultats

3.1. Cinétique de dégradation du pémétrexed en conditions photocatalytiques : aspects quantitatifs

Pour étudier l'influence des radicaux hydroxyle (•OH) et des lacunes électroniques (h^+) générés lors de l'emploi de la photocatalyse sur la cinétique de dégradation du PEME, des études visant à évaluer le devenir du pémétrexed, en présence ou non de photocatalyseur, et en ajoutant des substrats pièges : méthanol (substrat piège de •OH et de h^+) et isopropanol (substrat piège de •OH) ont ensuite été menées.

Celles-ci ont démontré que le pémétrexed était très sensible au processus de photocatalyse (courbe jaune) et qu'il était dégradé en partie par des radicaux hydroxyle et des lacunes électroniques (courbes verte et bleue). Par contre sur la durée de l'expérience, les processus de dégradation autres que la photocatalyse sont très mineurs voire inexistants (figure 67).

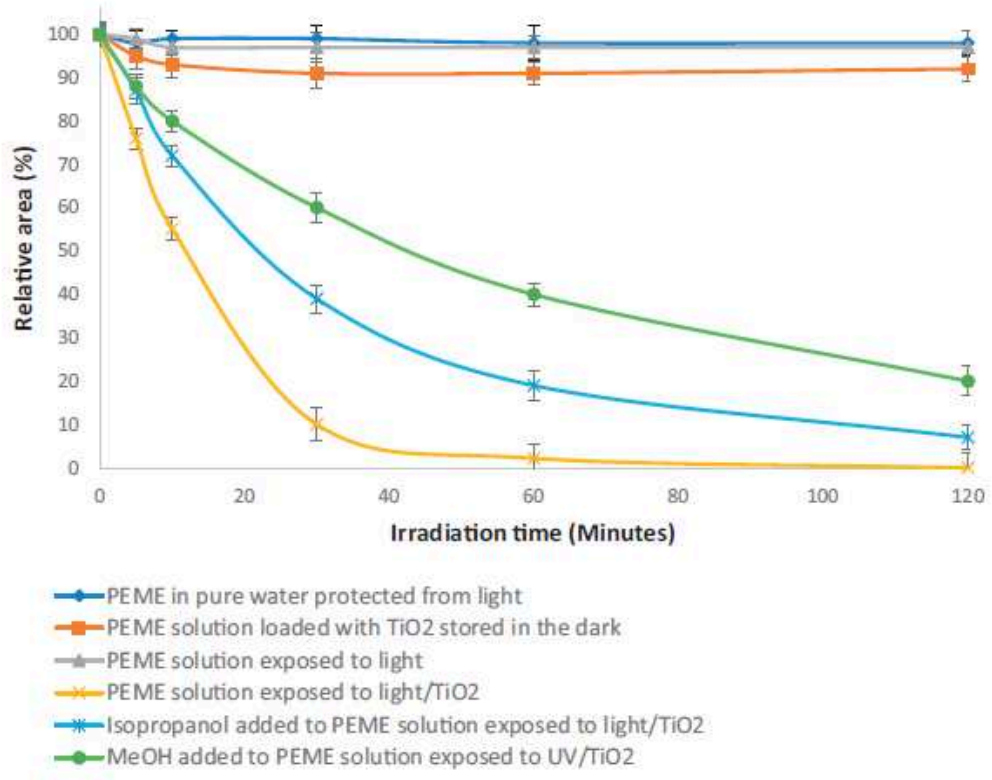


Figure 67 : dégradation du pémétrexed exposé à de la lumière simulée en solution aqueuse et dans différentes conditions.

Aucune dégradation n'a été observée dans nos conditions expérimentales en présence de lumière et sans photocatalyseur. Ce résultat est différent de celui obtenu dans d'autres travaux dans lesquels le pémétrexed a été dégradé en conditions photolytiques (Jansen et al., 2016). Cela pourrait s'expliquer par des différences de puissance d'émission des lampes employées entre 300 et 320 nm. En effet, le pémétrexed n'absorbe que très faiblement la lumière au-delà de 280 nm et plus du tout au-delà de 310 nm, de sorte qu'une variation de la puissance d'émission pour des longueurs d'onde inférieures à 310 nm peut induire un comportement très différent du pémétrexed (figure 68).

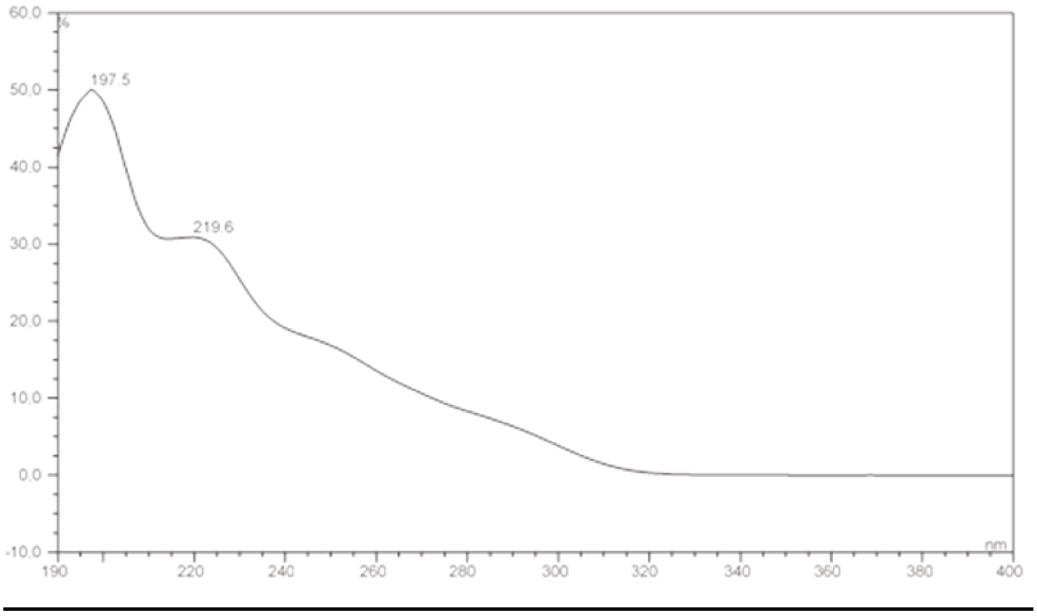


Figure 68 : spectre UV-visible d'une solution aqueuse de PEME à 80 mg.L^{-1}.

Les TPs détectés sont tous présents après 30 minutes et 60 minutes d'exposition. Les chromatogrammes totaux prenant en compte l'ensemble des ions (Total Ion Chromatogram, TIC) et les chromatogrammes obtenus par l'extraction des ions moléculaires correspondants (eXtracted Ion Chromatogram, XIC) sont présentés ci-dessous (figure 69).

Les ions moléculaires ([M+H]$^+$) caractéristiques des TPs protonés ont des valeurs de m/z de 227, 302, 330, 432, 444, 460 et 476. Pour des raisons de lisibilité, ces valeurs obtenues en masse exacte sont systématiquement écrites en masse nominale dans le texte et sur la figure 69 mais ont en réalité été acquises en mode à haute

résolution. Les TPs ont été ainsi dénommés TP_{226}, TP_{301}, TP_{329}, TP_{431}, TP_{443}, TP_{459} et TP_{475}.

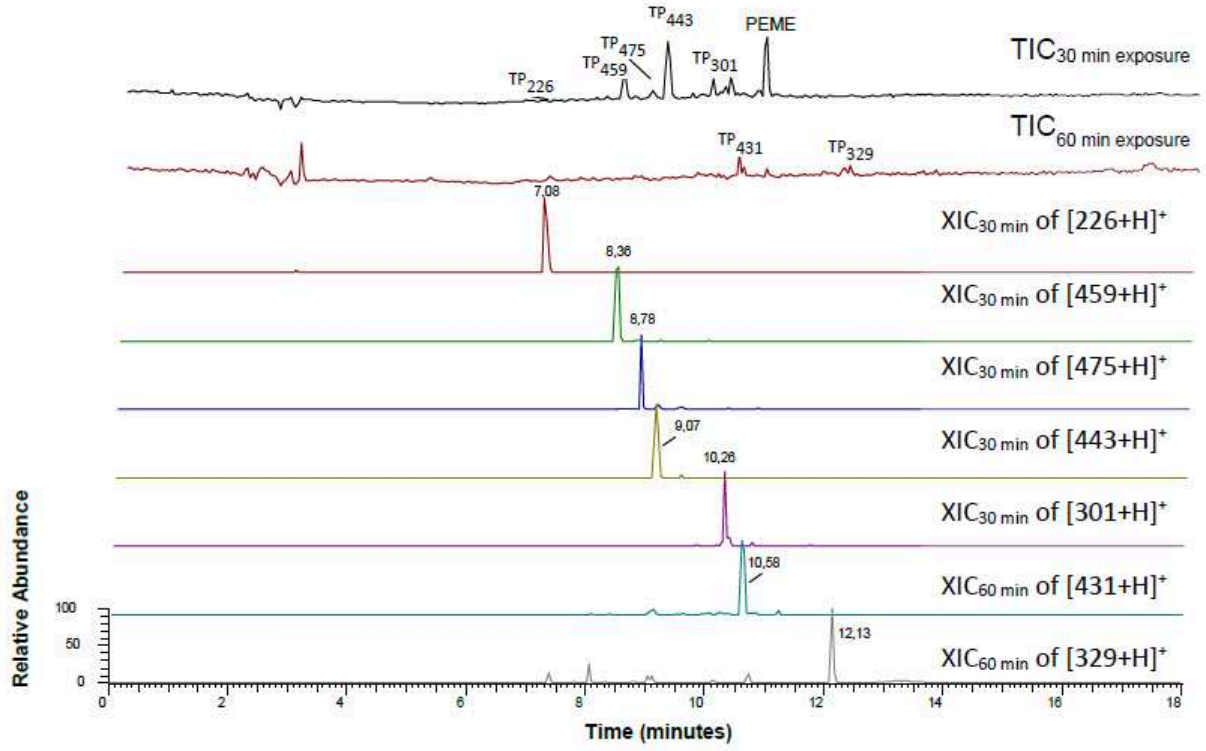


Figure 69 : chromatogrammes d'ions, totaux et extraits, après 30 ou 60 minutes d'exposition d'une solution aqueuse de PEME contenant du TiO_2.

En corrélant les temps de rétention des composés détectés par LC-HRMS avec les temps de rétention en LC-UV, les aires des pics chromatographiques correspondant à chaque TP ont été mesurées pour chaque durée d'irradiation et rapportées à celle du PEME avant irradiation, ce qui a permis d'obtenir les surfaces relatives (figure 70).

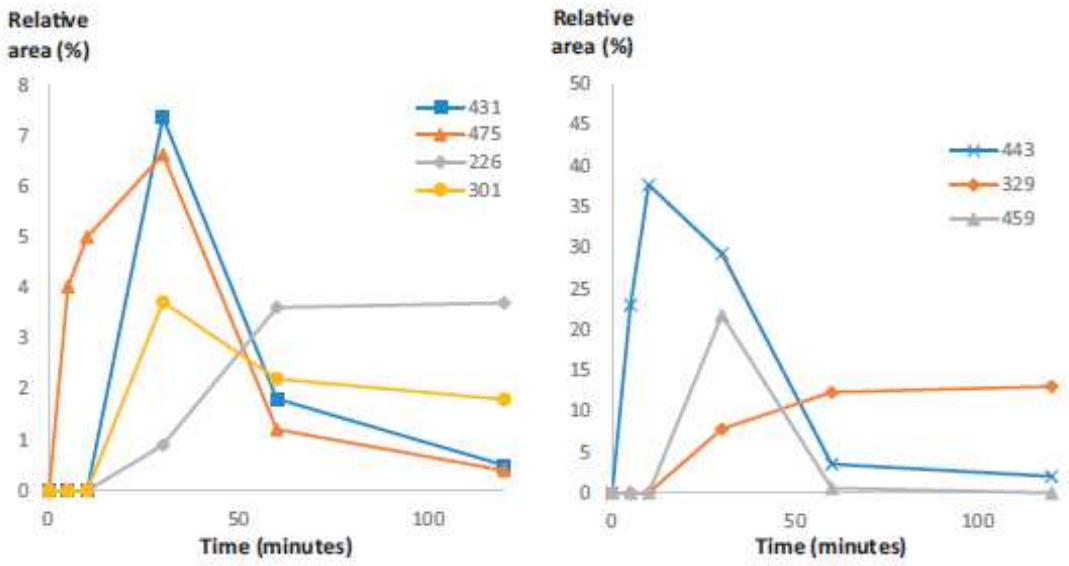


Figure 70 : profils d'évolution des aires relatives des produits de transformation du pémétrexed en fonction du temps d'exposition.

Les aires relatives (figure 70) obtenues pour chaque TP ont été utilisées pour contribuer à la compréhension des processus majoritaires de transformation du pémétrexed. En effet, il apparaît que TP_{443} est formé de façon importante dès le début de l'exposition puis diminue avec la durée d'exposition. Cela est en faveur de son rôle central et de précurseur d'autres produits de transformation. Inversement, TP_{329}, apparaissant plus tardivement, est sans doute issu de la dégradation d'autres TPs.

D'autre part, les aires relatives ont été employées pour évaluer la toxicité du mélange, à partir des données de toxicité de chacun des composés et de leur concentration relative dans le mélange.

3.2. Élucidation structurale des produits de transformation

3.2.1. Processus de fragmentation du pémétrexed en mode HRMS^n

Les spectres de fragmentation en mode HRMS^n de l'ion protoné du pémétrexed $[PEME+H]^+$ (masse exacte : 428,1564 ; formule brute : $C_{20}H_{22}N_5O_6^+$) contiennent nettement moins d'ions produits que ceux des ions protonés de l'apixaban et l'argatroban, ce qui indique que ce principe actif est certainement peu enclin à des réarrangements internes. Pour cette raison, que ce soit en HRMS^2 ou en HRMS^3, mis à part deux ions produits issus de déshydratation, seulement 3 autres ions produits ont été détectés : 299,1135, 281,1029 et 163,0613 correspondant respectivement aux formules brutes $C_{15}H_{15}N_4O_3^+$, $C_{15}H_{13}N_4O_2^+$ et $C_7H_7N_4O^+$ (figure-71).

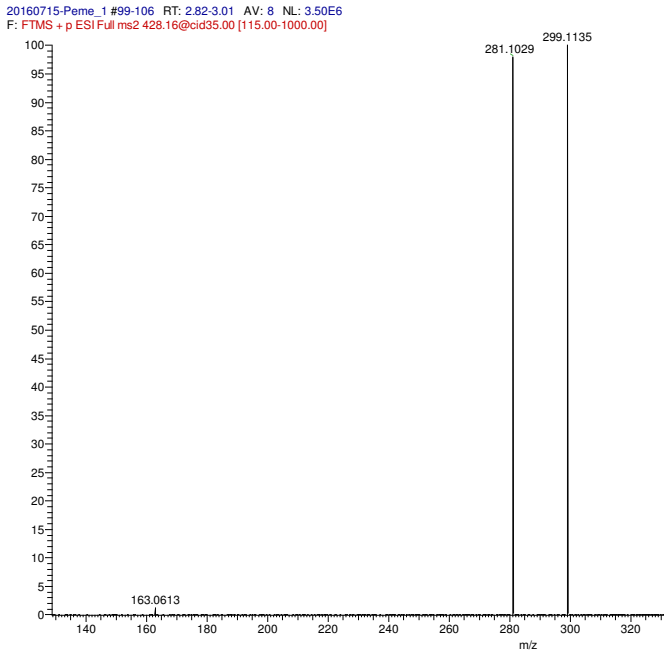


Figure 71 : spectre HRMS^2 du pémétrexed.

L'ion produit de rapport m/z 299, donnant le pic le plus intense (pic de base) s'interprète par un processus de réarrangement passant par un intermédiaire (cycle à 5) formé par une attaque nucléophile de l'oxygène 31 du groupement OH sur le carbone 20 déficient en électrons, comme le montre la figure 72. Les contraintes exercées sur ce cycle confèrent de l'instabilité au système se traduisant par des ruptures successives de liaisons entraînant des départs simultanés d'acide

4-iminobutanoïque ($C_4H_7NO_2$ M = 101 Da) et de monoxyde de carbone (CO M = 28 Da), soit une perte globale de 129 Da.

L'élément d'information clé issu de cet examen d'une partie du processus de fragmentation de l'ion protoné de la molécule mère est que toute transition correspondant à une perte de 129 Da signe la présence de la chaîne latérale contenant le groupe glutamate. En d'autres termes, si le schéma de fragmentation d'un produit de transformation inclut cette transition (perte de 129 Da), cela signifie que le produit de transformation possède toujours cette partie constitutive du PEME.

L'ion produit m/z 299 ainsi formé peut perdre facilement de l'eau au niveau de la fonction acide carboxylique et être à l'origine de l'ion produit de m/z 281.

L'ion de plus petite taille du spectre de masse de l'ion protoné du PEME (m/z 163) a été pris comme ion diagnostic produit dans les conditions de collision retenues pour cette étude. Des études de filiation par le biais du mode $HRMS^3$ confirment qu'il provient bien successivement des ions m/z 299 puis 281. La perte neutre du 4-méthylidènecyclohexa-2,5-dièn-1-ylidèneméthanone (M = 118 Da) qui accompagne la transition 281 ->163 est la conséquence d'une rupture de liaison induite par la charge du carbocation en 6C. Cette charge est apparue suite à la déshydratation de l'ion m/z 299 (figure 72). Dans le cas présent, ce n'est pas la transition de 118 Da qui est à retenir mais bien la présence ou non de l'ion produit de m/z 163 sur le spectre d'un produit de transformation à identifier. En effet, comme stipulé ci-dessus, sa présence permet d'exclure le fait que des transformations chimiques aient eu lieu sur la partie pyrrolopyrimidinone de la molécule mère.

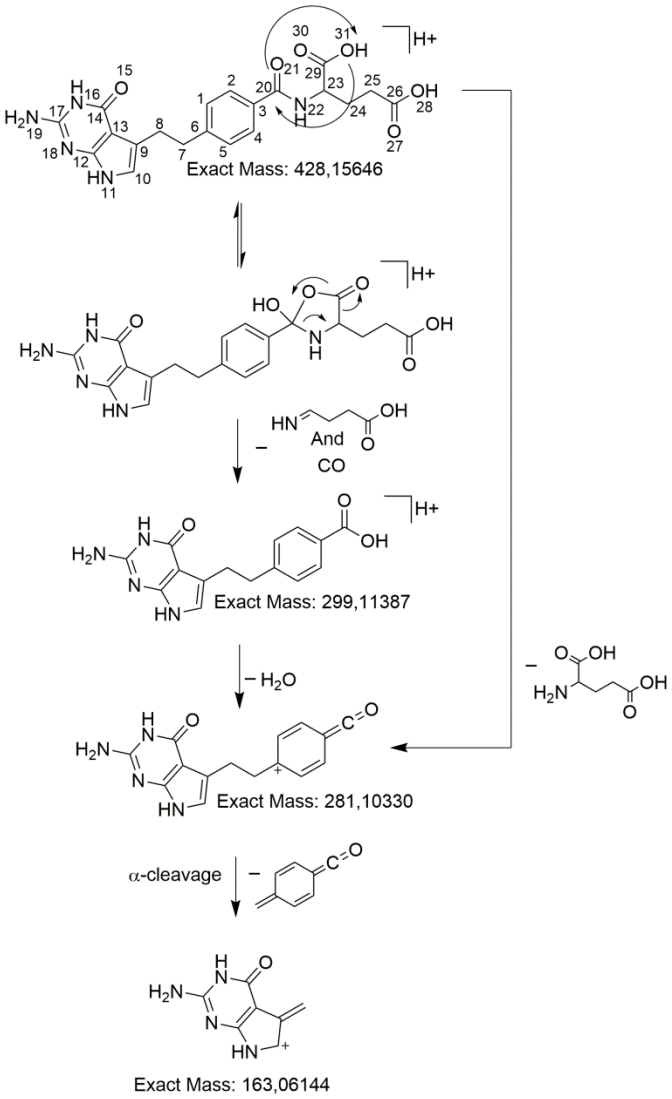


Figure 72 : processus de fragmentation du PEME.

3.2.2. Élucidation structurale des produits de transformation

Les TPs ont été caractérisés par l'étude détaillée des données issues des spectres de masse et par la recherche systématique des transitions caractéristiques et des ions diagnostics déterminés au travers de l'étude des processus de fragmentation du PEME.

TP_{431}, TP_{329} et TP_{301}

D'après leurs spectres $HRMS^n$, les structures des ions protonés de TP_{431} ($C_{19}H_{22}N_5O_7^+$), TP_{329} ($C_{15}H_{16}N_5O_4$+) et TP_{301} ($C_{14}H_{16}N_5O_3^+$) sont fortement apparentées. En effet, leurs pics de base ($HRMS^2$) présentent la même masse exacte m/z 285 ($C_{14}H_{13}N_4O_3^+$) et génèrent aussi les mêmes ions produits si l'on compare les spectres issus de leurs analyses en mode $HRMS^3$ (TP_{431} ou TP_{329} ou TP_{301}->285->mêmes ions produits ; cf. figure 73). Compte tenu de la formule brute de chacun des TPs, la formation de l'ion produit de m/z 285 à partir des ions protonés TP_{431}, TP_{329} et TP_{301}, peut s'expliquer par des pertes respectives d'acide glutamique, de formamide et d'ammoniac.

L'ion diagnostic m/z 163 est absent dans les trois cas, signifiant ainsi qu'aucun de ces produits de transformation n'a gardé intacte la fraction pyrrolopyrimidinone de la molécule mère.

Les ions produits de TP_{329} et TP_{301} ne présentent pas la transition caractéristique avec perte de 129 Da qui signerait la présence dans ces ions de la chaîne latérale contenant le groupe glutamate. À la place, un autre ion commun très intense de m/z 127 a été retrouvé dans chacun de leurs spectres $HRMS^2$, dont la formule brute ($C_4H_7N_4O^+$) ainsi que la connaissance préalable de la formule développée de la molécule d'origine ont permis de déduire qu'il s'agit de l'ion protoné de la 6-aminoisocytosine.

La compréhension de la structure du PEME et des ions produits de TP_{431}, TP_{329} et TP_{301} a permis de proposer pour ceux-ci les formules représentées sur la figure 73.

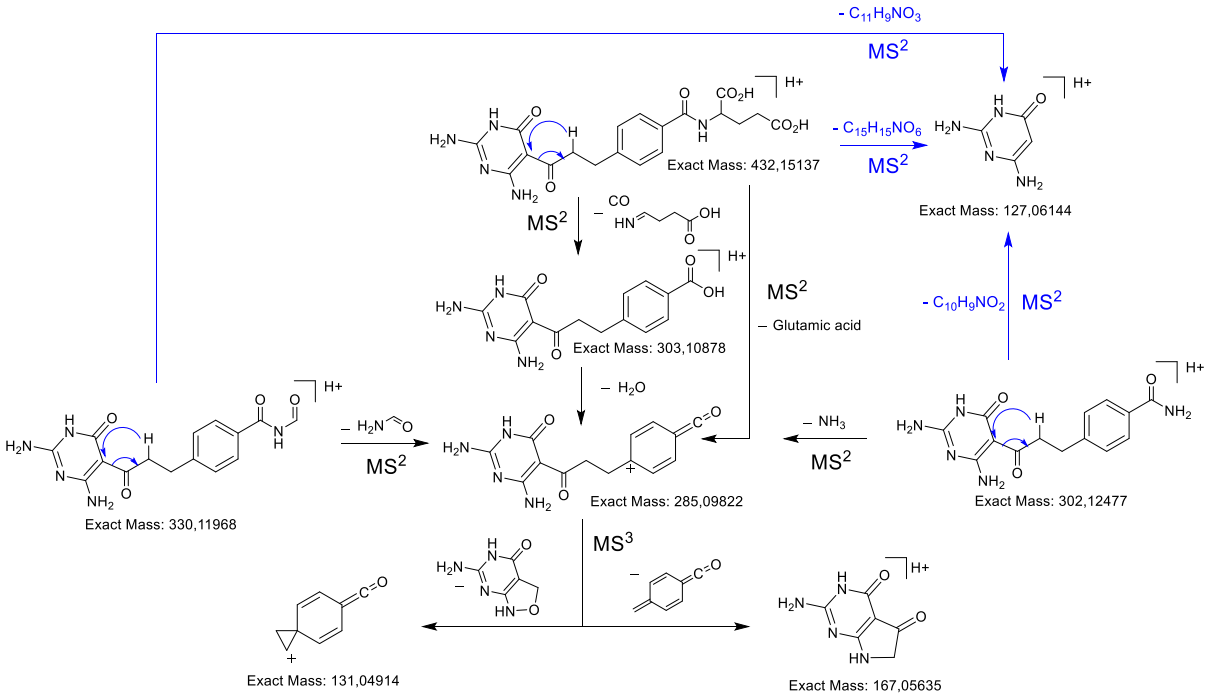


Figure 73 : schéma de fragmentation des TP_{431}, TP_{329} et TP_{301}.

TP_{226}

Le spectre $HRMS^2$ de TP_{226} (de formule brute $C_8H_{11}N_4O_4^+$) montre qu'il a perdu le groupe glutamate (pas de perte de masse 129 Da). Par contre le spectre présente l'ion produit de m/z 127 ($C_4H_7N_4O^+$, 6-aminoisocytosine) très caractéristique, déjà mis en évidence pour les TP_{431}, TP_{301} et TP_{329}. Une perte d'acide méthanoïque (227->181) est aussi observée. Or malgré la présence de deux fonctions acide carboxylique sur l'ion protoné du PEME, aucun départ direct d'acide carboxylique n'a pu être détecté jusqu'ici. Ainsi, pour que ce départ soit possible, il a dû apparaître une configuration différente de celle de la chaîne latérale du PEME. Cette configuration doit rester cohérente avec les trois transitions parallèles suggérées par les données du spectre $HRMS^2$ de l'ion protoné du TP_{226}: 227->209 ($-H_2O$), 227->181 ($-H_2CO_2$) et 227->127 ($-C_4H_4O_3$).

À partir des formules brutes des ions m/z 227 ($C_8H_{11}N_4O_4^+$) et m/z 127 ($C_4H_7N_40^+$) on déduit la formule brute de la perte neutre qui accompagne la transition 227->127 : $C_4H_4O_3$. En prenant en compte que m/z 227 perd une molécule d'acide méthanoïque dans la transition 227->181, on est conduit à émettre l'hypothèse que la chaîne latérale de m/z 227 qui donne lieu à la perte neutre $C_4H_4O_3$ est du type acide 4-oxobutanoïque. Cette hypothèse conduit à la structure de m/z 227 donnée dans la figure 74.

L'hypothèse est confirmée par la justification que l'on peut donner à la formation des ions produits 209 et 181.

En effet, le passage par un intermédiaire comprenant un cycle à 5 sommets formé suite à l'attaque nucléophile sur le carbone du carbonyle de la fonction amide adjacente permet aisément d'expliquer la perte d'eau (227->209), de H_2CO_2 (227->181) et d'un groupement de type oxolane-2,5-dione. Pour la structure de TP_{226} la configuration cyclique à 5 sommets de formule $C_4H_5O_3$ n'est pas privilégiée compte tenu des contraintes du cycle et de l'encombrement stérique. Par conséquent, TP_{226} apparaît comme étant l'acide 3-[(2-amino-6-oxo-1,6-dihydropyrimidin-4-yl)carbamoyl]propanoïque.

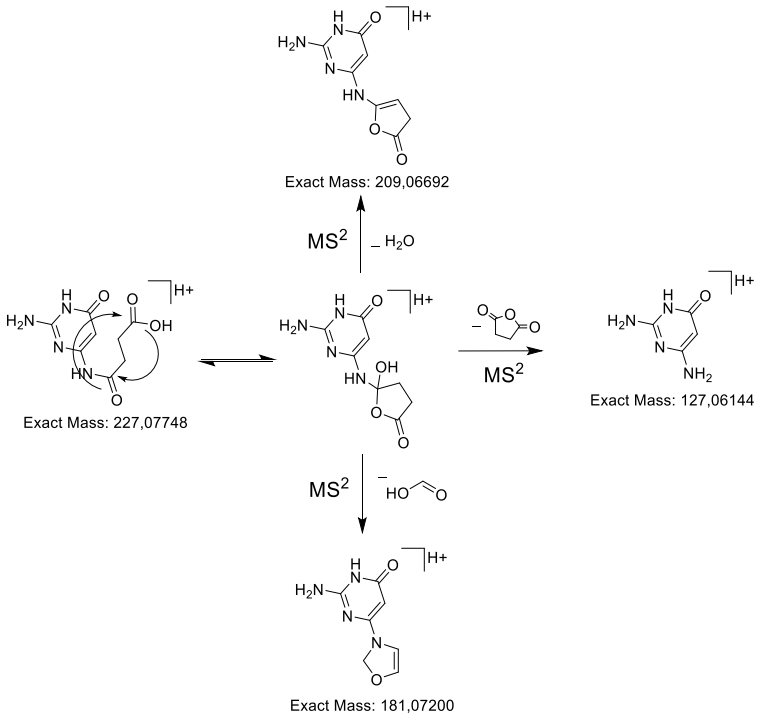


Figure 74 : processus de fragmentation de TP_{226}.

TP_{443}, TP_{459} et TP_{475}

Les ions protonés des 3 produits de transformation (TP_{443}, TP_{459} et TP_{475}) ont les formules brutes suivantes (données HRMS) : $C_{20}H_{22}N_5O_7^+$, $C_{20}H_{22}N_5O_8^+$ et $C_{20}H_{22}N_5O_9^+$. Elles indiquent qu'ils sont issus d'oxydations du PEME (formule brute du PEME : $C_{20}H_{22}N_5O_6^+$). Il est à remarquer que les trois produits de transformation ont le même nombre d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'azote que le PEME mais des nombres d'atomes d'oxygène supérieurs. Par ailleurs en HRMS², aucun de ces ions ne conduit à l'ion diagnostic de m/z 163, ce qui indique que le groupement

pyrrolopyrimidinone a été modifié pour chacun (cf. figure 72 processus de fragmentation du PEME), vraisemblablement par le gain d'un ou de plusieurs atomes d'oxygène.

TP_{443} étant issu d'une oxydation du PEME avec gain d'un seul atome d'oxygène sur le groupement mentionné ci-dessus, des expériences $HRMS^n$ ont été menées pour identifier le site de modification. Comme le PEME, TP_{443}, perd une molécule d'acide glutamique (M=147) pour donner l'ion m/z 297. La fragmentation de ce dernier donne naissance à deux pertes de neutre C_9H_8O (297->165) et $C_6H_6N_4O_2$ (297->131), correspondant au complémentaire de l'un vis-à-vis de l'autre. Cette fragmentation due à la rupture de la liaison 9C-8C indique que par rapport au PEME cette liaison a été affaiblie dans l'ion m/z 297. Cela peut être dû à la formation d'un équilibre céto-énolique résultant de l'hydroxylation qui a eu lieu sur C10. Il est d'ailleurs à noter que cette structure a été décrite dans une publication sur la photodégradation du pémétrexed publiée par Jansen et al (figure 75).

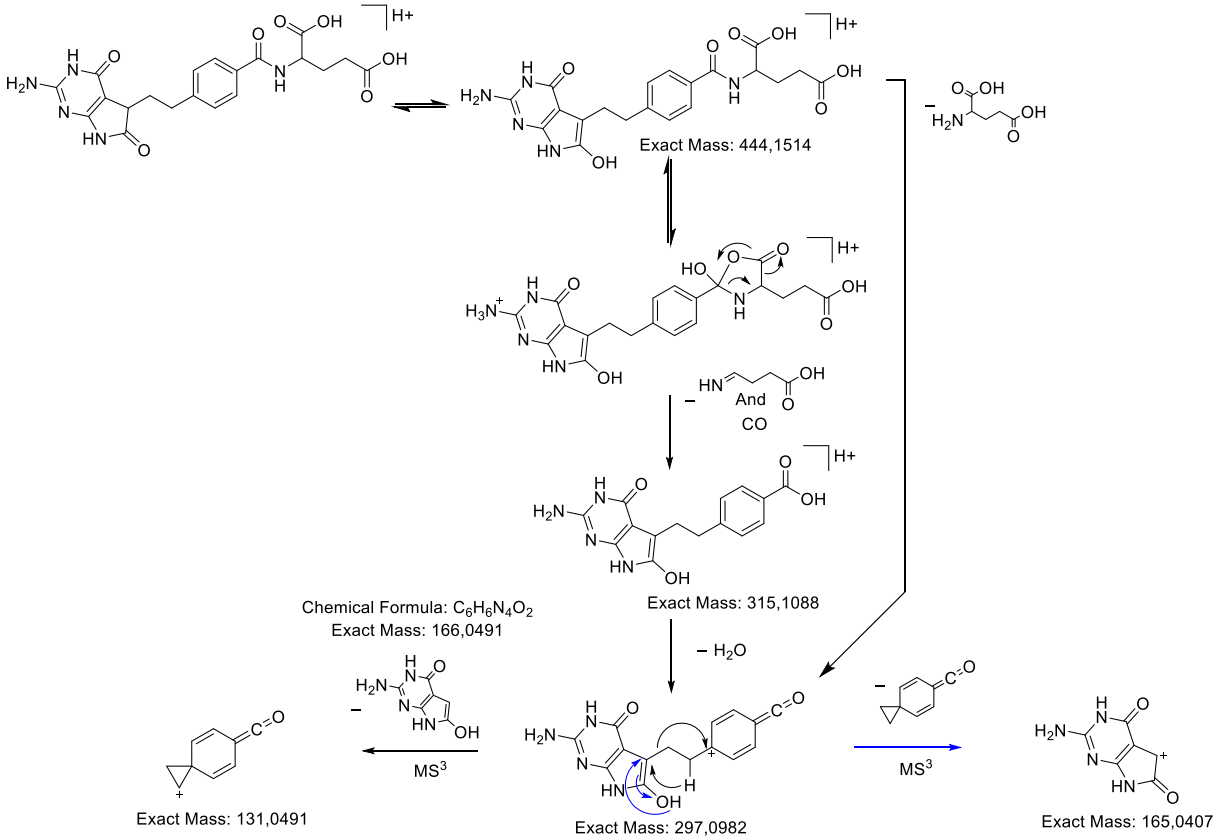


Figure 75 : processus de fragmentation du TP_{443}.

En ce qui concerne TP_{459}, on remarque que celui-ci a gagné 2 atomes d'oxygène par rapport au PEME et dont il faut déterminer la position. Comme la perte de neutre caractéristique de 129 Da (CO et $C_4H_7NO_2$) a été détectée (460->331; 442->313; 424->295), il a pu être établi que l'oxydation n'a pas eu lieu sur la chaîne latérale contenant le groupe glutamate. Deux ions intenses de m/z 165 et m/z 135 ont aussi été détectés ; l'ion de m/z 165 est identique à celui issu de la fragmentation de TP_{443} (cf. figure 76), ce qui indique qu'un atome d'oxygène s'est fixé sur le carbone 10 comme pour TP_{443}. La formation de l'ion m/z 135 issu de la fragmentation $HRMS^3$ de l'ion m/z 442 est en faveur d'une hydroxylation sur C9. Cette structure a aussi été décrite dans les travaux de Jansen et al (figure 76).

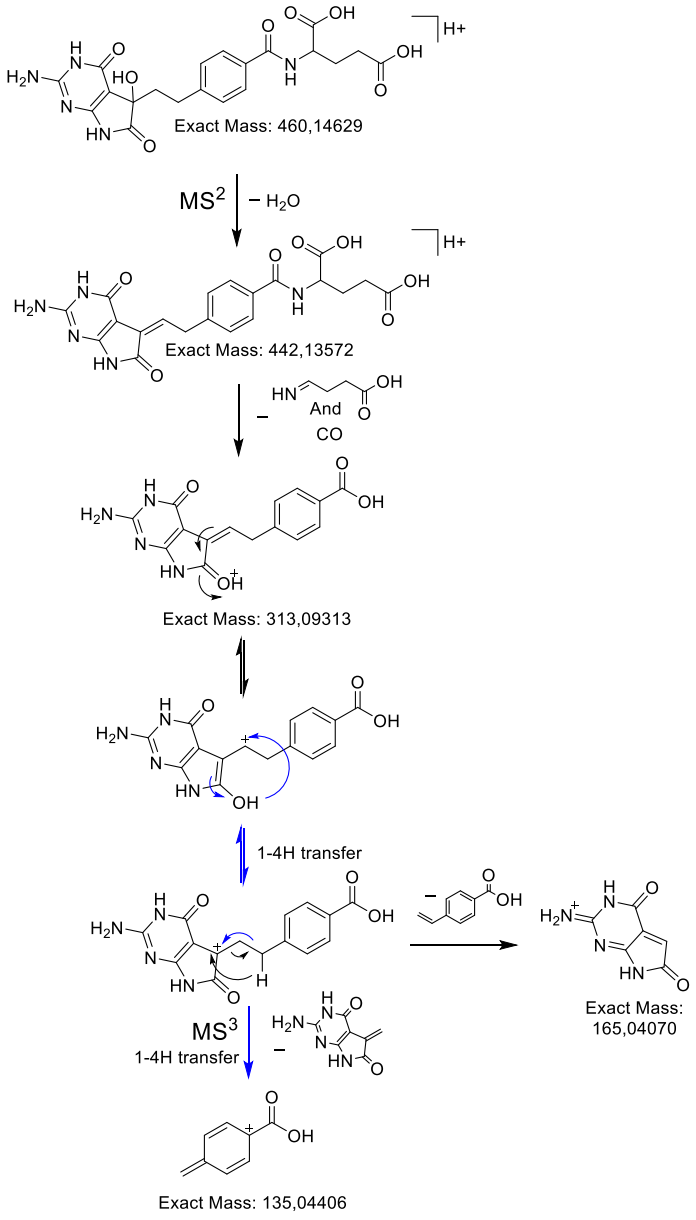


Figure 76 : processus de fragmentation du TP_{459}.

Pour TP_{475} (formule brute en HRMS : $C_{20}H_{22}N_5O_9^+$) le pic de base obtenu par $HRMS^2$ correspond à une masse exacte de 459,1146 (formule brute : $C_{20}H_{19}N_4O_9^+$) qui s'explique par la perte d'une molécule d'ammoniac. Quand les ions de m/z 476 et 459 sont soumis à des processus de fragmentation supplémentaires, des ions produits de m/z 347 et 330 sont formés avec dans les deux cas une perte globale de 129 Da, ce qui indique que le groupe glutamate n'a pas été modifié cette fois aussi. Une fois soumis à des processus de fragmentation supplémentaires, les ions 347 et 330 conduisent à des ions par des transitions qui permettent d'envisager que des modifications substantielles sont survenues sur la partie pyrrolopyrimidinone du PEME. Les données $HRMS^n$ rassemblées ont permis d'établir que la structure de TP_{475} correspond à un dérivé de type [2-amino-5-hydroxy-1,5-dihydropyrimidine-4,6-dione] (figure 77).

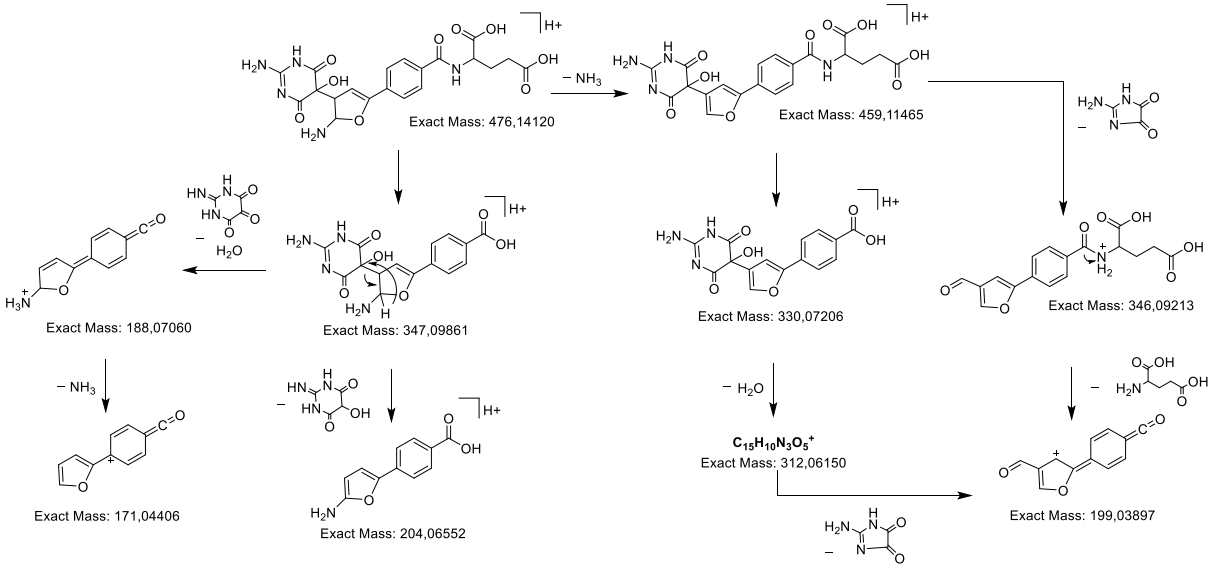


Figure 77 : processus de fragmentation du TP_{475}.

3.3. Voies de transformation du pémétrexed par photocatalyse

Les voies de transformation du PEME en présence de photocatalyseur et de lumière ont été obtenues en s'appuyant sur les structures établies en employant la LC-HRMS^n et sur des calculs de chimie quantique. Comme dans l'étude précédente de l'argatroban, le calcul *ab initio* de la densité des électrons frontières (Frontier Electron Density, FED) sur chacun des atomes a été réalisé. Les valeurs les plus élevées de FED^2_{HOMO} + FED^2_{LUMO} permettent de prédire les sites d'attaque les plus probables des radicaux hydroxyle ($^{\bullet}OH$). Les valeurs les plus élevées de $2FED^2_{HOMO}$ permettent de pronostiquer les sites de formation les plus favorables de lacunes électroniques (An et al., 2015 ; Zhang et al., 2008). Les calculs ont été effectués sur la structure optimisée du PEME (modèle B3LYP 6,31 G (d,p)) en utilisant le logiciel Gaussian. Les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau 14.

Tableau 14 : valeurs de $2\ FED^2_{HOMO}$ et de $FED^2_{LUMO} + FED^2_{HOMO}$ pour les atomes du PEME (numérotation effectuée selon celle de la figure 72).

Numérotation	Atome	$2\ FED^2_{HOMO}$	$FED^2_{LUMO} + FED^2_{HOMO}$
1	C	0.002	0.019
2	C	0.000	0.114
3	C	0.002	0.169
4	C	0.000	0.101
5	C	0.002	0.030
6	C	0.006	0.197
7	C	0.050	0.029
8	C	0.006	0.056
9	C	0.140	0.082
10	**C**	**0.380**	**0.192**
11	N	0.022	0.012
12	C	0.232	0.117
13	C	0.142	0.072
14	C	0.008	0.004
15	O	0.123	0.062
16	N	0.014	0.007

17	C	0.020	0.010
18	N	0.212	0.106
19	N	0.055	0.028
20	C	0.000	0.146
21	O	0.000	0.109
22	N	0.000	0.060
23	C	0.000	0.006
24	C	0.000	0.024
25	C	0.000	0.003
26	C	0.000	0.001
27	O	0.000	0.001
28	O	0.000	0.000
29	C	0.000	0.013
30	O	0.000	0.005
31	O	0.000	0.001

Les valeurs de $FED^2_{HOMO} + FED^2_{LUMO}$ (0.192) et de $2FED^2_{HOMO}$ (0.380) étant les plus élevées pour 10C, il est attendu que celui-ci soit le site préférentiel d'attaque de $^{\bullet}OH$ et de formation de lacune électronique (photooxydation). Ces prévisions sont cohérentes avec la structure proposée des produits de transformation et justifient que le site d'initiation de la transformation par photocatalyse est le carbone 10.

Plus précisément, les formations de TP_{443} et TP_{459} s'expliquent par des processus de photooxydation et/ou d'addition de $^{\bullet}OH$ initiés en 10C (tableau 14), processus consécutifs à l'emploi du procédé photocatalytique.

Compte tenu de la structure de TP_{475}, il est très probable que ce composé soit issu de photooxydation exclusivement (pas d'addition de $^{\bullet}OH$). Les autres composés pourraient être issus de l'un et/ou de l'autre des deux phénomènes (photooxydation et/ou addition de $^{\bullet}OH$).

Étant donné sa structure, TP_{431} apparaît très clairement comme étant au centre de la transformation photocatalytique du PEME : TP_{431} est issu de 443 et 459 par ouverture d'un cycle ; c'est aussi un intermédiaire à la formation de TP_{329}, TP_{301} et de TP_{226}. Ces derniers sont formés par décarboxylation oxydative du groupe glutamate, avec à la suite pour TP_{226}, une réaction de transamidation (figure 78).

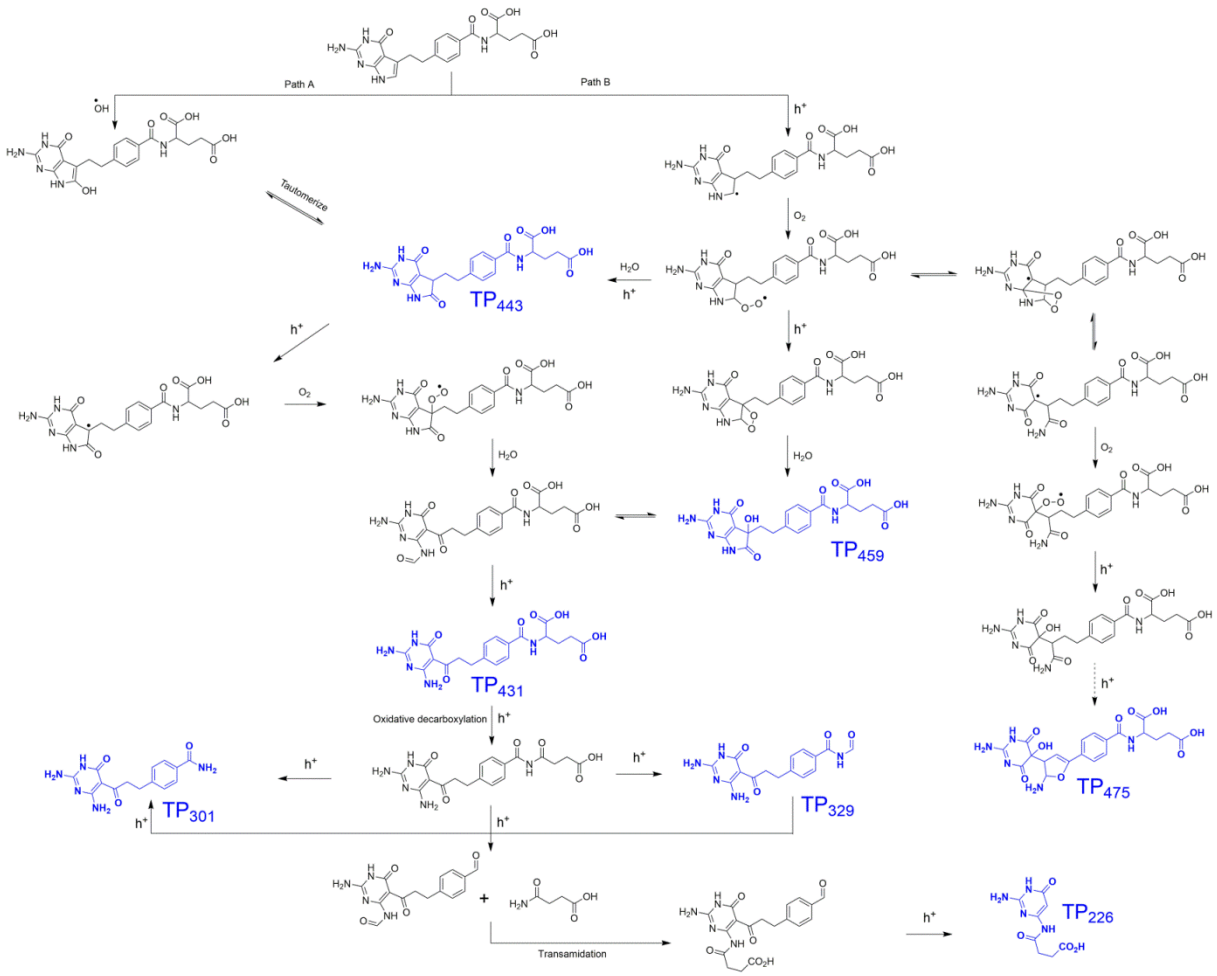


Figure 78 : schéma de transformation du PEME. Les TPs sont colorés en bleu.

3.4. Toxicité potentielle des produits de dégradation par étude *in silico*, *in vitro* et *ab initio*

3.4.1. Toxicité globale évaluée par bioluminescence (évaluation *in vitro*)

La toxicité globale des échantillons irradiés (solutions aqueuses de PEME dans lesquelles ont été ajoutées des nanoparticules de TiO_2, 1 $g.L^{-1}$) a été évaluée en mélangeant les solutions obtenues après différentes durées d'exposition avec des bactéries qui ont la propriété d'émettre chacune plus de bioluminescence lorsqu'elles sont plus nombreuses (Quorum sensing). Les conditions d'emploi de cet essai de bioluminescence avec *V. fischeri* sont rapportées dans la publication. Il s'agit d'un essai *in vitro* qui est prédictif de la toxicité de composés pour des espèces de niveau trophique bas (*i.e.* bactéries et algues). Les résultats sont représentés dans la figure 79.

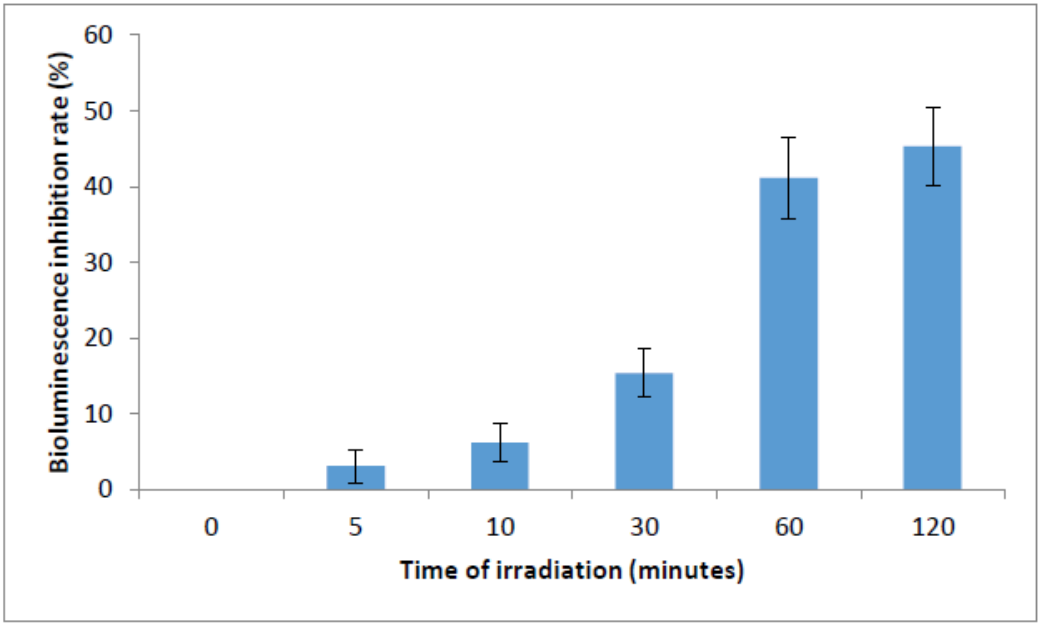


Figure 79 : pourcentage d'inhibition de bioluminescence en fonction du temps d'exposition.

Il a été détecté une forte croissance de l'inhibition de la bioluminescence, ce qui indique que les échantillons présentent une augmentation de leur toxicité lorsque la durée de leur irradiation augmente.

3.4.2. Toxicité globale évaluée par approche QSAR (évaluation *in silico*)

Pour confirmer le processus d'augmentation de toxicité globale (cf. étude *in vitro*), les résultats de l'élucidation structurale ont été employés afin d'évaluer la toxicité de chacun des TPs par approche QSAR (logiciel EPI, Agence de l'environnement des Etats Unis) pour les espèces des trois niveaux trophiques proposés par le logiciel (poisson, daphnie (crustacé planctonique) et algue verte) qui sont des modèles fréquemment employés à cette fin.

Pour chaque durée d'exposition l'échantillon est analysé. Pour chaque TP caractérisé i, son signal relatif X_i ($\Sigma X_i = 1$ pour chaque durée d'exposition) est déterminé en LC-UV, puis pour chaque durée d'exposition, la toxicité globale (TAEmix) du mélange vis-à-vis de chacune des espèces est calculée par la relation :

$$\frac{1}{TAEmix} = \sum \frac{Xi}{TAEi}$$

avec TAEi, la toxicité d'un composé i déterminée par approche QSAR. En fonction des espèces, les données obtenues sont soit une concentration létale pour 50% des organismes (LC 50) soit une concentration ayant un effet sur 50% des organismes (EC 50).

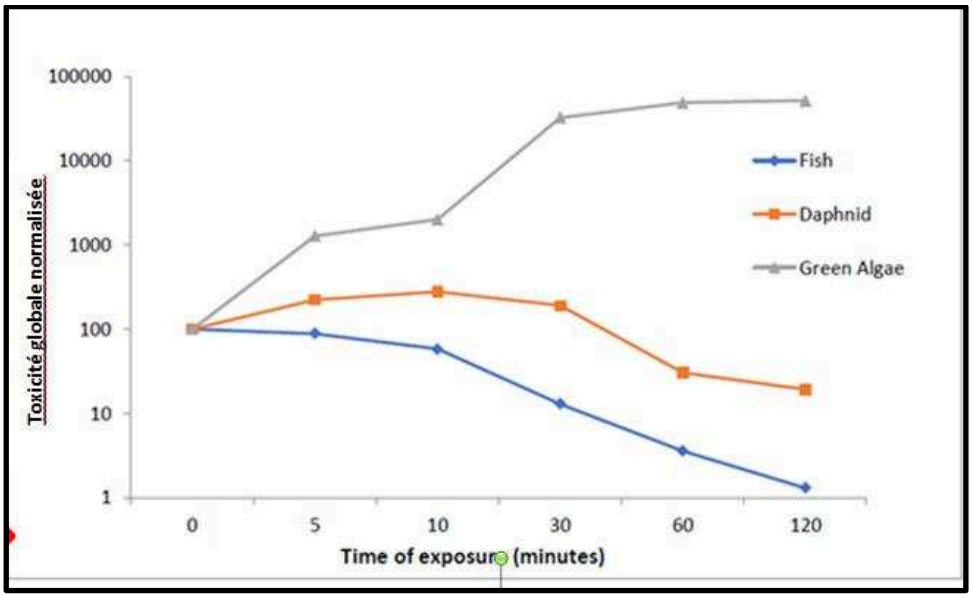


Figure 80 : toxicité globale normalisée (échelle logarithmique) en fonction de la durée d'exposition pour les trois espèces pour lesquelles des données QSAR

existent dans le logiciel EPI. Par convention la toxicité globale normalisée est fixée à 100 pour une durée d'exposition nulle.

On remarque que pour les espèces des plus grands niveaux trophiques (poisson et daphnie), la toxicité du mélange diminue avec la durée d'exposition, en faveur d'un processus de détoxification (figure 80). En revanche, de façon très cohérente avec les résultats *in vitro* (sur une bactérie), il a été retrouvé que la toxicité de la solution de PEME vis-à-vis d'autres organismes unicellulaires (algues vertes unicellulaires) augmente en fonction de la durée d'exposition au processus d'oxydation avancée.

3.4.3. Part de chaque composé dans la toxicité du mélange évaluée par approche QSAR (évaluation *in silico*)

Pour évaluer la part de chaque composé i dans la toxicité du mélange, le rapport $C_i/EC50_i$ a été calculé pour chaque durée d'irradiation (tableau 15), C_i étant la concentration du composé i et $EC50_i$ la concentration du composé i induisant 50% d'effet à 96h sur l'algue verte.

Tableau 15 : Ci/EC50i (96 heures, algue verte) en fonction de la durée d'irradiation.

	96-h green algae EC50 (mg L-1)	Irradiation Time (min)					
		0	**5**	**10**	**30**	**60**	**120**
PEME	795	0.126	0.109	0.069	0.013	0.003	0.000
TP_{443}	15.39	0.000	1.493	2.447	1.901	0.228	0.130
TP_{329}	0.2	0.000	0.000	0.000	39.025	61.488	**65.000**
TP_{459}	47852	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{475}	191000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{226}	9352	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{431}	5631	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
TP_{301}	143	0.000	0.000	0.000	0.026	0.015	0.013

Il s'avère que, très nettement, TP_{329} présente les valeurs de rapport les plus élevées (65 pour 120 minutes d'exposition, tableau 15) et qu'il est donc sans doute le principal responsable de la toxicité observée pour le mélange envers l'algue verte.

Pour renforcer cette hypothèse, une étude de corrélation entre l'inhibition de bioluminescence et la concentration du PEME ou de chaque TP a été menée (tableau 16).

Tableau 16 : coefficients de corrélation entre l'inhibition de bioluminescence et l'aire relative pour chaque TP et plages de pH dans lesquelles les TPs sont isoélectriques.

	PEME	TP_{226}	TP_{301}	TP_{329}	TP_{431}	TP_{443}	TP_{459}	TP_{475}
coefficients de corrélation (Pearson)	-0,85	0,99	0,61	0,95	0,32	-0,3	0,1	-0,15
Plages de pH TPs isoélectriques	1,5 à 3	1 à 3,5	1 à 7	2 à 7	0,5 à 2,5	1 à 2,5	1 à 2,5	3 à 4

Les valeurs du coefficient de corrélation de Pearson sont les plus importantes pour TP_{226} (0,99) et TP_{329} (0,95) (Tableau 16), confirmant les résultats obtenus par l'approche QSAR en faveur d'une toxicité potentielle de TP_{329}.

Au total, les méthodes *in vitro* et QSAR, cette dernière nécessitant de connaître les structures des produits de transformation, ont donc fourni des premiers éléments sur l'écotoxicité du mélange et de chaque TP isolé.

D'après l'étude QSAR, il semblerait qu'un produit de transformation présente une toxicité bien plus élevée que les autres vis-à-vis du niveau 1 trophique (échelle cellulaire/algue/bactérie), TP_{329}.

Pour expliquer la toxicité observée pour TP_{329} par rapport aux autres composés, la capacité des composés à traverser les membranes a été approchée en prenant pour critère le domaine de pH dans lequel les composés sont isoélectriques. Le logiciel Chemicalize® a permis d'obtenir ces données à partir des structures (Table 16). TP_{329}, contrairement au pémétrexed et aux autres produits de transformation à l'exception de TP_{301}, est isoélectrique au pH de l'essai *vibrio fischeri* (5 à 7), ce qui facilite le passage par diffusion passive du composé au travers de la membrane de cette bactérie.

3.4.4. Réactivité des produits de transformation par approche *ab initio*

Le présent paragraphe vise à évaluer la réactivité chimique du PEME et de chacun des produits de transformation en employant des calculs *ab initio*. En effet, dans un article (Kostal et al., 2015), les auteurs ont démontré que l'emploi de deux

descripteurs moléculaires pouvait permettre de classer ces substances en fonction de leurs risques d'induire des effets toxiques :

- le log P

- la différence d'énergie (ΔE) entre l'orbitale moléculaire inoccupée de plus faible énergie (LUMO) et l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO).

À partir de 617 composés, les auteurs ont pu proposer des filtres (ΔE>6 et log P<1,6) qui permettraient de prédire quels composés ne sont pas toxiques. En appliquant leurs filtres et en utilisant les données de LC 50 à 96h (concentration létale pour 50% de l'espèce à 96h) sur *Pimephales promelas* (poisson modèle) et de LC 50 à 48h sur *Daphnia Magna*, respectivement 99% et 89% des composés à toxicité élevée et modérée sont identifiés comme étant à risque, tandis que 45% et 88% des composés présentant une toxicité faible ou très faible sont évalués comme étant faiblement toxiques.

Cette autre approche a donc été appliquée à l'évaluation de la toxicité potentielle du PEME et de ses produits de transformation (figure 81). La différence d'énergie ΔE a été obtenue pour le PEME et chaque TP par approche *ab initio* en utilisant toujours des structures optimisées selon le modèle B3LYP 6,31 G (d,p). Les valeurs de log P ont été déterminées en utilisant le logiciel Marvinsketch®.

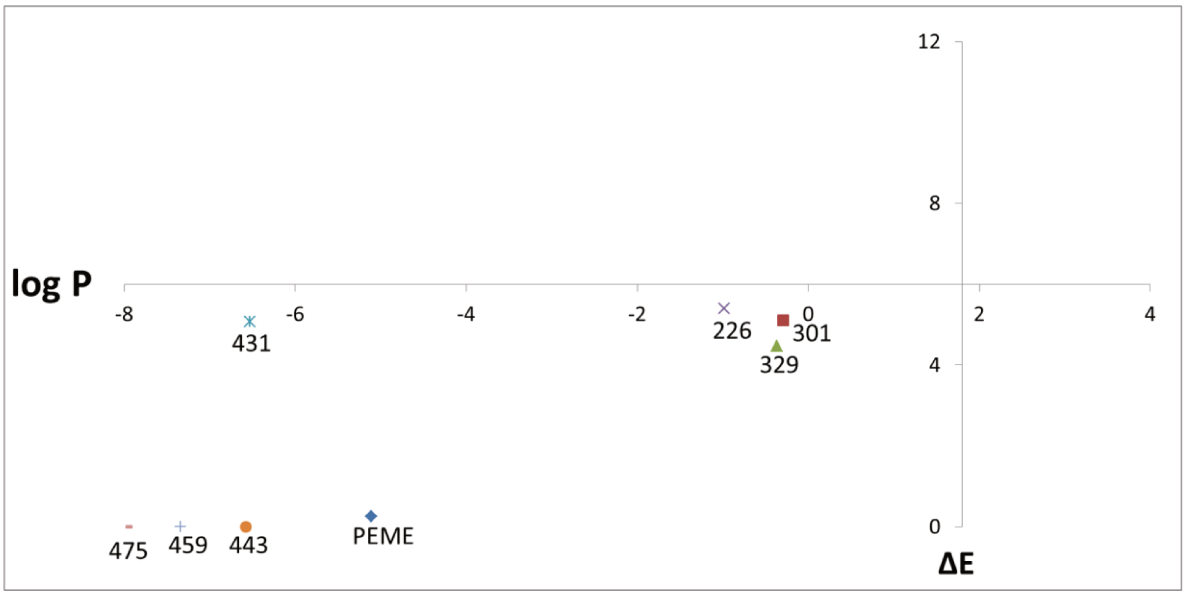


Figure 81 : distribution des couples ΔE et log P pour le PEME et ses produits de transformation.

Le point d'intersection des deux axes se situe aux valeurs seuils des filtres ΔE = 6 et log P = 1,6. Ainsi la zone présentant une valeur de log P faible et une valeur de ΔE élevée correspond aux composés à risque toxicologique faible alors que la zone présentant une valeur de log P élevée et une valeur de ΔE faible correspond aux composés à risque toxicologique élevé (figure 81).

Tout autant que ses produits de transformation, le principe actif présente une valeur de ΔE < 6 ce qui implique qu'ils ne sont pas sans risques. Néanmoins, à cause d'une valeur de log P <1,6 ils ne figurent pas parmi les composées que l'on considère comme présentant un risque élevé. Cependant parmi les composés, TP_{226}, TP_{301} et TP_{329}, proches des valeurs seuils des filtres (figure 81), on retrouve TP_{329} déjà signalé comme étant sans doute le principal responsable de la toxicité observée du mélange obtenu par dégradation photocatalytique du PEME. Cette convergence des résultats justifie la nécessité de conduire des études complémentaires qui devraient porter en priorité sur TP_{329}.

4. Conclusion

La caractérisation des produits de dégradation et les études *in vitro* et *in silico* du PEME exposé aux conditions photocatalytiques ont permis de mieux comprendre les processus de dégradation du PEME en présence d'un procédé d'oxydation avancée et de déterminer les impacts potentiels de la dégradation.

Le faisceau d'informations obtenues, issues des données expérimentales et de modèles, a mis en évidence que :

- la dégradation du PEME par un procédé d'oxydation avancée conduit à une augmentation de la toxicité vis-à-vis des espèces unicellulaires,

- les produits de transformation susceptibles de générer une toxicité doivent être aptes à traverser les membranes phospholipidiques des bactéries et des algues par diffusion passive. En raison de son caractère isoélectrique aux valeurs de pH du milieu réactionnel, déduit de sa structure chimique, le produit de transformation TP_{329} se place parmi les plus toxiques des produits de transformation du PEME,

- des produits de transformation formés peuvent être plus rémanents que leur précurseur, c'est notamment le cas de TP_{329}.

Ces résultats conduisent à recommander l'optimisation des procédés d'oxydation avancée pour permettre d'obtenir la minéralisation complète des composés toxiques. C'est pour cette raison que la conception de matériaux semi-conducteurs dopés fait l'objet d'intenses recherches (Daghrir et al., 2013).

Article 3 : pémétrexed degradation by photocatalytic process: kinetics, identification of transformation products and estimation of toxicity

Philippe-Henri Secrétan, Maher Karoui, Yves Levi, Hassane Sadou-Yayé, Lionel Tortolano, Audrey Solgadi, Najet Yagoubi and Bernard Do. Science of The Total Environment, **décembre 2017**; 624:1082-1094., DOI:10.1016/j.scitotenv.2017.12.182.

Science of the Total Environment 624 (2018) 1082–1094

Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Pemetrexed degradation by photocatalytic process: Kinetics, identification of transformation products and estimation of toxicity

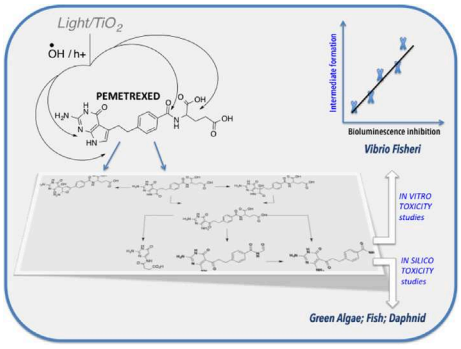
Philippe-Henri Secrétan [a,b,*,1], Maher Karoui [a,c,1], Yves Levi [d], Hassane Sadou-Yayé [a], Lionel Tortolano [a,c], Audrey Solgadi [e], Najet Yagoubi [a], Bernard Do [a,c]

[a] University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, Laboratory "Matériaux et Santé" EA 401, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France
[b] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Department of Pharmacy, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France
[c] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Henri Mondor, Department of Pharmacy, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France
[d] University of Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, UMR 8079, CNRS, AgroParisTech, Paris, France
[e] University of Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites, Institut d'Innovation Thérapeutique, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Chatenay-Malabry, France

HIGHLIGHTS

- The degradation mechanisms of pemetrexed (PEME) under UV/TiO_2 were studied.
- Transformation products (TPs) were detected by HPLC-UV/HRMS.
- Characterization of TPs was achieved by $HRMS^n$ and *ab initio* studies.
- The relative toxicities of TPs were assessed through *in silico* and *in vitro* studies.
- A relationship was established between the toxicity and chemical properties of TPs.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 12 October 2017
Received in revised form 16 December 2017
Accepted 17 December 2017
Available online xxxx

Editor: Kevin V. Thomas

Keywords:
Pemetrexed
Ecotoxicity
Photosensitized degradation
QSAR
in vitro assay
LC-ESI-MS^n

ABSTRACT

This study employed a UV-A/visible/TiO_2 system to investigate the degradation of pemetrexed, an antifolate agent used in chemotherapy. The laboratory-scale method employed a photostability chamber that could be used to study multiple samples. Reversed-phase HPLC coupled with high-resolution ESI-LTQ-Orbitrap mass spectrometry was used to determine the transformation products (TPs) of PEME. Based on the identified TPs and existing chemical knowledge, the mechanism of degradation of the target compound was proposed. Concentrations were monitored as a function of time, and the degradation kinetics were compared. The structures of seven TPs, four of which have not been described to date, were proposed. Most of the TPs stemmed from OH radical additions to the dihydropyrrole moiety and oxidative decarboxylation of the glutamate residue. Based on the elucidated structures, a computational toxicity assessment was performed, showing that the TPs with higher log D values than the parent compound are more toxic than the PEME itself. To support these findings, the toxicities of irradiated samples on *Vibrio fischeri* were monitored over time. The experimental results corresponded well with the results of previous computational studies.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, Laboratory "Matériaux et Santé" EA 401, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.
E-mail address: philippe-henri.secretan@u-psud.fr (P.-H. Secrétan).
[1] The first 2 authors contributed equally to this study and are therefore considered as first authors.

https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.182
0048-9697/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Effluents from sewage treatment plants represent the main sources of contaminants in surface waters; particularly, polar and bio-refractory compounds are partially or poorly removed from wastewater by traditional treatment technologies (Rivera-Utrilla et al., 2013). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) are no exception to this rule (Białk-Bielińska et al., 2016; Rivera-Utrilla et al., 2013; Santos et al., 2010). In wastewater treatment plants (WWTPs), PPCPs are poorly degradable; consequently, PPCPs can reach different components of the environment, such as surface water, groundwater and sediments, which would affect water quality and have harmful effects on humans and natural ecological systems (Białk-Bielińska et al., 2016; Rivera-Utrilla et al., 2013; Zounkova et al., 2010). Advanced oxidation processes (AOPs) have demonstrated a greater ability to effectively degrade PPCPs than traditional WWTPs.

AOPs refer to the treatment process involving reactive oxygen species (ROS) generated by the catalytic process, such as electrocatalysis and photocatalysis (Trawiński and Skibiński, 2017; Velazquez-Pena et al., 2013). Because TiO2 is inert, corrosion-resistant, inexpensive, capable of absorbing visible light, and has a low band gap energy at approximately 3.0 eV, it is a frequently studied and evaluated photocatalyst (Akpan and Hameed, 2011). The most commonly used TiO_2 material is Degussa 25, which comprises 25% rutile and 75% anatase forms and has better photochemical properties than rutile or anatase alone (Hurum et al., 2003). ROS are generated as a consequence of the interactions of UV–Vis radiation with the semiconductor surface, where electron-hole pairs are created (Prieto-Rodriguez et al., 2012). More recently, modifications of the TiO_2 surface with the aim of promoting its photoreactivity and its large-scale use have been increasingly studied (Di Paola et al., 2012). The effectiveness of other semiconductors, such as zinc, tungsten, zirconium, vanadium, bismuth, molybdenum or iron compounds, were also assessed with promising results in some cases. Nevertheless, TiO_2 has remained a cost-effective choice, requiring less energy to form electron-hole pairs than most semi-conductors (Di Paola et al., 2012).

The effectiveness of AOP action is mainly assessed by the kinetics of PPCP degradation. However, monitoring and identifying the phototransformation products formed is equally important for evaluating their persistence and relative toxicity with respect to the parent molecule, especially as they can be found in WWTP effluents (Sturini et al., 2012; Miolo et al., 2011; An et al., 2015; Topal and Topal, 2015). In addition, if by-products and end-products are non-toxic, further degradation and mineralization are ultimately not necessary, allowing the reduction of operating costs (Cavalcante et al., 2015; Vogna et al., 2004).

PEME is a toxic PPCP and is classified as a Class L antineoplastic agent per the Anatomical Therapeutic Classification (ATC) system. This drug is an antifolate agent capable of blocking enzyme activity and disrupting DNA synthesis. Regarding environmental risks and due to its intended function, PEME can exert cytotoxic, genotoxic or carcinogenic effects and induce subtle genetic and cell cycle changes in aquatic organisms under chronic exposure (Johnson et al., 2008; Rowney et al., 2009). Consumption studies in different European countries have shown an increase in the use of PEME (Franquet-Griell et al., 2015), especially because the drug is prescribed as a first-line treatment in lung cancer, and the number of new cases of this type of cancer continues to increase (Jemal et al., 2011). Being polar, water-soluble, non-volatile and weakly metabolized (Adjei, 2004), PEME may be present in wastewaters from hospital effluents as well as domestic dwellings due to the rise in home anticancer treatments. Singer et al. (2016) estimated that approximately 22% of PEME is removed during wastewater treatment, which indicates that PEME is likely persistent in the environment. In this regard, discharge from WWTPs can be considered as the main source of PEME contamination in aquatic environments, which is the case for other anticancer drugs (Fatta-Kassinos and Kümmerer, 2010; Rowney et al., 2009).

Although the predicted environmental concentrations of PEME in WWTP effluents appear to be increasing each year (Besse et al., 2012; Booker et al., 2014) and PEME is known to be fetotoxic and teratogenic (Novak, 2005), no information about its potential TPs and their ecotoxicity has been published. Methotrexate, another antifolate drug structurally close to PEME, was shown to photodegrade under photocatalytic conditions (Calza et al., 2014), and some TPs have been shown to have residual ecotoxicity (Lai et al., 2017).

The aim of this study was to investigate the photolytic and photocatalytic transformations of PEME when using TiO_2 as a heterogeneous photocatalyst and while paying particular attention to the reaction kinetics, intermediates and pathways. This study was not the subject matter of any paper before. The influences of ROS on PEME degradation were determined by kinetics in the presence of ROS scavengers. Quantitation of the PEME and the formed TPs and the characterization of the TPs were achieved using LC-UV and LC-high resolution multistage mass spectrometry (LC-$HRMS^n$).

Theoretical simulations using density functional theory (DFT) have provided additional information about the transformation process. *In silico* studies have provided overall insight into the toxicity of TPs. The experimental toxicity of PEME on *Vibrio fischeri* was followed over time throughout PEME degradation to support these findings.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

Pemetrexed (purity > 99%) and titanium dioxide (99.5% Aeroxide® P25, nanopowder, average primary particle size 21 nm) were obtained from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The structural properties of P25 TiO_2 given by the supplier are as follows: 21 nm primary particle size, 35–65 m^2/g surface area and ≥99.5% purity (Sigma Aldrich). Ryu and Choi provided the following more detailed and extended structural properties (Ryu and Choi, 2008): primary particle size of 27 nm for anatase and 16 nm for rutile, surface area of 50 m^2/g, hydrodynamic size of 473 nm, and zeta potential of 35 ± 5 mV.

Formic acid, isopropanol, methanol and acetonitrile (LC-MS grade) were purchased from VMR Prolabo® Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). Ultrapure water was produced by the Q-Pod Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

2.2. Preparation of solutions and suspensions

The stock solutions were prepared by dissolving an appropriate amount of PEME in pure water to obtain a concentration of 400 μg mL^{-1}. Working solutions were prepared by diluting the stock solution in water to obtain a PEME concentration of 100 μg mL^{-1}.

Calibration of the quantitative method for the determination of PEME was performed in the range 20–120 μg mL^{-1}. Calibration solutions were prepared by diluting the stock solution in ultrapure water.

Experiments were carried out to highlight the main pathways responsible for PEME photolytic and photocatalytic degradation. For the photocatalytic studies, TiO_2 was added to the working solutions to achieve a final concentration of 100 μg mL^{-1}. The suspensions were then kept in the dark for 30 min to reach sorption/desorption equilibrium before being exposed to light (see Section 2.3) for periods ranging from 0 to 120 min. The samples were stirred continuously, and the PEME and TiO_2 were equilibrated in the dark before exposing them to light.

To investigate the influences of radical oxygen ($^{\bullet}OH$) and photoholes (h^+) on PEME, light/TiO_2 experiments were carried out with the addition of methanol ($^{\bullet}OH$ and H^+ scavenger) and isopropanol ($^{\bullet}OH$ scavenger) to achieve a final concentration of 0.1 mol L^{-1} in both cases.

All of the samples were exposed to the same irradiation conditions described in Section 2.3.

2.3. Irradiation and sampling conditions

Photolysis experiments were performed using a QSUN-XE-1 light chamber equipped with a xenon lamp to simulate natural sunlight with a wavelength range of 300–800 nm. During all the experiments, the temperature was controlled and set at 25 ± 0.5 °C. A Daylight-Q filter was used to simulate CIE Standard Illuminant D65, and a constant irradiance was maintained c (1.5 Wm^{-2} at 420 nm). Manufacturer measurements indicate that this setting corresponds to a visible intensity of ~119,600 lx and a UV_A intensity (300–400 nm) of 66.5 The total irradiance spectrum of the lamp used is provided in the Supplementary material (Fig. S1).

The suspension used for the experiments consisted of 20 mL of the working solution spiked with TiO_2 to 100 μg mL^{-1}. Next, 2 mL aliquots of this suspension were sampled at various intervals of time (0–5–10–30–60–120 min), immediately filtered through a cellulose acetate membrane (0.45 μm pore size, 25 mm diameter) and centrifuged (4000 rpm, 5 min) to remove particles.

A 20 mL sample of the working solution spiked with TiO_2 to 100 μg mL^{-1} was wrapped with aluminum foil and used as a dark control to determine losses due to processes other than photolysis (*e.g.*, hydrolysis and adsorption).

2.4. Instrumental

Separation of PEME and TPs was achieved using a Kinetex™-C18 (5 μm, 250 × 4.6 mm d.i.) LC column. The chromatographic system consisted of a Dionex UltiMate 3000 HPLC system (Dionex, Les Ulis, France) controlled by Chromeleon® software version 6.80 SR11. The final optimized conditions were as follows: column oven, 35 °C; flow rate, 1 mL min^{-1}; and injection volume, 50 μL. Gradient mode combining 0.1% (v/v) formic acid in pure water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) was used to separate and detect compounds over a wide range of polarities. The gradient program was set as follows: 0–2 min, 95% A; 2–30 min, 95 → 0% A; 30–35 min, 0 → 95% A; and afterwards, 2 min equilibration time. The linearity, repeatability, limit of quantification and accuracy were assessed over the concentration range of 20–120 μg mL^{-1}, and the results are provided in the Supplementary material (Table S1). Quantification of TPs was carried out by integrating the peaks obtained with UV detection at 220 nm. Their relative concentrations were determined based upon the ratio (%) of their individual area to that of the initial PEME.

For the LC-$HRMS^n$ analyses, the chromatographic effluent was split using a 1/3 T-split to achieve a flow rate of 0.3 mL min^{-1}. The mass spectrometer was an electrospray-LTQ-Orbitrap Velos Pro system comprising a linear trap and an orbital trap (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Electrospray source conditions, which were set in positive ion mode because this mode appeared to provide more information after some preliminary infusion experiments, were optimized from PEME stock solution as follows: the source and the capillary temperatures were fixed at 300 °C and 350 °C, and the source voltage was fixed at 3.4 kV. The nitrogen flow was set at 35 and 15 arbitrary units for the sheath gas and auxiliary gas, respectively. To efficiently capture and focus the ions, the S-lens was set at 60%. It was found that a normalized collision set at 35% arbitrary units gave satisfactory information for most high-resolution fragmentation studies. Instrumentation calibration was performed daily based on the recommendations of the manufacturer of the mass spectrometer and using the Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution (ThermoFisher, United States). Thus, the HRMS studies were carried out in full scan MS over the mass range of 103–1200 as well as in targeted *MS*/*MS* mode or auto *MS*/*MS* mode at a mass range of 50–600 uma for the $HRMS^n$ studies. The chosen full width at half maximum was 60,000 for all stages of $HRMS^n$. The *MS* data were processed using Xcalibur® software (version 2.2 SP 1.48).

2.5. Data analysis

Calculations of the kinetic parameters of the phototransformation reaction were based on triplicate measurements. Once measured, the decreasing average concentration of PEME *versus* time in both types of experiments (photolysis and photocatalysis) was adjusted to a pseudo first-order kinetic model using Eq. (1):

$$\mathrm{Ln}(C_t/C_0) = -k\ t \tag{1}$$

where t is time, C_t and C_0 represent the aqueous concentrations (μg mL^{-1}) of the target compounds at the sampling times t and zero, respectively, and k (h^{-1}) is the degradation rate constant. Additionally, half-lives ($t_{1/2}$) were calculated using Eq. (2):

$$t_{1/2} = \ln(2)/k \tag{2}$$

2.6. In silico and in vitro toxicological assessment

To evaluate the potential risk for different trophic species due to the degradation of PEME, the relative toxicity of the mixtures resulting from degradation and of each of the formed TPs were both studied throughout the photosensitization process. This approach combines *in silico* studies (QSAR) and *in vitro* experiments based on bioluminescence inhibition.

2.6.1. QSAR studies

ECOSAR (Clements and Vincent, 1994) was used to predict the following endpoints for each compound: 48-h daphnid LC_{50}, 96-h fish LC_{50} and 96-h green algae EC_{50}.

These values were obtained from the equations expressing log LC_{50} from the existing database as a function of logP provided by the EPI Suite KOWWIN software. For the mixture study, excluding potential synergistic/antagonistic effects between the compounds present, the concept of concentration addition was applied at each time-point throughout the degradation process. For each mixture, the acute toxicity (ATEmix) was calculated using the following formula (European Chemicals Agency, 2009):

$$\frac{100}{ATEmix} = \sum_n \frac{Ci}{ATEi} \tag{3}$$

where

"Ci" denotes the concentration of a given ingredient present in the mixture (% w/w or % v/v), *i.e.*, PEME or a transformation product.

"i" denotes the individual ingredient, ranging from 1 to n.

"n" denotes the total number of ingredients in a given mixture.

"ATEi" accounts for the acute toxicity estimate for ingredient i, *i.e.*, EC_{50i} or $LC_{50i,}$ determined by means of QSAR models.

Mutagenicity, carcinogenicity, and developmental toxicity studies were also performed using a QSAR-based system using the consensus method (TEST software, United States Environmental Protection Agency, 2016) and a rule-based system (Toxtree (Patlewicz G et al.)).

2.6.2. In vitro toxicological studies

A Microtox Model 500 toxicity analyzer (Milan, Italy) was used to assess the ecotoxicity of PEME native and degraded samples. The assay relies on the bioluminescence inhibition of the bacteria *V. fischeri* when exposed to toxic compounds. Bacteria suspensions, positive and negative controls and tested samples were prepared and analyzed according to the manufacturer's recommendations. This study was carried out in triplicate using degraded samples obtained from the working solutions described above and samples deprived of PEME as blank controls. The pH, systematically measured for all the samples tested, was between 6.0 and 7.0. The bioluminescence was measured every 5 min over 30 min during incubation at 15 °C.

2.7. Physico-chemical calculations and computational approach

The Marvin calculator (MarvinSketch v17.1.2.0, 2017, ChemAxon) was used to predict descriptors such as the isoelectric point and Log $D_{o/w}$ at pH 7.0. Quantum chemical calculations were performed using the Gaussian 09 program (Frisch et al., 2015). The structures were optimized using the hybrid density functional B3LYP method with the 6-31 + G(d) basis set, B3LYP/6-31 + G(d). The geometrical relevance of the proposed structure was checked, verifying that no more than one imaginary frequency was obtained after optimization.

The frontier electron densities (FEDs) of the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) were also determined to predict the initial attack position by radical reactive species. In fact, the $2HOMO^2$ and $FED^2_{HOMO} + FED^2_{LUMO}$ values were used to predict the reaction sites for the •OH radical addition positions (Fukui et al., 1952).

3. Results and discussion

3.1. Dark controls and preliminary study

The photodegradation experiments were framed by a series of controls aimed at establishing the impacts of other processes such as sorption or hydrolysis.

Their contributions to the PEME decrease were negligible, as the PEME concentrations determined in the controls at the beginning and end of the degradation assays were similar (differences < 5%). This outcome is consistent with the fact that PEME does not have hydrolyzable functional groups.

Adsorption is one of the most important factors that influences photodegradation under heterogeneous photocatalysis (Van Doorslaer et al., 2011). As a result, PEME adsorption on TiO_2 particles was studied in the dark. A 10% PEME decrease was observed after 15 min of contact with TiO_2 particles, including the centrifuging time. The adsorption rate remained stable for up to 60 min in the dark (Table 1). From these results, a TiO_2 concentration of 100 mg/mL was selected for the photocatalysis studies.

3.2. Photolytic and photocatalytic degradation kinetics

No degradation was observed under our experimental conditions for the same period of exposure (Fig. 1). This result contradicts the results presented by Jansen et al., in which approximately 15% photodegradation was observed after 2 h of exposing 1 mg/mL PEME samples to ~300,000 lx visible and ~160 W/m^2 UV_A. This difference could be due to a lower relative irradiance (~240,000 lx visible and ~130 W/m^2 UV_A), especially for the sample emitting wavelengths lower than 320 nm. Indeed, PEME does not absorb above 320 nm (Fig. S2). The degradation rate and half-life time measured under these conditions are 0.08 min^{-1} and 8.89 min, respectively. To further investigate the involvement of the different reactive oxygen species and TiO_2 with PEME phototransformation, isopropanol and methanol were added to the samples described in Section 2.2. Methanol is an efficient scavenger of both •OH and h^+, while isopropanol mainly reacts with •OH. In their presence, PEME degradation significantly decreased, as shown in Fig. 1 ($p < 0.01$), but the phenomenon was significantly more intense for methanol ($p < 0.01$). Indeed, the corresponding PEME half-lives are 23.10 min and 53.32 min, respectively. As a result, the PEME photoproducts are expected to form from the interactions of PEME with •OH and H^+.

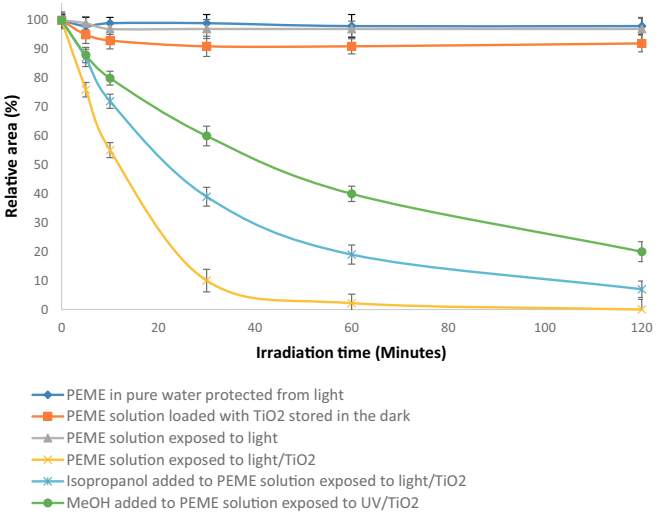


Fig. 1. Kinetics of PEME photodegradation.

Hence, it took <60 min of exposure to light for the PEME to become undetectable in the presence of the photocatalyst, as shown in Fig. 2. Parallel to the PEME decrease, substantial concentrations of seven TPs (labeled "$TP_{molecular\ mass}$") were detected and followed over 120 min (Figs. 2 and 3). Table 2 summarizes their respective characteristics. The total ion current chromatograms and the extracted ion chromatograms recorded for the samples exposed for 30 and 60 min to the UV/TiO_2 conditions show that most of them are eluted ahead of PEME, meaning that they would be more hydrophilic than the molecule that they originated from. To strengthen the structural elucidation stage and determine the PEME photolysis mechanisms, the kinetics of the TPs formed in the solutions set at pH 6.95 were followed using HPLC. Fig. 3 shows that TP_{443} and TP_{475} were quickly formed, but it is noteworthy that TP_{443} decreased almost immediately parallel to the appearance of TP_{226}, TP_{301}, TP_{329}, TP_{431}, TP_{443} and TP_{459}. Based on this result, one may deduce that these latter compounds may mainly originate from TP_{443}. With the exception of TP_{226} and TP_{329}, the concentrations of the TPs plummeted after 30 min of exposition. Nevertheless, this decrease was less acute for TP_{301}. In all cases, most of the TPs remained detectable after 60 min of exposition. In addition, compared to the other TPs, TP_{226}, TP_{301} and TP_{329} were the most persistent (Fig. 3).

3.3. Tentative identification of the transformation products formed

To study the TPs that resulted from the PEME, working solutions were exposed to light (300–800 nm) over varying periods of time. New chromatographic peaks were detected concomitantly with the decrease of the parent compound (Fig. 2). The analysis of the samples exposed for 30 and 60 min to light showed several peaks that were complementary to the peaks of the parent molecule, which were detected as molecular ions [M + H] + at *m/z* 227, 302, 330, 432, 444, 460 and 476 and labeled as TP_{226}, TP_{301}, TP_{329}, TP_{431}, TP_{443}, TP_{459} and TP_{475}, respectively. The product ion mass spectra of PEME and the TPs were recorded, and the corresponding accurate mass measurement data are compiled in Table 3. The fragmentation pattern of the mother molecule was elucidated, which was an integral part of process used to identify the structure of the TPs (Fig. 4) (Görög, 2015; Henriet et al., 2016; Secrétan et al., 2016).

The MS^2 spectrum of protonated PEME (Fig. S3, Supplementary material) exhibits a base peak at *m/z* 299 that corresponds to the (PEME

Table 1
Adsorption of PEME on the TiO_2 surface.

Time (min)	Mean PEME recovery rate (% C/C_0x100) and standard deviation (n = 3)
0	100 (±2.0)
15	92 (±1.86)
30	91 (±2.73)
60	91 (±3.64)

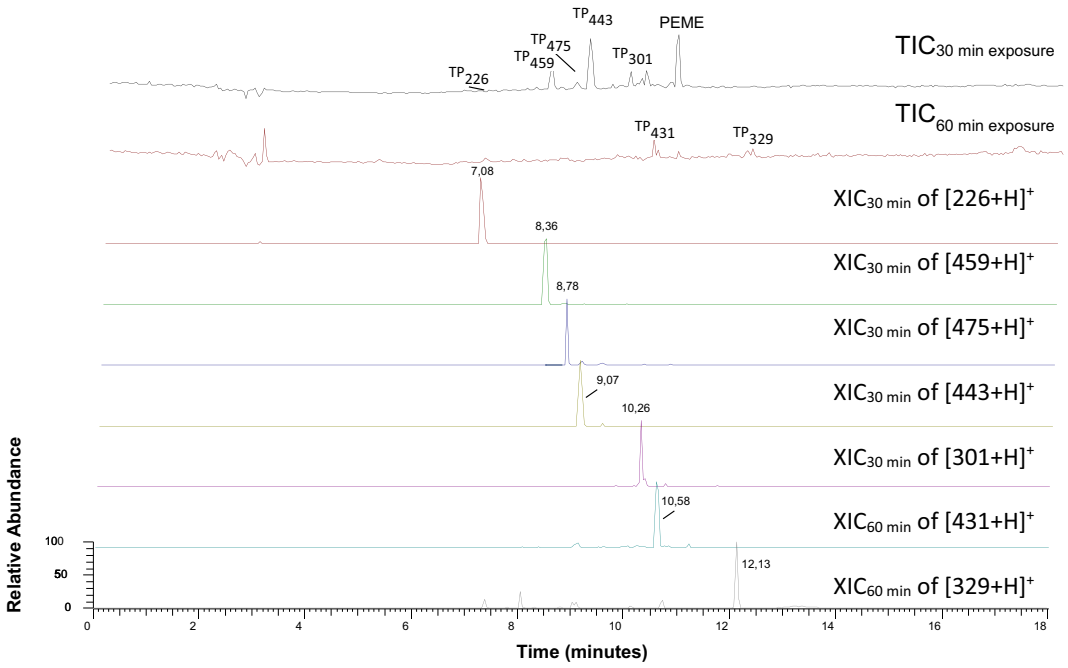


Fig. 2. Total and extracted ion chromatograms of aqueous PEME after 30 and 60 min of exposure to light/TiO_2.

$+ H\text{-}C_4H_7NO_2\text{-}CO)^+$ ion. As shown in Fig. 4, this ion would be formed through the transfer of the hydroxyl group from the carboxylic acid carbon atom linked to the benzamide derivative to the carbonyl carbon atom of the amide bond, thus forming a five-centered transition state. A concerted hydroxyl group transfer occurs, ending up with the elimination of 4-iminobutanoic acid and carbon monoxide (−129 Da). These simultaneous neutral losses are characteristic of the glutamate moiety, which suggests that the TPs still featuring this type of transition always carry this unaltered chemical group. Notably, a similar mechanism had already been proposed to explain the departure of dihydropyrrole and CO from protonated lisinopril (Burinsky and Sides, 2004) and the departure of methyltetrahydropyridin and CO from protonated argatroban (Secrétan et al., 2016). In the wake of this rearrangement-elimination process, the fragmentation continues with water loss, giving rise to the formation of an acylium or oxonium derivative at *m/z* 281. Due to resonance, the motion of the adjacent double bonds leads to the formation of a derivative of the tertiary-carbocation type with a structural configuration that is amenable for the departure of C_8H_6O (−118 Da) due to the promotion of heterolysis by the charge. The detection of such a transition within the MS/MS mass spectra of the TPs implies the absence of any substitution or change over the methylbenzamide moiety. As a result of this neutral loss, the product ion at *m/z* 163 is formed, accounting for the fraction [2-amino-5-methyl-1H,7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one] of the mother molecule. Likewise, its presence over the MS/MS mass spectra of the TPs suggests that this part of the molecule would remain unchanged. However, none of the seven-detected and tentatively characterized TPs feature the product ion at *m/z* 163. Thus, it can be inferred that PEME degradation in the presence of light/TiO_2 would primarily start at the corresponding part of the drug molecule.

3.3.1. TP_{443}, TP_{459} and TP_{475}

After 30 min of exposure to light, hydroxylation occurred on the PEME.

This process is highlighted by the onset and detection of $[TP_{443} + H]^+$, $[TP_{459} + H]^+$ and $[TP_{475} + H]^+$ ions, whose exact masses measured with HRMS are consistent with the elemental formulas $C_{20}H_{22}N_5O_7^+$ (2.27 ppm), $C_{20}H_{22}N_5O_8^+$ (1.63 ppm) and $C_{20}H_{22}N_5O_9^+$

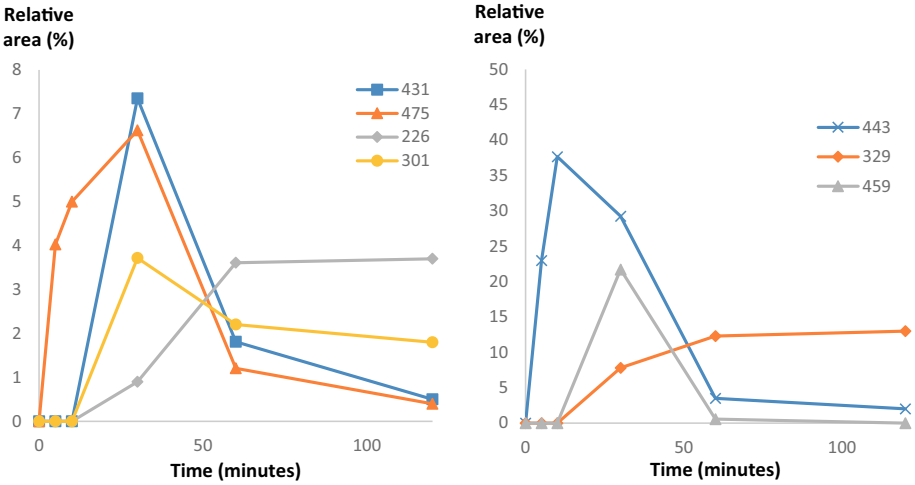


Fig. 3. Evolution profiles of PEME TPs relative levels as a function of the irradiation time, related to the initial level of the parent molecule.

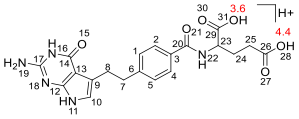
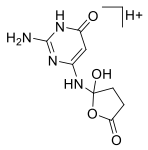
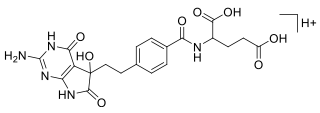
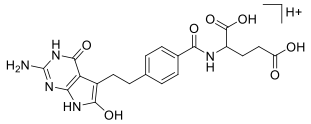
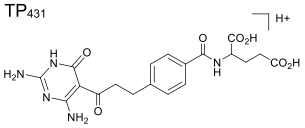
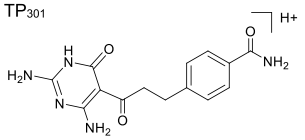
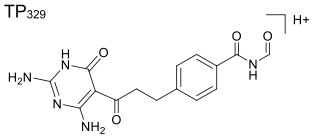
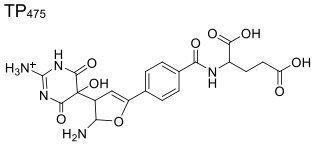
Table 2
Chemical characteristics of PEME and of its TPs.

Compound	log D	Isoelectric pH range
PEME	−5.11	1.50 to 3
TP_{226}	−0.98	1 to 3.5
TP_{301}	−0.29	1 to 7
TP_{329}	−0.37	2 to 7
TP_{431}	−6.53	0.5 to 2.5
TP_{443}	−6.58	1 to 3
TP_{459}	−7.34	1 to 2.50
TP_{475}	−7.97	3 to 4

(1.47 ppm), respectively. As stated above, the corresponding changes would affect at least one fraction [2-amino-5-methyl-1H,7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one] of the drug molecule given the absence of the *m/z* 163 ion in all cases.

Thus, TP_{443} would originate from the single oxidation of this chemical group. To further pinpoint the site where occurred, the base peak at *m/z* 297 ($[TP_{443} + H\text{-}C_4H_7NO_2\text{-}CO\text{-}H_2O]^+$), generated under MS^2 conditions, was trapped and then fragmented (Figs. S4 & S5, Supplementary material). Contrary to what was observed for PEME (Fig. 4), the fragmentation of the $[TP_{443} + H\text{-}C_4H_7NO_2\text{-}CO\text{-}H_2O]^+$ ion results in the cleavage of the bond linking 9C to 8C, hence eliminating C_9H_8O (297 → 165) or the complementary part, *i.e.*, $C_6H_6N_4O_2$ (297 → 131), as

Table 3
PEME and the TPs structures, molecular ions, characteristic fragment ions and relative times (rRTs). pK_a values are highlighted in red on the molecule.

Compound	MS^n mode	Best possible elemental formula	Accurate mass *m/z*	Theoretical mass *m/z*	Relative error (ppm)	rRT
Pemetrexed	Precursor ion	$C_{20}H_{22}N_5O_6^+$	428.1563	428.1565	0.37	1
	MS^2 (428→)	$C_{15}H_{15}N_4O_3^+$	299.1135	299.1139	1.10	
	MS^2 (428→)	$C_{15}H_{13}N_4O_2^+$	281.1029	281.1033	1.53	
	MS^2 (428→)	$C_7H_7N_4O^+$	163.0613	163.0614	0.74	
TP_{226}	Precursor ion	$C_8H_{11}N_4O_4^+$	227.0772	227.0775	1.32	0.66
TP_{226} 	MS^2 (227→)	$C_8H_9N_4O_3^+$	209.0673	209.0669	−1.72	
	MS^2 (227→)	$C_7H_9N_4O_2^+$	181.0724	181.0720	−2.04	
	MS^2 (227→)	$C_4H_7N_4O^+$	127.0615	127.0614	−0.55	
TP_{459}	Precursor ion	$C_{20}H_{22}N_5O_8^+$	460.1455	460.1463	1.63	0.78
TP_{459} 	MS^2 (460→)	$C_{20}H_{20}N_5O_7^+$	442.1359	442.1357	−0.45	
	MS^2 (460→)	$C_{15}H_{13}N_4O_4^+$	313.0937	313.0931	−1.88	
	MS^3 (460→313→)	$C_6H_5N_4O_2^+$	165.0409	165.0407	−0.91	
	MS^3 (460→313→)	$C_8H_7O_2^+$	135.0442	135.0440	−1.18	
TP_{443}	Precursor ion	$C_{20}H_{22}N_5O_7^+$	444.1504	444.1514	2.27	0.84
TP_{443} 	MS^2 (444→)	$C_{15}H_{15}N_4O_4^+$	315.1094	315.1088	−2.00	
	MS^2 (444→)	$C_{15}H_{13}N_4O_3^+$	297.0989	297.0982	−2.39	
	MS^3 (444→297→)	$C_6H_5N_4O_2^+$	165.0409	165.0407	−0.97	
	MS^3 (444→297→)	$C_9H_7O^+$	131.0492	131.0491	−0.38	
TP_{431}	Precursor ion	$C_{19}H_{22}N_5O_7^+$	432.1505	432.1514	1.99	0.99
TP_{431} 	MS^2 (432→)	$C_{14}H_{15}N_4O_4^+$	303.1096	303.1088	−2.77	
	MS^2 (432→)	$C_{14}H_{13}N_4O_3^+$	285.0988	285.0982	−2.10	
	MS^2 (432→)	$C_4H_7N_4O^+$	127.0614	127.0614	0.55	
	MS^3 (432→285→)	$C_6H_7N_4O_2^+$	167.0565	167.0564	−0.78	
	MS^3 (432→285→)	$C_9H_7O^+$	131.0491	131.0491	0.08	
TP_{301}	Precursor ion	$C_{14}H_{16}N_5O_3^+$	302.1244	302.1248	1.36	0.96
TP_{301} 	MS^2 (302→)	$C_{14}H_{13}N_4O_3^+$	285.0986	285.0982	−1.44	
	MS^2 (302→)	$C_4H_7N_4O^+$	127.0617	127.0614	−1.89	
	MS^3 (302→285→)	$C_6H_7N_4O_2^+$	167.0565	167.0564	−0.78	
	MS^3 (302→285→)	$C_9H_7O^+$	131.0491	131.0491	0.08	
TP_{329}	Precursor ion	$C_{15}H_{16}N_5O_4^+$	330.1193	330.1197	1.24	1.13
TP_{329} 	MS^2 (330→)	$C_{14}H_{13}N_4O_3^+$	285.0986	285.0982	−1.44	
	MS^2 (330→)	$C_4H_7N_4O^+$	127.0617	127.0614	−1.89	
	MS^3 (330→285→)	$C_6H_7N_4O_2^+$	167.0565	167.0564	−0.78	
	MS^3 (330→285→)	$C_9H_7O^+$	131.0491	131.0491	0.08	
TP_{475}	Precursor ion	$C_{20}H_{22}N_5O_9^+$	476.1405	476.1412	1.47	0.82
TP_{475} 	MS^2 (476→)	$C_{20}H_{19}N_4O_9^+$	459.1150	459.1146	−0.85	
	MS^2 (476→)	$C_{15}H_{15}N_4O_6^+$	347.0992	347.0986	−1.76	
	MS^2 (476→)	$C_{11}H_{10}NO_3^+$	204.0658	204.0655	−1.47	
	MS^2 (476→)	$C_{11}H_{10}NO_2^+$	188.0711	188.0706	−2.45	
	MS^2 (476→)	$C_{11}H_7O_2^+$	171.0443	171.0440	−1.75	
	MS^3 (476→459→)	$C_{17}H_{16}NO_7^+$	346.0926	346.0921	−1.47	
	MS^3 (476→459→)	$C_{15}H_{12}N_3O_6^+$	330.0727	330.0720	−2.03	
	MS^3 (476→459→)	$C_{15}H_{10}N_3O_5^+$	312.0622	312.0615	−2.08	
	MS^3 (476→459→)	$C_{12}H_7O_3^+$	199.0394	199.0390	−2.01	

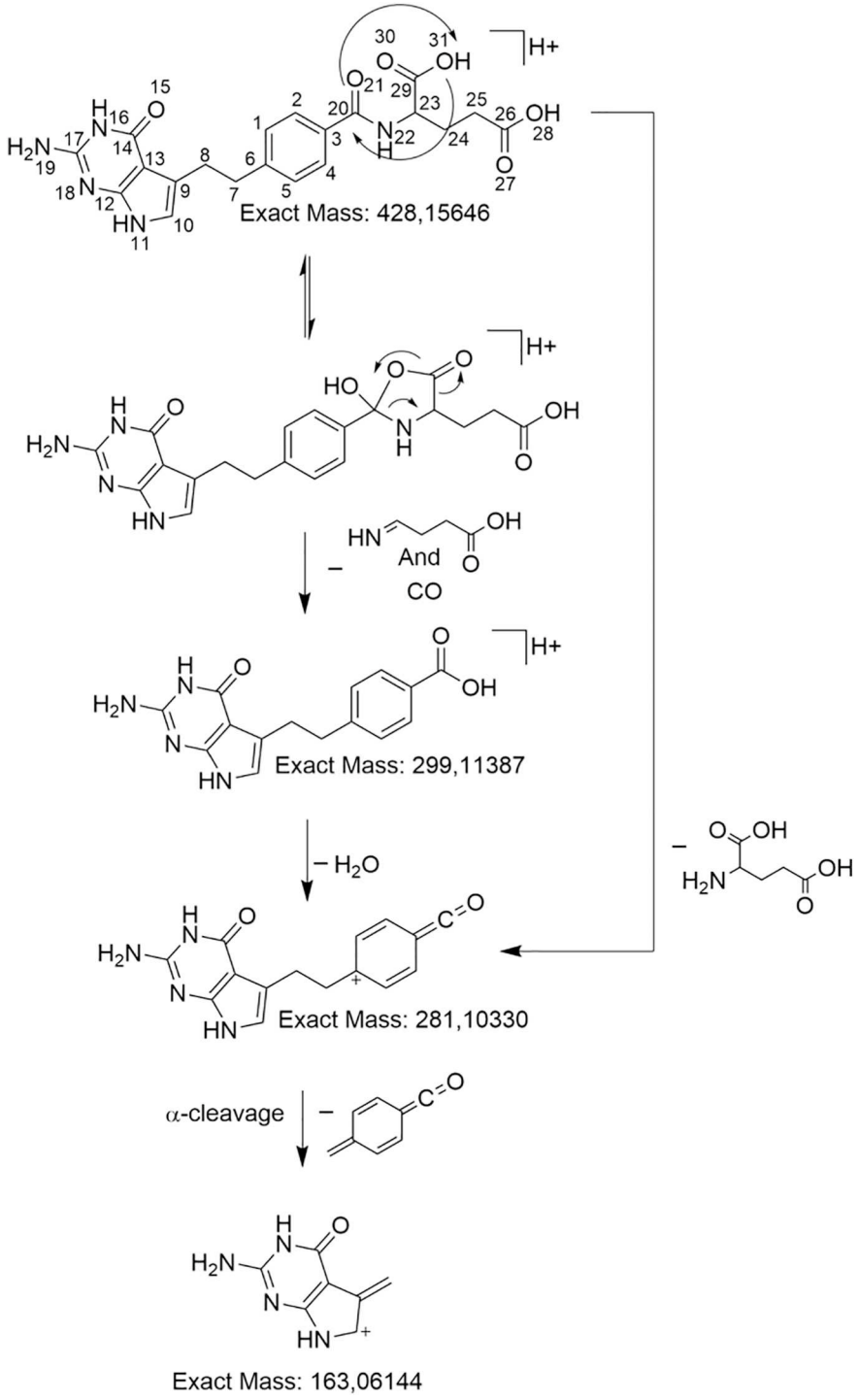


Fig. 4. Proposed fragmentation pattern for protonated PEME.

shown in Fig. 5. This difference results from a change in the immediate chemical environment of 9C; specifically, the formation of the enol function in equilibrium with carbonyl 10C═O would weaken the 9C—8C bond. Accordingly, although this assumption has not been confirmed by ^{1}H-MNR, it is likely that 10C is the hydroxylation site. Moreover, this structure has also been described to result from the forced degradation of PEME (Jansen et al., 2016).

Compared to PEME, the $[TP_{459} + H]^{+}$ ion loses two rather than one H_2O molecules immediately (460 → 442 → 424) (Fig. 6; Figs. S6 and S7 in Supplementary material), implying that one of the two extra OH groups is carried by an aliphatic carbon atom. The other OH group should be located on 6C as long as the *m/z* 165 ion also accounts for one of the product ions of the $[TP_{459} + H\text{-}C_4H_7NO_2\text{-}CO\text{-}2H_2O]^{+}$ ion (Fig. 6; Figs. S6 and S7 in the Supplementary material). As the neutral losses reflecting the presence of glutamate are also detected for TP_{459} (460 → 331; 442 → 313; 424 → 295), one may then deduce that the aliphatic-alcohol moiety is very likely tied to 9C or 8C, with a penchant for 9C to explain the departure of $C_7H_6N_4O_2$ or of $C_8H_9O_2$ when the $[TP_{460} + H\text{-}C_4H_7NO_2\text{-}CO\text{-}H_2O]^{+}$ ion is fragmented (Fig. 6; Figs. S6 and S7 in Supplementary material). It is noteworthy that Jansen et al. already described this structure.

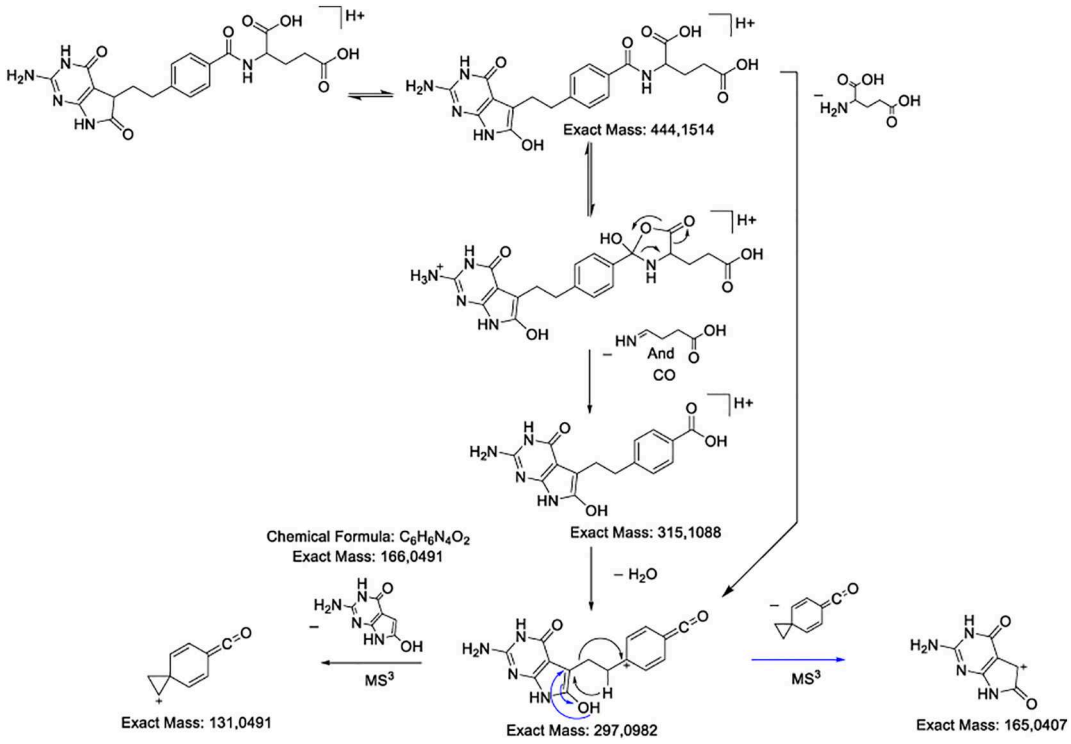


Fig. 5. Proposed fragmentation pattern for protonated TP_{443}.

The base peak (Fig. S8, Supplementary material) originating from the fragmentation of the $[TP_{475} + H]^+$ ion pertains to deamination (476 → 459), a specific process compared to TP_{443} and TP_{459}. In turn, the $[TP_{475} + H\text{-}NH_3]^+$ ion affords the *m/z* 330 ion ($[TP_{475} + H\text{-}NH_3\text{-}C_4H_7NO_2\text{-}CO]^+$) when subjected to fragmentation, implying that the glutamate residue is not concerned with hydroxylation. Another less intense process was highlighted that included the elimination of $C_3H_3N_3O_2$, thereby forming the ion at *m/z* 346 (Fig. 7; Figs. S8 and S9, Supplementary material). This result may suggest that dramatic changes have occurred over the fraction [2-amino-5-methyl-1H,7H-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidin-4-one] of the drug. Indeed, parallel to deamination, the $[TP_{475} + H\text{-}C_4H_7NO_2\text{-}CO]^+$ ion can lose a 143-Da moiety corresponding to the elemental formula $C_4H_5N_3O_3$. These key data, complemented by the data represented in Fig. 7, are consistent with a derivative of the [2-amino-5-hydroxy-1,5-dihydropyrimidine-4,6-dione] type.

3.3.2. TP_{431}, TP_{329} and TP_{301}

Based upon their MS^n mass spectra (Figs. S10–S15, Supplementary material), it is clear that TP_{431}, TP_{329} and TP_{301} are closely related to each other (Table 3). Indeed, their MS/MS mass spectra feature not only the same base peak ion (*m/z* 285) but also the same product ions in that the MS^3-products originating from this latter were found. To reach the *m/z* 285 ion, protonated TP_{431} had to lose glutamate, while the elimination of acetamide and amine was required for protonated TP_{329} and TP_{301}, respectively (Fig. 8). Accordingly, one may infer that these three TPs only differ from each other by the lateral chain connected to the 19C carbonyl carbon atom, and the neutral losses previously mentioned are indicative of the corresponding chemical groups. Beyond these data, the specific information needed to characterize these TPs includes the presence of the *m/z* 127 ion, which is attributed to protonated 6-aminoisocytosine. Combined with the information arising from the fragmentation of the base peak for the TP's ion (*m/z* 285), it should be possible to assimilate them as diaminopyrimidinone derivatives (Fig. 8). The structure of TP_{431} was recently described by Jansen et al.

3.3.3. TP_{226}

The MS/MS spectrum of protonated TP_{226} (Fig. S16, Supplementary material) shows that this TP not only lost the glutamate group, but also, no information suggesting the presence of acylbenzene in reference to what was previously highlighted for TP_{431}, TP_{301} and TP_{329} is found. The anchoring point of the characterization process is based on the detection of the *m/z* 127 ion, *i.e.*, protonated 6-aminoisocytosine, which is described above. The latter ion is formed as a result of the departure of a moiety, likely succinic anhydride (Fig. 9). Protonated TP_{226} can also lose carbonic acid (227 → 181), suggesting the presence of a carbonate function linked to an aliphatic carbon atom. The succinate group is assumed to be in equilibrium with carboxylate within the ion source, as shown in Fig. 9. Eventually, the structure proposed in Table 3 looks satisfactory as long as it allowed us to characterize the MS^2 fragmentation pattern of the $[TP_{226} + H]^+$ ion (Fig. 9).

3.4. Proposed degradation pathways

PEME photodegradation mechanisms were elucidated from HPLC/MS^n studies, taking into account the calculated data of FEDs. According to HPLC/MS^n analyses, seven TPs were tentatively identified and listed in Table 3. Theoretically calculated FEDs have also been considered to predict initial attack sites and thus have contributed to support the TPs' structures. The addition of $^{\bullet}OH$ radicals usually occurs at sites with higher $FED^2_{HOMO} + FED^2_{LUMO}$ values, while direct photohole oxidation (*i.e.*, electron extraction) may occur at sites with higher values of $2FED^2_{HOMO}$ (An et al., 2015; Zhang et al., 2008). Consequently, the FED data of PEME were calculated and summarized in the table provided in Table S2 (Supplementary material).

Clearly, the $FED^2_{HOMO} + FED^2_{LUMO}$ value of 10C stands among the highest (0.192), as does the $2FED^2_{HOMO}$ value (0.380), thereby facilitating $^{\bullet}OH$ radical addition and photohole oxidation over this site. Notably, this outcome is fully in line with the structures of

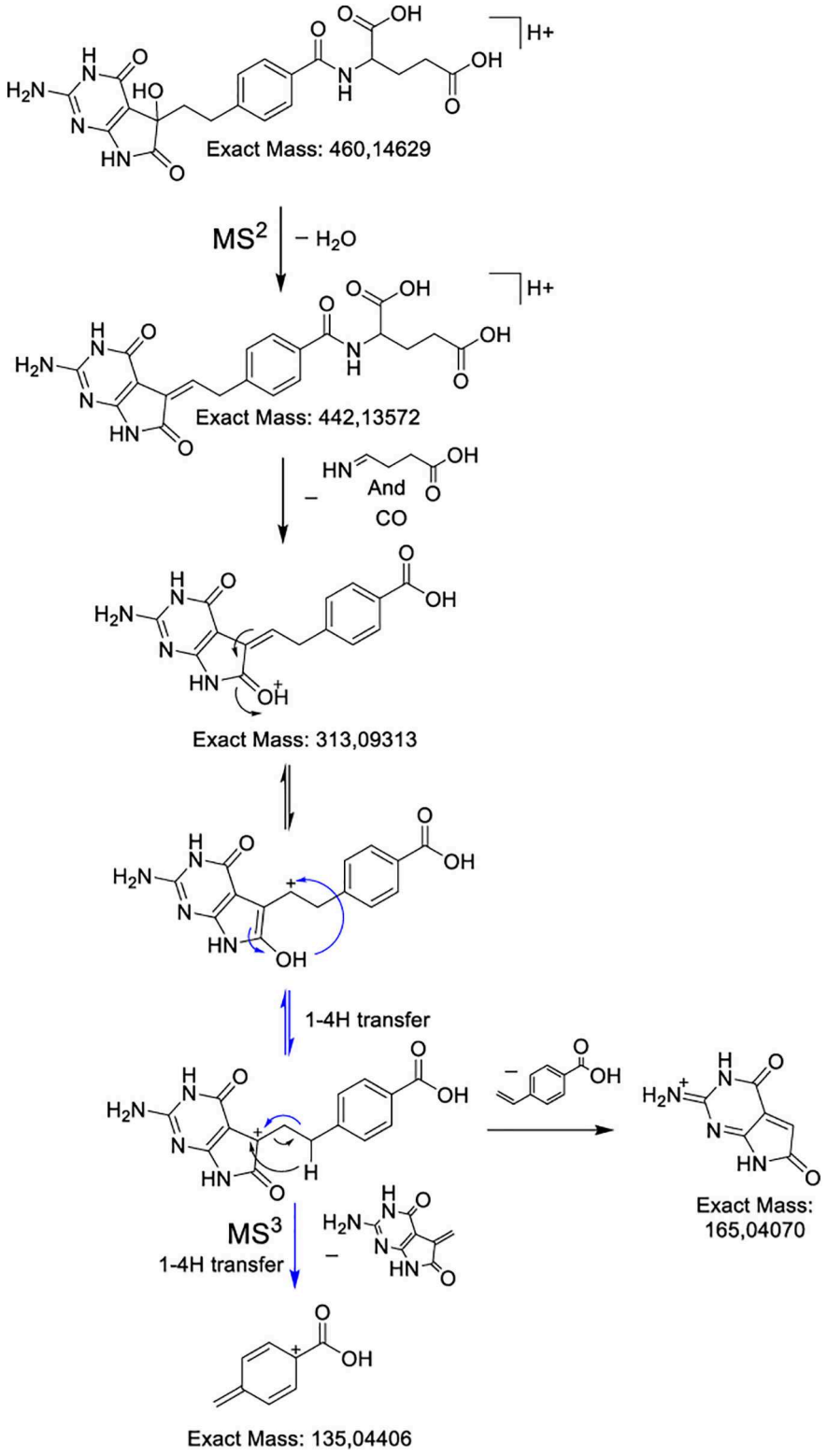


Fig. 6. Proposed fragmentation pattern for protonated TP459.

most of the TPs described above. A proposed mechanism of PEME photolysis under UV/TiO_2 is described in Fig. 10 in accordance with these data. Fig. 10 shows the proposed transformation pathways that link together all the characterized TPs resulting from PEME photoinduced degradation under heterogeneous photocatalysis. The hydroxylation addition and the direct photohole oxidation reaction are two initial predominant pathways for the photodegradation of PEME (Fig. 10 and S17 in the Supplementary material). While both paths may result in the formation of TP_{443} and TP_{459}, TP_{475} may result from more photohole oxidation with O_2 contributions (Fig. S17, Supplementary material). TP_{431} may be secondary to TP_{443} and TP_{459} with ring opening. In turn, TP_{431} undergoes oxidative decarboxylation on the glutamate residue, and due to other photohole attacks over the lateral chain, TP_{329}, TP_{301} and TP_{226}

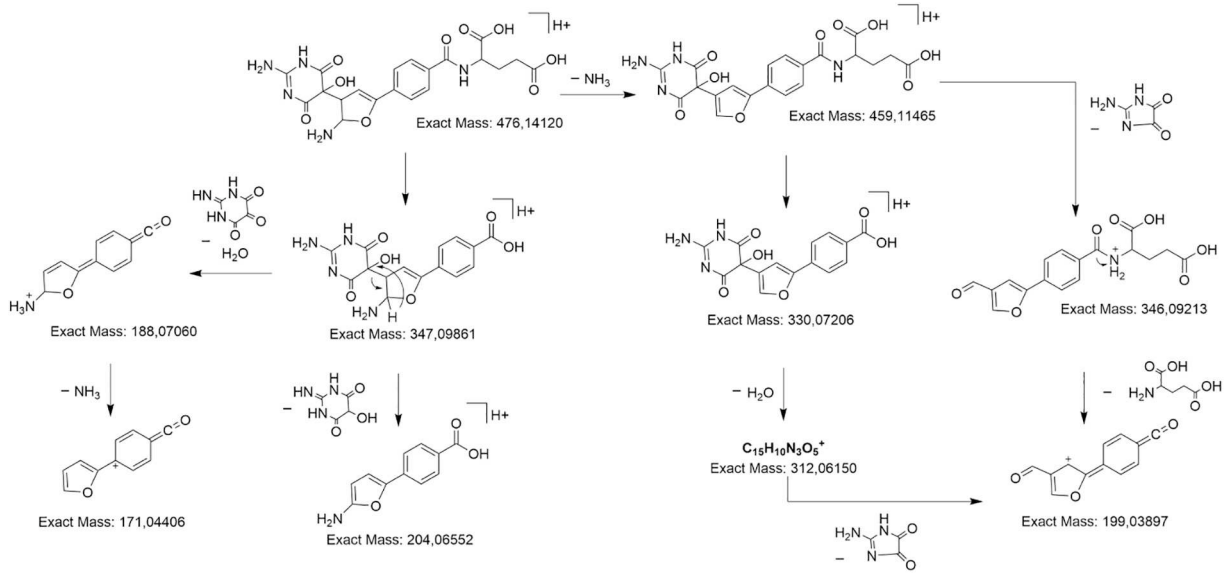


Fig. 7. Proposed fragmentation pattern for protonated TP_{475}.

ended up appearing (Fig. 10). Therefore, in the natural environment where triplet-sensitized oxidation is expected to be the main PEME transformation route, it may be assumed that the relevant pathways would be to produce TP_{443} followed successively by T_{431} and TP_{329} (Figs. 3 and 10). Further studies will be needed to confirm this assumption.

3.5. Assessment of the relative ecotoxicity of TPs and PEME mixtures

The issue raised in this chapter is whether the degradation of PEME may reduce the toxicity of PEME-contaminated water to the different trophic species present in the aquatic environment or, conversely, whether the resulting mixtures could be more toxic. In other words, this chapter compares the subsequent degraded solutions to the initial sample.

Complementary evaluation approaches have made it possible to link effects specifically to products or a group of products.

3.5.1. In silico studies

ECOSAR studies have shown that the relative toxicity of mixtures to fish and daphnids changes as the degradation of PEMEs increases, but the amplitude remains too low to support any concern for these species (Fig. 11, Tables S3 and S4).

With respect to green algae, the sample obtained after 10 min of exposure to photocatalytic conditions showed a dramatic increase in toxicity compared to the starting solution (Table S5). This change coincides perfectly with the emergence and increase of TP_{329}. A

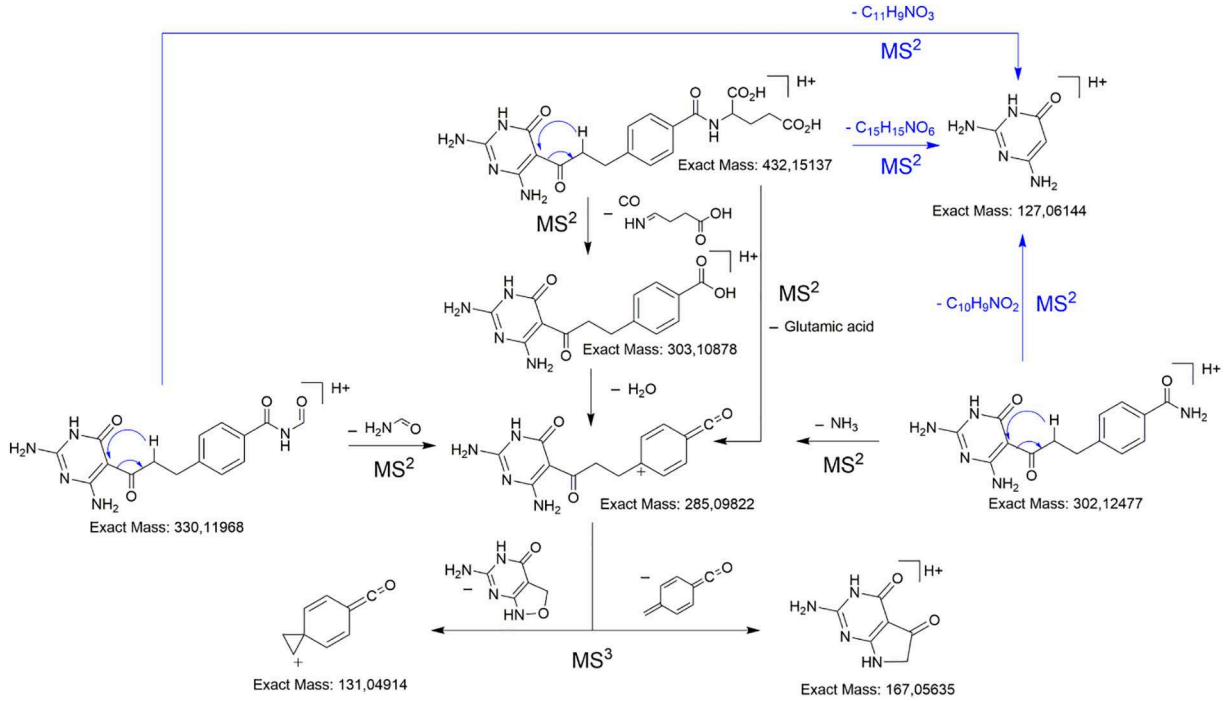


Fig. 8. Proposed common fragmentation pattern for protonated TP_{431}, TP_{329} and TP_{301}.

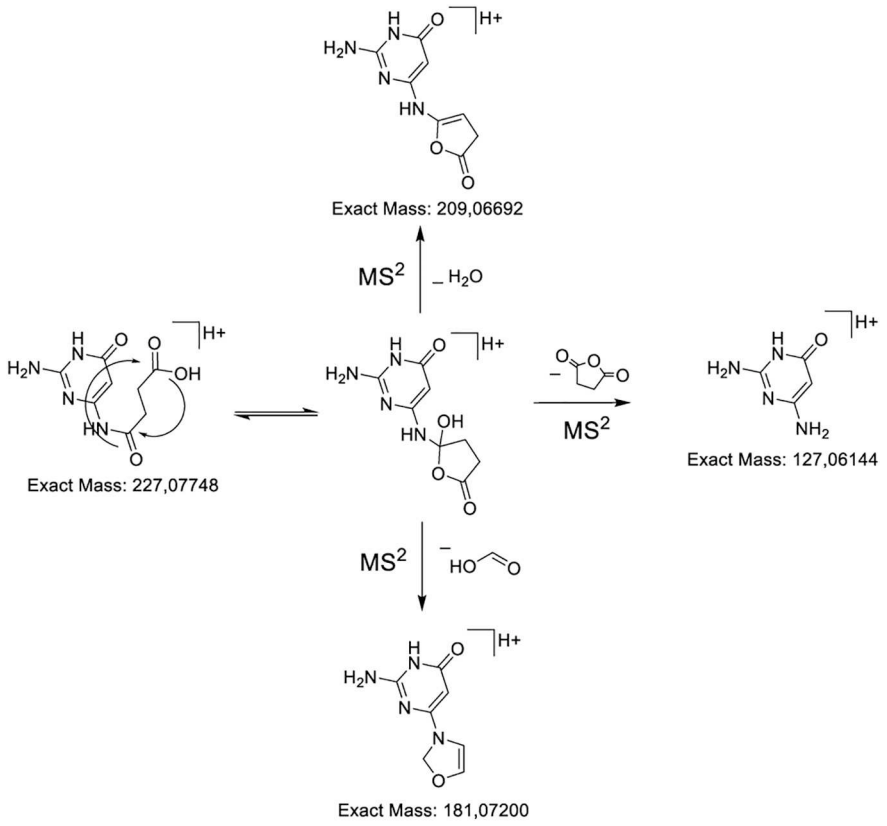


Fig. 9. Proposed fragmentation pattern for protonated TP_{226}.

lower EC 50 value and a higher C1/EC50 ratio compared with other TPs seem to confirm this correlation (Tables S3–S5; Fig. 11). From a mechanistic point of view, this outcome can be partly explained by the fact that TP_{329} is neutral at pH 7.0, which would favor its concentration in the microorganism (Neuwoehner and Escher, 2011).

In addition to acute toxicity studies, mutagenicity, carcinogenicity and developmental toxicity were also studied. While PEME does not present any structural alert for carcinogenicity, 6 of its TPs contain a functional group that may induce structural alerts for non-genotoxic carcinogenicity (Table 4). Indeed, α, β-saturated carbonyl groups are known to cause oxidative damage to DNA in mammalian cells. Regarding mutagenicity, QSAR does not trigger any particular alert. Regarding its impacts on development, all but the TP_{227} TP seemed to be capable of producing toxicity. Therefore, given the presence of this product in the mixtures, water contaminated with PEME may still have an effect on development, even after exposure to the photocatalytic process (Table 4).

3.5.2. In vitro studies

In vitro studies were carried out utilizing the *V. fischeri* bioassay. PEME itself did not induce any toxic effect on this bacterium because

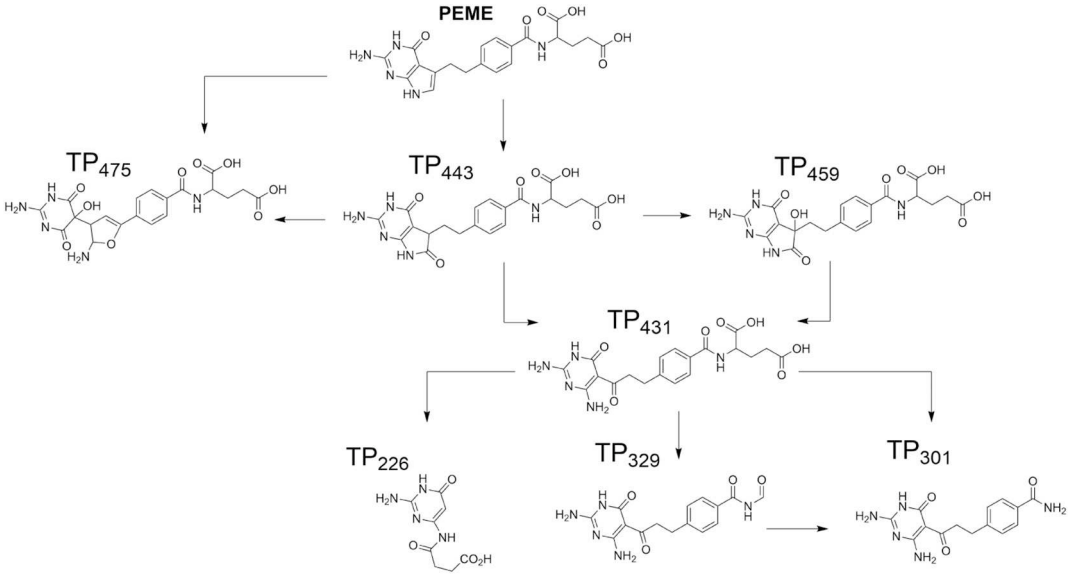


Fig. 10. Proposed photodegradation mechanism of PEME photosensitized conditions.

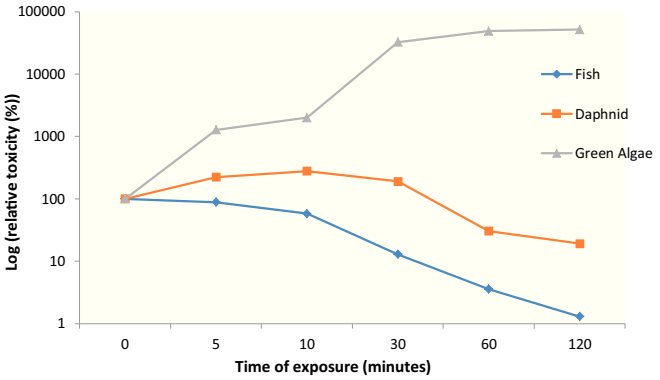


Fig. 11. Predicted relative toxicities of the different degraded samples represented using the logarithmic scale as a function of the exposition duration to light/TiO_2.

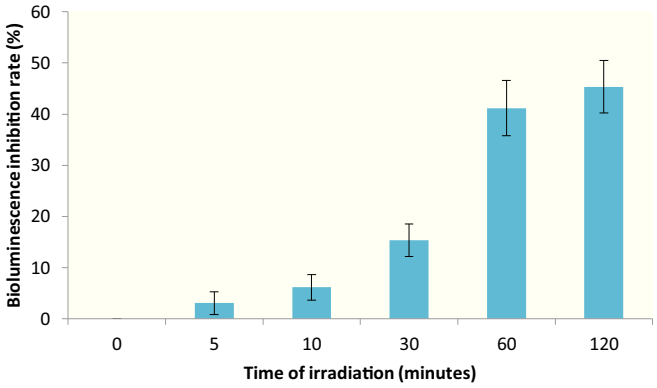


Fig. 12. Inhibition of *V. fischeri* bioluminescence as a function of the exposure duration to light/TiO_2.

no significant inhibition of bioluminescence was observed when it was brought into contact with the drug substance (Parvez et al., 2008). Moreover, the suspensions of TiO_2 without PEME and that underwent light irradiation (used as blanks) also did not inhibit the bioluminescence. However, the inhibition rate increased in parallel with the photodegradation of PEME, as shown in Fig. 12. Therefore, this evolution can be attributed to the appearance of toxic TPs.

3.5.3. Correlation between kinetics, in vitro and in silico results

When the evolution profiles of each TP were overlaid with the profile of the inhibition effect, it was evident that TP_{226}, TP_{301} and TP_{329} caused this response. The correlations of the evolution of each TP and the rate of bioluminescence inhibition were determined by calculating the respective Pearson correlation coefficients for each system. The corresponding data are presented in Fig. S18 (Supplementary material). These data unambiguously show that only TP_{226}, TP_{301}, TP_{329} and TP_{429} yield a positive correlation with toxicity and that the coefficients calculated for TP_{226} and TP_{329} are close to 1, thus implying a very significant correlation.

Specifically, TP_{226}, TP_{301} and TP_{329} have significantly higher log D values than PEME and other TPs, implying a higher bioaccumulation potential in the tested bacterium, which is a prerequisite for inducing toxic effects (Devillers et al., 1996). At neutral pH, only TP_{301} and TP_{329} occur in the isoelectric state, and according to Rendal et al., the compounds exert more toxicity when they are present in the molecular form (Kostal et al., 2015; Rendal et al., 2011). Thus, in the case of PEME, the loss of integrity of the glutamate residue may play a significant role in the inhibition of bioluminescence.

Overall, in view of the *in silico* and *in vitro* results, the photocatalytic degradation of PEME appeared to result in the formation of TPs that alone or together may be more harmful to trophic species 1. However, these results should be weighed according to their actual concentrations in the environment.

4. Conclusion

The photolytic and photocatalytic transformation of PEME that resulted from a simulated solar spectrum was studied for the first time.

The elimination of PEME from water can be accelerated by applying photocatalytic methods using TiO_2 (half-life: 8.89 min). Using isopropanol and methanol as reactive oxygen species scavengers, it was shown that hydroxyl radicals and photoholes were responsible for PEME degradation. Overall, seven transformation products were detected and characterized under UV/TiO_2.

Attacks on the dihydropyrrole moiety and the glutamate residue resulted in the formation of most of the products. Access to the structure of PEME TPs should pave the way to other monitoring studies, such as field analysis studies. Indeed, structural characterization and quantification of TPs have also made it possible to correlate structural properties and the kinetics of TP formation with *in silico* and *in vitro* results. This comparison allows us to highlight the potential individual and collective effects of TPs, compared to PEME with respect to fish, daphnid and green algae. It can be concluded that some of the degradation compounds are more toxic than PEME, especially to trophic-level species 1.

Acknowledgments

The authors want to thank K. Manerlax and M. Bimbot for their very appreciable contributions to this work. They are also thankful to Ile de France Region for financial support in the acquisition of the Orbitrap Velos Pro mass spectrometer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.182.

Table 4
In silico predictions of mutagenicity, carcinogenicity and developmental toxicity of PEME and its TPs.

	Carcinogenicity (rule based-structural alert)		Mutagenicity (QSAR)		Developmental toxicity (QSAR)	
Name of structure	Genotoxic carcinogenicity	Non-genotoxic carcinogenicity	Predicted value	Result	Predicted value	Result
PEME	No	No	−0.18	Negative	1.00	Positive
TP_{227}	Yes, one	No	0.11	Negative	0.37	Negative
TP_{301}	Yes, one	No	0.28	Negative	0.99	Positive
TP_{329}	Yes, one	No	0.14	Negative	0.74	Positive
TP_{431}	Yes, one	No	−0.09	Negative	0.86	Positive
TP_{443}	Yes, one	No	−0.02	Negative	0.84	Positive
TP_{459}	Yes, one	No	−0.07	Negative	0.87	Positive
TP_{475}	No	No	0.12	Negative	0.82	Positive

References

Adjei, A.A., 2004. Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed. Clin. Lung Cancer 5 (Suppl. 2):S51–55. https://doi.org/10.3816/CLC.2004.s.003.

Akpan, U.G., Hameed, B.H., 2011. Enhancement of the photocatalytic activity of TiO_2 by doping it with calcium ions. J. Colloid Interface Sci. 357 (1):168–178. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.01.014.

An, T., An, J., Gao, Y., Li, G., Fang, H., Song, W., 2015. Photocatalytic degradation and mineralization mechanism and toxicity assessment of antivirus drug acyclovir: experimental and theoretical studies. Appl. Catal. B Environ. 164:279–287. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.09.009.

Besse, J.-P., Latour, J.-F., Garric, J., 2012. Anticancer drugs in surface waters. Environ. Int. 39:73–86. https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.002.

Białk-Bielińska, A., Kumirska, J., Borecka, M., Caban, M., Paszkiewicz, M., Pazdro, K., Stepnowski, P., 2016. Selected analytical challenges in the determination of pharmaceuticals in drinking/marine waters and soil/sediment samples. J. Pharm. Biomed. Anal. 121:271–296. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.016.

Booker, V., Halsall, C., Llewellyn, N., Johnson, A., Williams, R., 2014. Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. Sci. Total Environ. 473–474:159–170. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.145.

Burinsky, D.J., Sides, S.L., 2004. Mass spectral fragmentation reactions of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 15:1300–1314. https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.05.010.

Calza, P., Medana, C., Sarro, M., Rosato, V., Aigotti, R., Baiocchi, C., Minero, C., 2014. Photocatalytic degradation of selected anticancer drugs and identification of their transformation products in water by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1362:135–144. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.035.

Cavalcante, R.P., Dantas, R.F., Bayarri, B., Gonzalez, O., Gimenez, J., Esplugas, S., Machulek, A., 2015. Synthesis and characterization of B-doped TiO_2 and their performance for the degradation of metoprolol. Catal. Today 252:27–34. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.09.030.

Clements, G., Vincent, J., 1994. ECOSAR, a Computer Program for Estimating the Ecotoxicity of Industrial Chemicals Based on Structure Activity Relationships: User's Guide. Environmental Effects Branch, Health and Environmental Review Division, Office of Pollution Prevention and Toxics, US. Environmental Protection Agency.

Devillers, J., Bintein, S., Domine, D., 1996. Comparison of BCF models based on log P. Chemosphere 33:1047–1065. https://doi.org/10.1016/0045-6535(96)00246-9.

Di Paola, A., García-López, E., Marcì, G., Palmisano, L., 2012. A survey of photocatalytic materials for environmental remediation. J. Hazard. Mater. 211:3–29. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.11.050.

European Chemicals Agency, 2009. Guidance on the application of the CLP criteria. URL. https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/clp_en.pdf/58b5dc6d-ac2a-4910-9702-e9e1f5051cc5 (www document, accessed 7.09.17).

Fatta-Kassinos, D., Kümmerer, K., 2010. Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks. Environ. Sci. Pollut. Res. 17:519–521. https://doi.org/10.1007/s11356-009-0276-4.

Franquet-Griell, H., Gómez-Canela, C., Ventura, F., Lacorte, S., 2015. Predicting concentrations of cytostatic drugs in sewage effluents and surface waters of Catalonia (NE Spain). Environ. Res. 138:161–172. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.015.

Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G.A., Nakatsuji, H., 2015. Gaussian 09, Revision A. 02. Gaussian, Inc. Wallingford, Connecticut.

Fukui, K., Yonezawa, T., Shingu, H., 1952. A molecular orbital theory of reactivity in aromatic hydrocarbons. J. Chem. Phys. 20:722. https://doi.org/10.1063/1.1700523.

Görög, S., 2015. Identification in drug quality control and drug research. Trends Anal. Chem. 69:114–122. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.020.

Henriet, T., Secrétan, P.-H., Amrani, F., Sadou-Yayé, H., Bernard, M., Solgadi, A., Yagoubi, N., Do, B., 2016. Phototransformation patterns of the antiplatelet drug tirofiban in aqueous solution, relevant to drug delivery and storage. New J. Chem. 40:1182–1194. https://doi.org/10.1039/C5NJ01826A.

Hurum, D.C., Agrios, A.G., Gray, K.A., Rajh, T., Thurnauer, M.C., 2003. Explaining the enhanced photocatalytic activity of Degussa P25 mixed-phase TiO2 using EPR. J. Phys. Chem. B 107 (19):4545–4549. https://doi.org/10.1021/jp0273934.

Jansen, P.J., Smith, W.K., Baertschi, S.W., Dorman, D.E., Kemp, C.A.J., McCune, K.A., 2016. Determination of the degradation chemistry of the antitumor agent pemetrexed disodium. J. Pharm. Sci. 105:3256–3268. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.029.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. CA Cancer J. Clin. 61:69–90. https://doi.org/10.3322/caac.20107.

Johnson, A.C., Jürgens, M.D., Williams, R.J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A., Sumpter, J.P., 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. J. Hydrol. 348:167–175. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.09.054.

Kostal, J., Voutchkova-Kostal, A., Anastas, P.T., Zimmerman, J.B., 2015. Identifying and designing chemicals with minimal acute aquatic toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 112:6289–6294. https://doi.org/10.1073/pnas.1314991111.

Lai, W.W.P., Hsu, M.H., Lin, A.Y.C., 2017. The role of bicarbonate anions in methotrexate degradation via UV/TiO2: mechanisms, reactivity and increased toxicity. Water Res. 112:157–166. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.040.

Miolo, G., Marzano, C., Gandin, V., Palozzo, A.C., Dalzoppo, D., Salvador, A., Caffieri, S., 2011. Photoreactivity of 5-fluorouracil under UVB light: photolysis and cytotoxicity studies. Chem. Res. Toxicol. 24 (8):1319–1326. https://doi.org/10.1021/tx200212z.

Neuwoehner, J., Escher, B.I., 2011. The pH-dependent toxicity of basic pharmaceuticals in the green algae *Scenedesmus vacuolatus* can be explained with a toxicokinetic ion-trapping model. Aquat. Toxicol. 101:266–275. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.008.

Novak, K.M., 2005. Drug Facts and Comparisons. 59th edn. Wolters Kluwer Health, St. Louis, Missouri.

Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S., 2008. Toxicity assessment of organic pollutants: reliability of bioluminescence inhibition assay and univariate QSAR models using freshly prepared *Vibrio fischeri*. Toxicol. In Vitro 22:1806–1813. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.07.011.

Prieto-Rodriguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Puma, G.L., Malato, S., 2012. Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO_2 concentrations. J. Hazard. Mater. 211:131–137. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.008.

Rendal, C., Kusk, K.O., Trapp, S., 2011. Optimal choice of pH for toxicity and bioaccumulation studies of ionizing organic chemicals. Environ. Toxicol. Chem. 30:2395–2406. https://doi.org/10.1002/etc.641.

Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. Chemosphere 93 (7):1268–1287. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059.

Rowney, N.C., Johnson, A.C., Williams, R.J., 2009. Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the Thames catchment in the United Kingdom. Environ. Toxicol. Chem. 28:2733. https://doi.org/10.1897/09-067.1.

Ryu, J., Choi, W., 2008. Substrate-specific photocatalytic activities of TiO_2 and multiactivity test for water treatment application. Environ. Sci. Technol. 42:294–300. https://doi.org/10.1021/es071470x.

Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. J. Hazard. Mater. 175 (1):45–95. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100.

Secrétan, P.-H., Karoui, M., Bernard, M., Ghermani, N., Safta, F., Yagoubi, N., Do, B., 2016. Photodegradation of aqueous argatroban investigated by LC/MS^n: photoproducts, transformation processes and potential implications. J. Pharm. Biomed. Anal. 131:223–232. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.08.033.

Singer, H.P., Wössner, A.E., McArdell, C.S., Fenner, K., 2016. Rapid screening for exposure to "non-target" pharmaceuticals from wastewater effluents by combining HRMS-based suspect screening and exposure modeling. Environ. Sci. Technol. 50 (13):6698–6707. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03332.

Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Pretali, L., Profumo, A., Fasani, E., Nucleo, E., 2012. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. Water Res. 46 (17):5575–5582. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.043.

Topal, M., Topal, E.I.A., 2015. Occurrence and fate of tetracycline and degradation products in municipal biological wastewater treatment plant and transport of them in surface water. Environ. Monit. Assess. 187 (12):750. https://doi.org/10.1007/s10661-015-4978-4.

Trawiński, J., Skibiński, R., 2017. Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 24 (2):1152–1199. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7727-5.

United States Environmental Protection Agency, 2016. User's guide for T.E.S.T. (version 4.2) (toxicity estimation software tool) A program to estimate toxicity from molecular structure. US EPA. URL. https://www.epa.gov/chemical-research/users-guide-test-version-42-toxicity-estimation-software-tool-program-estimate (www document).

Van Doorslaer, X., Demeestere, K., Heynderickx, P.M., Van Langenhove, H., Dewulf, J., 2011. UV-A and UV-C induced photolytic and photocatalytic degradation of aqueous ciprofloxacin and moxifloxacin: reaction kinetics and role of adsorption. Appl. Catal. B Environ. 101:540–547. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.10.027.

Velazquez-Pena, S., Saez, C., Canizares, P., Linares-Hernandez, I., Martinez-Miranda, V., Barrera-Diaz, C., Rodrigo, M.A., 2013. Production of oxidants via electrolysis of carbonate solutions with conductive-diamond anodes. Chem. Eng. J. 230:272–278. https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.078.

Vogna, D., Marotta, R., Napolitano, A., Andreozzi, R., d'Ischia, M., 2004. Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H2O2 and ozone. Water Res. 38 (2):414–422. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.028.

Zhang, X., Wu, F., Wu, X., Chen, P., Deng, N., 2008. Photodegradation of acetaminophen in TiO_2 suspended solution. J. Hazard. Mater. 157:300–307. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.098.

Zounkova, R., Kovalova, L., Blaha, L., Dott, W., 2010. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. Chemosphere 81 (2):253–260. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.06.029.

Supplementary Material

PEMETREXED DEGRADATION BY PHOTOCATALYTIC PROCESS: KINETICS, IDENTIFICATION OF TRANSFORMATION PRODUCTS AND ESTIMATION OF TOXICITY

Philippe-Henri Secrétan[a,b,*,1], Maher Karoui[a,c,1], Yves Levi[d], Hassane Sadou-Yayé[a], Lionel Tortolano[a,c], Audrey Solgadi[e], Najet Yagoubi[a] and Bernard Do[a,c].

[a] University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, Laboratory "Matériaux et Santé" EA 401, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.

[b] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Department of Pharmacy, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France.

[c] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Henri Mondor, Department of Pharmacy, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France.

[d] University of Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, UMR 8079, CNRS, AgroParisTech, Paris, France.

[e] University of Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites, Institut d'Innovation Thérapeutique, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Chatenay-Malabry, France

* Corresponding author. E-mail address: philippe-henri.secretan@u-psud.fr (P.-H. Secrétan).

[1] The first 2 authors contributed equally to this study and are therefore considered as first authors.

List of Figures:

Fig. S1. Total irradiance (300 nm-800 nm) of Q-SUN chamber's Daylight-Q filter compared to D65 outdoor sunlight. 3
Fig. S2. UV absorption spectrum of aqueous PEME. 4
Fig. S3. MS analysis of protonated PEME: MS^2 428-> 4
Fig. S4. MS analysis of protonated TP_{443}: MS^2 444-> 5
Fig. S5. MS analysis of protonated TP_{443}: MS^3 444->297-> 5
Fig. S6. MS analysis of protonated TP_{459}: MS^2 460-> 6
Fig. S7. MS analysis of protonated TP_{459}: MS^3 460->313-> 6
Fig. S8. MS analysis of protonated TP_{475}: $MS^2$476-> 7
Fig. S9. MS analysis of protonated TP_{475}: MS^3 476->459-> 7
Fig. S10. MS analysis of protonated TP_{431}: MS^2 432-> 8
Fig. S11. MS analysis of protonated TP_{431}: MS^3 432->285->....8
Fig. S12. MS analysis of protonated TP_{329}: MS^2 330-> 9
Fig. S13. MS analysis of protonated TP_{329}: MS^3 330->285->....9
Fig. S14. MS analysis of protonated TP_{301}: MS^2 302-> 10
Fig. S15. MS analysis of protonated TP_{301}: MS^3 302->285....10
Fig. S16. MS analysis of protonated TP_{226}: MS^2 227-> 11
Fig. S17. Proposed photodegradation mechanism of pemetrexed in UV/TiO2. 13
Fig. S18. Scatter plots showing the correlation between bioluminescence inhibition and the individual concentration of PEME and TPs as function of time. 16

List of Tables:

Table S1. Chromatographic method assessment results. 3
Table S2. Frontier electron densities on atoms of PEME calculated by using Gaussian 09 program at the B3LYP/6-31G* level....12
Table S3. QSAR values for fish and resulting Ci/LC50i for individual compounds as a function of irradiation time. 14
Table S4. QSAR values for daphnid and resulting Ci/LC50i for individual compounds as a function of irradiation time. 14
Table S5. QSAR values for green algae and resulting Ci/EC50i for individual compounds as a function of irradiation time. 15

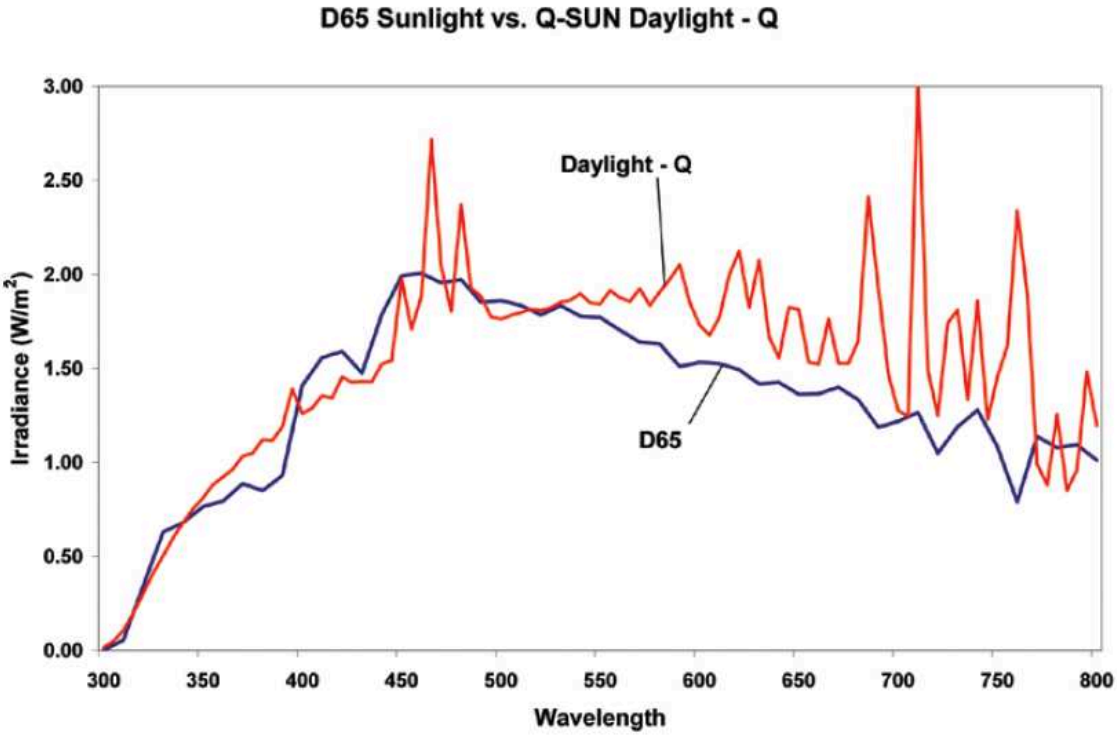


Fig. S1. Total irradiance (300 nm-800 nm) of Q-SUN chamber's Daylight-Q filter compared to D65 outdoor sunlight.

Table S1. Chromatographic method assessment results.

Parameters	**Results**
Linear range (µg.mL^{-1})	40 – 450
Slope	0,4718
Intercept	5,31
Correlation coefficient (r^2)	0.998
%RSD (intraday)	1,3
%RSD (interday)	0,4
LOQ (µg.mL^{-1})	0,37
Recovery % (n=6, 300 µg.mL^{-1})	99,5%
Recovery % (n=6, 100 µg.mL^{-1})	98,7%
PEME retention time (min)	10.72-10.81

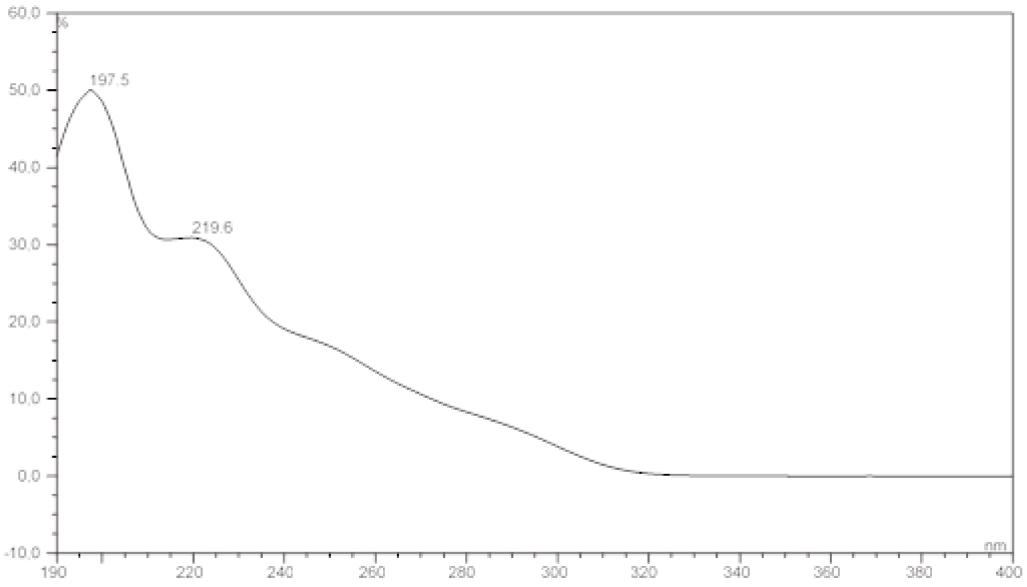


Fig. S2. UV absorption spectrum of aqueous PEME.

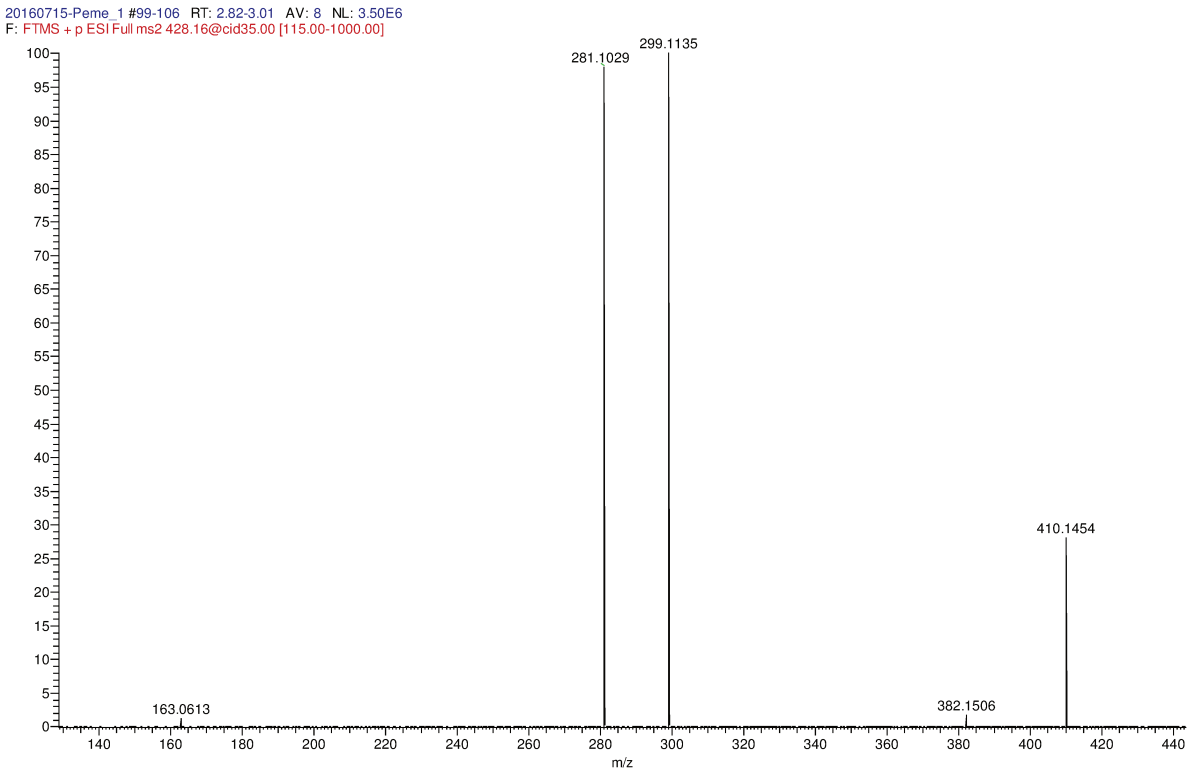


Fig. S3. MS analysis of protonated PEME: MS^2 428->

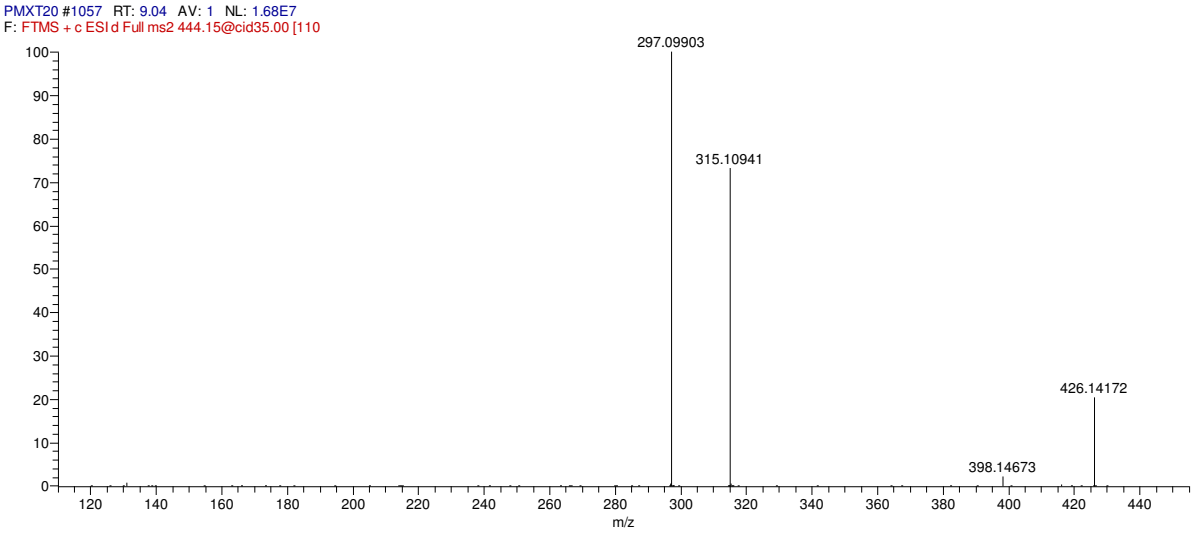


Fig. S4. MS analysis of protonated TP_{443}: MS^2 444->

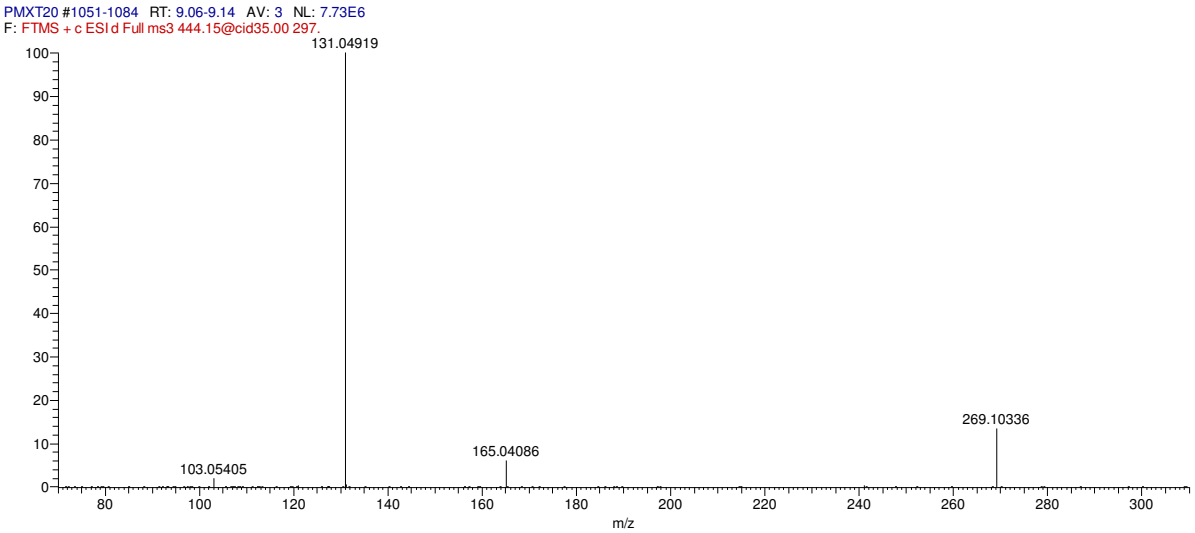


Fig. S5. MS analysis of protonated TP_{443}: MS^3 444->297->

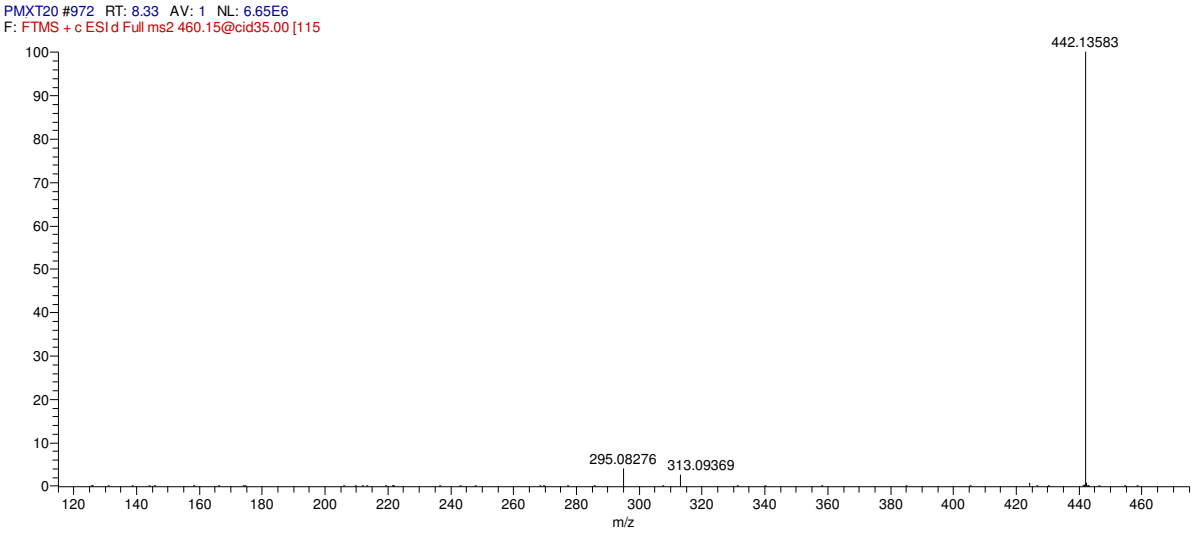


Fig. S6. MS analysis of protonated TP_{459}: MS^2 460->

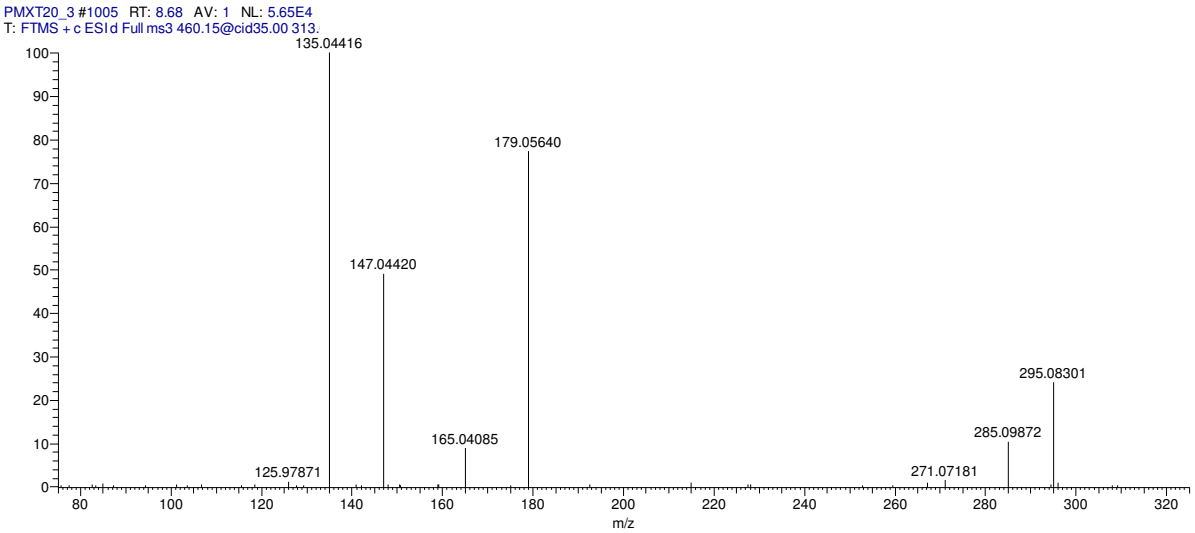


Fig. S7. MS analysis of protonated TP_{459}: MS^3 460->313->

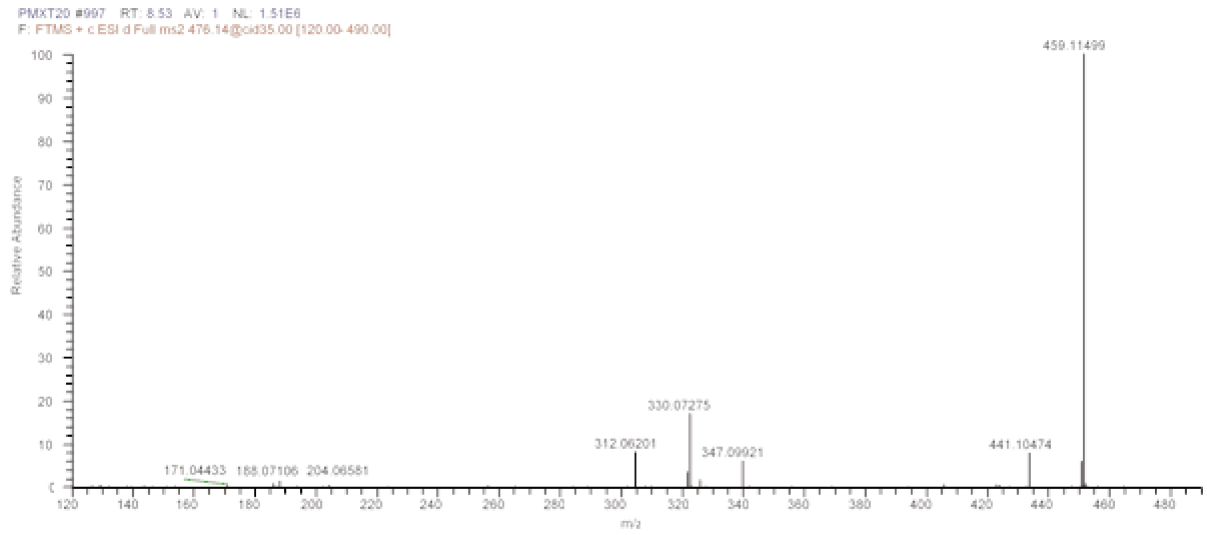


Fig. S8. MS analysis of protonated TP_{475}: $MS^2$476->

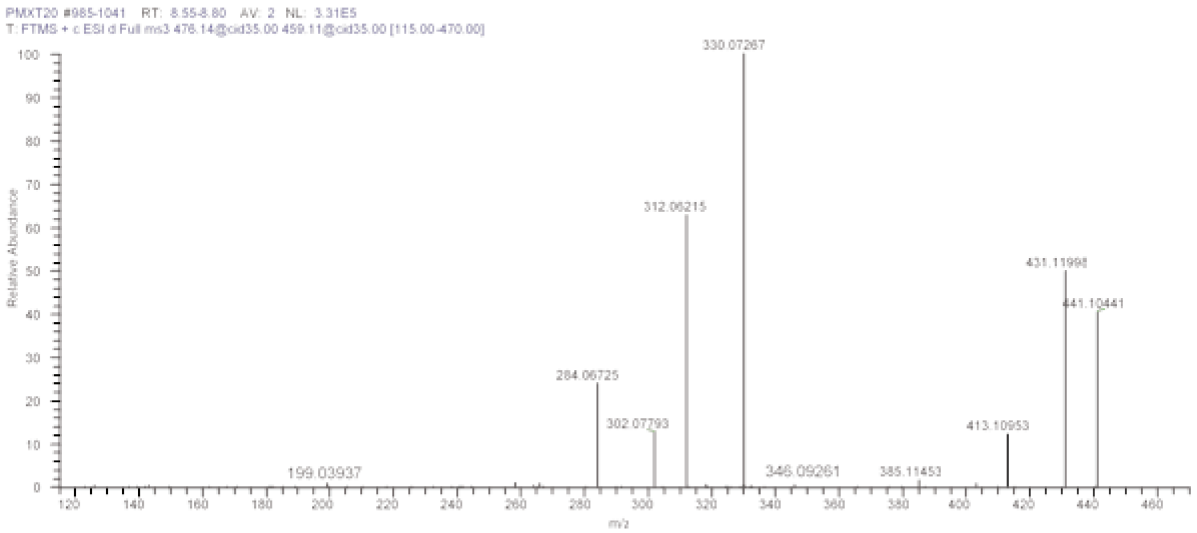


Fig. S9. MS analysis of protonated TP_{475}: MS^3 476->459->

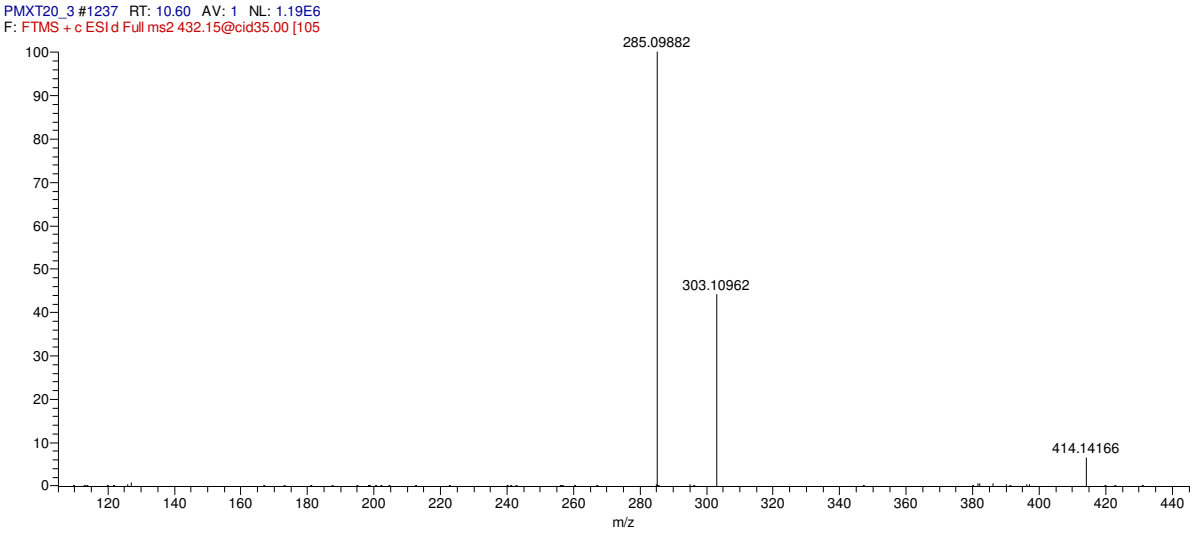


Fig. S10. MS analysis of protonated TP_{431}: MS^2 432->

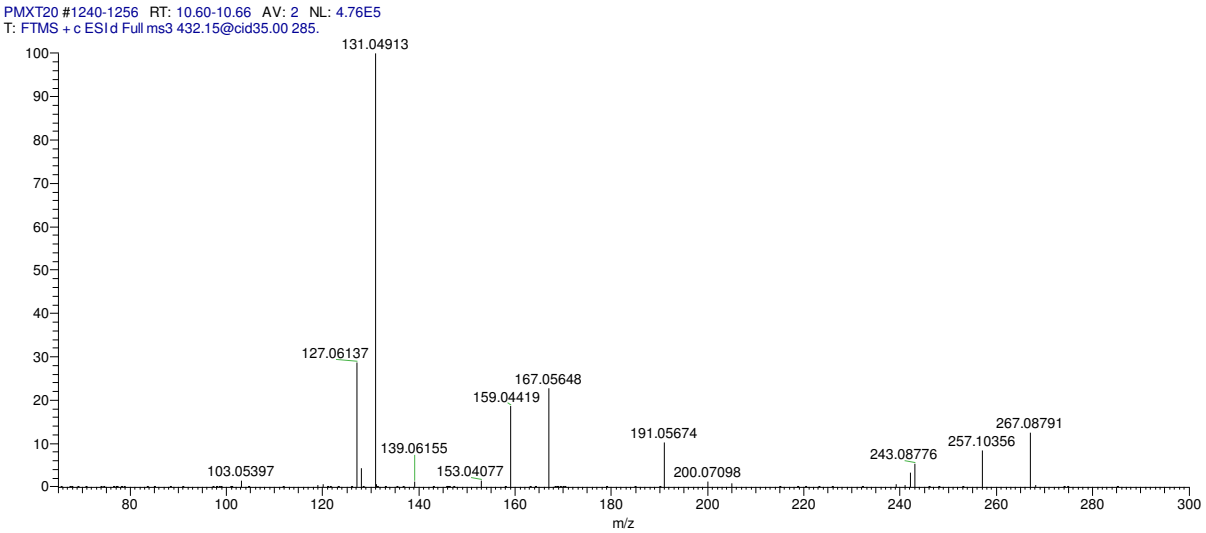


Fig. S11. MS analysis of protonated TP_{431}: MS^3 432->285->

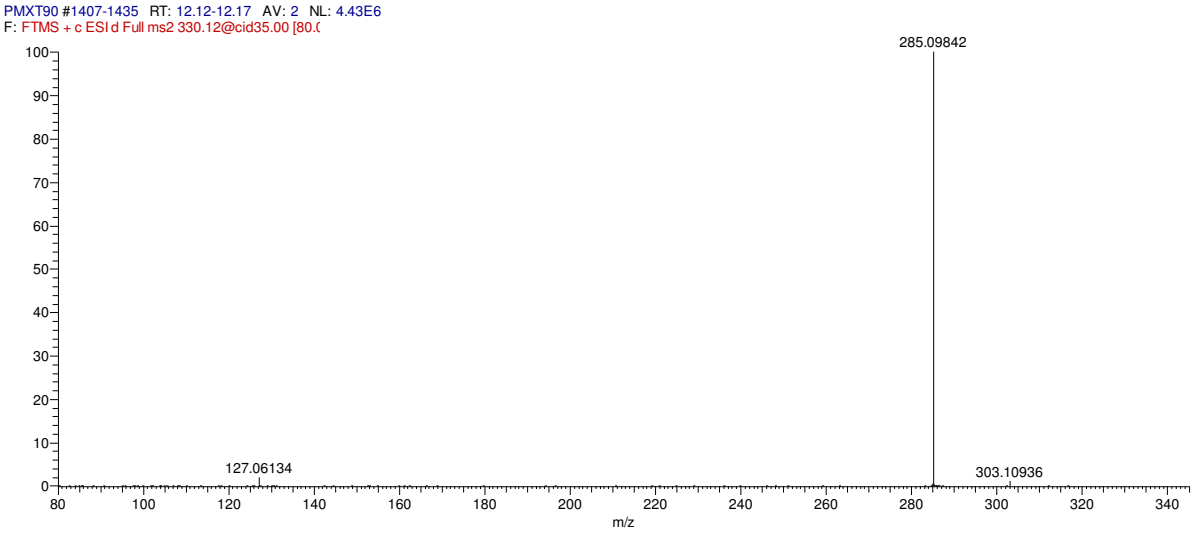


Fig. S12. MS analysis of protonated TP_{329}: MS^2 330->

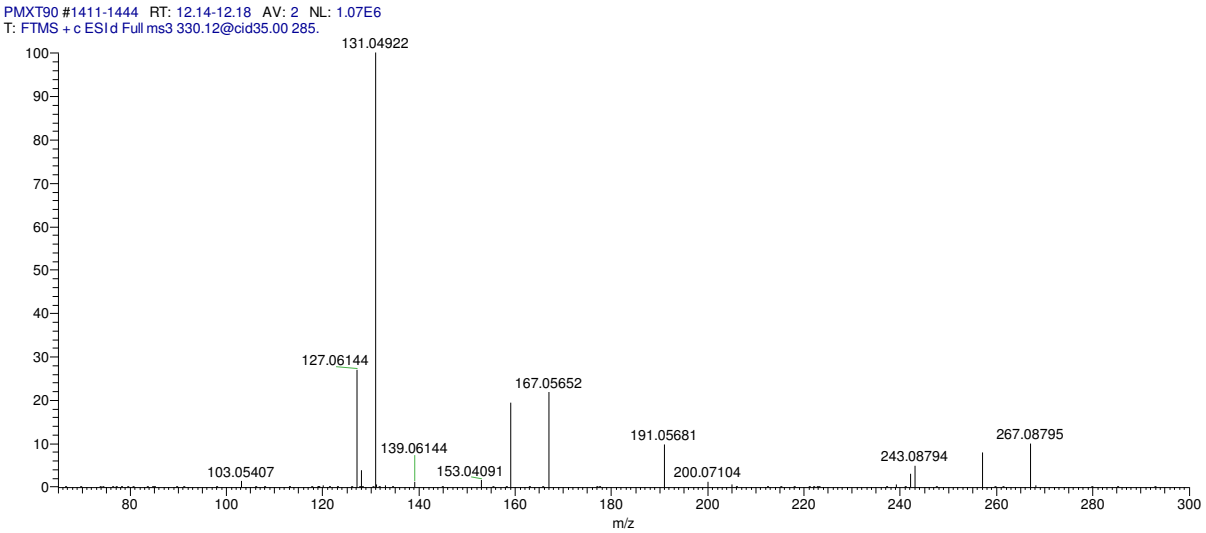


Fig. S13. MS analysis of protonated TP_{329}: MS^3 330->285->

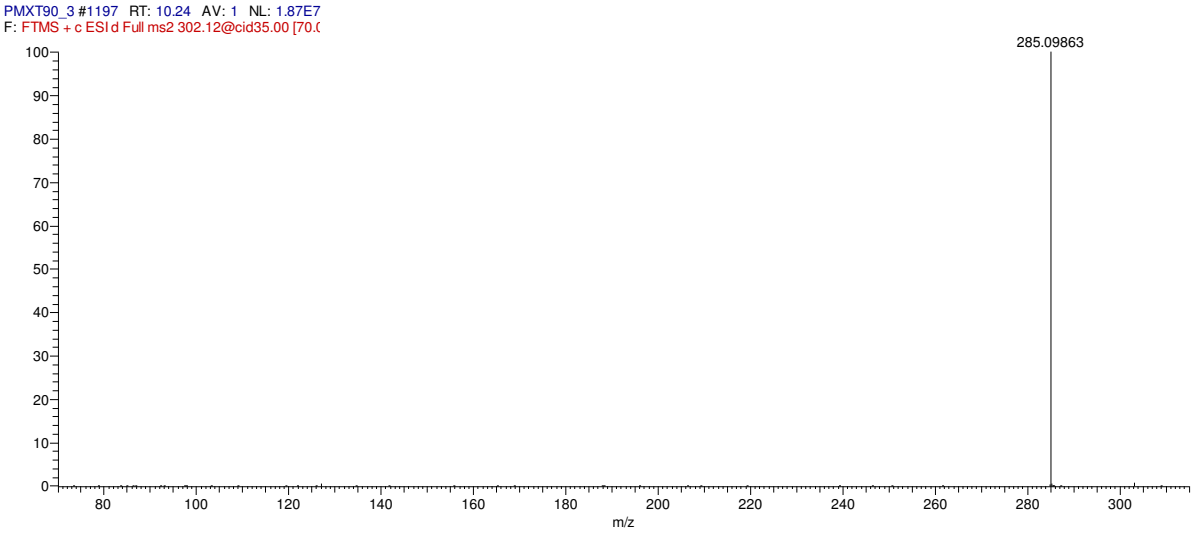


Fig. S14. MS analysis of protonated TP_{301}: MS^2 302->

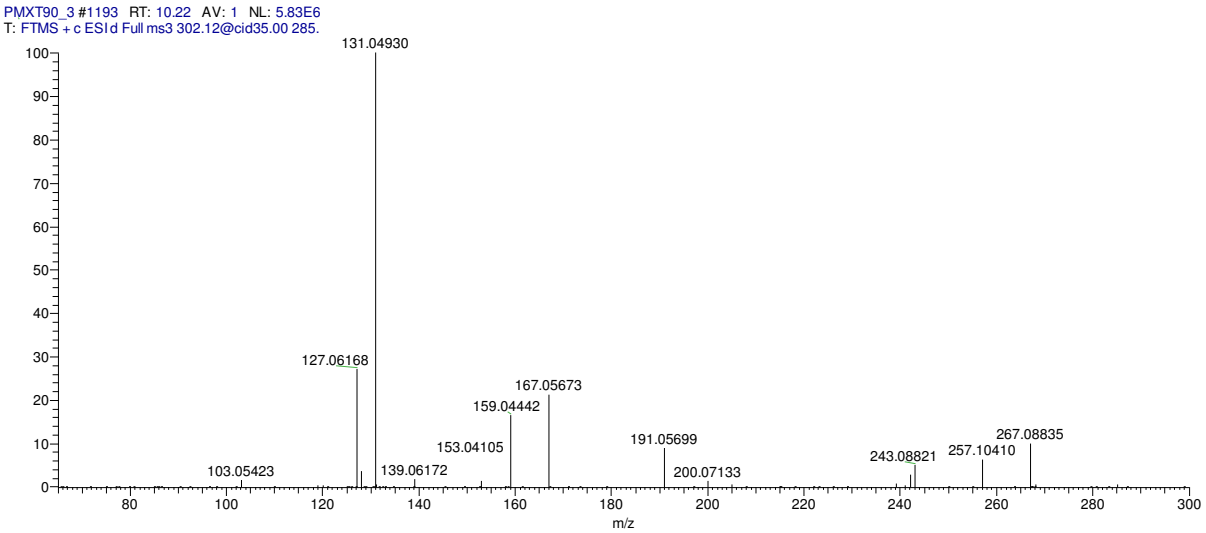


Fig. S15. MS analysis of protonated TP_{301}: MS^3 302->285

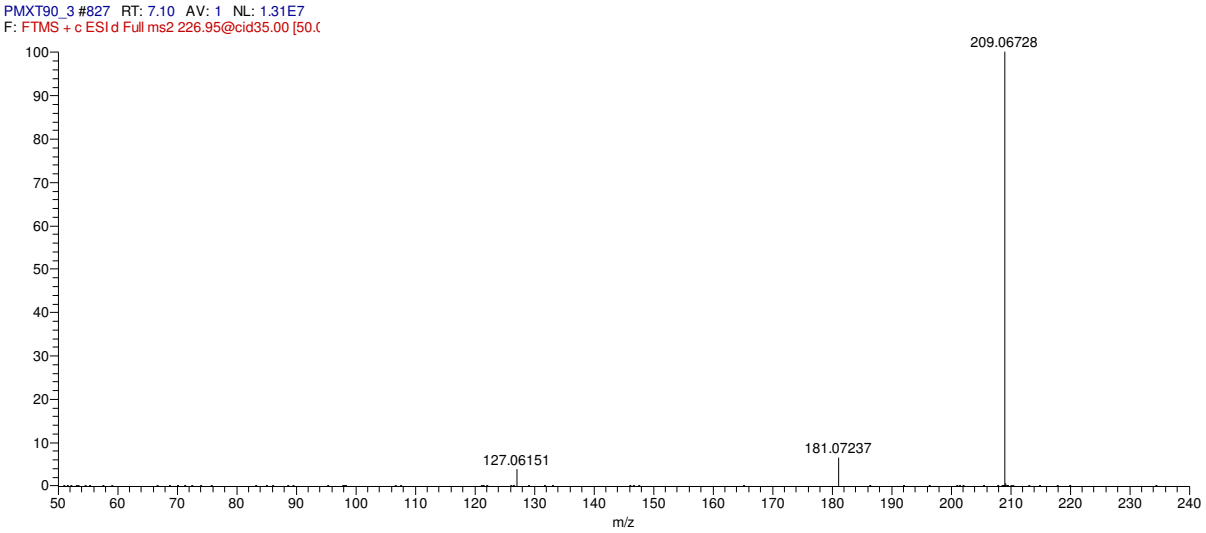


Fig. S16. MS analysis of protonated TP_{226}: MS^2 227->

Table S2. Frontier electron densities on atoms of PEME calculated by using Gaussian 09 program at the B3LYP/6-31G* level.

Number	Atom	$2 FED^2_{HOMO}$	$FED^2_{LUMO} + FED^2_{HOMO}$
1	C	**0.002**	**0.019**
2	C	**0.000**	**0.114**
3	C	**0.002**	**0.169**
4	C	**0.000**	**0.101**
5	C	**0.002**	**0.030**
6	C	**0.006**	**0.197**
7	C	**0.050**	**0.029**
8	C	**0.006**	**0.056**
9	C	**0.140**	**0.082**
10	C	**0.380**	**0.192**
11	N	**0.022**	**0.012**
12	C	**0.232**	**0.117**
13	C	**0.142**	**0.072**
14	C	**0.008**	**0.004**
15	O	**0.123**	**0.062**
16	N	**0.014**	**0.007**
17	C	**0.020**	**0.010**
18	N	**0.212**	**0.106**
19	N	**0.055**	**0.028**
20	C	**0.000**	**0.146**
21	O	**0.000**	**0.109**
22	N	**0.000**	**0.060**
23	C	**0.000**	**0.006**
24	C	**0.000**	**0.024**
25	C	**0.000**	**0.003**
26	C	**0.000**	**0.001**
27	O	**0.000**	**0.001**
28	O	**0.000**	**0.000**
29	C	**0.000**	**0.013**
30	O	**0.000**	**0.005**
31	O	**0.000**	**0.001**

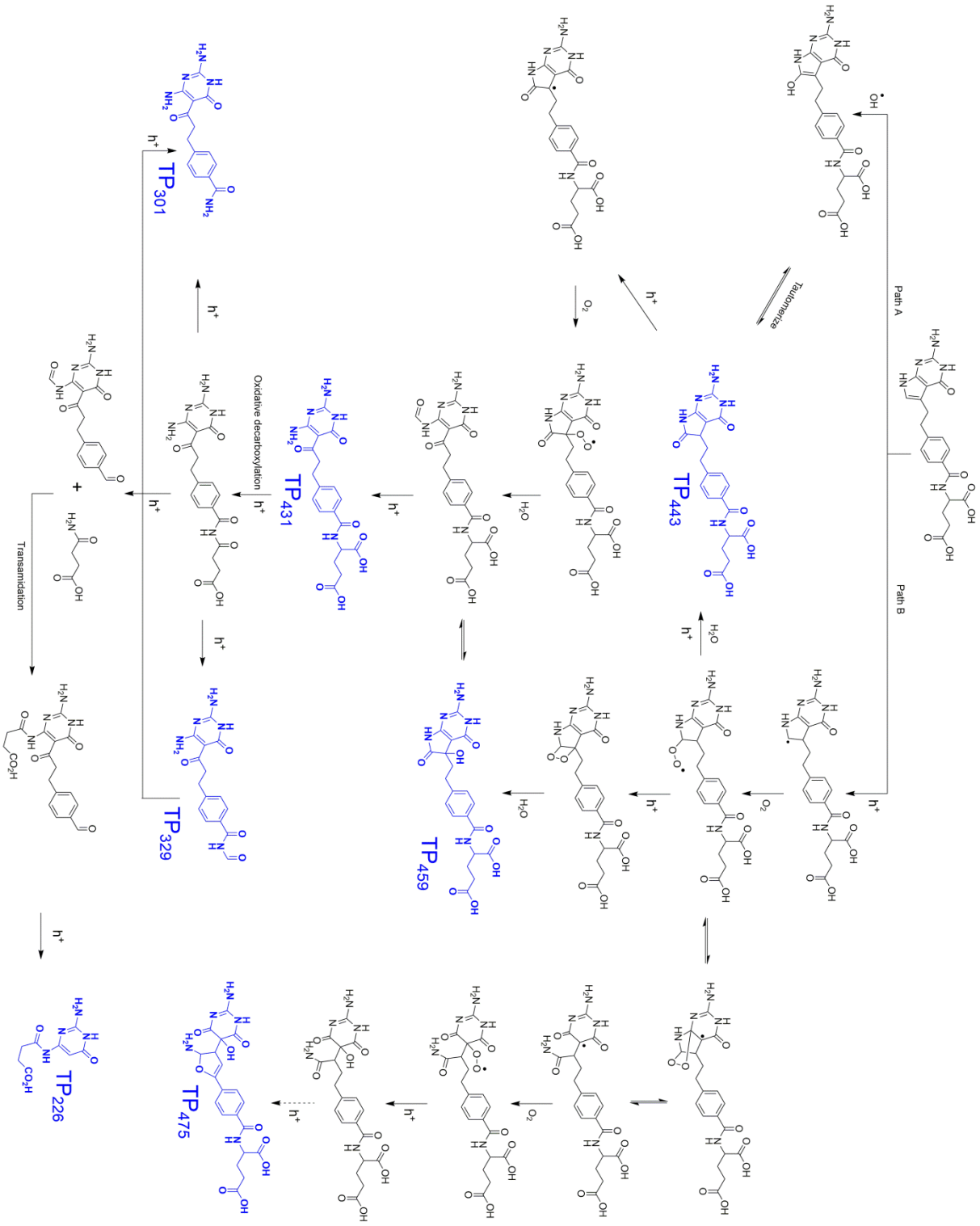


Fig. S17. Proposed photodegradation mechanism of pemetrexed in UV/TiO2.

Table S3. QSAR values for fish and resulting Ci/LC50i for individual compounds as a function of irradiation time.

	96-h fish LC50 (mg L-1)	Irradiation Time (min)					
		0	**5**	**10**	**30**	**60**	**120**
PEME	65.8	1.520	1.322	0.838	0.152	0.033	0.000
TP_{443}	965	0.000	0.024	0.039	0.030	0.004	0.002
TP_{329}	764.48	0.000	0.000	0.000	0.010	0.016	0.017
TP_{459}	4380000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{475}	3464	0.000	0.001	0.001	0.002	0.000	0.000
TP_{226}	745000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{431}	153000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{301}	3681	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.000

Table S4. QSAR values for daphnid and resulting Ci/LC50i for individual compounds as a function of irradiation time.

	48-h daphnid LC50 (mg L-1)	Irradiation Time (min)					
		0	**5**	**10**	**30**	**60**	**120**
PEME	300	0.333	0.290	0.184	0.033	0.007	0.000
TP_{443}	50.46	0.000	0.455	0.746	0.580	0.070	0.040
TP_{329}	707	0.000	0.000	0.000	0.011	0.017	0.018
TP_{459}	46100000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{475}	382000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{226}	5820000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{431}	12193	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
TP_{301}	318	0.000	0.000	0.000	0.012	0.007	0.006

Table S5. QSAR values for green algae and resulting Ci/EC50i for individual compounds as a function of irradiation time.

	96-h green algae EC50 (mg L-1)	Irradiation Time (min)					
		0	**5**	**10**	**30**	**60**	**120**
PEME	795	0.126	0.109	0.069	0.013	0.003	0.000
TP_{443}	15.39	0.000	1.493	2.447	1.901	0.228	0.130
TP_{329}	0.2	0.000	0.000	0.000	39.025	61.488	**65.000**
TP_{459}	47852	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{475}	191000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{226}	9352	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TP_{431}	5631	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000
TP_{301}	143	0.000	0.000	0.000	0.026	0.015	0.013

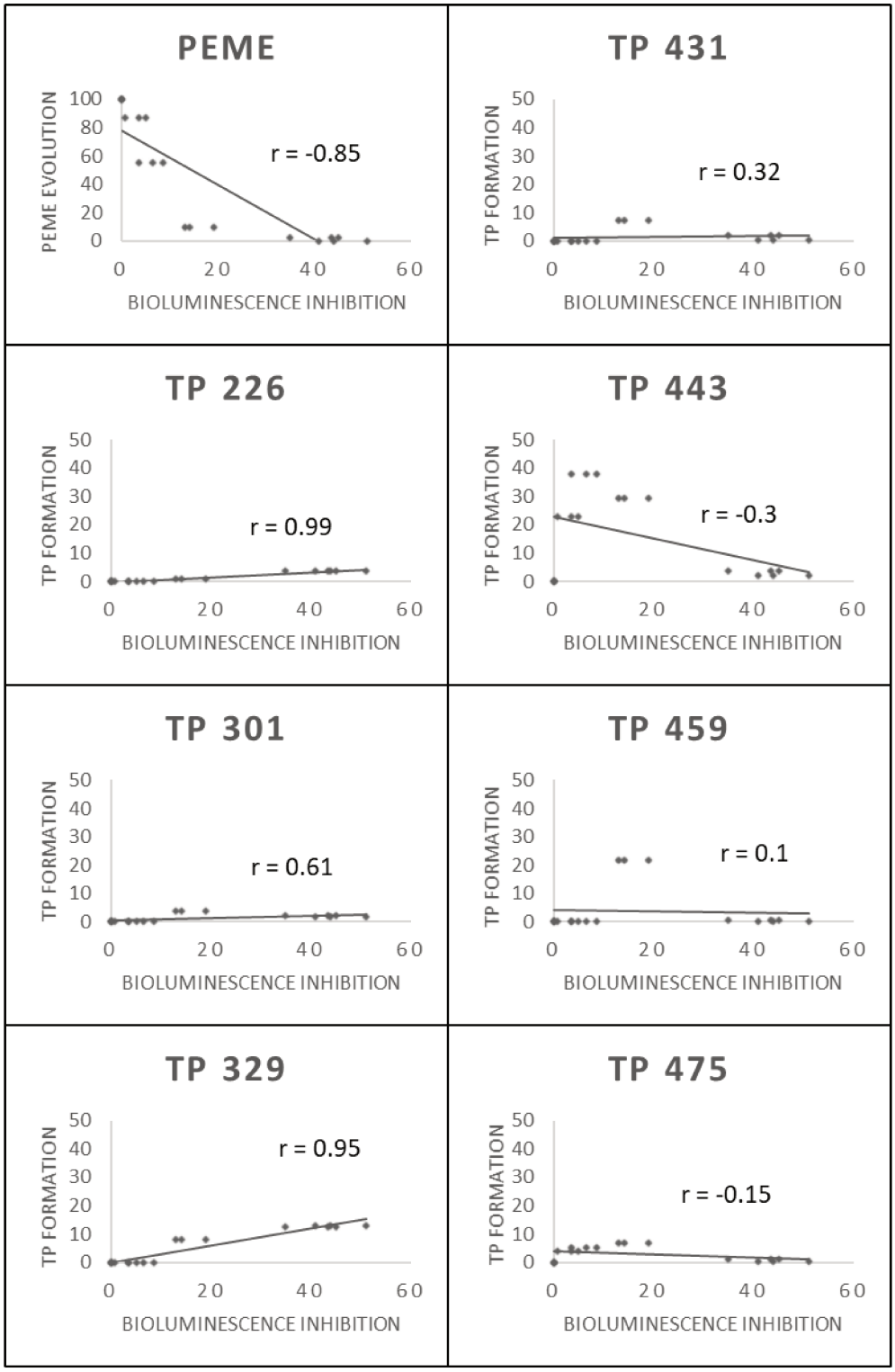


Fig. S18. Scatter plots showing the correlation between bioluminescence inhibition and the individual concentration of PEME and TPs as function of time.

CHAPITRE 6 : DISCUSSION

1. Caractérisation des produits de dégradation

1.1. Détection des principes actifs et des substances apparentées

1-1-1 Couplage CLHP-UV

Qu'il s'agisse de l'apixaban, de l'argatroban ou du pémétrexed, les concentrations des solutions et les conditions analytiques proposées ont permis d'atteindre des limites de détection inférieures à 0,3% par rapport au signal obtenu pour le principe actif avant l'exposition d'une solution à un stress. Les composés présentant un coefficient d'absorption supérieur ou égal à celui du principe actif à la longueur d'onde choisie pour sa quantification sont détectés directement sur le chromatogramme. L'emploi systématique d'une détection à barrette de diodes a permis de mettre en évidence des composés absorbant peu à la longueur d'onde choisie pour le principe actif.

1-1-2 Couplage CLHP-HRMS

Pour chacun des travaux menés, le spectromètre de masse ainsi que le procédé d'obtention des ions étaient les mêmes : il s'agissait d'un spectromètre de masse de type Orbitrap® utilisé avec une source permettant la formation d'ions par électronébulisation (ESI), cette source d'ionisation plus douce étant généralement préférée à d'autres dans le cas d'un couplage avec la CLHP (Holčapek et al., 2010 ; Kind and Fiehn, 2010). La source d'ionisation a été employée en mode positif.

Comme cela a été indiqué dans le chapitre 2, deux facteurs sont critiques pour la détection en ESI : l'ionisation de l'analyte et son aptitude à se désolvater de la solution avec laquelle il est introduit. Ces deux facteurs dépendent de l'affinité protonique de l'analyte et de sa surface topologique ainsi que du solvant employé pour l'introduire dans le spectromètre de masse. De façon simpliste, plus un composé contient de fonctions accepteuses de proton, plus il a tendance à en capter et donc à être détecté en mode positif. D'autre part, une étude visant à évaluer l'ionisation de 600 composés issus d'une bibliothèque interne a montré que les performances de l'ESI étaient plus faibles pour des composés de surface topologique inférieure à 60 $Å^2$(Cech and Enke, 2001).

Pour s'assurer que les principes actifs étudiés avaient bien une propension à s'ioniser, leur affinité protonique et leur surface topologique ont été obtenues en employant le logiciel Chemicalize® accessible en ligne. L'apixaban, l'argatroban et le pémétrexed comportant entre 5 et 9 fonctions accepteuses de proton et ayant des surfaces topologiques de 111, 180 et 187 Å² respectivement, on pouvait donc s'attendre, *a priori*, à une bonne détection en employant une source ESI. C'est ce qui a été observé dans les trois études.

En ce qui concerne les produits de dégradation, ne connaissant pas leurs structures *a priori*, il est difficile de savoir s'ils peuvent être détectés. Cependant étant issus des principes actifs, il est attendu qu'ils conservent une partie des propriétés de ceux-ci. Ainsi, même si une partie du principe actif est modifiée, compte tenu du nombre de fonctions accepteuses de proton, on peut anticiper que dans la plupart des cas, au moins une fonction accepteuse de proton est conservée de sorte que le produit de dégradation est lui aussi ionisé en ESI en mode positif. Dans tous les cas, les résultats obtenus en CLHP-HRMS ont été comparés à ceux des analyses en CLHP-UV afin de s'assurer que les produits de dégradation majoritaires détectés en CLHP-UV le soient aussi en CLHP-HRMS.

1.2. Élucidation structurale et mécanisme de dégradation

La seule exploitation des analyses LC-HRMS^n selon la stratégie décrite dans le chapitre 2 a permis de caractériser 20 produits de dégradation de l'apixaban, de l'argatroban et du pémétrexed sur les 22 produits néoformés suite à l'application de stress.

Pour les composés restant, P_6 et P_2 issus de la dégradation de l'argatroban dans des conditions photolytiques, les limites analytiques du couplage LC-HRMS^n n'ont pas permis de connaître le site du cycle aromatique concerné par l'hydroxylation pour P_6 ni la position du groupe oxo pour P_2. Il a été fait appel à l'approche *ab initio* pour proposer une structure pour P_6. Cependant, comme cela sera indiqué par la suite, l'approche *ab initio* présente également des limites. Aussi pour confirmer la structure du produit de dégradation obtenue par approche *ab initio*, il faudrait utiliser des approches expérimentales complémentaires comme la résonance magnétique

nucléaire, ou bien encore synthétiser le composé présumé et vérifier qu'il présente les mêmes caractéristiques physico-chimiques et spectrales que le produit de dégradation.

Il faut noter que le couplage LC-HRMS^n employé ne permet pas de différencier des isomères optiques. Si il est nécessaire de connaître la structure spatiale d'un composé chiral, il faudrait envisager d'avoir recours à la chromatographie chirale (Subramanian, 2006) et/ou à la spectrométrie de mobilité ionique (Dwivedi et al., 2006).

Au-delà de ces limites, dans toutes les études que nous avons conduites, la combinaison d'approches proposée a permis de caractériser les processus de dégradation des principes actifs, quel que soit le stress appliqué, ce qui laisse présager qu'elle pourrait être employée dans de nombreux contextes. De plus, même si le faisceau de données est insuffisant pour déterminer avec certitude la structure d'un produit de dégradation, cette combinaison d'approches permet cependant d'identifier les processus majoritaires de dégradation et donc de caractériser les modifications importantes subies par la molécule mère. Il est aussi à noter que les données obtenues permettent de mettre en évidence des composés présentant un risque, soit parce que leurs propriétés physico-chimiques sont à l'origine d'une distribution dans l'organisme différente de celle du principe actif comme cela a été le cas pour TP_{329} du pémétrexed, soit en raison de l'apparition d'un groupement induisant un risque d'activité génotoxique, comme cela a été mis en évidence dans le cas du composé P_2 de l'argatroban.

2. Caractérisation des processus de dégradation

2.1. Par approche expérimentale uniquement

Dans le cas d'un processus de dégradation issu d'un stress n'impliquant l'intervention que d'une seule espèce réactive, celui-ci sera établi au travers des réactions entre l'espèce réactive et le principe actif qui conduisent aux produits de dégradation caractérisés. Ainsi, pour les processus hydrolytiques, les ions hydronium et hydroxyde sont les espèces réactives impliquées respectivement en milieu acide et en milieu basique. Dans le cas de l'apixaban, les mécanismes de dégradation par hydrolyse ont pu être déduits uniquement à partir de l'exploitation des conditions réactionnelles appliquées et de la structure des produits de dégradation obtenus.

Lorsque le milieu réactionnel est plus complexe et contient plusieurs espèces réactives, l'emploi de substances pièges peut permettre de savoir quelles espèces sont impliquées préférentiellement dans les processus de dégradation. Cette stratégie a été adoptée dans le cas de l'étude de la dégradation du pémétrexed par un processus photocatalytique, processus induisant entre autres la formation de radicaux hydroxyle et de lacunes électroniques. Le méthanol (substrat piège de •OH et de h+) et l'isopropanol (substrat piège de •OH) ont été utilisés pour savoir si les lacunes électroniques et les radicaux hydroxyle étaient impliqués, ou non, dans la dégradation du principe actif.

2.2. En utilisant l'approche *ab initio*

Concernant la photolyse directe, pour comprendre quels processus peuvent être responsables de l'initiation de la réaction et des étapes suivantes il peut être fait appel, comme cela a été décrit dans les chapitres 1 et 2, aux données relatives à l'énergie des différents états (fondamental et excités) du principe actif. Ce sont ces considérations énergétiques, utilisant les approches *ab initio*, qui ont été employées pour étudier dans le chapitre 4 la dégradation de l'argatroban, principe actif photosensible.

Cependant, même si les méthodes *ab initio* hybrides (DFT entre autres) ont permis d'obtenir des résultats corrélés avec l'expérience, il est possible que des résultats obtenus par approche *ab initio* soient partiellement erronés, comme cela a pu être constaté dans certaines études (Ruscic, 2014).

Les méthodes *ab initio* faisant appel en partie à des résultats empiriques, le recours à des modèles à composante théorique plus marquée peut conduire à des résultats plus proches de la réalité. Mais compte tenu des ressources informatiques disponibles, ces méthodes s'avèrent souvent trop coûteuses en temps de calcul. Pour améliorer les résultats, des études complémentaires pourraient s'avérer nécessaires telles que :

- l'évaluation de l'exactitude/de l'applicabilité de l'approche computationnelle en l'employant sur des composés ou des systèmes similaires pour lesquels on dispose de données expérimentales,

- le recours à des approches expérimentales.

Le premier point nécessite de trouver des données sur des composés de structure similaire dans des milieux identiques. Actuellement, en raison de la taille des principes actifs, il est rare d'avoir des études sur ce type de système. De plus, étant donné la configuration spatiale des molécules, des interactions intramoléculaires sont susceptibles de survenir, de sorte que de faibles différences dans les structures peuvent avoir de grandes conséquences. Le choix d'un modèle s'avère donc difficile. Enfin, les approches *ab initio* ne permettent pas de modéliser ce qui survient dans des milieux aqueux non purs, milieux dans lesquels se trouve le principe actif dans son cycle de vie.

Le second point, le recours à des approches expérimentales, pourrait apporter un complément substantiel d'informations sur les espèces métastables.

Les états excités (singulet et triplet) et radicalaires ayant des durées de vie très faibles et différentes, l'emploi de méthodes avec une vitesse d'acquisition et une résolution temporelle très élevées est nécessaire. La photolyse flash (flash photolysis) présente ces caractéristiques (Windsor, 2003). Elle a permis à d'autres équipes, en combinaison avec des méthodes spectroscopiques moins résolues dans

le temps comme la spectroscopie UV-visible, la fluorescence et la phosphorescence, de comprendre les processus de photodégradation de composés en solution, que ce soit dans des solvants purs (Navaratnam et al., 1978) ou additionnés de composés organiques ou inorganiques dissous ou non tels que le dioxyde de titane (Tojo et al., 2004). La photolyse flash a aussi permis d'expliquer l'origine de processus de photodégradation (Shah and Neckers, 2004 ; Martins and Ferreira, 2017) et de phototoxicité cutanée (Morlière et al., 2015).

Il convient de souligner que l'emploi de ces méthodes expérimentales résolues dans le temps fait partie des perspectives de cette thèse.

3. Évaluation du risque toxicologique et écotoxicologique

Les études réalisées par approche *in silico* ont offert une première évaluation de l'impact potentiel des produits de dégradation sur quelques aspects. Ainsi, dans le cadre de la thèse, l'approche *in silico* a soulevé des risques potentiels pour :

- l'apixaban, l'un des produits de dégradation, DP-6, présentant une activité anticoagulante et étant à risque de traverser la BHE,

- l'argatroban, un des produits de dégradation, P_2, étant susceptible d'avoir une activité mutagène,

- le pémétrexed, un des produits de dégradation, TP_{329}, semblant être à risque pour l'environnement.

Cependant, même si cette approche est acceptée par les institutions dans certains contextes comme l'évaluation de la mutagénicité, dans d'autres cas, les données sont insuffisantes pour développer des modèles prédictifs de la toxicité ou de l'activité pharmacologique des composés de sorte qu'il est nécessaire d'avoir recours à d'autres méthodes. Celles-ci seront choisies en fonction de l'aspect à étudier.

Dans le cas présent, pour vérifier que les trois produits de dégradation ci-dessus présentent la toxicité supposée, il faudrait les isoler et réaliser, par exemple, les tests complémentaires suivants :

- pour DP-6 : un test semi-global de la coagulation sanguine comme le temps de céphaline activée (Dale et al., 2014)

- pour P_2 : un test d'Ames, généralement employé pour l'évaluation de la mutagénicité de composés (Maron and Ames, 1983),

- pour TP_{329} : l'essai *vibrio fischeri* et/ou l'essai des daphnies, ce dernier étant recommandé dans le cadre de l'évaluation de l'écotoxicité de composés organiques (Wollenberger et al., 2000).

À côté de ces tests et essais expérimentaux, à partir de considérations théoriques recourant à des approches *ab initio* combinées à des approches de type mécanique moléculaire (Quantique Mechanics/Molecular Mechanics), l'étude de l'affinité de

certains produits de dégradation pour des cibles protéiques constitue aussi une piste pour améliorer la prédiction de leur impact (van der Kamp and Mulholland, 2013). Par exemple, on pourrait envisager d'évaluer si DP-6 présente une affinité pour la cible pharmacologique de l'apixaban, le facteur X activé.

CONCLUSION

La caractérisation des processus de dégradation majoritaires de l'apixaban, de l'argatroban et du pémétrexed a permis de dégager des implications pharmaceutiques et environnementales de leur dégradation. Des perspectives pour ces travaux et des études complémentaires ont été aussi évoquées.

Les processus d'hydrolyse de l'apixaban en fonction du pH ont été caractérisés et expliqués par l'élucidation structurale et le calcul de la répartition des charges de Mulliken. L'impact toxicologique potentiel des produits de dégradation serait évaluable plus en détail par des approches *in vitro*.

L'étude de la photodégradation de l'argatroban a permis de déterminer des espèces pouvant être impliquées dans sa dégradation et de proposer ainsi des optimisations visant à réduire la photodégradation de l'argatroban et son impact sur les patients. Les mesures suggérées pourraient être confirmées par des approches expérimentales.

L'emploi d'un procédé photocatalytique semble être un moyen efficace pour éliminer le pémétrexed d'un milieu aqueux. Cependant, les résultats des approches expérimentale et informatique ont convergé vers l'apparition d'un produit de dégradation bien plus toxique, ce qui conduit à recommander l'optimisation des procédés d'oxydation avancée pour obtenir la minéralisation complète du pémétrexed et d'autres composés toxiques.

En dehors de ces trois principes actifs, durant la réalisation de la thèse, l'approche de caractérisation des produits de dégradation en solution a également été utilisée pour l'étude du devenir et des impacts potentiels de la dégradation de quatre autres principes actifs. Comme pour l'apixaban, l'argatroban et le pémétrexed, les principes actifs choisis présentaient une haute activité pharmacologique. Les études sur le devenir d'un autre anticoagulant, le dabigatran etexilate (Amrani et al., 2015) et de deux antiagrégants plaquettaires, le ticagrelor (Hassane et al., 2015) et le tirofiban (Henriet et al., 2016) ont chacune fait l'objet d'une publication distincte dans des journaux de chimie et de sciences pharmaceutiques. En raison de l'apparition de produits toxiques pour l'environnement lors de l'exposition du pémétrexed à des conditions de stress photocatalytiques, une étude a été menée par notre laboratoire dans les mêmes conditions et a porté sur un autre composé cytotoxique rémanent et

perturbateur endocrinien : l'imatinib. L'article est en cours de révision pour publication dans le Science of the Total Environment et est ajouté en annexe de la thèse.

Les limites des approches employées ont été discutées et des solutions ont été avancées. Les aspects mécanistiques et structuraux partiellement caractérisés, par exemple les processus de dégradation photolytique et la structure spatiale des composés, pourraient être approfondis par l'accès respectivement à la photolyse flash et à la spectrométrie de masse à mobilité ionique. La toxicité des produits de dégradation pourrait être précisée par la mise en œuvre d'approches complémentaires d'évaluation toxicologique (test d'Ames, essai de toxicité sur les daphnies) et d'évaluation pharmacologique (temps de céphaline activée, approche computationnelle Quantum Mechanics / Molecular Mechanisms).

En plus du milieu aqueux, d'autres travaux de recherche seront réalisés dans le cadre de la caractérisation des processus de dégradation dans d'autres systèmes.

Dans un contexte de développement pharmaceutique, la mise au point de procédés durables permettant de solubiliser le principe actif sans utiliser de solvant toxique, comme cela est souvent nécessaire, est un domaine de recherche émergent. L'emploi de solvants eutectiques profonds, approche plus écoresponsable, comme moyen d'extraire et de solubiliser des principes actifs, fait l'objet d'intenses recherches (Paiva et al., 2014). Ainsi des auteurs sont parvenus à solubiliser des principes actifs dans un mélange eutectique à une concentration jusqu'à 22000 fois plus élevée qu'en employant de l'eau (Morrison et al., 2009). Cependant, dans des solvants eutectiques profonds, l'hydrolyse de composés est facilitée (Sirviö et al., 2016), ce qui est en faveur d'une dégradation potentielle des principes actifs dans ceux-ci. La compréhension des facteurs influençant les réactions de dégradation des principes actifs dans ces solvants pourrait guider le choix de solvants eutectiques dans lesquels le principe actif est stable.

Dans un contexte environnemental, une application future du travail sur le pémétrexed rapporté dans la thèse pourrait être l'analyse de la pollution d'une eau potentiellement contaminée (eaux usées, eaux superficielles ou souterraines) avec une extension à d'autres médicaments anticancéreux et à leurs produits de dégradation. C'est dans ce contexte que nous menons actuellement une étude sur le

devenir de l'imatinib dans les eaux de surface, complémentairement à celle sur les processus photocatalytiques de dégradation de ce principe actif. L'objectif est de prédire la dégradation de ce composé ainsi que la formation de ses produits de transformation en fonction de la composition des eaux de surface, et d'en déduire l'effet perturbateur endocrinien potentiel de la présence d'imatinib dans l'eau en fonction de sa composition.

Dans un contexte de recherche et de développement technologique, des travaux relatifs à l'optimisation de matériaux photocatalytiques dopés pour limiter l'empreinte environnementale de composés organiques sont aussi d'un grand intérêt. Ceux-ci font appel à des techniques et à des expertises multiples pour caractériser le matériau, les interactions entre les composés à dégrader et ce matériau et pour déterminer son rendement photocatalytique et l'impact des produits néoformés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adjei, A.A., 2004. Pharmacology and mechanism of action of pemetrexed. Clin. Lung Cancer 5 Suppl 2, S51-55.

Ahmed, M.B., Zhou, J.L., Ngo, H.H., Guo, W., Thomaidis, N.S., Xu, J., n.d. Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review. J. Hazard. Mater. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.045

Alsante, K.M., Martin, L., Baertschi, S.W., 2003. A stress testing benchmarking study. Pharm. Technol. 27, 60–73.

Amrani, F., Secrétan, P.-H., Sadou-Yayé, H., Aymes-Chodur, C., Bernard, M., Solgadi, A., Yagoubi, N., Do, B., 2015. Identification of dabigatran etexilate major degradation pathways by liquid chromatography coupled to multi stage high-resolution mass spectrometry. RSC Adv. 5, 45068–45081. https://doi.org/10.1039/C5RA04251H

An, T., An, J., Gao, Y., Li, G., Fang, H., Song, W., 2015. Photocatalytic degradation and mineralization mechanism and toxicity assessment of antivirus drug acyclovir: Experimental and theoretical studies. Appl. Catal. B Environ. 164, 279–287. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.09.009

Ankley, G.T., Bencic, D.C., Breen, M.S., Collette, T.W., Conolly, R.B., Denslow, N.D., Edwards, S.W., Ekman, D.R., Garcia-Reyero, N., Jensen, K.M., Lazorchak, J.M., Martinović, D., Miller, D.H., Perkins, E.J., Orlando, E.F., Villeneuve, D.L., Wang, R.-L., Watanabe, K.H., 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 92, 168–178. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.01.013

Attia, K.A.M., Nassar, M.W.I., El-Din, M.M.K.S., Mohamad, A.A.A., Kaddah, M.M.Y., 2016. A stability-indicating QTRAP LC-MS/MS method for identification and structural characterization of degradation products of indapamide. Anal. Methods 8, 1836–1851. https://doi.org/10.1039/C5AY03075G

Baertschi, S.W., Clapham, D., Foti, C., Jansen, P.J., Kristensen, S., Reed, R.A., Templeton, A.C., Tønnesen, H.H., 2013. Implications of In-Use Photostability: Proposed Guidance for Photostability Testing and Labeling to Support the Administration of Photosensitive Pharmaceutical Products, Part 1: Drug Products Administered by Injection. J. Pharm. Sci. 102, 3888–3899. https://doi.org/10.1002/jps.23717

Bart Emary, W., Zhang, N.R., 2013. Utility of High-Resolution Mass Spectrometry for New Drug Discovery Applications, in: Korfmacher, W.A. (Ed.), Mass Spectrometry for Drug Discovery and Drug Development. John Wiley & Sons, Inc., pp. 37–54.

Benfenati, E., 2016. In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity. Springer New York.

Besse, J.-P., Latour, J.-F., Garric, J., 2012. Anticancer drugs in surface waters. Environ. Int. 39, 73–86. https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.002

Bhandi, M.M., Borkar, R.M., Shankar, G., Raut, S., Nagesh, N., Srinivas, R., 2016. Identification and characterization of stressed degradation products of rabeprazole using LC-ESI/MS/MS and 1H-NMR experiments: in vitro toxicity evaluation of major degradation products. RSC Adv. 6, 10719–10735. https://doi.org/10.1039/C5RA27965H

Białk-Bielińska, A., Stolte, S., Matzke, M., Fabiańska, A., Maszkowska, J., Kołodziejska, M., Liberek, B., Stepnowski, P., Kumirska, J., 2012. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. J. Hazard. Mater. 221–222, 264–274. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.044

Booker, V., Halsall, C., Llewellyn, N., Johnson, A., Williams, R., 2014. Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purposes. Sci. Total Environ. 473–474, 159–170. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.145

Calza, P., Medana, C., Sarro, M., Rosato, V., Aigotti, R., Baiocchi, C., Minero, C., 2014. Photocatalytic degradation of selected anticancer drugs and identification of their transformation products in water by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1362, 135–144. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.08.035

Carp, O., 2004. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. Prog. Solid State Chem. 32, 33–177. https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2004.08.001

Castell, J.V., Gomez-L., M.J., Miranda, M.A., Morera, I.M., 1987. PHOTOLYTIC DEGRADATION OF IBUPROFEN. TOXICITY OF THE ISOLATED PHOTOPRODUCTS ON FIBROBLASTS and ERYTHROCYTES. Photochem. Photobiol. 46, 991–996. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1987.tb04882.x

Cavalcante, R.P., Dantas, R.F., Bayarri, B., González, O., Giménez, J., Esplugas, S., Machulek, A., 2015. Synthesis and characterization of B-doped TiO2 and their performance for the degradation of metoprolol. Catal. Today 252, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.09.030

Cech, N.B., Enke, C.G., 2001. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. Mass Spectrom. Rev. 20, 362–387. https://doi.org/10.1002/mas.10008

Chermette, H., 1999. Chemical reactivity indexes in density functional theory. J. Comput. Chem. 20, 129–154. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19990115)20:1<129::AID-JCC13>3.0.CO;2-A

Cornish, P., 2005. “Avoid the crush”: hazards of medication administration in patients with dysphagia or a feeding tube. Can. Med. Assoc. J. 172, 871–872. https://doi.org/10.1503/cmaj.050176

Daghrir, R., Drogui, P., Robert, D., 2013. Modified TiO_2 For Environmental Photocatalytic Applications: A Review. Ind. Eng. Chem. Res. 52, 3581–3599. https://doi.org/10.1021/ie303468t

Dale, B.J., Ginsberg, J.S., Johnston, M., Hirsh, J., Weitz, J.I., Eikelboom, J.W., 2014. Comparison of the effects of apixaban and rivaroxaban on prothrombin and activated partial thromboplastin times using various reagents. J. Thromb. Haemost. 12, 1810–1815. https://doi.org/10.1111/jth.12720

Dearden, J.C., 2003. In silico prediction of drug toxicity. J. Comput. Aided Mol. Des. 17, 119–127. https://doi.org/10.1023/A:1025361621494

DellaGreca, M., Isidori, M., Temussi, F., 2014. Toxicity and Risk of Transformation Products of Emerging Contaminants for Aquatic Organisms: Pharmaceutical Case Studies, in: Lambropoulou, D.A., Nollet, L.M.L. (Eds.), Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment. John Wiley and Sons Ltd, pp. 827–858. https://doi.org/10.1002/9781118339558.ch28

Demarque, D.P., Crotti, A.E.M., Vessecchi, R., Lopes, J.L.C., Lopes, N.P., 2016. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. Nat Prod Rep 33, 432–455. https://doi.org/10.1039/C5NP00073D

Deng, Y., Zhao, R., 2015. Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Wastewater Treatment. Curr. Pollut. Rep. 1, 167–176. https://doi.org/10.1007/s40726-015-0015-z

DeRosa, M., 2002. Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coord. Chem. Rev. 233–234, 351–371. https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6

Devrukhakar, P.S., Shiva Shankar, M., Shankar, G., Srinivas, R., n.d. A stability indicating HPLC method of zidovudine: Validation, characterization and toxicity prediction of two major acid degradation products. J. Pharm. Anal. https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.01.006

Dorman, D.E., Lorenz, L.J., Occolowitz, J.L., Spangle, L.A., Collins, M.W., Bashore, F.N., Baertschi, S.W., 1997. Isolation and Structure Elucidation of the Major Degradation Products of Cefaclor in the Solid State. J. Pharm. Sci. 86, 540–549. https://doi.org/10.1021/js960428p

Doucet, J.P., Panaye, A., 2010. Three Dimensional QSAR: Applications in Pharmacology and Toxicology. CRC Press.

Dwivedi, P., Wu, C., Matz, L.M., Clowers, B.H., Siems, W.F., Hill, H.H., 2006. Gas-Phase Chiral Separations by Ion Mobility Spectrometry. Anal. Chem. 78, 8200–8206. https://doi.org/10.1021/ac0608772

Evelo, C.T.A., Spooren, A.A.M.., Bisschops, R.A.G., Baars, L.G.M., Neis, J.M., 1998. Two Mechanisms for Toxic Effects of Hydroxylamines in Human Erythrocytes: Involvement of Free Radicals and Risk of Potentiation. Blood Cells. Mol. Dis. 24, 280–295. https://doi.org/10.1006/bcmd.1998.0194

Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M.I., Kümmerer, K., 2011. Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts

and assessment of their biological potency. Chemosphere 85, 693–709. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.082

Fg, N., Vm, M., 1989. The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. Prog. Clin. Biol. Res. 304, 85–107.

Franquet-Griell, H., Gómez-Canela, C., Ventura, F., Lacorte, S., 2015. Predicting concentrations of cytostatic drugs in sewage effluents and surface waters of Catalonia (NE Spain). Environ. Res. 138, 161–172. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.015

Frimpter, G.W., Timpanelli, A.E., Eisenmenger, W.J., Stein, H.S., Ehrlich, L.I., 1963. Reversible Fanconi Syndrome Caused by Degraded Tetracycline. JAMA 184, 111–113. https://doi.org/10.1001/jama.1963.03700150065010

Fukui, K., Yonezawa, T., Shingu, H., 1952. A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic Hydrocarbons. J. Chem. Phys. 20, 722. https://doi.org/10.1063/1.1700523

Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2014. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. Nucleic Acids Res. 42, W32–W38. https://doi.org/10.1093/nar/gku293

Glaze, W.H., Kang, J.-W., Chapin, D.H., 1987. The Chemistry of Water Treatment Processes Involving Ozone, Hydrogen Peroxide and Ultraviolet Radiation. Ozone Sci. Eng. 9, 335–352. https://doi.org/10.1080/01919518708552148

Green, R.E., Taggart, M.A., Senacha, K.R., Raghavan, B., Pain, D.J., Jhala, Y., Cuthbert, R., 2007. Rate of Decline of the Oriental White-Backed Vulture Population in India Estimated from a Survey of Diclofenac Residues in Carcasses of Ungulates. PLoS ONE 2. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000686

Guideline, I.H.T., 2003. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). Nov.

Guideline, I.H.T., 1996. Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products. Q1B Curr. Step 4.

Ha, E., Wang, W., Wang, Y.J., 2002. Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability. J. Pharm. Sci. 91, 2252–2264. https://doi.org/10.1002/jps.10216

Hassane, S.Y., Secrétan, P.-H., Henriet, T., Bernard, M., Amrani, F., Akrout, W., Tilleul, P., Yagoubi, N., Do, B., 2015. Identification of the major degradation pathways of ticagrelor. J. Pharm. Biomed. Anal. 105, 74–83. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.046

Hayyan, M., Hashim, M.A., AlNashef, I.M., 2016. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. Chem. Rev. 116, 3029–3085. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407

He, L., Sun, X., Zhu, F., Ren, S., Wang, S., 2017. OH-initiated transformation and hydrolysis of aspirin in AOPs system: DFT and experimental studies. Sci. Total Environ. 592, 33–40. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.041

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. https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00041-3

Henriet, T., Secrétan, P.-H., Amrani, F., Sadou-Yayé, H., Bernard, M., Solgadi, A., Yagoubi, N., Do, B., 2016. Phototransformation patterns of the antiplatelet drug tirofiban in aqueous solution, relevant to drug delivery and storage. New J. Chem. 40, 1182–1194. https://doi.org/10.1039/C5NJ01826A

Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M., 2010. Basic rules for the interpretation of atmospheric pressure ionization mass spectra of small molecules. J. Chromatogr. A, Mass Spectrometry: Innovation and Application. Part VI 1217, 3908–3921. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.02.049

Hopfgartner, G., 2013. Overview of the Various Types of Mass Spectrometers that are Used in Drug Discovery and Drug Development, in: Korfmacher, W.A. (Ed.), Mass Spectrometry for Drug Discovery and Drug Development. John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–35.

Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. J. Mass Spectrom. 40, 430–443. https://doi.org/10.1002/jms.856

Hurum, D.C., Agrios, A.G., Gray, K.A., Rajh, T., Thurnauer, M.C., 2003. Explaining the Enhanced Photocatalytic Activity of Degussa P25 Mixed-Phase TiO_2 Using EPR. J. Phys. Chem. B 107, 4545–4549. https://doi.org/10.1021/jp0273934

Jain, D., Basniwal, P.K., 2013. Forced degradation and impurity profiling: Recent trends in analytical perspectives. J. Pharm. Biomed. Anal. 86, 11–35. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.013

Janga, K.Y., King, T., Ji, N., Sarabu, S., Shadambikar, G., Sawant, S., Xu, P., Repka, M.A., Murthy, S.N., 2018. Photostability Issues in Pharmaceutical Dosage Forms and Photostabilization. AAPS PharmSciTech 19, 48–59. https://doi.org/10.1208/s12249-017-0869-z

Jansen, P.J., Smith, W.K., Baertschi, S.W., Dorman, D.E., Kemp, C.A.J., McCune, K.A., 2016. Determination of the Degradation Chemistry of the Antitumor Agent Pemetrexed Disodium. J. Pharm. Sci. 105, 3256–3268. https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.06.029

Jiao, S., Zheng, S., Yin, D., Wang, L., Chen, L., 2008. Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photolytic products to luminescent bacteria. Chemosphere 73, 377–382. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05.042

Johnson, A.C., Jürgens, M.D., Williams, R.J., Kümmerer, K., Kortenkamp, A., Sumpter, J.P., 2008. Do cytotoxic chemotherapy drugs discharged into rivers pose a risk to the environment and human health? An overview and UK case study. J. Hydrol. 348, 167–175. https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.09.054

Jung, Y.S., Lim, W.T., Park, J.-Y., Kim, Y.-H., 2009. Effect of pH on Fenton and Fenton-like oxidation. Environ. Technol. 30, 183–190. https://doi.org/10.1080/09593330802468848

Kind, T., Fiehn, O., 2010. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. Bioanal. Rev. 2, 23–60. https://doi.org/10.1007/s12566-010-0015-9

Kostal, J., Voutchkova-Kostal, A., Anastas, P.T., Zimmerman, J.B., 2015. Identifying and designing chemicals with minimal acute aquatic toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. 112, 6289–6294. https://doi.org/10.1073/pnas.1314991111

Lacorte, S., Agüera, A., Cortina-Puig, M., Gómez-Canela, C., 2015. Recent Developments in Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, in: Tsipi, D., Botitsi, H., Economou, A. (Eds.), Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites. John Wiley & Sons, Inc, pp. 131–159.

Lai, W.W.-P., Hsu, M.-H., Lin, A.Y.-C., 2017. The role of bicarbonate anions in methotrexate degradation via UV/TiO2: Mechanisms, reactivity and increased toxicity. Water Res. 112, 157–166. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.040

Lam, M.W., Mabury, S.A., 2005. Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters. Aquat. Sci. 67, 177–188. https://doi.org/10.1007/s00027-004-0768-8

Landge, S.B., Jadhav, S.A., Dahale, S.B., Solanki, P.V., Bembalkar, S.R., Mathad, V.T., 2015. Development and Validation of Stability Indicating RP-HPLC Method on Core Shell Column for Determination of Degradation and Process Related Impurities of Apixaban—An Anticoagulant Drug. Am. J. Anal. Chem. 06, 539–550. https://doi.org/10.4236/ajac.2015.66052

Lei, Y., Jin, B., Ma, C., Zhang, T., Li, T., 2017. Identification of forced degradation products of tedizolid phosphate by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. J. Pharm. Biomed. Anal. 139, 221–231. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.03.006

Makarov, A., Denisov, E., Lange, O., Horning, S., 2006. Dynamic range of mass accuracy in LTQ orbitrap hybrid mass spectrometer. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 977–982. https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.03.006

Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj. 113, 173–215. https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9

Martins, L.J.A., Ferreira, J.M.M., 2017. Phototransformation of 5-nitro-2-furaldehyde in aqueous solution. A laser flash photolysis and product analysis study. Photochem. Photobiol. Sci. 16, 721–735. https://doi.org/10.1039/C6PP00423G

McClure, D.S., 1949. Triplet-Singlet Transitions in Organic Molecules. Lifetime Measurements of the Triplet State. J. Chem. Phys. 17, 905–913. https://doi.org/10.1063/1.1747085

Melo, S.R. de O., Homem-de-Mello, M., Silveira, D., Simeoni, L.A., 2014. Advice on Degradation Products in Pharmaceuticals: A Toxicological Evaluation. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 68, 221–238. https://doi.org/10.5731/pdajpst.2014.00974

Milman, B.L., 2015. General principles of identification by mass spectrometry. TrAC Trends Anal. Chem. 69, 24–33. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.009

Miolo, G., Marzano, C., Gandin, V., Palozzo, A.C., Dalzoppo, D., Salvador, A., Caffieri, S., 2011. Photoreactivity of 5-fluorouracil under UVB light: photolysis and cytotoxicity studies. Chem. Res. Toxicol. 24, 1319–1326. https://doi.org/10.1021/tx200212z

Morlière, P., Boscá, F., Silva, A.M.S., Teixeira, A., Galmiche, A., Mazière, J.-C., Nourry, V., Ferreira, J., Santus, R., Filipe, P., 2015. A molecular insight into the phototoxic reactions observed with vemurafenib, a first-line drug against metastatic melanoma. Photochem. Photobiol. Sci. 14, 2119–2127. https://doi.org/10.1039/C5PP00231A

Morrison, H.G., Sun, C.C., Neervannan, S., 2009. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. Int. J. Pharm. 378, 136–139. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.05.039

Narayanam, M., Handa, T., Sharma, P., Jhajra, S., Muthe, P.K., Dappili, P.K., Shah, R.P., Singh, S., 2014. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography–mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. J. Pharm. Biomed. Anal. 87, 191–217. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.027

Navaratnam, S., Parsons, B.J., Phillips, G.O., Davies, A.K., 1978. Laser flash photolysis study of the photoionisation of chlorpromazine and promazine in solution. J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases 74, 1811. https://doi.org/10.1039/f19787401811

Nič, M., Jirát, J., Košata, B., Jenkins, A., McNaught, A. (Eds.), 2009. resolution in mass spectroscopy, in: IUPAC Compendium of Chemical Terminology. IUPAC, Research Triagle Park, NC.

Niessen, W.M.A., Tinke, A.P., 1995. Liquid chromatography-mass spectrometry General principles and instrumentation. J. Chromatogr. A 703, 37–57. https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01198-N

Ohno, T., Sarukawa, K., Tokieda, K., Matsumura, M., 2001. Morphology of a TiO2 Photocatalyst (Degussa, P-25) Consisting of Anatase and Rutile Crystalline Phases. J. Catal. 203, 82–86. https://doi.org/10.1006/jcat.2001.3316

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C., 2014. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. ACS Sustain. Chem. Eng. 2, 1063–1071. https://doi.org/10.1021/sc500096j

Pal, A., Gin, K.Y.-H., Lin, A.Y.-C., Reinhard, M., 2010. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. Sci. Total Environ. 408, 6062–6069. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.09.026

Patel, P.N., Kalariya, P.D., Sharma, M., Garg, P., Talluri, M.V.N.K., Gananadhamu, S., Srinivas, R., 2015. Characterization of forced degradation products of pazopanib hydrochloride by UHPLC-Q-TOF/MS and in silico toxicity prediction. J. Mass Spectrom. JMS 50, 918–928. https://doi.org/10.1002/jms.3602

PAYNE, G.B., DEMING, P.H., WILLIAMS, P.H., 1961. Reactions of Hydrogen Peroxide. VII. Alkali-Catalyzed Epoxidation and Oxidation Using a Nitrile as Co-reactant. J. Org. Chem. 26, 659–663. https://doi.org/10.1021/jo01062a004

Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R.M., Pocurull, E., 2011. Analytical methods for personal-care products in environmental waters. TrAC Trends Anal. Chem. 30, 749–760. https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.009

Petrovic, M., Petrovic, M., Barceló, D., 2007. LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment. TrAC Trends Anal. Chem., Pharmaceutical-residue analysis 26, 486–493. https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.010

Pignatello, J.J., Oliveros, E., MacKay, A., 2006. Advanced Oxidation Processes for Organic Contaminant Destruction Based on the Fenton Reaction and Related Chemistry. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 36, 1–84. https://doi.org/10.1080/10643380500326564

Pinheiro, M.S., Viana, G.M., Vieira, B. de A.A., de Souza, A.M.T., Rodrigues, C.R., Marins, R. de C.E.E., Cabral, L.M., de Sousa, V.P., 2017. Identification, characterization and in silico ADMET prediction of Roflumilast degradation products. J. Pharm. Biomed. Anal. 138, 126–133. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.012

Prabhune, S.S., Jaguste, R.S., Kondalkar, P.L., Pradhan, N.S., 2014. Stability-Indicating High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Apixaban in the Presence of Degradation Products. Sci. Pharm. 82, 777–785. https://doi.org/10.3797/scipharm.1403-25

Prieto-Rodriguez, L., Miralles-Cuevas, S., Oller, I., Agüera, A., Puma, G.L., Malato, S., 2012. Treatment of emerging contaminants in wastewater treatment plants (WWTP) effluents by solar photocatalysis using low TiO2 concentrations. J. Hazard. Mater., Nanotechnologies for the Treatment of Water, Air and Soil 211–212, 131–137. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.008

Quaglia, M.G., Farina, A., Donati, E., Cotechini, V., Bossù, E., 2003. Determination of MPTP, a toxic impurity of pethidine. J. Pharm. Biomed. Anal. 33, 1–6.

Raies, A.B., Bajic, V.B., 2016. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 6, 147–172. https://doi.org/10.1002/wcms.1240

Ramisetti, N.R., Kuntamukkala, R., 2014. Development and validation of a stability indicating LC-PDA-MS/MS method for separation, identification and characterization of process related and stress degradation products of rivaroxaban. RSC Adv. 4, 23155. https://doi.org/10.1039/c4ra00744a

Reid, D.L., Calvitt, C.J., Zell, M.T., Miller, K.G., Kingsmill, C.A., 2004. Early Prediction of Pharmaceutical Oxidation Pathways by Computational Chemistry and Forced Degradation. Pharm. Res. 21, 1708–1717. https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000041469.96466.12

Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. Chemosphere 93, 1268–1287. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059

Roux, B., Simonson, T., 1999. Implicit solvent models. Biophys. Chem. 78, 1–20. https://doi.org/10.1016/S0301-4622(98)00226-9

Rowney, N.C., Johnson, A.C., Williams, R.J., 2009. Cytotoxic drugs in drinking water: a prediction and risk assessment exercise for the thames catchment in the United kingdom. Environ. Toxicol. Chem. 28, 2733–2743. https://doi.org/10.1897/09-067.1

Ruscic, B., 2014. Uncertainty quantification in thermochemistry, benchmarking electronic structure computations, and Active Thermochemical Tables. Int. J. Quantum Chem. 114, 1097–1101. https://doi.org/10.1002/qua.24605

Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., Altenburger, R., 2007. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. Anal. Bioanal. Chem. 387, 1389–1396. https://doi.org/10.1007/s00216-006-0825-3

Schrank, S.G., José, H.J., Moreira, R.F.P.M., Schröder, H.F., 2004. Comparison of different advanced oxidation process to reduce toxicity and mineralisation of tannery wastewater. Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res. 50, 329–334.

Scigelova, M., Makarov, A., 2006. Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry, in: Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd.

Secrétan, P.-H., Sadou-Yayé, H., Aymes-Chodur, C., Bernard, M., Solgadi, A., Amrani, F., Yagoubi, N., Do, B., 2015. A comprehensive study of apixaban's degradation pathways under stress conditions using liquid chromatography coupled to multistage mass spectrometry. RSC Adv. 5, 35586–35597. https://doi.org/10.1039/C5RA00171D

Segalin, J., Sirtori, C., Jank, L., Lima, M.F.S., Livotto, P.R., Machado, T.C., Lansarin, M.A., Pizzolato, T.M., 2015. Identification of transformation products of rosuvastatin in water during ZnO photocatalytic degradation through the use of associated LC–QTOF–MS to computational chemistry. J. Hazard. Mater. 299, 78–85. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.036

Shah, B.K., Neckers, D.C., 2004. Laser Flash Photolysis of *tert* -Butyl Aroylperbenzoates: Kinetics of the Singlet and Triplet States and the Aroylphenyl Radicals [1]. J. Am. Chem. Soc. 126, 1830–1835. https://doi.org/10.1021/ja030231g

Singer, H.P., Wössner, A.E., McArdell, C.S., Fenner, K., 2016. Rapid Screening for Exposure to "Non-Target" Pharmaceuticals from Wastewater Effluents by

Combining HRMS-Based Suspect Screening and Exposure Modeling. Environ. Sci. Technol. 50, 6698–6707. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03332

Sirviö, J.A., Visanko, M., Liimatainen, H., 2016. Acidic Deep Eutectic Solvents As Hydrolytic Media for Cellulose Nanocrystal Production. Biomacromolecules 17, 3025–3032. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00910

Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Pretali, L., Profumo, A., Fasani, E., Albini, A., Migliavacca, R., Nucleo, E., 2012. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of the photoproducts. Water Res. 46, 5575–5582. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.043

Subramanian, G. (Ed.), 2006. Chiral Separation Techniques. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. https://doi.org/10.1002/9783527611737

Sudha, D., Sivakumar, P., 2015. Review on the photocatalytic activity of various composite catalysts. Chem. Eng. Process. Process Intensif. 97, 112–133. https://doi.org/10.1016/j.cep.2015.08.006

Sun, M., Dai, W., Liu, D.Q., 2008. Fragmentation of aromatic sulfonamides in electrospray ionization mass spectrometry: elimination of SO2 via rearrangement. J. Mass Spectrom. 43, 383–393. https://doi.org/10.1002/jms.1335

Sutter, A., Amberg, A., Boyer, S., Brigo, A., Contrera, J.F., Custer, L.L., Dobo, K.L., Gervais, V., Glowienke, S., Gompel, J. van, Greene, N., Muster, W., Nicolette, J., Reddy, M.V., Thybaud, V., Vock, E., White, A.T., Müller, L., 2013. Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. Regul. Toxicol. Pharmacol. 67, 39–52. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.05.001

Thong, M.Y., Manrique, Y.J., Steadman, K.J., 2018. Drug loss while crushing tablets: Comparison of 24 tablet crushing devices. PLOS ONE 13, e0193683. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193683

Tirado-Rives, J., Jorgensen, W.L., 2008. Performance of B3LYP Density Functional Methods for a Large Set of Organic Molecules. J. Chem. Theory Comput. 4, 297–306. https://doi.org/10.1021/ct700248k

Tojo, S., Tachikawa, T., Fujitsuka, M., Majima, T., 2004. Direct observation of one-electron oxidation processes of aromatic sulfides in TiO2 colloidal solution by laser flash photolysis. Phys. Chem. Chem. Phys. 6, 960. https://doi.org/10.1039/b314062h

Toolaram, A.P., Kümmerer, K., Schneider, M., 2014. Environmental risk assessment of anti-cancer drugs and their transformation products: A focus on their genotoxicity characterization-state of knowledge and short comings. Mutat. Res. Mutat. Res. 760, 18–35. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.02.001

Trawiński, J., Skibiński, R., 2017. Photolytic and photocatalytic degradation of tandospirone: Determination of kinetics, identification of transformation

products and in silico estimation of toxicity. Sci. Total Environ. 590–591, 775–798. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.050

van der Kamp, M.W., Mulholland, A.J., 2013. Combined Quantum Mechanics/Molecular Mechanics (QM/MM) Methods in Computational Enzymology. Biochemistry (Mosc.) 52, 2708–2728. https://doi.org/10.1021/bi400215w

Velazquez-Peña, S., Sáez, C., Cañizares, P., Linares-Hernández, I., Martínez-Miranda, V., Barrera-Díaz, C., Rodrigo, M.A., 2013. Production of oxidants via electrolysis of carbonate solutions with conductive-diamond anodes. Chem. Eng. J. 230, 272–278. https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.06.078

Vogna, D., Marotta, R., Napolitano, A., Andreozzi, R., d'Ischia, M., 2004. Advanced oxidation of the pharmaceutical drug diclofenac with UV/H2O2 and ozone. Water Res. 38, 414–422. https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.028

Waterman, K.C., 2009. Understanding and Predicting Pharmaceutical Product Shelf-Life, in: Huynh-Ba, K. (Ed.), Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development. Springer New York, pp. 115–135. https://doi.org/10.1007/978-0-387-85627-8_6

Waterman, K.C., Adami, R.C., Alsante, K.M., Antipas, A.S., Arenson, D.R., Carrier, R., Hong, J., Landis, M.S., Lombardo, F., Shah, J.C., Shalaev, E., Smith, S.W., Wang, H., 2002a. Hydrolysis in Pharmaceutical Formulations. Pharm. Dev. Technol. 7, 113–146. https://doi.org/10.1081/PDT-120003494

Waterman, K.C., Adami, R.C., Alsante, K.M., Hong, J., Landis, M.S., Lombardo, F., Roberts, C.J., 2002b. Stabilization of Pharmaceuticals to Oxidative Degradation. Pharm. Dev. Technol. 7, 1–32. https://doi.org/10.1081/PDT-120002237

Windsor, M.W., 2003. Flash photolysis and triplet states and free radicals in solutionDedicated to the memory of Nobel Laureate, Lord George Porter FRSC FRS OM. Photochem. Photobiol. Sci. 2, 455. https://doi.org/10.1039/b300213f

Wollenberger, L., Halling-Sørensen, B., Kusk, K.., 2000. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna. Chemosphere 40, 723–730. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00443-9

Yang, Y., Ok, Y.S., Kim, K.-H., Kwon, E.E., Tsang, Y.F., 2017. Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. Sci. Total Environ. 596–597, 303–320. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102

Yassine, M., Fuster, L., Dévier, M.-H., Geneste, E., Pardon, P., Grélard, A., Dufourc, E., Al Iskandarani, M., Aït-Aïssa, S., Garric, J., Budzinski, H., Mazellier, P., Trivella, A.S., 2018. Photodegradation of novel oral anticoagulants under sunlight irradiation in aqueous matrices. Chemosphere 193, 329–336. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.036

Yin, L., Wang, B., Yuan, H., Deng, S., Huang, J., Wang, Y., Yu, G., 2017. Pay special attention to the transformation products of PPCPs in environment. Emerg. Contam. 3, 69–75. https://doi.org/10.1016/j.emcon.2017.04.001

Zang, Y., Farnood, R., 2005. Effects of hydrogen peroxide concentration and ultraviolet light intensity on methyl tert-butyl ether degradation kinetics. Chem. Eng. Sci. 60, 1641–1648. https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.11.003

Zhang, S., Chen, J., Qiao, X., Ge, L., Cai, X., Na, G., 2010. Quantum Chemical Investigation and Experimental Verification on the Aquatic Photochemistry of the Sunscreen 2-Phenylbenzimidazole-5-Sulfonic Acid. Environ. Sci. Technol. 44, 7484–7490. https://doi.org/10.1021/es101131h

Zhang, T., Creek, D.J., Barrett, M.P., Blackburn, G., Watson, D.G., 2012. Evaluation of Coupling Reversed Phase, Aqueous Normal Phase, and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Orbitrap Mass Spectrometry for Metabolomic Studies of Human Urine. Anal. Chem. 84, 1994–2001. https://doi.org/10.1021/ac2030738

Zhang, X., Wu, F., Wu, X., Chen, P., Deng, N., 2008. Photodegradation of acetaminophen in TiO2 suspended solution. J. Hazard. Mater. 157, 300–307. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.098

Zhou, L., Ji, Y., Zeng, C., Zhang, Y., Wang, Z., Yang, X., 2013. Aquatic photodegradation of sunscreen agent p-aminobenzoic acid in the presence of dissolved organic matter. Water Res. 47, 153–162. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.09.045

ANNEXES

Article 4 : Identification of dabigatran etexilate major degradation pathways by liquid chromatography coupled to multi stage high-resolution mass spectrometry

Fatma Amrani, **Philippe-Henri Secrétan**, Hassane Sadou-Yayé, Caroline Aymes-Chodur, Mélisande Bernard, Audrey Solgadi, Najet Yagoubia and Bernard Do, RSC Avances, mai 2015, DOI : 10.1039/c5ra04251h

Article 5 : first generation tyrosine kinase inhibitor imatinib: major photocatalytic degradation pathways in aqueous media and its transformation products' relative toxicity

Philippe-Henri Secrétan, Maher Karoui, Hassane Sadou-Yaye, Yves Levi, Lionel Tortelano, Audrey Solgadi, Najet Yagoubi, Bernard Do, en cours de révision pour publication dans le journal Science of the Total Environment

RSC Advances

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

CrossMark click for updates

Cite this: *RSC Adv.*, 2015, **5**, 45068

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

Identification of dabigatran etexilate major degradation pathways by liquid chromatography coupled to multi stage high-resolution mass spectrometry

Fatma Amrani,†[a] Philippe-Henri Secrétan,†[a] Hassane Sadou-Yayé,[ab] Caroline Aymes-Chodur,[a] Mélisande Bernard,[ac] Audrey Solgadi,[d] Najet Yagoubi[a] and Bernard Do*[ac]

Received 10th March 2015
Accepted 27th April 2015

DOI: 10.1039/c5ra04251h

www.rsc.org/advances

Dabigatran etexilate (DABET) is an oral direct thrombin inhibitor that has been approved for the prevention of blood clot formation. As the active pharmaceutical ingredient (API) may undergo degradation, leading to drug activity loss or to the occurrence of adverse effects associated with degradation products, thorough knowledge of the API's stability profile is required. Since very few studies have been reported on the drug stability profile, a study related to DABET's behaviour under stress conditions was carried out in order to identify its major degradation pathways. DABET was subjected to hydrolytic (acidic and alkaline), oxidative, photolytic and thermal stress, as per ICH-specified conditions. Up to ten degradation products along with dabigatran, the active metabolite of DABET, were formed and detected by reverse phase liquid chromatography in gradient mode (LC) coupled to UV and mass spectrometry (UV-MS). Structures were determined by elemental composition determination and study of the fragmentation patterns, using high-resolution mass spectrometry in multistage mode (HR-MS^n). Under hydrolytic stress conditions, *O*-dealkylation may occur and formation of benzimidic acid derivatives was also observed. DABET was shown to be much less susceptible to photolysis and oxidative stress, even if *N*-dealkylation was highlighted. In view of the structures identified, various degradation pathways of DABET have been proposed.

Introduction

Dabigatran etexilate (DABET) (ethyl 3-{[(2-{[(4-{[(hexyloxy) carbonyl]carbamimidoyl}phenyl)amino]methyl}-1-methyl-1*H*-benzimidazol-5-yl)carbonyl](pyridin-2-yl)amino}propanoate) is a pro-drug, rapidly converted to dabigatran after oral administration. As a direct thrombin inhibitor, DABET is used in the prevention of thromboembolic events for patients with atrial fibrillation as well as in the prevention of venous thromboembolism.[1–4] It has been developed as an alternative to warfarin, an anticoagulant with a narrow therapeutic index and hence trickier to use. As the API may experience degradation, resulting in activity loss or occurrence of adverse effects associated with the appearance of degradation products, a thorough knowledge of the API's stability profile is one of the key factors to prevent these risks during manufacture, transportation and storage.[5] This is why study of the API's major degradation pathways should be carried out under stress conditions, such as those recommended by the International Conference of Harmonization guidelines.[6]

Liquid chromatography combined with multi-stage mass spectrometry (LC-MS^n) has been successfully used for the identification and characterization of degradation products generated by the API.[7–12] The comprehensive fragmentation pattern of API can be compared to the fragment ions of degradation products thus enabling their characterization.

Liquid chromatography methods have been used for the determination of dabigatran in plasma and other biological matrices.[13–16] Impurities formed during the synthesis of DABET[17] and drug metabolites[18] have also been determined by LC and reported in literature. However, no study has been published on the formation and characterization of the DABET degradation products. That's why various stress conditions have

[a]*Université Paris-Saclay, UFR de Pharmacie, Groupe Matériaux et Santé, Institut d'Innovation Thérapeutique, 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France. E-mail: bernard.do@parisdescartes.fr; Fax: +33146691492; Tel: +33662306275*

[b]*Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Pharmacie, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France*

[c]*Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Agence Générale des Equipements et Produits de Santé, Département de Contrôle Qualité et Développement Analytique, 7 rue du Fer à Moulin, 75005 Paris, France*

[d]*Université Paris-Saclay, UFR de Pharmacie, SAMM – Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites, Institut d'Innovation Thérapeutique, 5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France*

† The first 2 authors contributed equally to this study and are therefore considered as first authors.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

been applied in order to simulate the degradation of DABET, such as hydrolysis, thermal, photolysis and oxidative conditions. The degradation products were to be detected and characterized. In view of the structures identified, major degradation pathways of DABET were to be proposed.

Experimental

Chemicals and reagent

Dabigatran etexilate (MW: 627.7332 g mol^{-1}) tablets (Pradaxa®) are marketed by Boehringer Ingelheim (France). Analytical grade methanol and formic acid came from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Ultrapure water was produced by the Q-Pod Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France) and used for dissolution or as a mobile phase component. Hydrogen peroxide (H_2O_2) 30% was provided by Carlo Erba SDS (Val de Reuil, France).

LC-UV-HR-MS conditions

LC analyses were performed using a Dionex Ultimate 3000 system (DIONEX, Ulis, France) coupled to UV and MS detections. LC is equipped with a quaternary pump, a degasser, an autosampler and a thermostated column compartment, a 50 μL injection loop and a photo-diode array (PDA) detector. Kinetex™, C18 (100 Å, 50 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) column accounted for the stationary phase. Mobile phase was composed of 2.5 mM formic acid (A) and methanol (B). The optimized gradient chromatographic program was the following: B 5% from 0 to 5 min; B 100% from 5 to 25 min with a fixed level from 25 to 28 min; B 5% from 28 to 35 min. The flow rate was set at 0.4 mL min^{-1}. LC-HR-MS^n was performed coupling this same LC system to an electrospray (ESI)-LTQ-Orbitrap Velos Pro system, composed of a double linear trap and an orbital trap (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Analyses were carried out in positive ion mode with the following conditions: the source voltage was set at 3.4 kV, the source and the capillary temperatures were fixed at 500 °C and 600 °C, respectively. S-lens was set at 60%. 30–40% CEL were set for high-resolution fragmentation studies. The MS data were processed using Xcalibur® software (version 2.2 SP 1.48).

Forced degradation protocol

Stock standard solutions were prepared by disintegrating 10 tablets, accounting for 1500 mg DABET, in 1500 mL of ultrapure water/methanol 50/50 (v/v). The working solutions were prepared by diluting stock solution in sort to obtain a final concentration of 0.5 mg mL^{-1}. For each condition, samples were made up in triplicate and allocated in 15 mL hermetically sealed glass vials.

Four stress conditions were tested: thermal, hydrolytic, photolytic and oxidative conditions. Thermal stress was achieved at 80 °C up to 28 days. Hydrolysis was studied at 40 °C over a period of 72 hours using HCl 0.1 mol L^{-1} or NaOH 0.1 mol L^{-1}. Oxidation was tested in the presence of an equivalent of 3% (v/v) H_2O_2, at room temperature for 72 hours. Photo-degraded samples resulted from exposure of working solutions for 45 hours to light using a xenon test chamber Q-SUN Xe-1 (Q-Lab Westlake, California, USA) operating in window mode. Wavelengths ranged from 300 to 800 nm. The light intensity delivered was at 1.50 W m^{-2}.

Results and discussion

Degradation of DABET along with formation of degradation products

Fig. 1 shows LC-MS extracted ion chromatograms obtained by analysis of samples submitted to various stress conditions. A total of ten degradation products, along with DABET and dabigatran were detected when taken at a degradation rate near to 20%. Even if degradation continues beyond, the study has been deliberately limited to that of the degradation products formed precociously in stress conditions, insofar as the others, sometimes secondarily formed, can be considered as less likely with respect to real-storage.[19]

Thereafter, the degradation products are named "DP-*n*" and numbered according to their elution order. Their relative retention times (rrT) and the HR-MS^n data (origin, exact mass, accurate mass and relative errors of degradation products and relevant product ions) are gathered in Table 1. Eight degradation products and dabigatran were eluted ahead DABET, whereas two degradation products eluted after. During the implementation stages of the separation method, it was noticed that DABET's retention time varied slightly from one day to another and showed certain sensitivity to temperature. Thermostatisation of the column at 40 °C had allowed to effectively remedy this fluctuation, but this approach was not used to minimize risk of *in situ* degradation during analysis. Nevertheless, to control any co-elution risk and to be sure of the method capacity to highlight the main degradation products formed with each of the stress conditions, purity of DABET's peak and mass balance were systematically monitored. A component detection algorithm (CODA) was run and outcome showed that the main peak always contains the only signals pertaining to DABET. In addition, mass balance (%assay + % total degradation products) of all the stressed samples of DABET was obtained in the range of 98.7–99.8%, suggesting that for each condition tested, most of the degradation products formed have been detected (Tables 1 and 2).

The hydrolytic conditions showed a strong impact on DABET's stability (Tables 1 and 2). In basic condition, after 1 hour of exposition to NaOH 0.1 mol L^{-1}, 24% degradation has occurred, resulting in the formation of DP-1 (rrT = 0.52), dabigatran (rrT = 0.58) and DP-6 (rrT = 0.89). The acidic conditions yielded DP-7 (rrT = 0.92), DP-8 (rrT = 0.97), DP-9 (rrT = 1.08) and DP-10 (rrT = 1.10) after 24 hours of exposure to HCl 0.1 mol L^{-1}, accounting for 25% DABET loss (Table 1).

To the other degradation conditions, degradation seems to be slower. After three days of exposure to H_2O_2 3%, DP-3 (rrT = 0.64) was formed along with 22% DABET loss. After 45 hours of exposure inside the light chamber, DP-2 (rrT = 0.63) and DP-5 (rrT = 0.78) appeared along with 11% DABET loss. After 28 days of exposure at 80 °C, DP-4 (rrT = 0.67) and

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

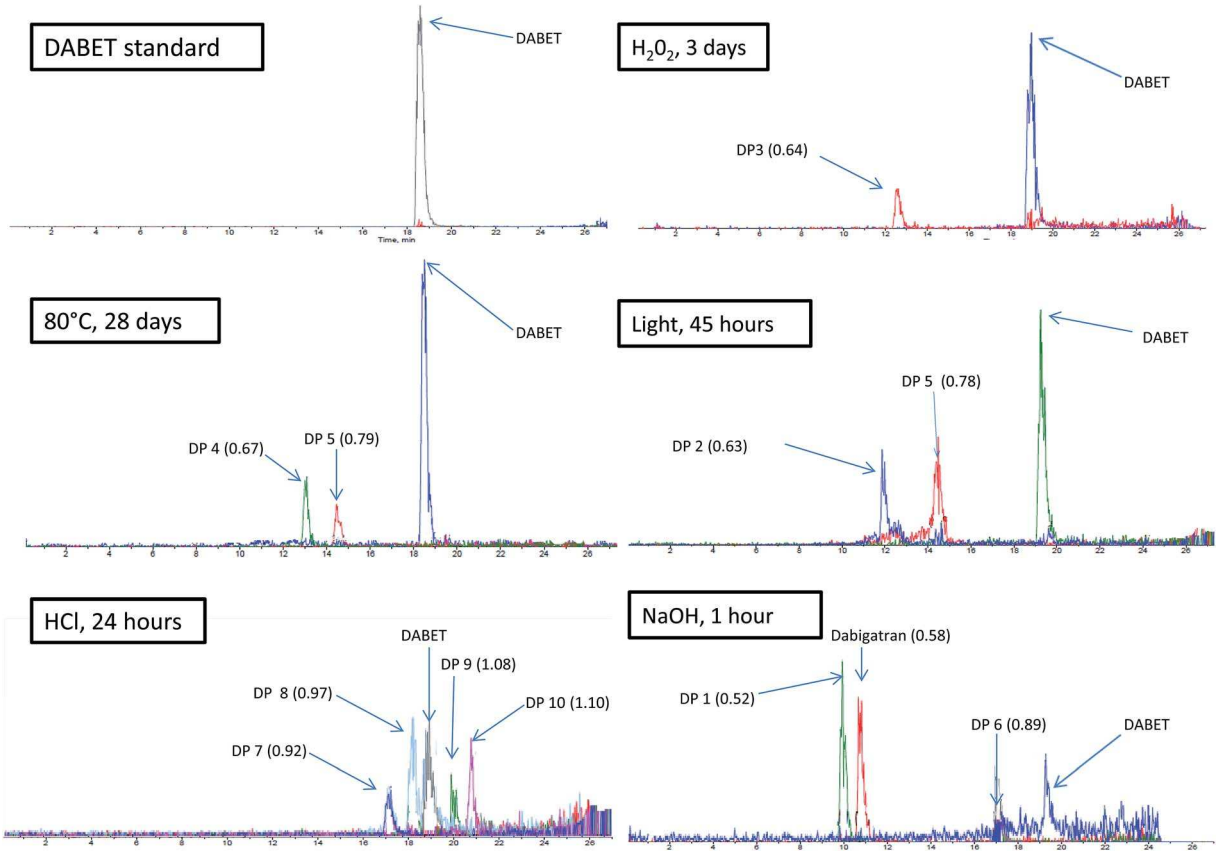


Fig. 1 Extracted ion chromatograms of DABET and degradation products according to stress conditions.

DP-5 (rrT = 0.78) were produced and only 8% of DABET loss was observed (Tables 1 and 2).

Characterization of DABET'S fragmentation pattern

The fragmentation scheme of DABET, which has not been studied in detail so far, was determined using ESI^+ high-resolution multi-stage mass spectrometry ($ESI^+/HR\text{-}MS^n$). The comprehension of various mechanisms that result, can, to a large extent, assist in the structural elucidation of the aforementioned degradation products. Hence, a study in depth of DABET's fragmentation pattern had been achieved in order to help assign, by comparison, the structures of the major product ions coming from the degradation products ions. The structures proposed for the product ions were systematically confirmed by the elemental compositions determined from accurate mass measurement and from the corresponding errors levels (systematically inferior to 4 ppm), as well as by logical or plausible losses. These data have been reported in Tables 2 and 3 and the proposed fragmentation pattern for the drug has been built based upon multi-stage HR-MS studies (Fig. 2 and 3). However, for the sake of visibility in terms of graphical

Table 1 Degradation outcome

Stress condition	Time	Average assay of API (%)	Average total impurities (%, area normalisation)	Average mass balance (assay + total impurities%)	Commentaries
Base hydrolysis (0.1 mol L^{-1} NaOH)	1 hour	76.0	22.7	98.7	Degradation accompanied by appearance of DP-1, dabigatran and DP-6
Acid hydrolysis (0.1 mol L^{-1} HCl)	24 hours	75.1	24.4	99.5	Degradation accompanied by appearance of DP-7, DP-8, DP-9 and DP-10
Oxidation (3% H_2O_2)	72 hours	78.1	21.2	99.3	Degradation accompanied by appearance of DP-3
Thermal (80 °C)	28 days	91.8	8.0	99.8	Degradation accompanied by appearance of DP-4 and DP-5
Photolysis (UV light)	45 hours	88.6	10.3	98.9	Degradation accompanied by appearance of DP-2 and DP-5

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

Table 2 Relative retention times (rrT), accurate masses with errors, elemental compositions and MS^n relevant product ions of the degradation products

DP Name and rrT	Origin of ions	Best possible elemental formula	Theoretical mass *m/z*	Accurate mass *m/z*	Error (ppm)
DP-1 (0.5)	Precursor ion	$C_{25}H_{23}N_6Na_2O_4^+$	517.15707	517.15679	−0.54
	MS^1	$C_{25}H_{24}N_6O_4^+$	473.19318	473.19285	−0.70
	MS^2 (517→)	$C_{22}H_{15}N_4Na_2O_2^+$	445.13594	445.13535	−1.33
	MS^2 (517→)	$C_{18}H_{16}N_4Na_2O_3^{\bullet+}$	382.10123	382.10101	−0.58
	MS^2 (517→)	$C_{17}H_{15}N_4Na_2O_3^+$	369.09341	369.09322	−0.51
	MS^3 (517 → 382→)	$C_{17}H_{13}N_4Na_2O_3^+$	367.07776	367.07721	−1.50
	MS^3 (517 → 445→)	$C_{16}H_{15}N_4Na_2O^+$	325.10358	325.10331	−0.83
	MS^3 (517 → 445→)	$C_{15}H_{12}N_4Na_2O^+$	310.08100	310.07978	−3.93
	MS^3 (517 → 369→)	$C_{14}H_{11}N_4Na_2O^+$	297.07228	297.07178	−1.68
Dabigatran (0.58)	Precursor ion	$C_{25}H_{26}N_7O_3^+$	472.20916	472.20771	−3.07
	MS^2 (472→)	$C_{22}H_{22}N_7O^+$	400.18803	400.18768	−0.87
		$C_{17}H_{16}N_5O^+$	306.13494	306.13483	−0.36
		$C_{17}H_{13}N_4O^+$	289.10839	289.10829	−0.35
DP-2 (0.61)	Precursor ion	$C_{20}H_{21}N_4O_4^+$	381.15573	381.15568	−0.13
	MS^2 (381→)	$C_{18}H_{15}N_4O_3^+$	335.11387	335.11342	−1.34
	MS^2 (381→)	$C_{15}H_{13}N_4O_2^+$	281.10330	281.10295	−1.25
	MS^2 (381→)	$C_{10}H_7N_2O_2^+$	187.05020	187.04989	−1.66
DP-3 (0.65)	Precursor ion	$C_{27}H_{30}N_7O_3^+$	500.24046	500.23944	−2.04
	MS^2 (500→)	$C_{27}H_{27}N_6O_3^+$	483.21392	483.21381	−0.23
		$C_{22}H_{22}N_7O^+$	400.18803	400.18788	−0.37
		$C_{20}H_{21}N_4O_3^+$	365.16082	365.16070	−0.33
		$C_{17}H_{16}N_5O^+$	306.13494	306.13488	−0.20
		$C_{17}H_{13}N_4O^+$	289.10839	289.10828	−0.38
DP-4 (0.67)	Precursor ion	$C_{27}H_{29}N_6O_4^+$	501.22448	501.22358	−1.80
	MS^2 (501→)	$C_{27}H_{26}N_5O_4^+$	484.19793	484.19765	−0.58
		$C_{20}H_{21}N_4O_3^+$	365.16082	365.16081	−0.03
		$C_{17}H_{17}N_4O_3^+$	325.12952	325.12957	0.15
		$C_{17}H_{15}N_4O_2^+$	307.11895	307.11914	0.62
		$C_{17}H_{13}N_4O^+$	289.10839	289.10825	−0.48
DP-5 (0.78)	Precursor ion	$C_{21}H_{25}N_4O_5^+$	413.18195	413.18088	−2.59
	MS^2 (413→)	$C_{21}H_{23}N_4O_4^+$	395.17138	395.17124	−0.35
	MS^2 (413→)	$C_{20}H_{21}N_4O_4^+$	381.15573	381.15560	−0.34
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{20}H_{20}N_4O_4^{*+}$	380.14791	380.14791	0.00
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{20}H_{19}N_4O_4^+$	379.14008	379.14010	0.05
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{20}H_{23}N_4O_3^+$	367.17647	367.17642	−0.14
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{20}H_{19}N_4O_3^+$	363.14152	363.14157	0.15
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{19}H_{17}N_4O_3^+$	349.12952	349.12945	−0.20
	MS^3 (413 → 381→)	$C_{18}H_{15}N_4O_3^+$	335.11387	335.11342	−1.34
	MS^4 (413 → 395 → 349→)	$C_{18}H_{13}N_4O_3^+$	333.09822	333.09724	−2.94
	MS^4 (413 → 395 → 349→)	$C_{18}H_{13}N_4O_2^+$	317.10330	317.10296	−1.07
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{16}H_{15}N_4O_2^+$	295.11895	295.11801	−3.19
	MS^3 (413 → 381→)	$C_{15}H_{13}N_4O_2^+$	281.10330	281.10295	−1.25
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{15}H_{11}N_4O_2^+$	279.08765	279.08727	−1.36
	MS^4 (413 → 395 → 295→)	$C_{15}H_{15}N_4O^+$	267.12404	267.12350	−2.02
	MS^3 (413 → 395→)	$C_{15}H_{11}N_4O^+$	263.09274	263.09241	−1.25
	MS^2 (413→)	$C_{11}H_{11}N_2O_3^+$	219.07642	219.07612	−1.37
	MS^3 (413 → 219→)	$C_{11}H_9N_2O_2^+$	201.06585	201.06583	−0.10
	MS^3 (413 → 381→)	$C_{10}H_7N_2O_2^+$	187.05020	187.05021	0.05
	MS^4 (413 → 395 → 295→)	$C_{10}H_9N_2O^+$	173.07094	173.07082	−0.69
	MS^3 (413 → 219→)	$C_9H_7N_2O^+$	159.05529	159.05511	−1.13
DP-6 (0.89)	Precursor ion	$C_{29}H_{31}N_6O_6^+$	559.22996	559.22840	−2.79
	MS^2 (559→)	$C_{28}H_{27}N_6O_5^+$	527.20374	527.20362	−0.23
	MS^3 (559 → 527→)	$C_{27}H_{29}N_5O_4^+$	484.19793	484.19778	−0.31
	MS^3 (559 → 527→)	$C_{20}H_{21}N_4O_3^+$	365.16082	365.16059	−0.63
	MS^2 (559→)	$C_{18}H_{13}N_4O_3^+$	333.09822	333.09829	0.22
	MS^2 (559→)	$C_{18}H_{16}N_3O_3^+$	322.11862	322.11811	−1.58
DP-7 (0.92)	Precursor ion	$C_{32}H_{38}N_7O_5^+$	600.29289	600.29180	−1.82
	MS^2 (600→)	$C_{26}H_{24}N_7O_4^+$	498.18843	498.18830	−0.26
		$C_{25}H_{23}N_6O_3^+$	455.18262	455.18230	−0.70
		$C_{25}H_{26}N_7O_3^+$	472.20916	472.20920	0.08
		$C_{18}H_{17}N_4O_3^+$	337.12952	337.12898	−1.60

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

Table 2 (*Contd.*)

DP Name and rrT	Origin of ions	Best possible elemental formula	Theoretical mass *m/z*	Accurate mass *m/z*	Error (ppm)
		$C_{17}H_{13}N_4O^+$	289.10839	289.10813	−0.90
DP-8 (0.96)	Precursor ion	$C_{33}H_{40}N_7O_5^+$	614.30854	614.30705	−2.43
	MS^2 (614→)	$C_{27}H_{26}N_7O_4^+$	512.20408	512.20351	−1.11
		$C_{26}H_{25}N_6O_3^+$	469.19827	469.19782	−0.96
		$C_{24}H_{28}N_5O_3^+$	434.21867	434.21844	−0.53
		$C_{23}H_{27}N_4O_2^+$	391.21285	391.2126	−0.64
		$C_{18}H_{14}N_5O_2^+$	383.16149	383.16132	−0.44
		$C_{19}H_{19}N_4O_3^+$	351.14152	351.14131	−0.59
		$C_{18}H_{14}N_5O_2^+$	332.11420	332.11409	−0.33
		$C_{16}H_{21}N_2O_2^+$	273.15975	273.15954	−0.77
Dabigatran etexilate	API	$C_{34}H_{42}N_7O_5^+$	628.32419	628.32236	−2.91
DP-9 (1.08)	Precursor ion	$C_{33}H_{39}N_6O_6^+$	615.29256	615.29137	−1.93
	MS^2 (615→)	$C_{27}H_{25}N_60_5^+$	513.18809	513.1873	−1.54
		$C_{26}H_{24}N_5O_4^+$	470.18228	470.18152	−1.62
		$C_{24}H_{27}N_4O_4^+$	435.20268	435.20226	−0.97
		$C_{23}H_{26}N_3O_3^+$	392.19687	392.19673	−0.36
		$C_{22}H_{18}N_5O_2^+$	384.145501	384.145102	−1.04
		$C_{19}H_{19}N_4O_3^+$	351.14517	351.14493	−0.68
		$C_{18}H_{13}N_4O_3^+$	333.09822	333.09811	−0.33
		$C_{16}H_{21}N_2O_2^+$	273.15975	273.15945	−1.10
DP-10 (1.10)	Precursor ion	$C_{34}H_{41}N_6O_6^+$	629.30821	629.30712	−1.73
	MS^2 (629→)	$C_{28}H_{27}N_6O_5^+$	527.20374	527.20298	−1.44
		$C_{27}H_{26}N_5O_4^+$	484.19793	484.19669	−2.56
		$C_{24}H_{27}N_4O_4^+$	435.20268	435.20175	−2.14
		$C_{23}H_{26}N_3O_3^+$	392.19687	392.19598	−2.27
		$C_{20}H_{21}N_4O_3^+$	365.16082	365.16060	−0.60
		$C_{18}H_{17}N_4O_3^+$	337.12952	337.12891	−1.81
		$C_{18}H_{13}N_4O_3^+$	333.09822	333.0981	−0.36
		$C_{17}H_{14}N_3O_3^+$	308.10297	308.10292	−0.16
		$C_{16}H_{21}N_2O_2^+$	273.15975	273.15920	−2.01
		$C_{15}H_{13}N_4O^+$	265.10839	265.10825	−0.53

representations, the mass-to-charge values linked to each of the structures presented in Fig. 3–8 have been written in the form of nominal values.

Analysed in positive ion mode, DABET was detected as protonated $[M + H]^+$ ion (*m/z* 628) and sodium adduct $[M + Na]^+$ ion (*m/z* 650). Its HR-MS^2 spectrum yields 6 product ions with *m/z* of 526, 483, 434, 332, 289 and 273 (Table 3). However, as it will be demonstrated thereafter, the ions at *m/z* 483, 332, and 289 came from the ion at *m/z* 526, whereas *m/z* 273 ion turns out to be the fragmentation product of *m/z* 434 ion.

Table 3 Origin, best possible elemental formulae, exact and accurate masses of relevant DABET fragment ions along with relative errors in ppm

Product ions	Origin of fragments	Best possible elemental formulae	Theoretical mass *m/z*	Accurate mass *m/z*	Error (ppm)
628	$(M + H)^+$	$C_{34}H_{42}N_7O_5^+$	628.32419	628.32236	−2.91
526	MS^2 (628→)	$C_{28}H_{28}N_7O_4^+$	526.21973	526.21920	−1.01
483	MS^3 (628 → 526→)	$C_{27}H_{27}N_6O_3^+$	483.21392	483.21327	−1.35
434	MS^2 (628→)	$C_{24}H_{28}N_5O_3^+$	434.21867	434.21824	−0.99
391	MS^3 (628 → 434→)	$C_{23}H_{27}N_4O_2^+$	391.21285	391.21247	−0.97
365	MS^3 (628 → 526→)	$C_{20}H_{21}N_4O_3^+$	365.16082	365.16060	−0.60
337	MS^3 (628 → 526→)	$C_{18}H_{17}N_4O_3^+$	337.12952	337.12891	−1.81
332	MS^3 (628 → 526→)	$C_{18}H_{14}N_5O_2^+$	332.11420	332.11401	−0.57
307	MS^4 (628 → 434 → 391)	$C_{17}H_{15}N_4O_2^+$	307.11895	307.11832	−2.05
289	MS^2 (628→)	$C_{17}H_{13}N_4O^+$	289.10839	289.10829	−0.35
273	MS^4 (628 → 434 → 391→)	$C_{16}H_{21}N_2O_2^+$	273.15975	273.15920	−2.01
265	MS^3 (628 → 526)	$C_{15}H_{13}N_4O^+$	265.10839	265.10825	−0.53
261	MS^4 (628 → 434 → 289→)	$C_{16}H_{13}N_4^+$	261.11347	261.11289	−2.22
172	MS^4 (628 → 434 → 289→)	$C_{10}H_8N_2O^{\bullet+}$	172.06311	172.06273	−2.23

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

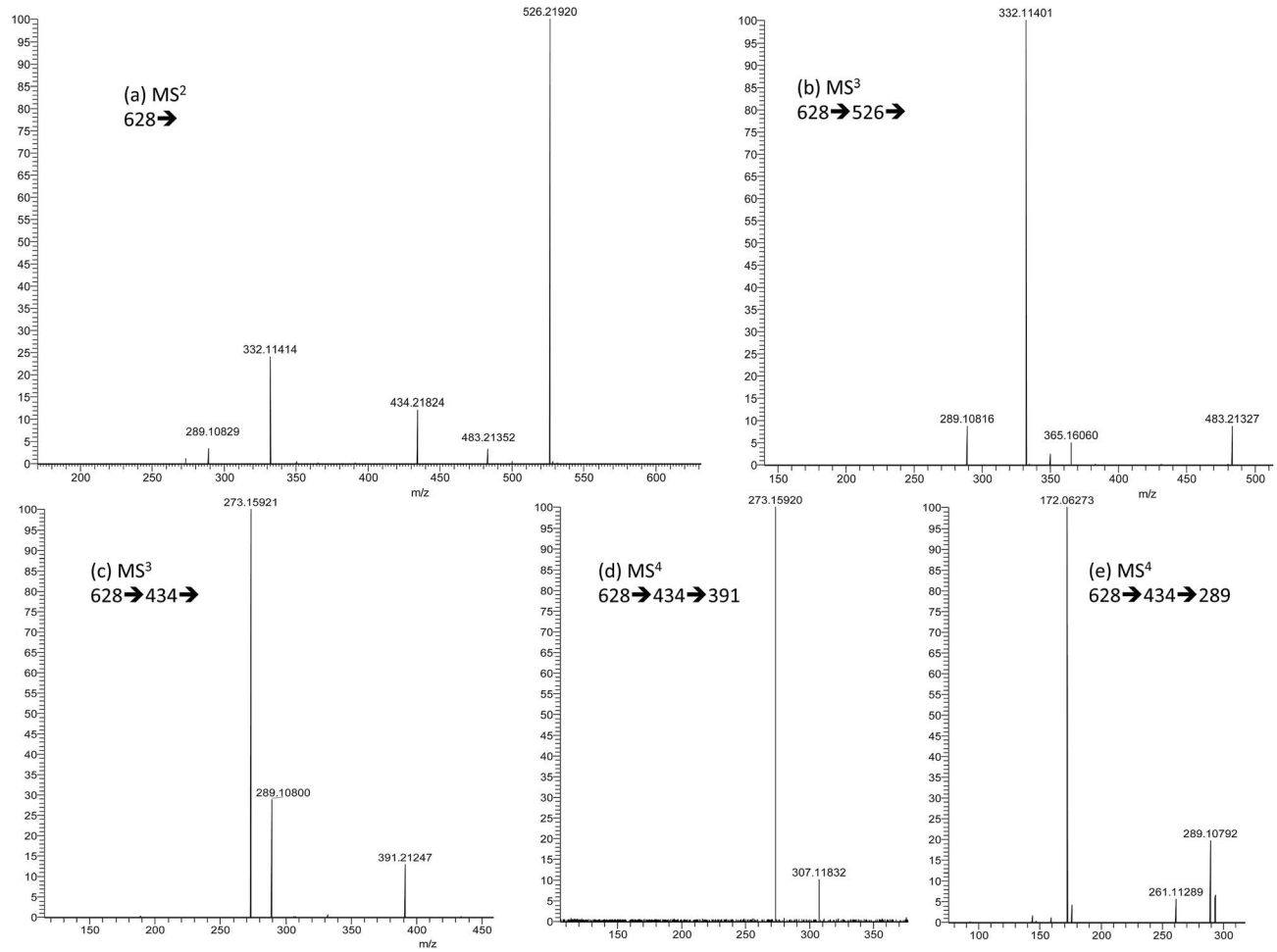


Fig. 2 HR-MS spectra of protonated DABET.

As shown in Fig. 3, the formation of *m*/*z* 526 ion ($C_{28}H_{28}N_7O_4^+$) may be due to an elimination of hexan-1-ol from protonated DABET ion. However, considering the product ions formed from *m*/*z* 526 ion, it appears that the way that protonated DABET was fragmented would be closely dependent upon the protonation site of the molecule. Although there are several possibilities, the system formed from the protonation of the amine function would facilitate the elimination of hexan-1-ol (−102 Da) through a rearrangement process involving a six-member centre, leading to the formation of an intermediate amino-acylium ion with *m*/*z* of 526, as shown in Fig. 3. From there, an internal rearrangement involving migration of adjacent double bonds would take place so to obtain a stable carbocation. Taken in turn as precursor for HR-MS^3 studies, *m*/*z* 526 ion could lose isocyanic acid to give *m*/*z* 483 ($C_{27}H_{27}N_6O_3^+$) carbocation, whose configuration, such is proposed in Fig. 3, would allow the departure of a 118 Da moiety by heterolytic cleavage of the C–N bond along with formation of a π-bond between N and C. This neutral loss would correspond to the departure of 4-(iminomethylene) cyclohexa-2,5-dienimine or equivalent, generating *m*/*z* 365 ion ($C_{20}H_{21}N_4O_3^+$). Thereafter, the fragmentations that would involve the ester and amide functions were highlighted by the detection of *m*/*z* 337 ion ($C_{18}H_{17}N_4O_3^+$) and of *m*/*z* 265 ion ($C_{15}H_{13}N_4O^+$), formed by loss of ethylene and of ethyl acrylate, respectively. Parallel to this series of fragmentation, protonation of *O*-carbamimide would have facilitated the loss of ethyl 3-(pyridin-2-ylamino)propanoate (−194 Da), leading to the formation of *m*/*z* 332 ion ($C_{18}H_{14}N_5O_2^+$). At MS^4, *m*/*z* 332 ion would lose isocyanic acid to afford *m*/*z* 289 ion ($C_{17}H_{13}N_4O^+$). Taken in turn as precursor to go further in the fragmentation study, thereof could be transformed into *m*/*z* 261 ion ($C_{16}H_{13}N_4^+$) by loss of CO. The ion at *m*/*z* 289 could also give way to *m*/*z* 172 radical dystonic ion ($C_{10}H_8N_2O^{*+}$) by homolytic cleavage leading to the departure of radical 4-(iminomethylene)cyclohexa-2,5-dienimine (−117 Da).

Parallel to loss of hexan-1-ol, protonated DABET ion could undergo direct loss of ethyl 3-(pyridin-2-ylamino)propanoate to yield *m*/*z* 434 ion ($C_{24}H_{28}N_5O_3^+$), according to a rearrangement process involving the proton carried by *O*-carbamimide (Table 3 and Fig. 3). Taken as a precursor for HR-MS^3 studies, *m*/*z* 434 ion resulted in the formation of three intense product ions with *m*/*z* of 391, 289 and 273, while the hexane-1-ol loss seemed to be more difficult, given the very low intensity of the

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

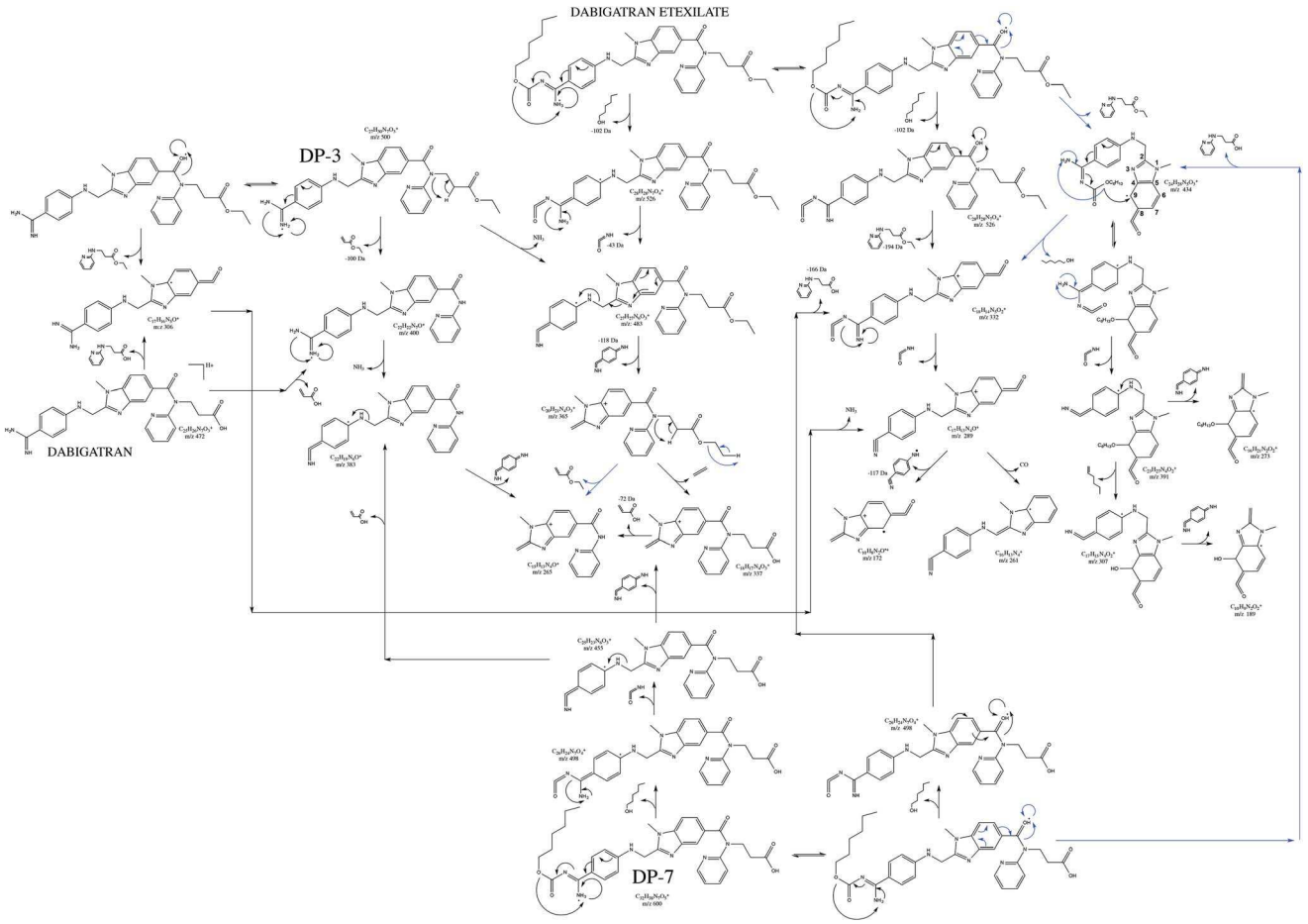


Fig. 3 Proposed fragmentation patterns of protonated DABET, dabigatran, DP-3 and DP-7.

resulting ion, supposed to have a mass-to-charge of 332 (Fig. 2). However, the surprising element is tied to the direct elimination of isocyanic acid to generate *m/z* 391 ion ($C_{23}H_{27}N_4O_2^+$), knowing that such a loss could logically occur only after elimination of hexan-1-ol. Therefore, the only plausible explanation has been to consider the prior migration of hexanolate towards another site of the structure, favoured by the configuration of the product ion. So the premise proposed here would be that the elimination of the 194 Da moiety would have resulted in rearrangements involving the successive migration of the adjacent double bonds, hence leading to a configuration where C_9 had become electron-deficient. C_9 would have then undergone nucleophile attack materialized by the transfer of hexan-1-ol to form an ether-oxyde function, *via* a rearrangement mechanism implying a twelve-member centre, such was proposed in Fig. 3. This assumption was not meaningless insofar as the product ion at *m/z* 273 ($C_{16}H_{21}N_2O_2^+$), resulting from the loss of 4-(iminomethylene)cyclohexa-2,5-dienimine group from *m/z* 391 ion, would still have conserved the hexan-1-ol moiety. Parallel to the path leading to *m/z* 273 ion, *m/z* 391 ion could also successively lose hex-1-ene and 4-(iminomethylene) cyclohexa-2,5-dienimine to generate *m/z* 307 ion ($C_{17}H_{15}N_4O_2^+$) and *m/z* 189 ion ($C_{10}H_9N_2O_2^+$), respectively.

Identification of the degradation products by LC-HR-MS^n

DP-1. DP-1 degradation product was the first eluted. The accurate mass measured (*m/z* 517.15679) was consistent with elemental formula $C_{25}H_{23}N_6Na_2O_4^+$ (relative error: −0.54 ppm). The corresponding ion would then account for $[DP_1–H + 2Na]^+$ ion. The MS spectrum acquired at the relative retention time of 0.5 also included a weakly intense peak at *m/z* 473.19285, which could be attributed to the protonated $[DP_1 + H]^+$ ion, as the accurate mass value is consistent with elemental formula $C_{25}H_{24}N_6O_4^+$ (Table 2). Because of the low information level obtained for the protonated ion, the fragmentation studies have been performed on the sodium-adduct ion, in order to highlight information useful to the identification of the degradation product. The HR-MS^2 spectrum of $[DP_1–H + 2Na]^+$ ion is mainly characterized by the presence of three intense peaks with *m/z* of 445, 382 and 369, which, in all likelihood, should correspond to the product ions having as elemental formulae $C_{22}H_{15}N_4Na_2O_2^+$, $C_{18}H_{16}N_4Na_2O_3^+$ and $C_{17}H_{15}N_4Na_2O_3^+$, respectively (Fig. 4). Similarly to what has been already described for DABET protonated ion, *m/z* 445 ion

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

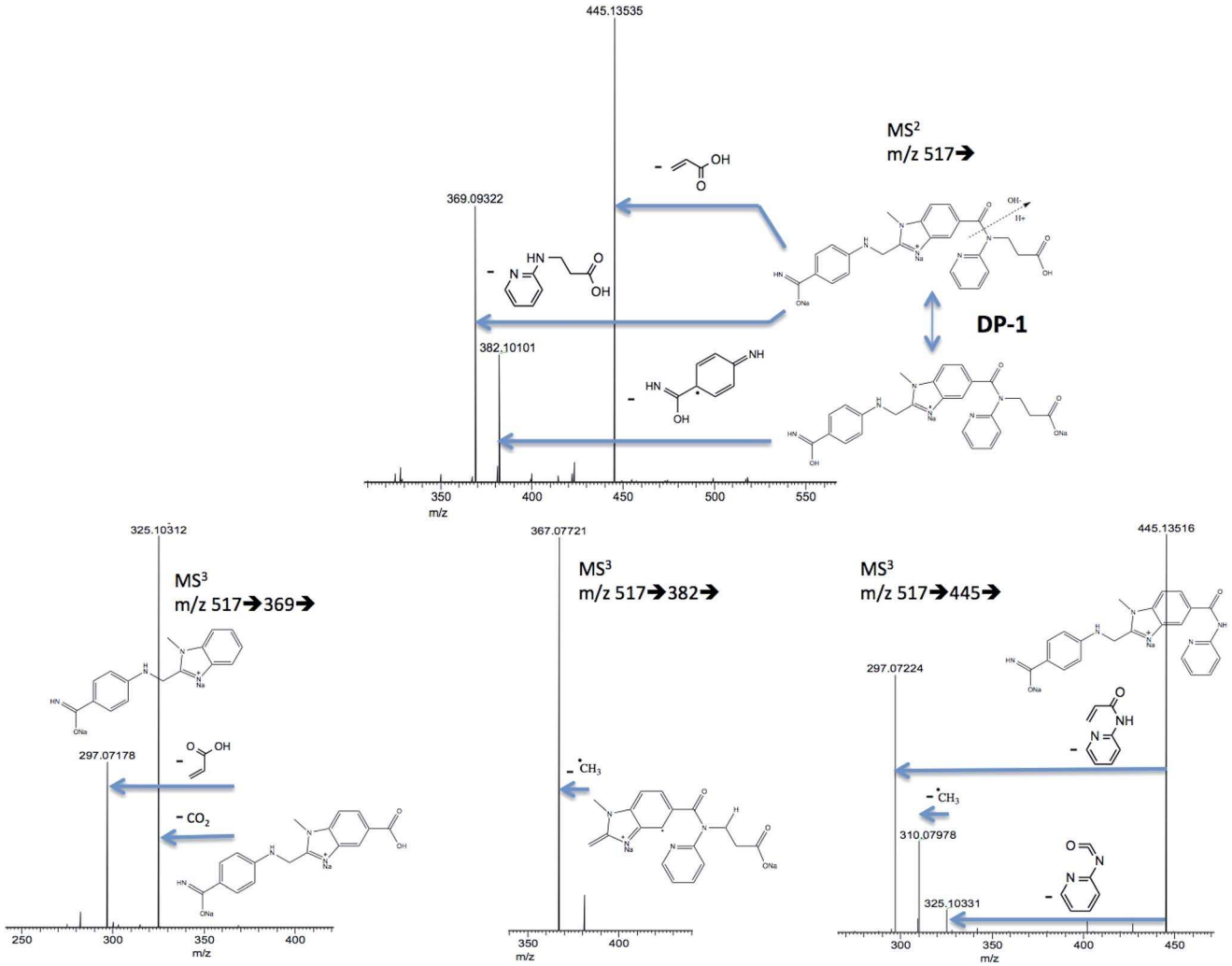


Fig. 4 Proposed fragmentation pattern of $[DP_1–H + 2Na]^+$.

would be produced by loss of acrylic acid, according to *N*-dealkylation process. When taken as precursor for MS^3 studies, *m*/*z* 445 could lose 2-isocyanatopyridine, to result *m*/*z* 325 ion ($C_{16}H_{15}N_4Na_2O^+$). From there, an elimination of a radical methyl was formulated to try to explain the presence of *m*/*z* 310 dystonic ion ($C_{15}H_{12}N_4Na_2O^+$). In parallel, the presence of *m*/*z* 297 could be attributed to the departure of *N*-(pyridin-2-yl) acrylamide ($C_{14}H_{11}N_4Na_2O^+$). Due to the nature of the losses observed, it was possible to locate sites that had interacted with the sodium ions.

Apart from the fragmentation in *m*/*z* 445 ion, $[DP_1–H + 2Na]^+$ ion could also generated *m*/*z* 369 ion by loss 3-(pyridin-2-ylamino)propanoic acid (−166 Da). This seems to be due to hydrolysis of the amide bond, by involvement of a water molecule. Subjected to further stage of fragmentation, *m*/*z* 369 ion lost CO_2 to yield *m*/*z* 325 ion and this helped confirm the previous assumption. Transition 517 → 382 means the possible loss of 4-iminocyclohexa-2,5-dienecarboxamide radical group by homolytic cleavage of the N–C bond. The next fragmentation stage leads to the formation of *m*/*z* 367 ion ($C_{17}H_{13}N_4Na_2O_3^+$), by possible loss of radical $*CH_3$.

These data seem to be consistent with the structure of 3-(2-((4-(hydroxy(imino)methyl)phenylamino)methyl)-1-methyl-*N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole-5-carboxamido)propanoic acid.

DP-2. DP-2 yielded a protonated ion with an accurate mass of 381.15568, consistent with elemental formula $C_{20}H_{21}N_4O_4^+$ (relative error: −0.13 ppm). Due to strong similarities that exist between the protonated DP-2 MS^2 spectrum and that of one of the MS^3 product ion related to protonated DP-5, the data that pertain to DP-2 are therefore discussed below in the part devoted to DP-5 (Table 2). They show that DP-2 may be ethyl 3-(*N*-(pyridin-2-yl)-1,3-dihydrobenzo[*d*]oxazolo[3,4-*a*]imidazole-6-carboxamido)propanoate (Table 2 and Fig. 5 and 6).

DP-3. DP-3 gave a protonated ion with an accurate mass of 500.23944, consistent with elemental formula $C_{27}H_{30}N_7O_3^+$ (relative error: −2.04 ppm). Compared to that of DABET, the gap should correspond to a loss equivalent to 7C, 12H and 2O

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

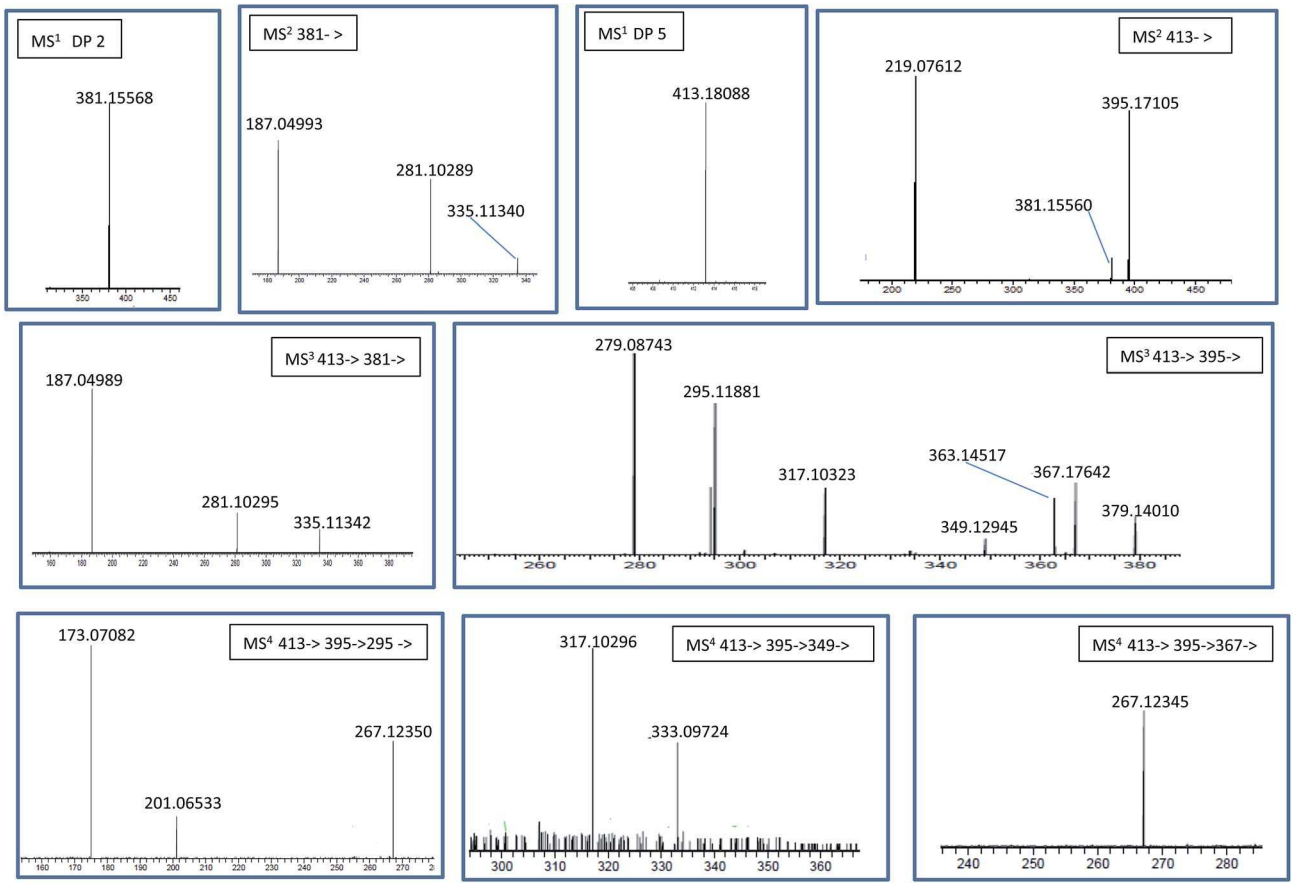


Fig. 5 HR-MS spectra of protonated DP-2 and DP-5.

(Tables 2 and 3). Moreover, the transitions that have been attributed to the departure of hexanol (−102 Da) or of isocyanic acid (−43 Da) are totally absent (Tables 2 and 3, Fig. 3). As a result, DP-3 could be considered as may be ethyl 3-(2-((4-carbamimidoylphenylamino)methyl)-1-methyl-*N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole-5-carboxamido)propanoate.

DP-4. DP-4 gave a protonated ion with *m*/*z* of 501.22358, consistent with elemental formula $C_{27}H_{29}N_6O_4^+$ (relative error: −1.80 ppm). By drawing a parallel with that of DP-3, it appears that the difference is due to the substitution of NH_2 by OH (Table 2). During the fragmentation process, DP-4 can give rise, on the one hand, to the formation of the ions common to that of DP-3 and on the other hand, to that of the ions having one mass unit greater than their NH_2 counterparts (Table 2). Protonated DP-4 can undergo deamination giving birth to *m*/*z* 484 ion ($C_{27}H_{26}N_5O_4^+$) instead of *m*/*z* 483 ion ($C_{27}H_{27}N_6O_3^+$) that has been previously reported for protonated DP-3. Loss of ethyl acrylate was highlighted by transition 501 → 401, all as transition 500 → 400 for DP-3 (Fig. 3 and 7). After loss of ethyl 3-(pyridin-2-ylamino)propanoate (−194 Da), loss of water was observed, which has allowed, at this point, to say that DP-4 rather carries a benzimidic acid function. In the same way, loss of (4-iminocyclohexa-2,5-dienylidene)methanone (−119 Da) from *m*/*z* 484 ion to give *m*/*z* 365 ion, has confirmed the assumption inherent in this type of change (Table 2 and Fig. 7). Considering these results, DP-4 could be 4-((5-((3-ethoxy-3-oxopropyl)(pyridin-2-yl)carbamoyl)-1-methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)methylamino)benzimidic acid.

DP-5. Protonated DP-5 has an accurate mass-to-charge value of 413.18088, particularly well correlated with elemental formula $C_{21}H_{25}N_4O_5^+$ (relative error: −2.59 ppm). Subjected to MS^2 studies (Table 2 and Fig. 5 and 6), *m*/*z* 413 ion yielded three main product ions at *m*/*z* 395 ($C_{21}H_{23}N_4O_4^+$), *m*/*z* 381 ($C_{20}H_{21}N_4O_4^+$) and *m*/*z* 219 ($C_{11}H_{11}N_2O_3^+$). The other fragments turn out to have been secondarily formed, as discussed later. The peak at *m*/*z* 219 accounts for the base peak. Transition 413 → 219 would be the reflect of the neutral loss previously attributed to ethyl 3-(pyridin-2-ylamino)propanoate. This result has allowed deducing that this part of the structure had not been impacted during the degradation having led to the formation of DP-5. When taken as precursor for MS^3 studies, *m*/*z* 219 ion produced two other ions with *m*/*z* of 201 and 187 by loss of water and of methanol, respectively, which is in line with the hypothesis for its structure. The ion at *m*/*z* 159 would be, as for it, secondarily formed from *m*/*z* 187 ion, by loss of CO (Table 2).

The ions that were produced either by dehydration (*m*/*z* 395) or by loss of methanol (*m*/*z* 381) have been fragmented (Table 2 and Fig. 5). But the usual losses related to the departure of isocyanic acid (−43 Da) or of 4-(iminomethylene)

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

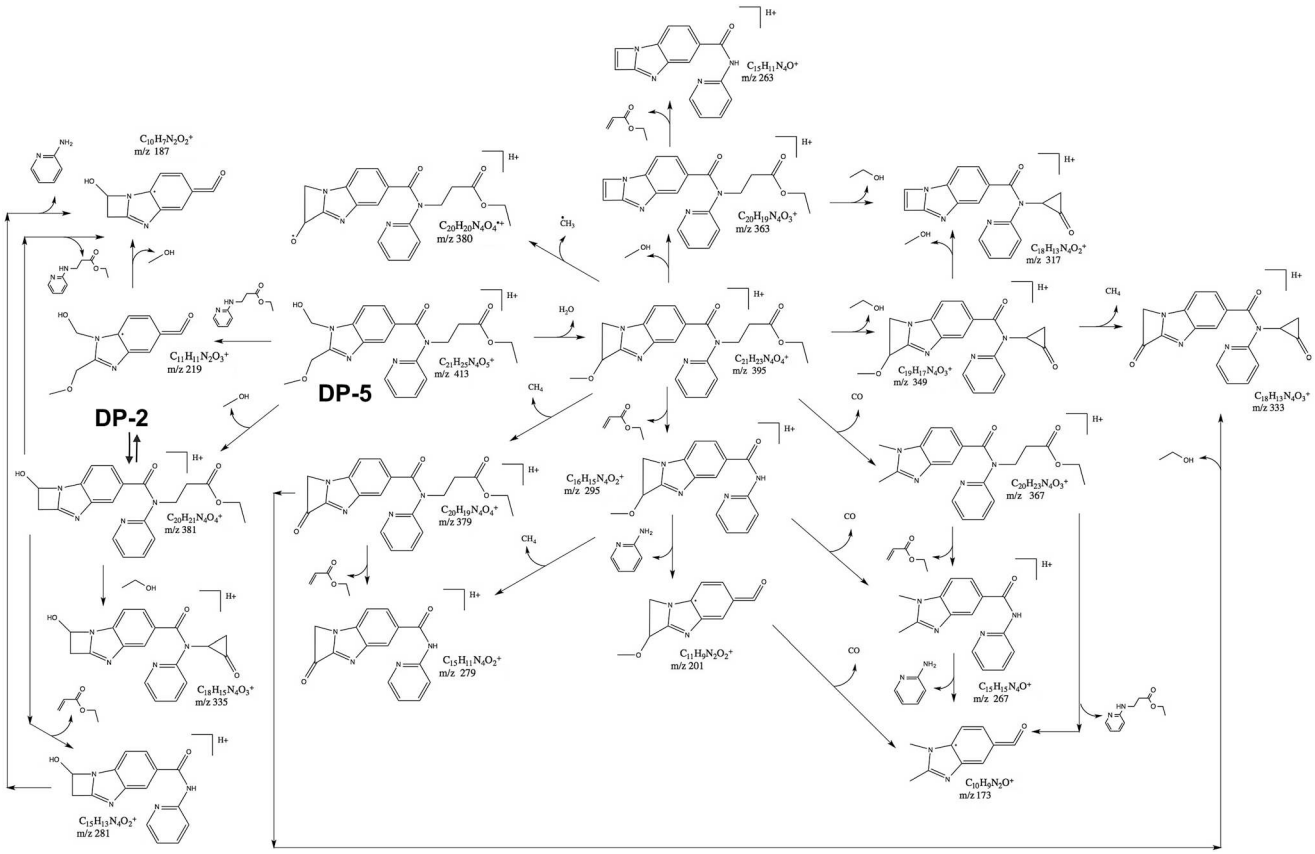


Fig. 6 Proposed fragmentation patterns of protonated DP-2 and DP-5.

cyclohexa-2,5-dienimine (−118 Da) have not been detected, which informs about the nature of the changes that would have taken place in the structure. As a result, products such as ethyl 3-(1-(hydroxymethyl)-2-(methoxymethyl)-*N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole-5-carboxamido)propanoate or ethyl 3-(2-(hydroxymethyl)-1-(methoxymethyl)-*N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzo-[*d*]imidazole-5-carboxamido)propanoate, seem to be able to respond to these fragmentation data. To provide more evidence for the hypothesis, we have chosen to use the first derivative as pattern, knowing that it could just as well function with the other configuration. The ion at *m*/*z* 395 could successively lose methane and ethyl acrylate, to give *m*/*z* 379 and *m*/*z* 279 ions (Table 2 and Fig. 5 and 6). It could also be directly fragmented in *m*/*z* 295 ion, by elimination of ethyl acrylate. Thence, parallel to loss of methane to yield the ion at *m*/*z* 279, departures of CO (transition 295 → 267) and of pyridin-2-amine (transition 295 → 201), were also highlighted. Then reciprocally, loss of CO coming from *m*/*z* 201 ion or of pyridin-2-amine from *m*/*z* 267 ion, would have allowed the formation of *m*/*z* 173 ion (Fig. 6). In all likelihood, when *m*/*z* 295 ion was present under another configuration dictated by the protonation site, instead of losing CO, loss of methanol may rather occur to afford *m*/*z* 263 ion (Fig. 6).

Aside from the ions at *m*/*z* 395 and 219, another MS^2 product ion of protonated DP-5, with *m*/*z* of 381, was also detected. It would stem from the methanol loss. The losses resulting from MS^3 seem to perfectly match with the data of the MS^2 spectrum obtained after analysis of protonated DP-2 (Table 2 and Fig. 6). As a result, DP-2 may correspond to ethyl 3-(*N*-(pyridin-2-yl)-1,3-dihydrobenzo[*d*]oxazolo[3,4-*a*]imidazole-6-carboxamido) propanoate, an intermediate product of the degradation route having led to the formation of DP-5 such is presented in the next chapter.

Although every of the elements presented above seemed to converge to the structures' hypothesis proposed for DP-2 and DP-5, analysis by ^{1}H-MNR and ^{13}C-MNR should be complementarily performed for confirmation.

DP-6. DP-6 gave a protonated ion with an accurate mass of 559.22840 (Table 2), consistent with elemental composition $C_{29}H_{31}N_6O_6^+$ (relative error: −2.79 ppm). As shown in Fig. 7, instead of losing hexan-1-ol, protonated DP-6 lost methanol to form *m*/*z* 527 ion, suggesting the methylester presence. Just after that, loss of isocyanic resulted in *m*/*z* 484 ion, that turns out to be also one of the product ions of protonated DP-4. Indeed, transition 484 → 365, previously attributed to the elimination of (4-iminocyclohexa-2,5-dienylidene)methanone or equivalent, was also found for DP-6 (Table 2). This indicates the presence of an imidic acid derivative instead of an aminimide derivative. Aside from this, the presence of *m*/*z* 333 ion could be due to consecutive elimination of methanol and of ethyl 3-(pyridin-2-ylamino)propanoate (−194 Da) from protonated DP-6. Loss of the 194 Da moiety allows suggesting that the

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

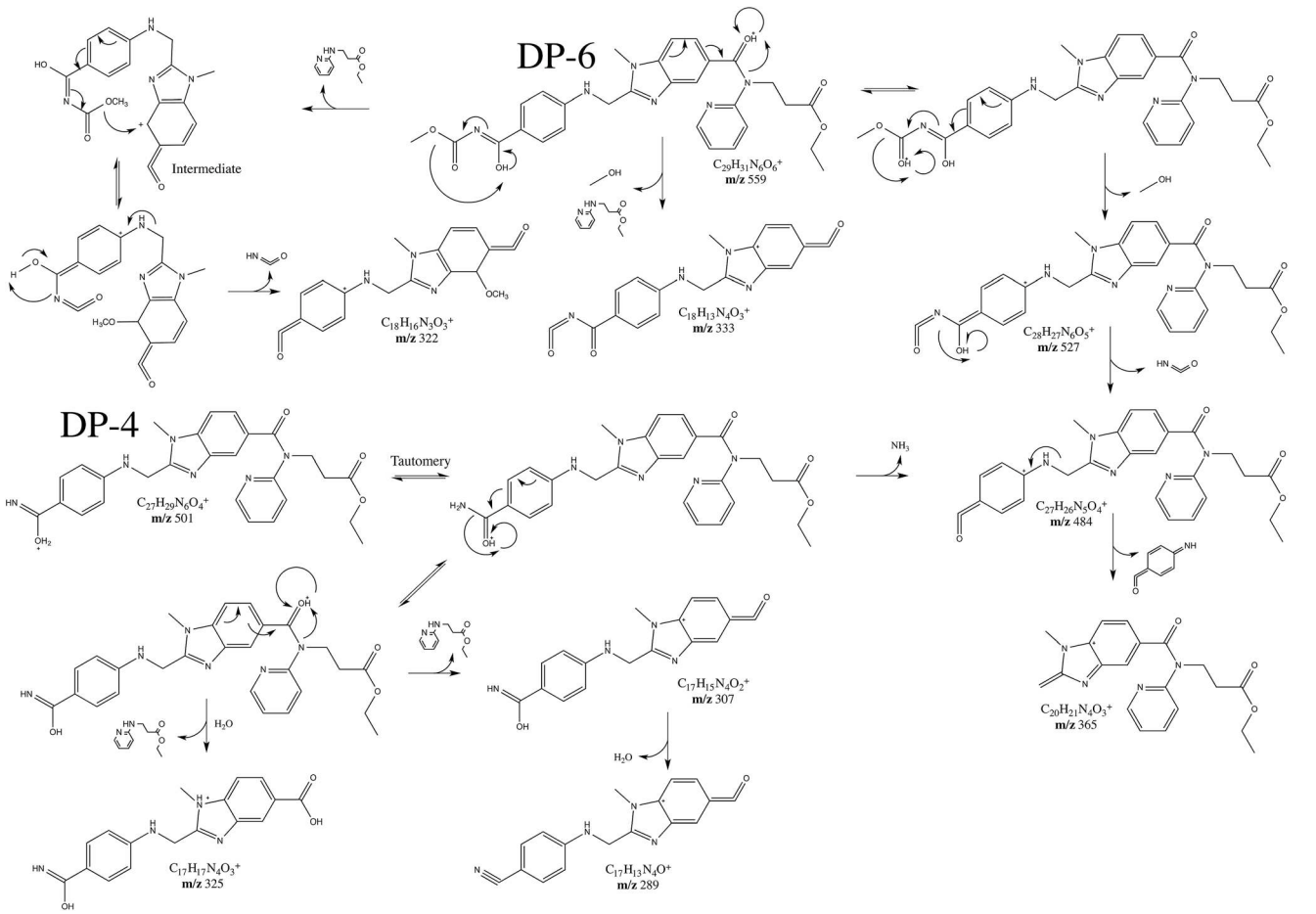


Fig. 7 Proposed fragmentation patterns of protonated DP-4 and DP-6.

part of the molecule that was the cause, has remained identical to that of DABET. Similarly as what has been described above regarding the intra-molecular transfer mechanism of a chemical group from one site to another during the fragmentation process, formation of *m*/*z* 322 ion is an additional example that justifies the assumption previously posed (Fig. 3 and 7).

Taken together, these data have allowed proposing the derivative 4-((5-((3-ethoxy-3-oxopropyl)(pyridin-2-yl)carbamoyl)-1-methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)methylamino)-*N*-(methoxycarbonyl)benzimidic acid as may correspond to DP-6.

DP-7. DP-7 gave a protonated ion with an accurate mass of 600.29180, consistent with elemental formula $C_{32}H_{38}N_7O_5^+$ (relative error: −1.82 ppm). A gap of 28 Da with respect to that of protonated DABET, should in all likelihood, be due to hydrolysis of the ester function. As shown in Table 2, the HR-MS^2 spectrum of protonated DP-7 comprises a lot of common ions to that of protonated DABET. Absence of the transition that reflects the departure of ethylene group has been noted though, which is in line with the above statement (Fig. 3). As a result, DP-7 can be identified as 3-(2-((4-(*N*′-(hexyloxycarbonyl) carbamimidoyl)phenylamino)methyl)-1-methyl-*N*-(pyridin-2-yl)-1*H*-benzoimidazole-5-carboxamido)propanoic acid.

DP-8 and DP-9. All like the parallel drawn between DP-3 and DP-4, the same thing has been observed between DP-8 and DP-9 regarding their elemental compositions and respective fragmentation patterns (Table 2 and Fig. 8). Protonated DP-8 is characterized by an accurate mass of *m*/*z* 614.30705, while protonated DP-9, by *m*/*z* 615.29137, consistent with elemental formulae $C_{33}H_{40}N_7O_5^+$ (relative error: −2.43 ppm) and $C_{33}H_{39}N_6O_6^+$ (relative error: −1.93 ppm), respectively, thus showing that DP-9 carries an imidic acid function instead of the aminimido group carried by DP-8 (Table 2). But as shown in Fig. 8, they both lost methyl 3-(pyridin-2-ylamino)propanoate (−180 Da) rather than ethyl 3-(pyridin-2-ylamino)propanoate (−194 Da). This information has allowed identifying them as methyl propanoate derivatives and not the ethyl propanoate ones as is the case of DABET. This is in line with loss of methylacrylate as show transitions 469 → 383 and 470 → 384, pertaining to DP-8 and DP-9, respectively. For the rest, the fragmentation scheme of protonated DP-8 is comparable to that of protonated DABET, showing that DP-8 could be identified as 4-((5-((3-methoxy-3-oxopropyl)(pyridin-2-yl)carbamoyl)-1-methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)methylamino)-*N*-(hexyloxycarbonyl)benzimidic acid and consequently, DP-9 as *N*-(hexyloxycarbonyl)-4-((5-((3-methoxy-3-oxopropyl)(pyridin-2-yl)carbamoyl)-1-methyl-1*H*-benzo-[*d*]imidazol-2-yl)methylamino)benzimidic acid.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

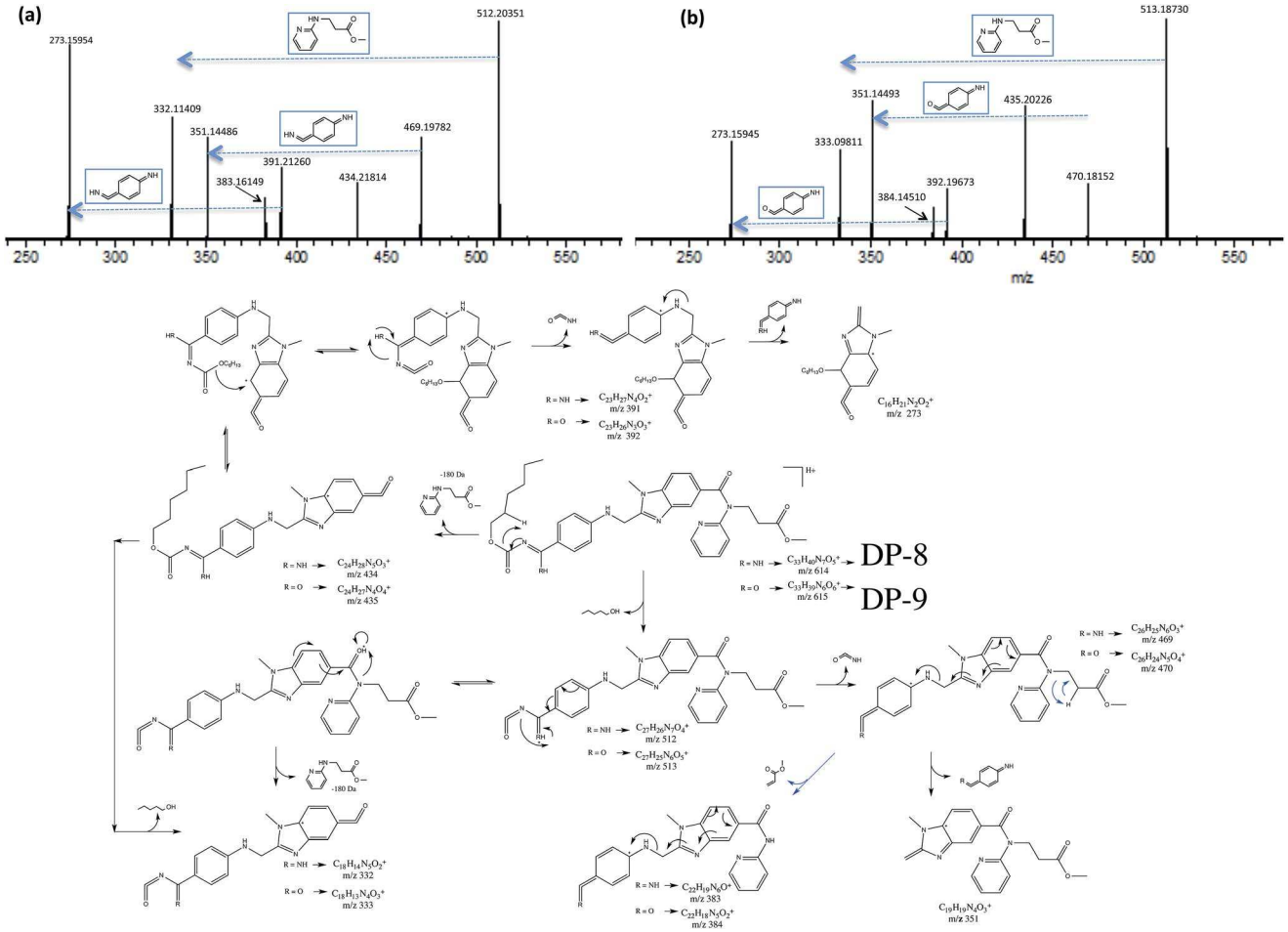


Fig. 8 Proposed fragmentation patterns of protonated DP-8 and DP-9.

DP-10. Similarly to what was drawn for DP-3/DP-4 and DP-8/DP-9, compared to DABET, DP-10 should be its OH counterpart (Table 2). As a result, DP-10 may correspond to 4-((5-((3-ethoxy-3-oxopropyl)(pyridin-2-yl)carbamoyl)-1-methyl-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-yl)methylamino)-*N*-(hexyloxycarbonyl)benzimidic acid.

Proposed degradation pathways of dapixaban etexilate

Under influence of various stress conditions, DABET was degraded as per several degradation routes producing ten major degradation products in addition to dabigatran (Tables 1 and 2). Thereof turns out to be the compound, whose DABET is the pro-drug. The ten unknowns have been successfully characterized by use of multistage high-resolution mass spectrometry. On the whole, DABET was shown susceptible to hydrolysis, involving the ester function as well as the carbamimido group. *O*-Dealkylation may occur and formation of benzimidic acid derivatives was also observed. The schematic representations of mechanism of formation of the degradation products under hydrolytic stress (DP-1, DP-4, DP-6, DP-7, DP-8, DP-9 and DP-10) are shown in Fig. 9.

Over the other tested conditions, degradations by photo-catalysis and that in the presence of H_2O_2 were less significant. Nevertheless, DP-2, DP-3 and DP-5 were still produced, along the degradation pathways proposed in Fig. 10. In solution, photo-catalytic conditions may put into play a certain number of reactions that would be radical initiated. A number of reactions that followed this initiation stage may be rather of molecular nature, involving nucleophile attacks. Reaching a certain excited state, DABET could undergo auto-oxidation by radical initiation, which resulted in the abstraction of a proton from the α-carbon linked to the arylamine-nitrogen.[20,21] The radical reaction was prolonged by reaction with O_2 to generate peroxide radical and then peroxide, by abstraction of a proton from solvent. From there, intermediate etheroxide DP-2 would have been formed by recombination mechanisms in the presence of water, such as stipulated in Fig. 10. A photo-catalytic methanolysis reaction has been proposed to explain the formation of DP-5. DP-2 was also found in oxidative condition in the presence of hydrogen peroxide, likely due to attack on the α-carbon linked to the arylamine-nitrogen, as shown in Fig. 10.

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

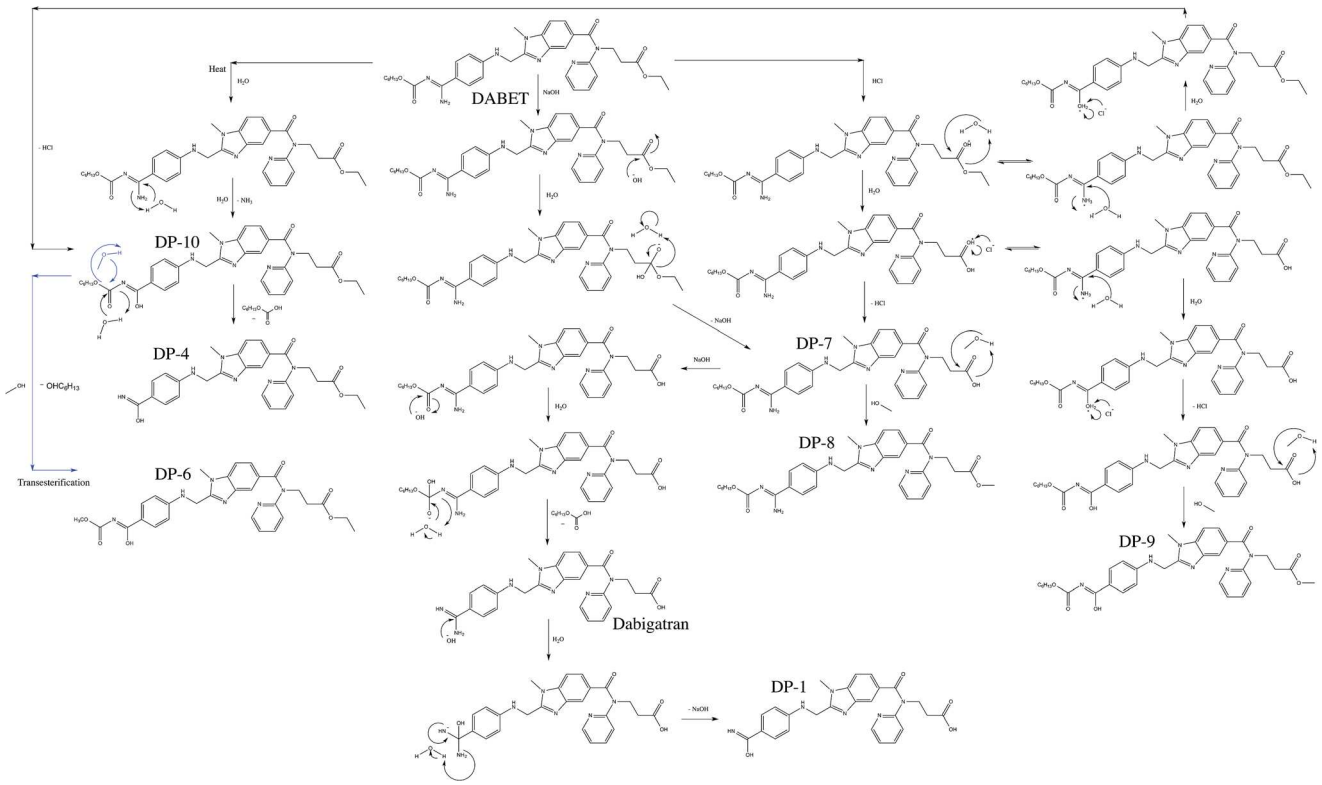


Fig. 9 Proposed degradation pathways of DABET under thermal and hydrolytic stress conditions.

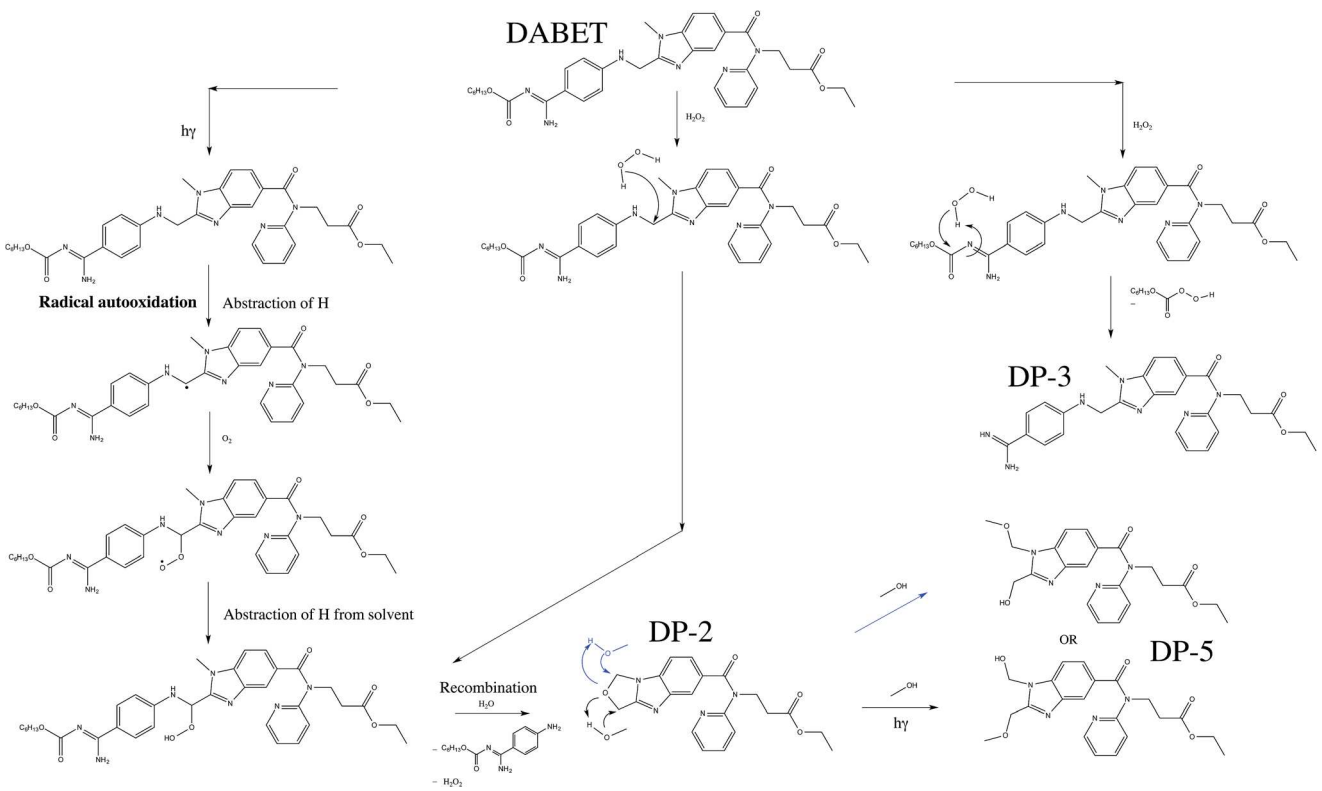


Fig. 10 Proposed degradation pathways of DABET under photolysis and oxidative stress conditions.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 27 April 2015. Downloaded by UNIVERSITE PARIS SUD on 09/06/2016 12:03:13.

Conclusion

The degradation behaviour of DABET under hydrolytic (acid, base), oxidative, photolytic and thermal stress conditions was studied. Its MS^n fragmentation scheme was studied in depth in order to help assign, by comparison, the structures of the product ions formed from the degradation products. A total of ten degradation products were formed under stress conditions and characterized. Under hydrolytic stress conditions, *O*-dealkylation may occur and formation of benzimidic acid derivatives was also observed. DABET was shown much less susceptible to photolysis and oxidative stress, even if *N*-dealkylation was highlighted through the identification of the degradation products. Based on identification, it was possible to deduct major degradation mechanisms in the context of stress testing.

References

1 C. T. January, L. S. Wann, J. S. Alpert, H. Calkins, J. E. Cigarroa, J. C. Cleveland, J. B. Conti, P. T. Ellinor, M. D. Ezekowitz, M. E. Field, K. T. Murray, R. L. Sacco, W. G. Stevenson, P. J. Tchou, C. M. Tracy and C. W. Yancy, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2014, **64**, 2246.
2 J. W. M. Cheng and H. Vu, *Clin. Ther.*, 2012, **34**, 766.
3 C. S. Miller, S. M. Grandi, A. Shimony, K. B. Filion and M. J. Eisenberg, *Am. J. Cardiol.*, 2012, **110**, 453.
4 M. Ganetsky, K. M. Babu, S. D. Salhanick, R. S. Brown and E. W. Boyer, *J. Med. Toxicol.*, 2011, **7**, 281.
5 S. W. Baertschi, K. M. Alsante and R. A. Reed, in *Pharmaceutical stress testing: predicting drug degradation*, Informa Healthcare, New York, 2nd edn, 2011, ch. 2, pp. 10–49.
6 ICH Q1A(R2), *International Conference on Harmonization*, IFPMA, Geneva, 2003.
7 S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal and R. P. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **69**, 148.
8 D. Jain and P. K. Basniwal, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2013, **86**, 11.
9 E. Nägele and R. Moritz, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, **16**, 1670.
10 H. Sadou Yaye, P. H. Secrétan, T. Henriet, M. Bernard, F. Amrani, W. Akrout, P. Tilleul, N. Yagoubi and B. Do, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, **105**, 74.
11 I. Gana, A. Dugay, T. Henriet, I. B. Rietveld, M. Bernard, C. Guechot, J.-M. Teulon, F. Safta, N. Yagoubi, R. Céolin and B. Do, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **96**, 58.
12 R. P. Shah, V. Kumar and S. Singh, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2008, **22**, 613.
13 J. Li, J. Fang, F. Zhong, W. Li, Y. Tang, Y. Xu, S. Mao and G. Fan, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2014, **973**, 110.
14 J. P. Antovic, M. Skeppholm, J. Eintrei, E. E. Boija, L. Söderblom, E.-M. Norberg, L. Onelöv, Y. Rönquist-Nii, A. Pohanka, O. Beck, P. Hjemdahl and R. E. Malmström, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2013, **69**, 1875.
15 M. Korostelev, K. Bihan, L. Ferreol, N. Tissot, J.-S. Hulot, C. Funck-Brentano and N. Zahr, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **100**, 230.
16 X. Delavenne, J. Moracchini, S. Laporte, P. Mismetti and T. Basset, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2012, **58**, 152.
17 Y.-Y. Zheng, C.-W. Shen, M.-Y. Zhu, Y.-M. Zhou and J.-Q. Li, *Org. Process Res. Dev.*, 2014, **18**, 744.
18 Z.-Y. Hu, R. B. Parker, V. L. Herring and S. C. Laizure, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, **405**, 1695.
19 M. Blessy, R. D. Patel, P. N. Prajapati and Y. K. Agrawal, *J. Pharm. Anal.*, 2014, **4**, 165.
20 G. A. Russe, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 3871.
21 F. Minisci and F. Fontana, *La Chimica e l'Industria*, 1998, 80, pp. 1309.

Elsevier Editorial System(tm) for Science of the Total Environment

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Imatinib: major photocatalytic degradation pathways in aqueous media and the relative toxicity of its transformation products

Article Type: Research Paper

Keywords: imatinib, tyrosine kinase inhibitors, toxicity,photocatalytic degradation, QSAR, in vitro assay, LC-ESI-MSn

Corresponding Author: Dr. Philippe-Henri Secrétan,

Corresponding Author's Institution: Université Paris Sud

First Author: Philippe-Henri Secrétan

Order of Authors: Philippe-Henri Secrétan; Maher Karoui; Hassane Sadou-Yaye; Yves Levi; Lionel Tortelano; Audrey Sogaldi; Najet Yagoubi; Bernard Do

Abstract: The photocatalytic degradation of a tyrosine kinase inhibitor, imatinib (IMA), has been investigated in TiO2 aqueous suspensions. Surface reactions of TiO2 appear to play an important role in the degradation of IMA. Studies to determine the involvement of reactive oxygen species (ROSs) showed that photohole (h+) and hydroxyl radical (* OH) were mainly responsible for its degradation. HPLC/MS/MS has identified twelve transformation products (TPs), but most of them have not yet been described in the literature. Based on the structures elucidated, the QSAR (T.E.S.T.) and rule-based (Toxtree) softwares were used to evaluate the predicted acute toxicity of the TPs and their mutagenic potential against those of the parent compound. The toxicity of the different degraded samples against V. fischeri was also studied. Overall, the decrease in the content of IMA did not lead to a reduction of the initial acute toxicity ascribed to the IMA. In addition, some TPs may even present mutagenic properties. The major pathways likely to initiate the photocatalytic degradation of IMA were proposed based on the joint information obtained from both experimental results and the theoretical data of frontier electron densities and point charges. The formation of a *OH-adduct at the C24 carbon atom (see graphical abstract) of the [N-(3-amino-4-methylphenyl)formamide] fraction, *OH mediated H-abstractions on the C14 and C9 carbon atoms of the methylpiperazine group and the electron transfer from the TiO2 to an aromatic carbon atom of the pyrimidine moiety, most likely C30, were proposed as being the major initiation reactions.

Suggested Reviewers: Mohamad Sleiman
IRCELYON, Institut de recherches sur la catalyse et l’environnement de Lyon, 2 avenue Albert Einstein, F-69626 Villeurbanne, France
mohamad.sleiman@ircelyon.univ-lyon1.fr
Pr Sleiman published articles in the field of drug degradation by photocatalysis.

Paola Calza

Dipartimento di Chimica Analitica, Università di Torino, via P. Giuria 5, 10125 Torino, Italy
paola.calza@unito.it
Pr Calza performed structural elucidation of drug transformation products by use of mass spectrometry.

Christoph Trautwein
Department of Environmental Health Sciences, University Medical Centre Freiburg, Breisacher Str. 115B, D-79106 Freiburg, Germany
christoph.trautwein@uniklinik-freiburg.de
Pr Trautwein studied the degradation of the tricyclic antipsychotic drug chlorpromazine by LC–MSn and their effects on environmental bacteria

Cindy de Jongh
KWR Watercycle Research Institute, P.O. Box 1072, 3430 BB, Nieuwegein, The Netherlands
Cindy.de.Jongh@kwrwater.nl
Pr de Jongh performed a screening and human health risk assessment of pharmaceuticals and their transformation products in Dutch surface waters and drinking water.

Serge Chiron
Laboratoire Chimie Provence, Aix-Marseille Universités-CNRS (UMR 6264), 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 3, France
serge.chiron@univ-provence.fr
Pr Chiron has an high level of expertise in the field of mass spectrometry.

Opposed Reviewers:

Cover Letter

To the Editor of the *Science of the Total Environment* journal,

Dear Professor,

I am enclosing herewith a manuscript entitled "**Imatinib: major photocatalytic degradation pathways in aqueous media and the relative toxicity of its transformation products**" for possible evaluation and publication in the *Science of the Total Environment* journal.

Imatinib was the first FDA-approved tyrosine kinase in the treatment of newly diagnosed chronic myeloid leukemia, currently still used as a first-line treatment for this disease. Several factors contributed to warn of its potential presence as a pollutant in WWTP effluent, including its high consumption and very low removal via traditional water treatment processes. This is all the more worrisome as the presence of imatinib may harm aquatic species due to its high estrogenic and cytotoxic activity and mutagenic potential.

The objective of this work was to study the photocatalytic degradation of the IMA by exposure to TiO_2/UV-A conditions and to evaluate what this degradation could imply in terms of generated toxicity with respect to aquatic species. The work includes monitoring and identification of the main transformation products using HPLC/MS/MS. These results along with experimental studies and *ab initio* molecular modelling have helped elucidate the major mechanisms that initiated the degradation of the IMA by photocatalytic process. Based on the elucidated structures of TPs, individual toxicity profiles were established using QSARs and rules-based programs, and the results were compared with those of the parent molecule. At the same time, *in vitro* toxicity studies were conducted on an aquatic trophic species, *V. fischeri*, to supplement and/or support the previous data.

The submitted manuscript is a full-length article. The work we are submitting is original and has not been covered by another paper dealing with the same topic.

All authors are in agreement with the submission of this manuscript to the *Science of the Total Environment* journal and share responsibility for its content.

All the authors have no personal financial or non-financial conflicts of interest.

On behalf of all the authors,
Dr Philippe-Henri Secrétan.

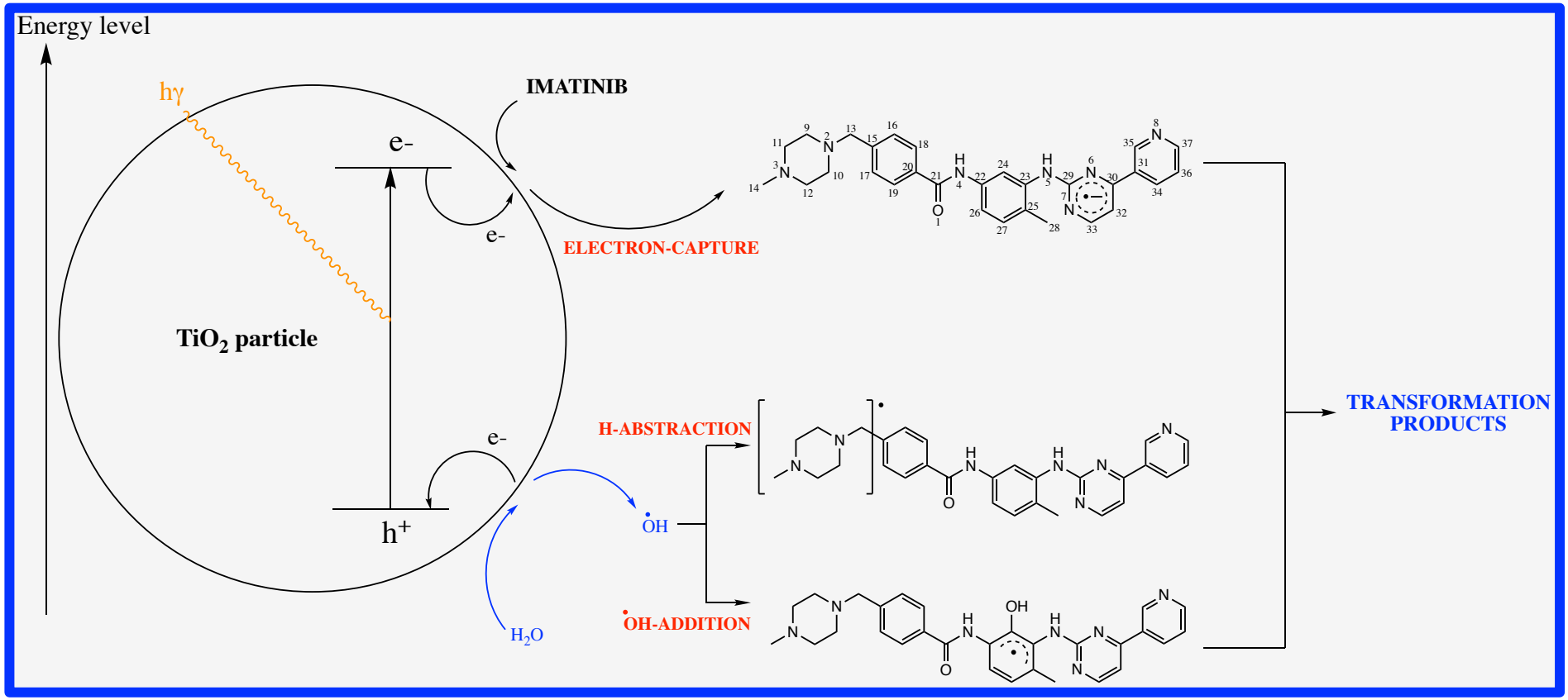
Imatinib: major photocatalytic degradation pathways in aqueous media and the relative toxicity of its transformation products

P.H. Secrétan[a,b,*], M. Karoui[a], H. Sadou-Yaye[a,c], Y. Levi[d], L. Tortelano[a,e], A. Solgadi[f], N. Yagoubi[a], B. Do[a,e,]

[a] University of Paris-Sud, Department of Pharmacy, Laboratory "Matériaux et Santé" EA 401, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France.
[b] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker, Department of Pharmacy, 149 Rue de Sèvres, 75015 Paris, France.
[c] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe Pitié-Salpétrière, Department of Pharmacy, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris.
[d] University of Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, UMR 8079, CNRS, AgroParisTech, Paris, France.
[e] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Groupe hospitalier Henri Mondor, Department of Pharmacy, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010 Créteil, France.
[f] University of Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites, Institut d'Innovation Thérapeutique, 5 rue Jean Baptiste Clément, 92296 Chatenay-Malabry, France

* Corresponding author. E-mail address: philippe-henri.secretan@u-psud.fr (PH. Secrétan).

*Graphical Abstract



***Highlights (for review : 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters including spaces per bullet point)**

Highlights:

- The photocatalytic degradation of imatinib (IMA) in TiO_2 suspensions was studied.
- Twelve transformation products (TPs) were tentatively identified by HPLC/MS/MS.
- The major photocatalytic pathways initiating the degradation of IMA are proposed.
- These degradation schemes were supported from *ab initio* calculations and experiments.
- The relative toxicity of the TPs was assessed through *in silico* and *in vitro* studies.

*Manuscript (double-spaced and continuously LINE and PAGE numbered)
Click here to download Manuscript (double-spaced and continuously LINE and PAGE numbered): Manuscript.docx
Click here to view linked References

ABSTRACT.

The photocatalytic degradation of a tyrosine kinase inhibitor, imatinib (IMA), has been investigated in TiO_2 aqueous suspensions. Surface reactions of TiO_2 appear to play an important role in the degradation of IMA. Studies to determine the involvement of reactive oxygen species (ROSs) showed that photohole (h^+) and hydroxyl radical (•OH) were mainly responsible for its degradation. HPLC/MS/MS has identified twelve transformation products (TPs), but most of them have not yet been described in the literature. Based on the structures elucidated, the QSAR (T.E.S.T.) and rule-based (Toxtree) softwares were used to evaluate the predicted acute toxicity of the TPs and their mutagenic potential against those of the parent compound. The toxicity of the different degraded samples against *V. fischeri* was also studied. Overall, the decrease in the content of IMA did not lead to a reduction of the initial acute toxicity ascribed to the IMA. In addition, some TPs may even present mutagenic properties. The major pathways likely to initiate the photocatalytic degradation of IMA were proposed based on the joint information obtained from both experimental results and the theoretical data of frontier electron densities and point charges. The formation of a •OH-adduct at the C24 carbon atom (see graphical abstract) of the [N-(3-amino-4-methylphenyl)formamide] fraction, •OH mediated H-abstractions on the C14 and C9 carbon atoms of the methylpiperazine group and the electron transfer from the TiO_2 to an aromatic carbon atom of the pyrimidine moiety, most likely C30, were proposed as being the major initiation reactions.

Keywords: imatinib, tyrosine kinase inhibitors, toxicity, photocatalytic degradation, QSAR, *in vitro* assay, LC-ESI-MS^n

1. Introduction

Effluents from wastewater treatment plants are the main sources of organic contaminants in surface water as they are often incompletely removed by traditional treatment technologies. Pharmaceuticals as contaminants are of particular concern as they are poorly degradable by wastewater treatment plants (WWTPS) [Santos et al., 2010; Rivera-Utrilla et al., 2013]. Advanced oxidation processes (AOPs) have been extensively studied in recent years and have been shown to effectively reduce drug concentrations prior to their removal to natural water. That's why the use of photocatalysts in this field has received increasing attention. TiO_2 is a frequently studied and evaluated photocatalyst because of its low cost, its ability to absorb UV-A light and its low band gap energy at around 3.0 eV [Gaya and Abdullah, 2008]. The effectiveness of the TiO_2/UV-A system on the removal of pollutants is determined on the basis of the degradation kinetics of the parent molecules. However, their different phototransformation products (TPs) generated during the treatment process must also be tracked and identified in order to evaluate their resistance to treatment as well as their relative toxicity compared to the parent molecules [Miolo et al., 2011; Sturini et al., 2012 ; An et al., 2015]. Access to the toxicity profile of the TPs is also important to assess whether or not the treatment needs to be extended to full mineralization. In the case of non-toxic intermediates, the process can be revised so that operating costs can be reduced [Vogna et al., 2004; Cavalcante et al., 2015].

Imatinib was the first FDA-approved tyrosine kinase in the treatment of newly diagnosed chronic myeloid leukemia [Druker et al., 2001; Sacha, 2013]. Currently, the drug is always used as a first-line treatment for this disease [Hehlmann et al., 2017]. If the disease is not treated, it inexorably evolves to blast crisis [Sawyers, 1999]. Several elements helped to warn about its potential presence as a pollutant

from WWTP effluents. First, approximately 25% of IMA is excreted unchanged in the urine after the administration of the treatment [Gschwind, 2005; Besse et al., 2012]. Secondly, frequent outpatient treatments imply that the release of the drug via the urine can directly reach the WWTPs without having previously passed through the purification systems available in most hospitals [Mendoza et al., 2015]. At last, Singer et al (2016) estimated that only about 6% of the IMA would be eliminated in wastewater treatment plants, confirming the more than probable presence of IMA in WWTP effluents and a predicted environmental concentration about 5 $ng.l^{-1}$ in France, England and Portugal [Besse et al., 2012; Booker et al., 2014; Santos et al., 2017]. This is all the more worrisome as the presence of the IMA can contribute to narcotic effects and exert other adverse effects due to its high estrogenic and cytotoxic activity [Parrella et al., 2014b] as well as its mutagenic [Lutterbeck et al., 2015]

Taken together, these data show that the IMA is indeed one of the cytostatic pollutants to be studied as a priority relative to other anticancer drugs, with an emphasis on its potential impact on aquatic fauna [Besse et al., 2012; Mendoza et al., 2015] and the means to be implemented to achieve its effective elimination.

To the best of our knowledge, no data regarding either issue are to date available. Hence, the objective of this work was to study the photocatalytic degradation of the IMA by exposure to TiO_2/UV-A conditions and to evaluate what this degradation could potentially imply in terms of the toxicity generated with respect to aquatic species. A corner stone of this work was the monitoring and identification of the main TPs using HPLC/MS/MS. Experimental studies and *ab initio* molecular modelling have helped elucidate the major mechanisms that initiated the degradation of the IMA by photocatalytic process. Based on the elucidated structures of the TPs,

individual toxicity profiles (acute toxicity and mutagenicity) were established using QSAR (T.E.S.T.) and rule-based programs (Toxtree), and the results were compared with those of the parent molecule. At the same time, *in vitro* toxicity studies were conducted on an aquatic trophic species, *V. fischeri*, to supplement and/or support the previous data. The results of these predictive studies should be a first step in assessing the potential environmental impact of the IMA degradation associated with the emergence of its TPs.

2. Materials and methods

2.1. Materials and reagents

Imatinib (purity > 99 %) and titanium dioxide (99.5 % Aeroxide® P25, nanopowder, average primary particle size 21 nm) came from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). The structural properties of P25 TiO_2 are: 21 nm primary particle size, surface area 35–65 m^2/g and purity ≥ 99.5% (Sigma Aldrich).

The ultrapure water was produced by the Q-Pod Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Formic acid, isopropanol, methanol and acetonitrile (LC-MS grade) were purchased from VWR Prolabo® Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France).

2.2. Preparation of solutions and suspensions.

The stock solutions were prepared by dissolving the IMA in ultrapure water to a concentration of 200 µg mL^{-1}. Working solutions were prepared by diluting the stock solution with ultrapure water. Calibration of the quantitative method for the determination of the IMA was performed in the concentration range 10-110 µg mL^{-1}. TiO_2 was added to the working solutions to achieve a final concentration of 500 µg mL^{-1}. The suspensions were then kept in the dark for 30 min to reach the

sorption/desorption equilibrium before being exposed to light (see section 2.3) for periods ranging from 0 to 240 min. The samples were stirred continuously both when IMA and TiO_2 were equilibrated in the dark and while they were exposed to light.

In order to study the influence of radical oxygen (•OH) and photoholes (h^+) on the IMA, light/TiO_2 experiments were carried out with the addition of isopropanol (•OH scavenger) and methanol (•OH and h^+ scavenger) to obtain a final concentration of 0.1 mol L^{-1} in both cases.

All samples were exposed to the same irradiation conditions as described in Section 2.3.

2.3. Irradiation and sampling conditions

Photolysis experiments were performed using a QSUN-XE-1 light chamber equipped with a xenon lamp, which simulates natural sunlight in a wavelength range of 300-800 nm. A Daylight-Q filter was used to simulate CIE Standard Illuminant D65 and irradiance was maintained constant (1.5 Wm^{-2} at 420 nm). The measurements made by the manufacturer indicate that this setting corresponds to a visible intensity of ~119,600 lx, and a UV_A intensity (300-400 nm) of 66.5 W/m^2. The total irradiance spectrum under these conditions used is provided in Supplementary Information (Fig. S.I. 1). For all the experiments the temperature was controlled and set at 25+/-0.5°C.

For each experiment, 2 mL aliquots of the suspensions were sampled at various intervals of time (0-2-5-10-30-60-120-240min), immediately filtered through cellulose acetate membrane (0.45 µm pore size, 25 mm diameter) and centrifuged (4000 rpm, 5 min) to remove particles.

The potential decrease in IMA caused by processes other than photolysis (e. g. hydrolysis and adsorption) was determined using a dark control consisting of a 20 mL sample of an added working solution of TiO_2 at 500 µg mL^{-1}.

2.4. Instrumental

The IMA and its TPs were separated by using a Kinetex™-C18 (5 µm, 250 x 4.6 mm d.i.) LC column. The chromatographic system consisted of a Dionex UltiMate 3000 HPLC system (Dionex, Les Ulis, France), equipped with a thermostated autosampler and a quaternary pump and controlled by Chromeleon® software version 6.80 SR11. The final optimised conditions were the followings: column oven: 35 °C, flow-rate: 1 mL min^{-1}, injection volume: 50 µL. A T-split was used so that only a third of the effluent was injected in the mass spectrometer. Gradient mode combining 0.1 % (*v/v*) formic acid both in pure water (solvent A) and acetonitrile (solvent B) was used in order to separate and detect compounds over a wide range of polarity. The gradient program was set as follows: 0–2 min: 95% A; 2–30 min: 95→0% A; 30–35 min: 0→95% A and afterwards 2 min equilibration time. Linearity, repeatability, limit of quantification and accuracy were assessed over the concentration of 10-110 µg mL^{-1} and the results are provided in the supplementary material (Table S1). Integration of peaks detected in UV at 220 nm was used for quantification of TPs. Relative concentrations of TPs were determined based upon the ratio (%) of their individual area to that of initial IMA.

The LC-$HRMS^n$ analyses were performed by use of an electrospray-LTQ-Orbitrap Velos Pro system composed of a linear trap and an orbital trap (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Instrumentation calibration was performed daily based on the recommendations of the manufacturer of the mass spectrometer and using Pierce™

LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution (Thermofisher, United States). Electrospray source conditions were optimised from IMA stock solution. The source chosen was an electrospray set in positive ion mode as it provided more information after some preliminary infusion experiments, and the capillary temperatures were fixed at 300 °C and 350 °C and the source voltage at 3.2 kV. Nitrogen flows were set at 36 and 16 arbitrary units (A.U.) for sheath gas and auxiliary gas, respectively. To capture and focus the ions, S-lens was set at 60 %. It was found that a normalized collision set at 37 % A.U. gave satisfactory information for most high-resolution fragmentation studies. HRMS studies were carried out in full scan MS over the mass range of 103-1200. $HRMS^n$ studies were performed using targeted MS/MS mode and auto *MS/MS* mode at a mass range of 50-700 uma. The chosen full width at half maximum was 60 000 for all stages of $HRMS^n$. The MS data were processed using Xcalibur® software (version 2.2 SP 1.48).

2.5. Data analysis

Calculations of the phototransformation reactions kinetic parameters were based on triplicate measurements. Once measured, the decreasing average concentration of IMA versus time in both types of experiments (photolysis and photocatalysis) was adjusted to a pseudo first-order kinetic model using Eq. (1):

$$\mathrm{Ln}\,(C_t/C_0) = -k\,t \quad (1)$$

where t is time, C_t and C_0 represent the aqueous concentrations (μg mL^{-1}) of the target compounds at the sampling times t and zero, respectively, and k (h^{-1}) is the degradation rate constant. Additionally, half-lives ($t_{1/2}$) were calculated using Eq. (2):

$$t_{1/2} = \ln(2)/k \quad (2)$$

2.6. *In silico* and *in vitro* toxicological assessment

The evaluation of mutagenicity and acute toxicity (*D. magna* LD50 48h) using an *in silico* approach was performed using a QSAR-based system (T.E.S.T. software [United States Environmental Protection Agency, 2016]) with the consensus method and a rule-based system (Toxtree [Patlewicz G et al, 2008]).

The Microtox Model 500 toxicity analyzer (Milan, Italy) was used to assess the toxicity of IMA native and irradiated samples towards *V. fischeri*. Bacteria suspensions, positive and negative controls and tested samples were prepared and analysed according to the manufacturer's recommendations. The study was carried out in triplicate on degraded samples obtained from the working solutions described above and on those deprived of IMA used as blank control. pH of all tested solutions was between 5.7 and 6.0. Bioluminescence measurements were taken every 5 min out of a total of 30 minutes incubation at 15°C.

2.7. *Ab initio* computational approach

Molecular orbital calculations of the highest occupied molecular orbital (HOMO) and of the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) were carried out by using Gaussian 09 program (Gaussian, Inc.). The geometry of the structure was optimized by using the hybrid density functional B3LYP method with the 6-31G (d,p) basis set, B3LYP/6-31G (d,p). Harmonic vibrational frequencies were calculated at the same level to check that all stationary points were true minima (zero imaginary frequency).

The values of (FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}) and $2FED^2_{HOMO}$ were computed to predict the initial attack sites for •OH radicals addition and photoholes (electron extraction) to

198 (from) IMA molecule, respectively [Xu Zhang et al., 2008; An et al., 2010]. The point
199 charges were also calculated with the help of natural bond orbital (NBO) to predict
200 the chemisorption position of IMA onto the TiO_2 surface.
201

202 3. Results and discussion

203 3.1. Preliminary studies

204 A series of controls to determine the impact of other processes such as sorption or
205 hydrolysis on IMA degradation have been prepared.
206 Under hydrolytic conditions (pH 4.0 and pH 10.0), the decrease in IMA was
207 negligible, and the levels of IMA measured in controls were similar over time
208 (differences < 4 % after one day). This outcome is consistent with the fact that the
209 IMA only degrades upon strong acido-basic conditions.
210 Adsorption is a factor that may strongly influence photodegradation under
211 heterogeneous photocatalysis (Van Doorslaer *et al*., 2011). As a result, the IMA
212 adsorption on TiO_2 particles was studied in the dark. A decrease of approximately 14
213 % in IMA was observed after 15 minutes of contact with TiO_2 particles including
214 centrifugation time. After that, the adsorption rate remained stable up to 24 hours of
215 storage in the dark (Table 1). The TiO_2 concentration of 500 µg mL^{-1} was then
216 retained for photocatalysis studies.
217

218 Table 1. Mean IMA recovery rate (% C/C0x100) and standard deviation (n=3) for
219 hydrolytic degradation and adsorption of IMA on the TiO_2 surface
220

221 3.2. IMA photocatalytic degradation: kinetics and TPs formation

The photocatalytic degradation kinetics of the IMA was studied and the corresponding results summarized in Fig. 1. The IMA was completely degraded after 240 min of irradiation based on a TiO_2 concentration of 500 µg mL^{-1}, with an initial concentration of 100 µg mL^{-1} and in the presence of a pH ranging from 5.7 to 6.0.

Fig. 1: Kinetics of IMA photocatalytic degradation with or without scavenger.

To determine the relative contribution of the surface reaction with h+, •OH radicals and other ROSs, such as $O_2^{\bullet-}$, $HO_2^{\bullet}$ and H_2O_2 on the degradation kinetics, different scavengers were employed. Isopropanol (0.1 M) was added in the reaction solutions to scavenge •OH radicals and 0.1 M methanol was selected as scavenger of both h+ and •OH radicals [Cho et al., 2005; Xiwang Zhang et al., 2008; Yang et al., 2009]. IMA degradation was significantly reduced in the presence of isopropanol and methanol. The pseudo-first-order rate constant decreased from 26 min^{-1} to 173 min^{-1} with the addition of isopropanol. These results suggest that 84.9 % of the degradation rate of the IMA resulted from reaction of the •OH radicals. The addition of methanol instead of isopropanol resulted in an additional decrease of the overall rate to 231 min^{-1}. Overall these data showed that 88.7 % of the degradation rate results from the h+ and •OH radicals. Thus the contribution of h^+ in the degradation rate of IMA was calculated as 3.8 %. The remaining 11.3% of the overall degradation rate may result from the reaction of the other ROSs not eliminated by these compounds.

The substantial decrease of IMA was counterbalanced by the progressive appearance of twelve transformation products named TP_{164}, TP_{172}, TP_{188}, TP_{233}, TP_{380}, TP_{425}, TP_{485}, $TP_{509\text{-}1}$, $TP_{509\text{-}2}$, $TP_{509\text{-}3}$, TP_{523} and TP_{539}, where the indexed

numbers designate the molecular weights deduced from the accurate mass-to-charge values of the protonated TPs ions. TP_{509-1} and TP_{509-2} are in fact isobaric compounds whereas TP_{509-3} has a different exact mass.

Fig. 2: Evolution of the TPs as a function of the irradiation time in ultrapure water spiked with 500 µg/mL of TiO2. The relative areas are the ratios between the peaks areas corresponding to each compound and that of the IMA at the initial time.

The relative area (with respect to that of IMA at the beginning of the experiment) of the chromatographic peaks of each of these compounds as a function of time is depicted in Fig.2. Interestingly, for some TPs the highest relative area of peaks were detected during the early stages of the process (after 30 minutes for exposure for TP_{172}, TP_{465} and TP_{509-1} for instance) while for others, the maximum relative area was obtained later (60 minutes for TP_{188} for example). These orders of appearance were taken into account later when determining the degradation pathways of the IMA and its degradants (Section 3.4).

3.3. Structural characterization of IMA transformation products

The fragmentation of the protonated IMA occurs by N-dealkylation with methylpiperazine detachment (-100 Da) leading to the detection of *m/z* 394.17 ion as base peak, or else, by cleavage of the amide bond thus explaining the formation of *m/z* 217.13 ion (-277 Da) (Fig. 3; Table 2). The ion at *m/z* 394.17 also undergoes fragmentation through the amide bond cleavage to afford *m/z* 276.12 ion ($-C_8H_6O$). The [6-methyl-N1-[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]benzene-1,3-diamine] fraction, on the

other hand, is hard to fragment even in the presence of high collision energy. The study of IMA's principal fragmentation pathways constitutes the first step in the process of characterizing its TPs.

Fig. 3: Proposed fragmentation pattern of protonated IMA.

Table 2. IMA and the TPs structures, molecular ions, characteristic fragment ions and relative error between accurate and exact mass.

The methylpiperazine derivatives

The protonated ions of TP_{233}, TP_{380}, TP_{485}, TP_{509-1} and TP_{509-2} all display the characteristic loss of methylpiperazine, which means they still share this moiety in common with IMA. For TP_{233}, the product of this neutral loss leads to the formation of a carbocation representing the methylbenzamide part of the mother molecule (Fig. S.I. 2; Table 2). TP_{233} would then result from the cleavage of the N-C bond located between the amide nitrogen atom and the phenyl alpha carbon. The structure of TP_{380} comprises TP_{233} as fragment, the complementary part of which is represented by $C_8H_{10}N_3$ including either 4 double bonds or 3 double bonds and a ring (Fig. 4; Table 2). The protonated TP_{380} ion can eliminate methanediimine (381.24→339.22) or MH_3 (381.24→364.21) (Fig. 4; Table 2). If there was no MH_3 elimination, the [N-(2-methylphenyl)guanidine] fraction may be possible for $C_8H_{10}N_3$ in which case TP_{380} would be the impurity B (N-(3-carbamimidamido-4-methylphenyl)-4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzamide) specified in the Eur. Ph. monograph [Eur. Ph. Monograph 2736]. However, such a configuration is unlikely to result in a loss of

295 amine, so the option for 1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-2-amine to identify $C_8H_{10}N_3$ was
296 selected.

297

298 Fig. 4: Proposed fragmentation pattern of protonated TP_{380}.

299

300 $TP_{509\text{-}1}$ and $TP_{509\text{-}2}$ are isobaric with an extra oxygen atom compared to IMA, which
301 makes them hydroxy-derivatives. After the loss of methylpiperazine, the MS^2-product
302 ion (*m/z* 410.16) originating from either of these two TPs was taken as precursor for
303 MS^3 studies (Fig. S.I. 3-4; Table 2). For $TP_{509\text{-}1}$, this fragmentation gave rise to the
304 formation of *m/z* 238.09 ion by loss of $C_9H_8N_4$ (4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amine),
305 showing, complementarily to the preceding loss, that hydroxylation took place on one
306 of the sites of the [4-methylaniline] moiety. Loss of methyl radical based upon
307 transition 410.16→395.14, clearly suggests that hydroxylation did not occur on the
308 methyl group but on the phenyl group (Fig. S.I. 3; Table 2). The loss of the methyl
309 radical was not detected for $TP_{509\text{-}2}$. This latter rather lost either water
310 (410.16→392.15) or CO (410.16→382.17) during its fragmentation process, meaning
311 that the hydroxyl group is tied to the methyl group (Fig. S.I. 4; Table 2).

312 The protonated TP_{485} gives an accurate mass consistent with elemental formula
313 $C_{27}H_{32}N_7O_2^+$, i.e. with an extra oxygen atom but with two carbon atoms less than that
314 of the protonated IMA. The formation of *m/z* 339.22 results from the loss of $C_7H_5N_3O$,
315 thereby showing that changes had occurred specifically on the IMA's [4-(pyridin-3-
316 yl)pyrimidin-2-amine] moiety (Fig. 5; Table 2). The N-C bond cleavage suggests that
317 the carbon atom engaged in this bond would be rather of sp^3 type to make this
318 scenario possible. The intense departure of NH_3 (486.23→469.23) on the one hand

supports this assumption and on the other hand, seems to orient towards a configuration of N-(diaminomethyl)-amide type rather than that of initial guanidine. As a result, $C_7H_5N_3O$ could then correspond to 3H,4H-pyrido[4,3-d]pyrimidin-4-one (Table 2; Fig. 5).

Fig. 5: proposed fragmentation pattern of protonated TP_{485}

The 4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amine derivatives

Unlike the preceding cases, none of the product ions originating from the fragmentation processes of the protonated TP_{172}, TP_{188}, TP_{425}, $TP_{509\text{-}3}$, TP_{523} and TP_{539} stemmed from the loss of methylpiperazine. The protonated TP_{172} features an accurate mass consistent with the elemental formula $C_9H_9N_4^+$, the [4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-amine] fragment of IMA (Fig. 6; Table 2). Given its accurate mass, TP_{188} is a hydroxyl derivative of TP_{172} (Fig. S.I. 5; Table 2). Owing to the fact that its fragmentation involves a loss of methanediimine, it is likely that hydroxylation would have occurred on the [pyrimidin-2-amine] moiety and, more specifically, on the most oxidizable carbon atom. The loss of formamide from the protonated TP_{188} supports this assumption (189.08→144.07).

The protonated TP_{425} is fragmented to yield the protonated TP_{172} (Fig. 6; Table 2). Such a process has not been detected for the IMA. This may have occurred due to a change in the alpha carbon's configuration. The neutral loss correlated with the detection of *m/z* 133.03 ion (426.16→133.03) is consistent with the elemental formula $C_{16}H_{15}N_5O$, confirming that the change has occurred through a hydroxylation

process. Besides, the presence of m/z 133.03 ion instead of m/z 217.13 ion previously described for the IMA suggests that the methylpiperazine group was effectively oxidized and replaced with an oxo-group (Fig. 6; Table 2).

346

347 The other TPs of higher mass (TP_{509-3}, TP_{523} and TP_{539}) are formed consecutively to
348 localized oxidations at the methylpiperazine level, as shown in Table 2 and
349 Supplementary Information (Fig. S.I. 6-7 ; Table 2).

350 It is worth noticing that none of these tentatively identified TPs but TP_{380} correspond
351 to the degradation products highlighted in the literature [Szczepek et al., 2007] and
352 the related substances listed in Eur. Ph. [Eur. Ph. Monograph 2736]. Actually, to the
353 best of our knowledge, these structures have not been hitherto described in the
354 literature. The main degradation products mentioned in the literature were generated
355 under extreme pH conditions and under oxidation conditions. The [4-methyl-N3-(4-
356 pyridin-3-yl-pyrimidyn-2-yl)-benzene-1,3-diamine] and [4-(4-methyl-piperazin- 1-
357 ylmethyl)-benzoic acid] compounds were formed under acidic and alkali conditions,
358 while those produced under oxidation conditions are the [4-[(4-methyl-4-oxido-
359 piperazin-1-yl)-methyl]-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-
360 benzamide], [4-[(4-methyl-1-oxido-piperazin-1-yl)-methyl]-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-
361 yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide] and [4-[(4-methyl-1,4-dioxido-piperazin-1-
362 yl)-methyl]-N-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-yl-pyrimidin-2-ylamino)-phenyl]-benzamide]
363 compounds [Szczepek et al., 2007].

364

365 **3.4. Characterization of IMA's transformation pathways**

366 The photocatalytic degradation mechanism of IMA was elucidated from LC-MS^n
367 results coupled with the calculated data of the FEDs and point charges. According to
368 the LC-MS^n analyses, twelve intermediates were identified and listed in Table 2. As
369 discussed above in the chapter 3.3, •OH was the major contributor to the
370 photocatalytic degradation of the IMA. Thus, the detailed degradation pathways as

well as the degradation mechanisms were also attempted in the •OH mediated IMA oxidation. To further elucidate the detailed reaction mechanisms of the •OH mediated photocatalytic degradation of IMA, quantum chemical calculations were performed to predict the potential initial sites as well as the product formation processes. The calculations were made on the protonated IMA and also on its neutral form, considering that both forms coexisted at the pH values ranging from 5.7 to 6.0.

The OH radical usually oxidizes organics in aqueous media via three possible reaction mechanisms: •OH addition, H-abstraction, and/or single electron transfer [Agopcan Cinar et al., 2017].

For the •OH addition pathways, •OH-adducts were always the main products for the aromatic or unsaturation [Brezová et al., 1991; Bui et al., 2010; An et al., 2011a]. This further resulted in the production of hydroxy-compounds. Furthermore, the •OH attack sites can usually be predicted by the Frontier Orbital theory. That is, •OH radicals usually attack the sites with higher $FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}$ values [[Fukui et al., 1952 ; An et al., 2011b]. The FEDs data of neutral IMA and of the protonated IMA were calculated and the results summarized in Table 3. For neutral IMA, the results found that the C22, C23 and C24 atoms have higher $FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}$ values, while those of the protonated IMA are rather attributed to the C35, C24 and C34 atoms, indicating that these positions are more likely to be attacked by •OH through the •OH addition pathways. However, the C22, C23, C34 and C35 sites appear to be unlikely due to stereo-hindrance effects. An OH-radical attack on the C24 atom of the parent molecule resulted in two possible •OH-adducts as shown in Fig. 7. These adducts underwent thereafter either reduction or oxidation. Oxidation afforded TP_{509-}

396 $_1$, while reduction is the route leading to the appearance of TP_{233} and TP_{172} after
397 cleavage of the C22-N4 and C23-N5 bonds, respectively, involving the direct
398 photohole (h^+) oxidation. This outcome is in line with the onset order of these TPs
399 such was presented earlier in the chapter 3.2.
400
401 Fig. 7 : Proposed •OH-addition route in the initial reaction of IMA with •OH (Pathway
402 1).
403
404 $TP_{509\text{-}1}$ underwent a second attack by •OH, either through •OH addition on the same
405 aromatic ring or through hydrogen abstraction at the phenol oxygen atom. The
406 formation of these intermediates also paved the way to that of TP_{233} and TP_{172} as
407 shown in Fig. 8. On the other side, hydrogen abstraction on the C13 atom of $TP_{509\text{-}1}$
408 gave rise posteriorly to the formation of TP_{425} by N-dealkylation.
409
410 Fig. 8 : Proposed degradation pathway of $TP_{509\text{-}1}$.
411
412 Hydrogen abstraction, another major pathway initiating the degradation of IMA
413 induced by •OH, has also been considered to explain the presence of some
414 transformation products. Generally, the H-abstraction reaction is likely to occur at the
415 atoms with a more positive charge [Mitroka et al., 2010]. As summarized in Table 3,
416 the C14 and C9/11 atoms have shown more positive charge than the other aliphatic
417 carbon atoms. Therefore, both C14 and C9/11 atoms were the possible positions for
418 the H-abstraction reaction resulting in the ultimate formation of TP_{523}, TP_{539} and
419 $TP_{509\text{-}3}$, as shown in Fig. 9.
420

421 Fig. 9 : Proposed H-abstraction route in the initial reaction of IMA with •OH (Pathway
422 2).
423
424 Regarding the oxidation by single electron transfer mediated by •OH, these reactions
425 generally barely contribute to the formation of transformation products due to very
426 short-lived radical cations and the rapid hydrolysis to yield •OH-addition products
427 [Klaning et al., 1985]. As a result, this mechanism was not highlighted as a major
428 process initiating the degradation of IMA in the presence of TiO_2.
429
430 Table 3: Frontier electron densities and Mulliken charges on different atoms in
431 imatinib calculated using Gaussian 09 program at the B3LYP/6-31G* level.
432
433 Photoholes and •OH attacks alone cannot explain the formation of the hydro and
434 dihydro-pyrimidin-2-amine derivatives represented by TP_{485}, TP_{165} and TP_{380}. These
435 compounds should initially stem from reduction by electron capture. The addition of
436 an extra electron to the IMA molecule would be easy because of the presence of
437 conjugated systems all the more composed of electronegative atoms such as
438 nitrogen atoms. Such a system would therefore lead to a substantial decrease in
439 energy on the LUMO, which would make it more suitable for accepting an electron to
440 form the corresponding anionic radical [Holy, 1974]. The calculated charge densities
441 in the IMA anion radicals have shown that most of the negative charge on its
442 aromatic carbon atoms resides on sequence C29-N6-C30. However, the IMA should
443 first be adsorbed on the TiO_2 surface at the beginning of the degradation, since the
444 electron transfer should mainly take place at this level. The Mulliken charges were
445 also calculated to explain the chemisorption pattern onto the TiO_2 catalyst and the

446 data obtained are listed in Table 4. The relative more negative point charges were
447 found at the [N7-C29-N6-C30-C32] sequence, i.e. on the pyrimidine fraction of the
448 parent molecule. Therefore, it was expected that the [4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-
449 amine] fragment was the preferential site to be adsorbed onto the surface of TiO_2
450 through the chemisorption model (Fig. 10) insofar as the point of zero discharge for
451 P25 Degussa is 6.9 and accordingly, the surface of the TiO_2 is positively charged at
452 pH 6.0 [Kosmulski, 2006]. Therefore, atoms of this functional group would be reduced
453 early in comparison with other atoms by direct electron attacks. Thus, it would not be
454 a surprise to find that protonation had occurred on atoms of the [pyrimidin-2-amine]
455 fraction. The result was the formation of a [hydro-pyrimidin-2-amine] type radical
456 [Dryhurst and Elving, 1969]. Since the SOMO in the [hydro-pyrimidin-2-amine] radical
457 is an NBMO, this radical is easily reduced to the corresponding [hydro-pyrimidin-2-
458 amine] anion. This anion is then protonated to yield [dihydro-pyrimidin-2-amine]
459 derivatives as shown in Fig. 10. Thus, the formation of TP_{485}, TP_{165} and TP_{380} could
460 be explained by the reduction of the IMA prior to attacks by $\bullet OH/h^+$.
461
462 Fig. 10 : Proposed single electron transfer route in the initial reaction of IMA with TiO_2
463 (Pathway 3).
464
465 Table 4: Frontier electron densities on different atoms in IMA radical anion calculated
466 using Gaussian 09 program at the B3LYP/6-31G* level.
467
468 In summary, as discussed above, three predominant degradation pathways were
469 proposed to initiate the degradation of the IMA (see graphical abstract and Fig. 7-10).
470 In pathway 1(Fig. 7), •OH reacted with the IMA at the C22 and C23 atoms and with

471 the protonated IMA at the C24 atom to form •OH-adducts, producing thereafter
472 hydroxy-IMA and some cleavage products (TP_{425}, TP_{172} and TP_{188}). In pathway 2(Fig.
473 9), •OH attacks the IMA through H-abstraction at the C14 (when N3 is neutral) and
474 C9/11 atoms (when N3 is protonated), resulting in the formation of TP_{523}, TP_{539} and
475 $TP_{509\text{-}3}$. When the process took place at the C28 atom, it gave rise to the formation of
476 $TP_{509\text{-}2}$. In pathway 3(Fig. 10), electron transfer from TiO_2 to an atom of the [N7-C29-
477 N6-C30-C32] sequence, most likely the C30 atom, reduces the IMA leading
478 ultimately to the formation of TP_{485}, TP_{165} and TP_{380} involving •OH/h^+ oxidations.
479
480 **3.4. Study of the potential toxicity of the transformation products**
481 The structural elucidation of TPs allowed to carry out *in silico* studies in order to
482 predict their potential toxicity profile (Table 5). Attention was paid on acute toxicity on
483 a primary consumer of the aquatic chain, *Daphnia magna*, (LC50 48h) [Guilhermino
484 et al., 2000] and on mutagenicity (micronucleus assay and Ames test). However, to
485 ensure the performance and a certain validity of these tools, the data obtained by the
486 *in silico* approaches for the mother molecule were compared with those published in
487 the literature and from different experimental studies. Thus, regarding mutagenicity,
488 the Toxtree programme predicted positive results with the micronucleus test and
489 negative results with the Ames test for the IMA. These results happen to be in good
490 agreement with most of the data found in the literature [Parrella et al., 2015 ; Novak
491 et al., 2017].
492
493 Table 5 : *In silico* predictions of mutagenicity and acute toxicity of IMA and its TPs.
494

Likewise, the LC 50 value of the IMA predicted for *D. magna* turns out to be of the same order of magnitude than the value obtained from experimental studies, i.e. 5.87 mg/l versus 11.97 mg/l [Parrella, A, 2014,a].

Therefore, a good match between prediction and experimentation for IMA made it possible to bring some confidence in the results of the *in silico* studies performed on its TPs. Compared to the IMA, with an average LC 50 value of 27.4 mg/l, no TP yield more acute ecotoxicological effects than the parent compound so that implies that AOPs-based treatments used to remove IMA should lead to the IMA detoxification rather than increasing toxicity.

However, in terms of mutagenicity, some TPs such as TP_{185}, TP_{172} and $TP_{509\text{-}1}$ seem to exhibit structural alerts or present higher Ames QSAR test values than that of IMA. TP_{295} and TP_{425} even yield both higher Ames test values and structural alerts. The structural alerts refer to the presence of either α,β unsaturated carbonyls [Janzowski, 2003] as is the case of TP_{165}, TP_{295}, TP_{485} and $TP_{509\text{-}1}$ or to that of primary aromatic amine groups [Benigni, 2002] present on TP_{172}. Like the IMA, all TPs have at least one structural alert that can make the micronucleus test positive.

Alongside the *in silico* studies, inhibition of *V. fischer*i bioluminescence under the influence of IMA irradiated samples was measured (Fig. 11). Blank samples devoid of IMA and TPs did not exert any inhibition, while the non-irradiated IMA solutions were responsible for an average of 25.3 % inhibition. Under irradiation, the inhibition peak (40.2 %) was reached after a 60-minute exposure, likely due to the fact that some emerging TPs may have caused higher toxicity to *V. fischeri* than the IMA itself.

Fig. 11: Inhibition of the *V. Fischeri* bioluminescence as a function of the irradiation time

Nevertheless, this increase was low and transient, which, in a way, could go along with the results presented above pertaining to the acute toxicity predicted by *in silico* approach.

Though they may give some insights of the relative toxicity of TPs and IMA, and owing to the different mechanisms of toxicity that may be exerted by these compounds, the results provided by the *in silico* and *in vitro* approach need to be confirmed by other experiments.

4. Conclusion

The photocatalytic degradation kinetics of IMA and the contribution of ROSs were studied. In addition, the photocatalytic degradation mechanisms of IMA were elucidated from HPLC/MS–MS results coupled with the calculated data of the FEDs and point charges. The results showed that the surface reaction on TiO_2 played a significant role in the degradation of IMA and that •OH are responsible for its major degradation. The contribution of h^+ to its photocatalytic degradation was also highlighted. At last, three main redox photocatalytic degradation pathways of the IMA were proposed, including (i) hydroxylation addition, preferentially occurred on atom C24, (ii) •OH mediated hydrogen abstraction from the carbon atoms located alpha to the nitrogen atoms of the piperazine moiety and also (iii) electron transfer from TiO_2 to the pyrimidine moiety of the parent compound. From there, a total of twelve TPs were formed by further •OH/h^+ oxidations and their structures reported for the first time. These structures allowed for *in silico* toxicity studies, which showed an alarming

trend: if TPs does not appear to be much more toxic in terms of acute toxicity than the parent compound, which was confirmed by the Microtox tests, some of them display structural alerts and/or higher Ames QSAR test values than the parent compound. Therefore, further investigation on the toxicity of TPs is needed, which is crucial to evaluate the efficiency of the toxicity removal.

Acknowledgements

The authors want to thank K. Manerlax and M. Bimbot for their very appreciable contributions to this work. They are also thankful to Ile de France Region for financial support in the acquisition of the Orbitrap Velos Pro mass spectrometer.

REFERENCES

Agopcan Cinar, S., Ziylan-Yavaş, A., Catak, S., Ince, N.H., Aviyente, V., 2017. Hydroxyl radical-mediated degradation of diclofenac revisited: a computational approach to assessment of reaction mechanisms and by-products. Environ. Sci. Pollut. Res. 24, 18458–18469. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9482-7

An, T., An, J., Gao, Y., Li, G., Fang, H., Song, W., 2015. Photocatalytic degradation and mineralization mechanism and toxicity assessment of antivirus drug acyclovir: experimental and theoretical studies. Appl. Catal. B Environ. 164, 279–287. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.09.009

An, T., An, J., Yang, H., Li, G., Feng, H., Nie, X., 2011a. Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of antivirus drug-lamivudine in TiO_2 dispersion. J. Hazard. Mater. 197, 229–236. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.09.077

An, T., Sun, L., Li, G., Gao, Y., Ying, G., 2011b. Photocatalytic degradation and detoxification of o-chloroaniline in the gas phase: Mechanistic consideration and mutagenicity assessment of its

569 decomposed gaseous intermediate mixture. Appl. Catal. B Environ. 102, 140–146.
570 https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.11.035

571 An, T., Yang, H., Li, G., Song, W., Cooper, W.J., Nie, X., 2010. Kinetics and mechanism of advanced
572 oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water. Appl. Catal. B Environ. 94, 288–
573 294. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2009.12.002

574 Benigni, R., 2002. Carcinogenicity of the aromatic amines: from structure–activity relationships to
575 mechanisms of action and risk assessment. Mutat. Res. Mutat. Res. 511, 191–206.
576 https://doi.org/10.1016/S1383-5742(02)00008-X

577 Besse, J.-P., Latour, J.-F., Garric, J., 2012. Anticancer drugs in surface waters. Environ. Int. 39, 73–86.
578 https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.002

579 Booker, V., Halsall, C., Llewellyn, N., Johnson, A., Williams, R., 2014. Prioritising anticancer drugs for
580 environmental monitoring and risk assessment purposes. Sci. Total Environ. 473–474, 159–170.
581 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.145

582 Brezová, V., Čeppan, M., Brandšteterová, E., Breza, M., Lapčík, L., 1991. Photocatalytic hydroxylation
583 of benzoic acid in aqueous titanium dioxide suspension. J. Photochem. Photobiol. Chem. 59, 385–
584 391. https://doi.org/10.1016/1010-6030(91)87090-I

585 Bui, T.D., Kimura, A., Ikeda, S., Matsumura, M., 2010. Determination of Oxygen Sources for Oxidation
586 of Benzene on TiO_2 Photocatalysts in Aqueous Solutions Containing Molecular Oxygen. J. Am. Chem.
587 Soc. 132, 8453–8458. https://doi.org/10.1021/ja102305e

588 Cavalcante, R.P., Dantas, R.F., Bayarri, B., González, O., Giménez, J., Esplugas, S., Machulek, A., 2015.
589 Synthesis and characterization of B-doped TiO2 and their performance for the degradation of
590 metoprolol. Catal. Today 252, 27–34. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.09.030

591 Cho, M., Chung, H., Choi, W., Yoon, J., 2005. Different Inactivation Behaviors of MS-2 Phage and
592 Escherichia coli in TiO2 Photocatalytic Disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 71, 270–275.
593 https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.270-275.2005

594 Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H.,
595 Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C.L., 2001. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the
596 BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. N. Engl. J. Med. 344, 1031–1037.
597 https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401

598 Dryhurst, G., Elving, P.J., 1969. Electrochemical oxidation-reduction paths for pyrimidine, cytosine,
599 purine and adenineCorrelation and application. Talanta 16, 855–874. https://doi.org/10.1016/0039-
600 9140(69)80126-8

601 Fukui, K., Yonezawa, T., Shingu, H., 1952. A Molecular Orbital Theory of Reactivity in Aromatic
602 Hydrocarbons. J. Chem. Phys. 20, 722. https://doi.org/10.1063/1.1700523

603 Gaya, U.I., Abdullah, A.H., 2008. Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants
604 over titanium dioxide: A review of fundamentals, progress and problems. J. Photochem. Photobiol. C
605 Photochem. Rev. 9, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2007.12.003

606 Gschwind, H.-P., 2005. METABOLISM AND DISPOSITION OF IMATINIB MESYLATE IN HEALTHY
607 VOLUNTEERS. Drug Metab. Dispos. 33, 1503–1512. https://doi.org/10.1124/dmd.105.004283

608 Guilhermino, L., Diamantino, T., Carolina Silva, M., Soares, A.M.V.M., 2000. Acute Toxicity Test with
609 *Daphnia magna*: An Alternative to Mammals in the Prescreening of Chemical Toxicity? Ecotoxicol.
610 Environ. Saf. 46, 357–362. https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1916

611 Hehlmann, R., Lauseker, M., Saußele, S., Pfirrmann, M., Krause, S., Kolb, H.J., Neubauer, A., Hossfeld,
612 D.K., Nerl, C., Gratwohl, A., Baerlocher, G.M., Heim, D., Brümmendorf, T.H., Fabarius, A., Haferlach,
613 C., Schlegelberger, B., Müller, M.C., Jeromin, S., Proetel, U., Kohlbrenner, K., Voskanyan, A.,

614 Rinaldetti, S., Seifarth, W., Spieß, B., Balleisen, L., Goebeler, M.C., Hänel, M., Ho, A., Dengler, J., Falge,
615 C., Kanz, L., Kremers, S., Burchert, A., Kneba, M., Stegelmann, F., Köhne, C.A., Lindemann, H.W.,
616 Waller, C.F., Pfreundschuh, M., Spiekermann, K., Berdel, W.E., Müller, L., Edinger, M., Mayer, J.,
617 Beelen, D.W., Bentz, M., Link, H., Hertenstein, B., Fuchs, R., Wernli, M., Schlegel, F., Schlag, R., de
618 Wit, M., Trümper, L., Hebart, H., Hahn, M., Thomalla, J., Scheid, C., Schafhausen, P., Verbeek, W.,
619 Eckart, M.J., Gassmann, W., Pezzutto, A., Schenk, M., Brossart, P., Geer, T., Bildat, S., Schäfer, E.,
620 Hochhaus, A., Hasford, J., 2017. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid
621 leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML
622 determinants. Leukemia 31, 2398–2406. https://doi.org/10.1038/leu.2017.253

623 Holy, N.L., 1974. Reactions of the radical anions and dianions of aromatic hydrocarbons. Chem. Rev.
624 74, 243–277. https://doi.org/10.1021/cr60288a005

625 Janzowski, C., 2003. α,β-Unsaturated carbonyl compounds: induction of oxidative DNA damage in
626 mammalian cells. Mutagenesis 18, 465–470. https://doi.org/10.1093/mutage/geg018

627 Klaning, U.K., Sehested, K., Holcman, J., 1985. Standard Gibbs energy of formation of the hydroxyl
628 radical in aqueous solution. Rate constants for the reaction chlorite (ClO2-) + ozone .dblarw. ozone(1-
629) + chlorine dioxide. J. Phys. Chem. 89, 760–763. https://doi.org/10.1021/j100251a008

630 Kosmulski, M., 2006. pH-dependent surface charging and points of zero charge. J. Colloid Interface
631 Sci. 298, 730–741. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.01.003

632 Lutterbeck, C.A., Kern, D.I., Machado, Ê.L., Kümmerer, K., 2015. Evaluation of the toxic effects of four
633 anti-cancer drugs in plant bioassays and its potency for screening in the context of waste water reuse
634 for irrigation. Chemosphere 135, 403–410. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.019

635 Mendoza, A., Aceña, J., Pérez, S., López de Alda, M., Barceló, D., Gil, A., Valcárcel, Y., 2015.
636 Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their

637 presence and characterise their environmental risk and hazard. Environ. Res. 140, 225–241.
638 https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.04.003

639 Miolo, G., Marzano, C., Gandin, V., Palozzo, A.C., Dalzoppo, D., Salvador, A., Caffieri, S., 2011.
640 Photoreactivity of 5-fluorouracil under UVB light: photolysis and cytotoxicity studies. Chem. Res.
641 Toxicol. 24, 1319–1326. https://doi.org/10.1021/tx200212z

642 Mitroka, S., Zimmeck, S., Troya, D., Tanko, J.M., 2010. How Solvent Modulates Hydroxyl Radical
643 Reactivity in Hydrogen Atom Abstractions. J. Am. Chem. Soc. 132, 2907–2913.
644 https://doi.org/10.1021/ja903856t

645 Novak, M., Žegura, B., Nunić, J., Gajski, G., Gerić, M., Garaj-Vrhovac, V., Filipič, M., 2017. Assessment
646 of the genotoxicity of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in cultured fish and human cells.
647 Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. 814, 14–21. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.12.002

648 Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., Fiumano, V., Isidori, M., 2014a. Acute and chronic
649 toxicity of six anticancer drugs on rotifers and crustaceans. Chemosphere 115, 59–66.
650 https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.013

651 Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., Isidori, M., 2015. Eco-genotoxicity of six anticancer
652 drugs using comet assay in daphnids. J. Hazard. Mater. 286, 573–580.
653 https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.01.012

654 Parrella, A., Lavorgna, M., Criscuolo, E., Russo, C., Isidori, M., 2014b. Estrogenic activity and
655 cytotoxicity of six anticancer drugs detected in water systems. Sci. Total Environ. 485–486, 216–222.
656 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.050

657 Patlewicz, G., Jeliazkova, N., Safford, RJ., Worth, AP., Aleksiev B, 2008. An evaluation of the
658 implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. SAR QSAR Environ Res.
659 19, 495-524. https://doi: 10.1080/10629360802083871

660 Rivera-Utrilla, J., Sánchez-Polo, M., Ferro-García, M.Á., Prados-Joya, G., Ocampo-Pérez, R., 2013.
661 Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. Chemosphere
662 93, 1268–1287. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.07.059

663 Sacha, T., 2013. Imatinib in chronic myeloid leukemia: an overview. Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.
664 6, 2014007. https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.007

665 Santos, L.H.M.L.M., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C.B.S.M.,
666 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic
667 environment. J. Hazard. Mater. 175, 45–95. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.100

668 Santos, M.S.F., Franquet-Griell, H., Lacorte, S., Madeira, L.M., Alves, A., 2017. Anticancer drugs in
669 Portuguese surface waters – Estimation of concentrations and identification of potentially priority
670 drugs. Chemosphere 184, 1250–1260. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.102

671 Sawyers, C.L., 1999. Chronic Myeloid Leukemia. N. Engl. J. Med. 340, 1330–1340.
672 https://doi.org/10.1056/NEJM199904293401706

673 Singer, . P., Wossner, A. E., McArdell, C. S., Fenner, K., 2016. Rapid screening for exposure to “non-
674 target” pharmaceuticals from wastewater effluents by combining HRMS-based suspect screening and
675 exposure modeling. Environ. Sci. Technol.746 50(13), 6698-6707. doi : 10.1021/acs.est.5b03332

676 Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Pretali, L., Profumo, A., Fasani, E., Albini, A., Migliavacca, R.,
677 Nucleo, E., 2012. Photodegradation of fluoroquinolones in surface water and antimicrobial activity of
678 the photoproducts. Water Res. 46, 5575–5582. https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.043

679 Szczepek, W.J., Kosmacińska, B., Bielejewska, A., Łuniewski, W., Skarżyński, M., Rozmarynowska, D.,
680 2007. Identification of imatinib mesylate degradation products obtained under stress conditions. J.
681 Pharm. Biomed. Anal. 43, 1682–1691. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.033

682 United States Environmental Protection A ency, 2016. User's Guide for T.E.S.T. (version 4.2) (Toxicity
683 Estimation Software Tool) A Program to Estimate Toxicity from Molecular Structure [WWW
684 Document]. US EPA. URL https://www.epa.gov/chemical-research/users-guide-test-version-42-
685 toxicity estimation-software-tool-program-estimate

686 Van Doorslaer, X., Demeestere, K., Heynderickx, P.M., Van Langenhove, H., Dewulf, J., 2011. UV-A
687 and UV-C induced photolytic and photocatalytic degradation of aqueous ciprofloxacin and
688 moxifloxacin: Reaction kinetics and role of adsorption. Appl. Catal. B Environ. 101, 540–547.
689 https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2010.10.027

690 Vogna, D., Marotta, R., Napolitano, A., Andreozzi, R., d'Ischia, M., 2004. Advanced oxidation of the
691 pharmaceutical drug diclofenac with UV/H2O2 and ozone. Water Res. 38, 414–422.
692 https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.028

693 Yang, L., Yu, L.E., Ray, M.B., 2009. Photocatalytic Oxidation of Paracetamol: Dominant Reactants,
694 Intermediates, and Reaction Mechanisms. Environ. Sci. Technol. 43, 460–465.
695 https://doi.org/10.1021/es8020099

696 Zhang, X., Sun, D.D., Li, G., Wang, Y., 2008. Investigation of the roles of active oxygen species in
697 photodegradation of azo dye AO_7 in TiO_2 photocatalysis illuminated by microwave electrodeless
698 lamp. J. Photochem. Photobiol. Chem. 199, 311–315.
699 https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2008.06.009

700 Zhang, X., Wu, F., Wu, X., Chen, P., Deng, N., 2008. Photodegradation of acetaminophen in TiO_2
701 suspended solution. J. Hazard. Mater. 157, 300–307. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.098

702

Table 1

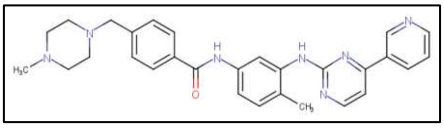
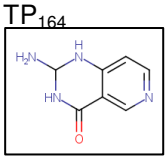
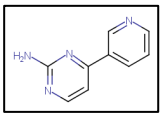
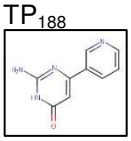
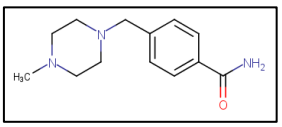
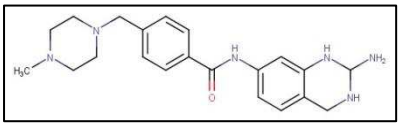
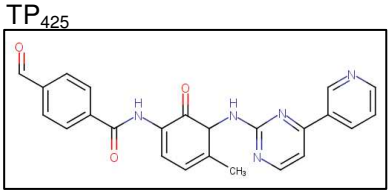
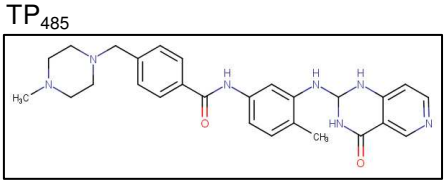
Click here to download Table: Table 1.docx

Table 1. Mean IMA recovery rate (% C/C0x100) and standard deviation (n=3) for hydrolytic degradation and adsorption of IMA on the TiO_2 surface

Time (min)	Adsorption (pH=6.0, TiO_2= 500 µg.mL^{-1})	Acidic degradation pH=4	Basic degradation pH=9
0	100 (± 1.9)	100 (± 2.6)	100 (± 2.3)
15	85 (± 2.5)	99 (± 1.8)	100 (± 1.8)
30	81 (± 2.7)	100 (± 2.3)	101 (± 2.7)
60	82 (± 2.4)	99 (± 2.4)	99 (± 1.64)
1440 (one day)	80 (± 2.6)	98 (± 1.3)	97(± 1.8)

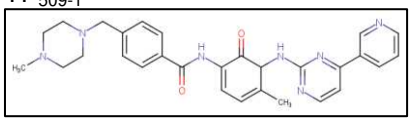
Table 2
Click here to download Table: Table 2.docx

Table 2. IMA and the TPs structures, molecular ions, characteristic fragment ions and relative error between accurate and exact mass.

Compound	MS^n mode	Best possible elemental formula	Accurate mass m/z	Theoretical mass m/z	Relative error (ppm)
Imatinib 	Precursor ion	$C_{29}H_{31}N_7O^+$	494.2665	494.2663	0.4
	MS^2 (494→)	$C_{24}H_{20}N_5O^+$	394.1665	394.1662	0.8
	MS^2 (494→)	$C_{16}H_{14}N_5^+$	276.1239	276.1235	1.4
	MS^2 (494→)	$C_{13}H_{17}N_2O^+$	217.1338	217.1335	1.4
TP_{164} 	Precursor ion	$C_7H_9N_4O^+$	165.0774	165.0771	1.8
	MS^2 (165→)	$C_7H_6N_3O^+$	148.0505	148.0505	0
	MS^2 (165→)	$C_6H_7N_2O_2^+$	123.0552	123.0553	-0.8
	MS^2 (165→)	$C_6H_5N_2^+$	105.0446	105.0447	-0.9
TP_{172} 	Precursor ion	$C_{20}H_{22}N_5O_8^+$	173.0824	173.0821	1.7
TP_{188} 	Precursor ion	$C_{20}H_{22}N_5O_7^+$	189.0773	189.0771	1.1
	MS^2 (189→)	$C_{15}H_{15}N_4O_4^+$	147.0552	147.0553	-0.6
	MS^2 (189→)	$C_{15}H_{13}N_4O_3^+$	144.0555	144.0556	-0.7
TP_{233} 	Precursor ion	$C_{13}H_{19}N_3O^+$	234.1603	234.1601	0.8
	MS^2 (234→)	$C_{13}H_{17}N_2O^+$	217.1338	217.1335	1.3
	MS^2 (234→)	$C_8H_8NO^+$	134.0600	134.0600	0.0
TP_{380} 	Precursor ion	$C_{21}H_{28}N_6O^+$	381.2392	381.2397	-1.3
	MS^2 (426→)	$C_{21}H_{25}N_5O^+$	364.2135	364.2132	0.8
	MS^2 (426→)	$C_{20}H_{26}N_4O^+$	339.2184	339.2179	1.5
	MS^3 (426→)	$C_{16}H_{14}N_3O^+$	264.1133	264.1131	0.8
	MS^3 (426→)	$C_{13}H1_7N_2O^+$	217.1339	217.1335	1.8
TP_{425} 	Precursor ion	$C_{24}H_{19}N_5O_3^+$	426.1559	426.1560	-0.2
	MS^2 (426→)	$C_{16}H_{15}N_5O^+$	293.1274	293.1271	1.0
	MS^2 (426→)	$C_9H_8N_4^+$	173.0821	173.0821	0.0
	MS^3 (426→)	$C_8H_5O_2^+$	133.0284	133.0284	0.0
TP_{485} 	Precursor ion	$C_{27}H_{31}N_7O_2^+$	486.2610	486.2612	-0.4
	MS^2 (486→)	$C_{27}H_{29}N_6O_2^+$	469.2342	469.2347	-1.1
	MS^2 (486→)	$C_{21}H_{24}N_5O^+$	362.1981	362.1975	1.7

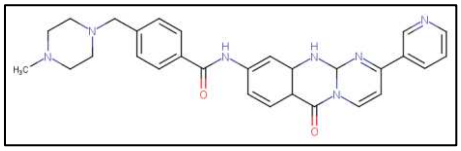
MS^2 (486→)	$C_{20}H_{26}N_4O^+$	339.2178	339.2179	-0.3
MS^2 (486→)	$C_{13}H_{17}N_2O^+$	217.1340	217.1335	2.3

$TP_{509\text{-}1}$



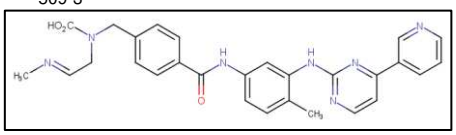
Precursor ion	$C_{29}H_{31}N_7O_2^+$	510.2614	510.2612	0.4
MS^2 (510→)	$C_{24}H_{20}N_5O_2^+$	410.1610	410.1612	-0.5
MS^2 (510→)	$C_{13}H_{17}N_2O^+$	217.1338	217.1335	1.4
MS^3 (510→410→)	$C_{23}H_{17}N_5O_2^+$	395.1379	395.1377	0.5
MS^3 (510→410→)	$C_{16}H_{14}N_5O^+$	292.1201	292.1193	2.7
MS^3 (510→410→)	$C_{15}H_{12}NO_2^+$	238.0872	238.0863	3.7
MS^3 (510→410→)	$C_{14}H_{12}NO_2^+$	226.0867	226.0863	1.8
MS^3 (510→410→)	$C_{10}H_9N_4^+$	185.0829	185.0822	3.8

$TP_{509\text{-}2}$



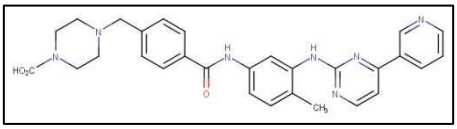
Precursor ion	$C_{29}H_{31}N_7O_2^+$	510.2617	510.2612	1.0
MS^2 (510→)	$C_{24}H_{20}N_5O_2^+$	410.1610	410.1612	-0.5
MS^3 (510→410→)	$C_{24}H_{18}N_5O^+$	392.1513	392.1506	1.8
MS^3 (510→410→)	$C_{23}H_{20}N_5O^+$	382.1667	382.1662	1.3
MS^3 (510→410→)	$C_{23}H_{17}N_4O^+$	365.1398	365.1397	0.3
MS^3 (510→410→)	$C_{16}H_{14}N_5O^+$	292.1200	292.1193	2.4
MS^3 (510→410→)	$C_9H_9N_4^+$	173.0818	173.0822	-2.3

$TP_{509\text{-}3}$



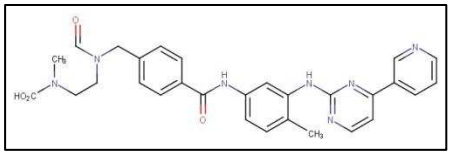
Precursor ion	$C_{20}H_{22}N_5O_9^+$	510.2251	510.2248	0.6
MS^2 (510→)	$C_{20}H_{19}N_4O_9^+$	492.2141	492.2142	-0.2
MS^2 (510→)	$C_{15}H_{15}N_4O_6^+$	464.2191	464.2193	-0.4
MS^2 (510→)	$C_{11}H_{10}NO_3^+$	233.0921	233.0920	0.4
MS^3 (510→492→)	$C_{11}H_{10}NO_2^+$	408.1455	408.1455	0
MS^3 (510→492→)	$C_{11}H_7O_2^+$	394.1663	394.1662	0.2

TP_{523}



Precursor ion	$C_{29}H_{29}N_7O_3^+$	524.2412	524.2405	1.3
MS^2 (524→)	$C_{28}H_{27}N_7O^+$	478.2347	478.2350	-0.6
MS^2 (524→)	$C_{24}H_{20}N_5O^+$	394.1662	394.1662	0
MS^2 (524→)	$C_{13}H_{15}N_2O_3^+$	247.1077	247.1077	0

TP_{539}



Precursor ion	$C_{29}H_{29}N_7O_4^+$	540.2357	540.2354	1.5
MS^2 (540→)	$C_{29}H_{27}N_7O_3^+$	522.2244	522.2248	-0.8
MS^2 (540→)	$C_{28}H_{27}N_7O_2^+$	494.2298	494.2299	-1.8
MS^2 (540→)	$C_{24}H_{18}N_5O^+$	392.1506	392.1506	-1.5
MS^2 (540→)	$C_{13}H_{17}N_2O_4^+$	265.1184	265.1183	-2.4
MS^2 (540→)	$C_{13}H_{15}N_2O_3^+$	247.1077	247.1077	-1.7

Table 3

Click here to download Table: Table 3.docx

Table 3: Frontier electron densities and Mulliken charges on different atoms in imatinib calculated using Gaussian 09 program at the B3LYP/6-31G* level.

Number	Atom	Neutral imatinib		Protonated imatinib	
		$FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}$	Mulliken charges	$FED^2_{HOMO}+FED^2_{LUMO}$	Mulliken charges
1	O	0,0178	-0,5846	0,000005508	-0,5839
2	N	0,0006	-0,1905	0,000004156	-0,1775
3	N	0,0001	-0,2282	0,000000229	-0,0465
4	N	0,0462	0,0431	0,000001368	0,0455
5	N	0,1833	-0,0494	0,000002653	-0,0570
6	N	0,1507	-0,3127	0,000018669	-0,3187
7	N	0,1834	-0,2793	0,000003034	-0,2719
8	N	0,0244	-0,2330	0,000002012	-0,2482
9	C	0,0051	0,1666	0,000000033	0,1640
10	C	0,0159	0,1022	0,000000034	0,1562
11	C	0,0035	-0,1433	0,000000015	0,1309
12	C	0,0244	-0,0344	0,000000007	0,1924
13	C	1,3910	-0,4667	0,000000098	-0,3781
14	C	0,0005	0,1235	0,000000003	0,3445
15	C	0,8534	0,7824	0,000000435	0,7024
16	C	2,0034	-0,4941	0,000001419	-0,4451
17	C	0,5687	-0,0225	0,000000021	0,0724
18	C	1,8667	0,2380	0,000003070	0,1808
19	C	0,7864	-0,0537	0,000000507	-0,1498
20	C	1,0599	0,3361	0,000000473	0,3511
21	C	0,6761	0,4306	0,000001734	0,4318
22	C	4,0346	-0,1482	0,000006318	-0,0802
23	C	5,7699	0,4892	0,000000432	0,4650
24	C	2,5497	0,0794	0,000034238	0,0436
25	C	0,9099	0,1931	0,000026420	0,1339
26	C	0,5619	-0,1437	0,000001562	-0,1198
27	C	1,1244	-0,2657	0,000003324	-0,2100
28	C	0,3385	-0,1609	0,000000262	-0,1752
29	C	0,1802	0,1307	0,000009157	0,0735
30	C	5,7392	-0,4478	0,000003461	0,1485
31	C	6,4248	0,9470	0,000001579	0,4714
32	C	0,9158	-0,3935	0,000005433	-0,4284
33	C	0,7791	0,2540	0,000002906	0,2455
34	C	3,9070	0,5796	0,000027554	0,5483
35	C	1,2779	-0,3947	0,000039047	-0,3449
36	C	1,1977	0,1583	0,000004363	0,1627
37	C	0,3786	-0,0068	0,000000403	-0,0290

Table 4

Click here to download Table: Table 4.docx

Table 4: Frontier electron densities on different atoms in IMA radical anion calculated using Gaussian 09 program at the B3LYP/6-31G* level.

Number	Atom	$2FED^2_{LUMO}$
1	O	1,42E-05
2	N	3,20E-07
3	N	2,00E-08
4	N	4,80E-07
5	N	1,92E-07
6	N	1,77E-06
7	N	1,06E-07
8	N	3,20E-09
9	C	1,80E-09
10	C	1,80E-09
11	C	8,00E-10
12	C	8,00E-10
13	C	7,20E-09
14	C	8,00E-10
15	C	5,78E-08
16	C	9,80E-09
17	C	5,00E-09
18	C	1,80E-07
19	C	2,18E-07
20	C	4,50E-08
21	C	1,77E-06
22	C	3,28E-06
23	C	2,59E-07
24	C	2,33E-05
25	C	3,20E-09
26	C	1,07E-06
27	C	1,80E-07
28	C	1,28E-08
29	C	6,73E-07
30	C	7,44E-07
31	C	1,25E-07
32	C	5,00E-09
33	C	3,20E-07
34	C	2,45E-07
35	C	1,62E-08
36	C	6,48E-08
37	C	4,50E-08

Table 5
Click here to download Table: Table 5.docx

Table 5: *In silico* predictions of mutagenicity and acute toxicity of IMA and its TPs.

In silico endpoint	**LC50, *D.magna* 48 hr (mg/l)**	**Micronucleus assay**	**Ames test (structure based)**	**Ames test (QSAR based)value**
Imatinib	5.87	0.54	No	
165	8.68	0.07	Yes	
172	4.56	0.21	Yes	
188	80.53	0.19	No	
233	54.47	0.12	No	
295	51.83	0.68	Yes	
380	37.74	0.16	No	Positive (classe 1)
425	1.63	0.79	Yes	
485	16.44	0.35	No	
509-1	8.96	0.35	Yes	
509-2	3.49	0.65	No	
509-3	81.17	0.26	No	
523	12.06	0.32	No	
539	16.40	0.75	No	
TPs average	27.42	0.39	N.A.	N.A.

Figure 1
Click here to download Figure: Fig. 1.pdf

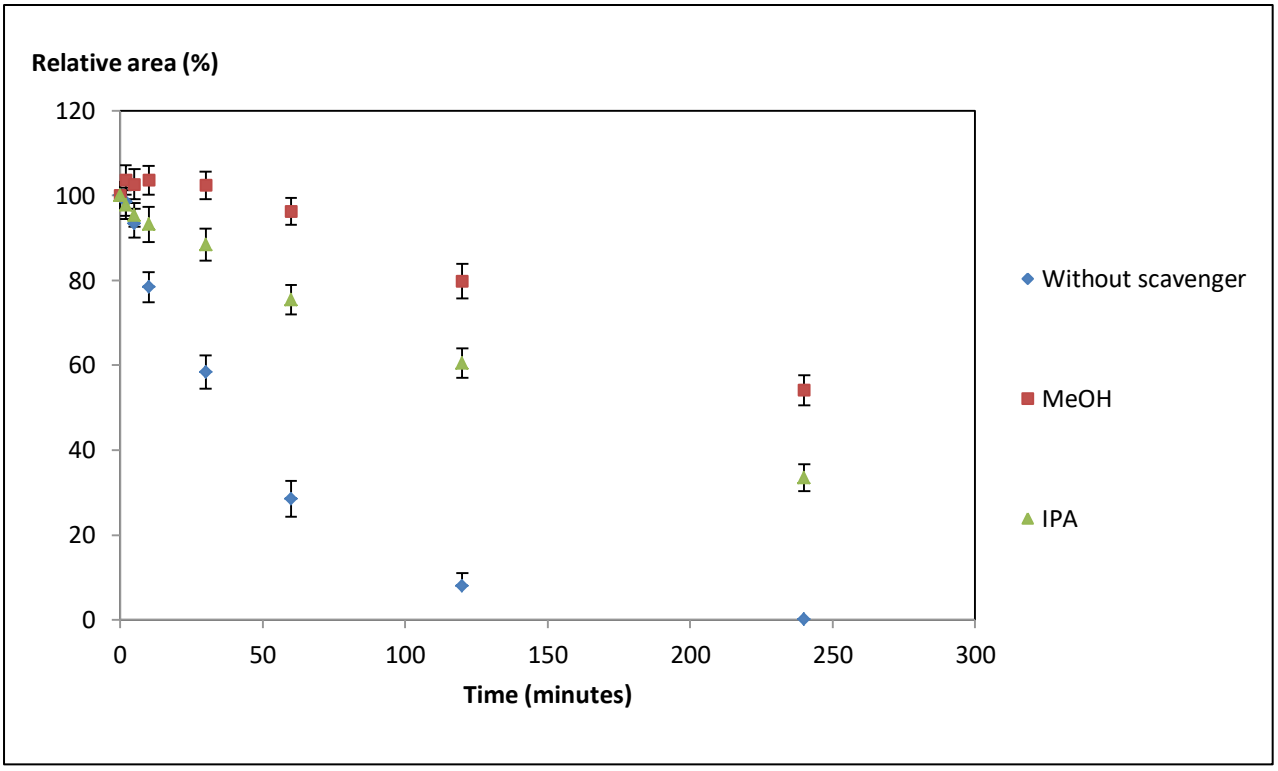


Fig. 1: Kinetics of the IMA photocatalytic degradation with or without scavenger.

Figure 2

Click here to download Figure: Fig. 2.pdf

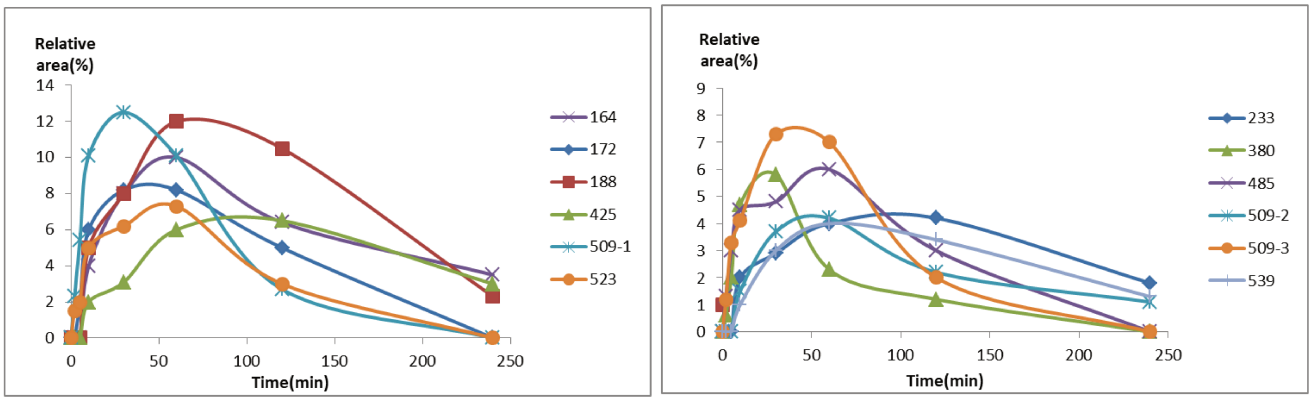


Fig. 2: Evolution of the TPs as a function of the irradiation time in ultrapure water spiked with 500 µg/mL of TiO2. The relative areas are the ratios between the peaks areas corresponding to each compound and that of the IMA at the initial time.

Figure 3

Click here to download high resolution image

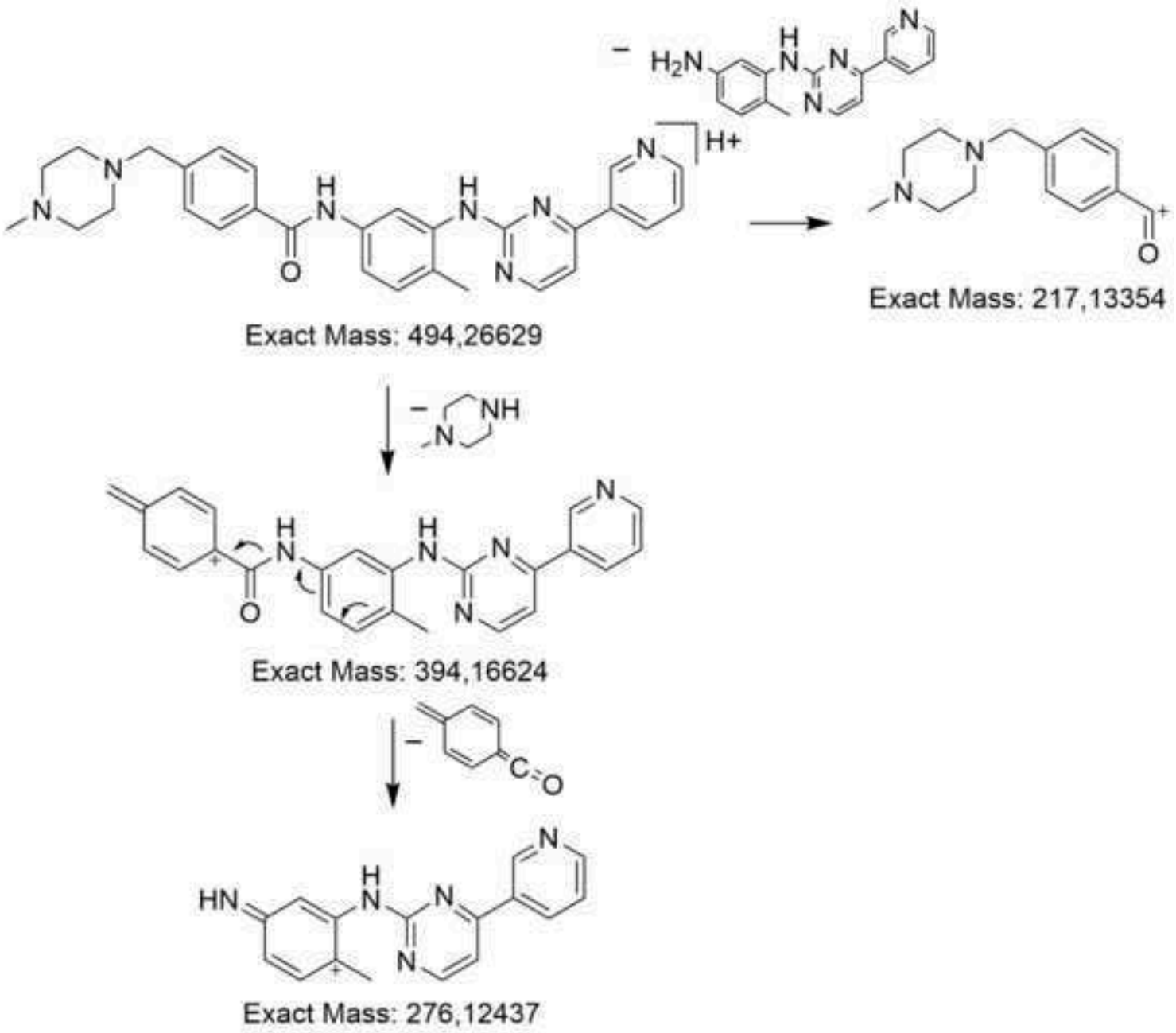


Fig. 3: Proposed fragmentation pattern of protonated IMA.

Figure 4

Click here to download high resolution image

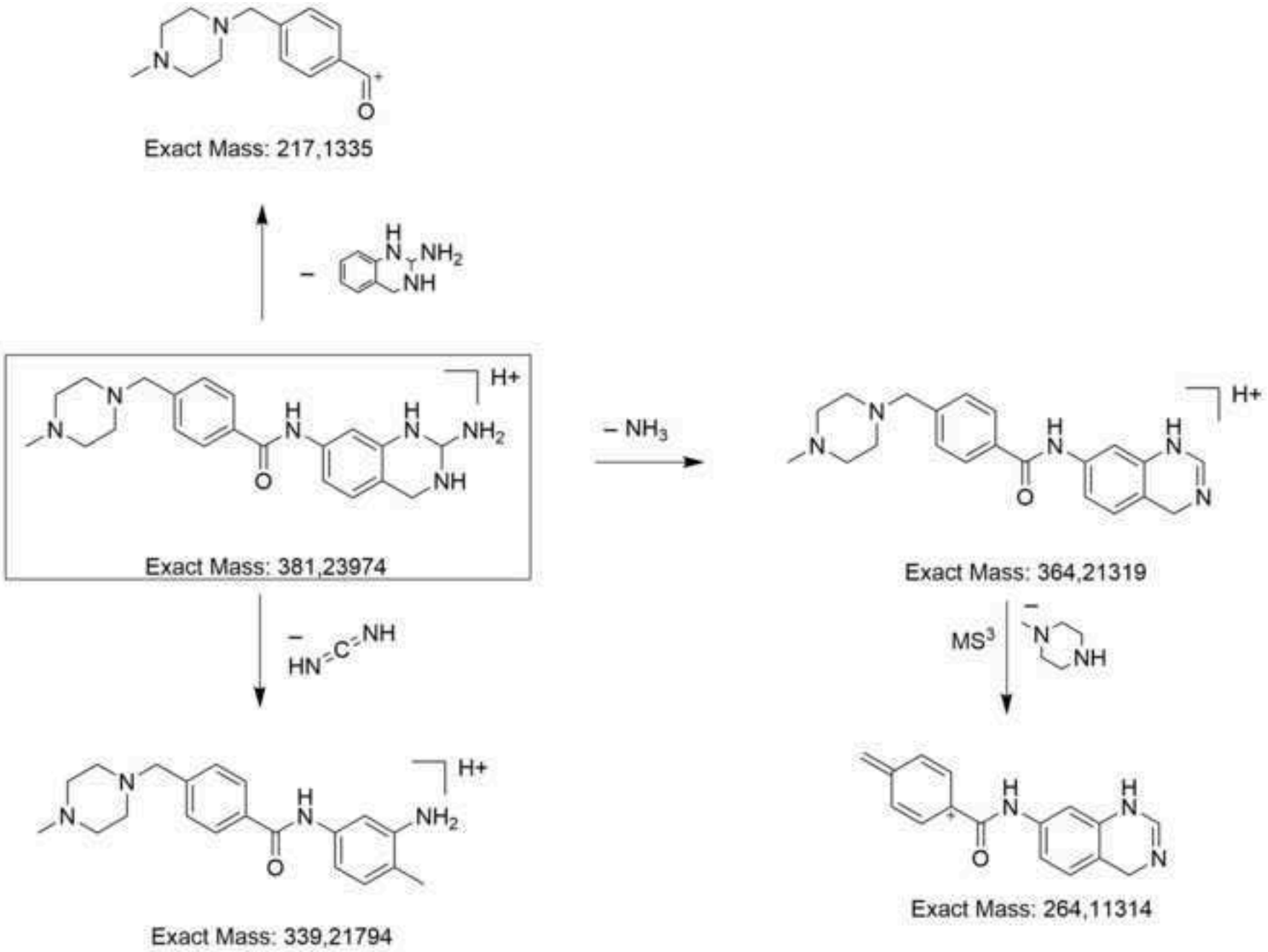


Fig. 4: Proposed fragmentation pattern of protonated TP_{380}.

Figure 5

Click here to download high resolution image

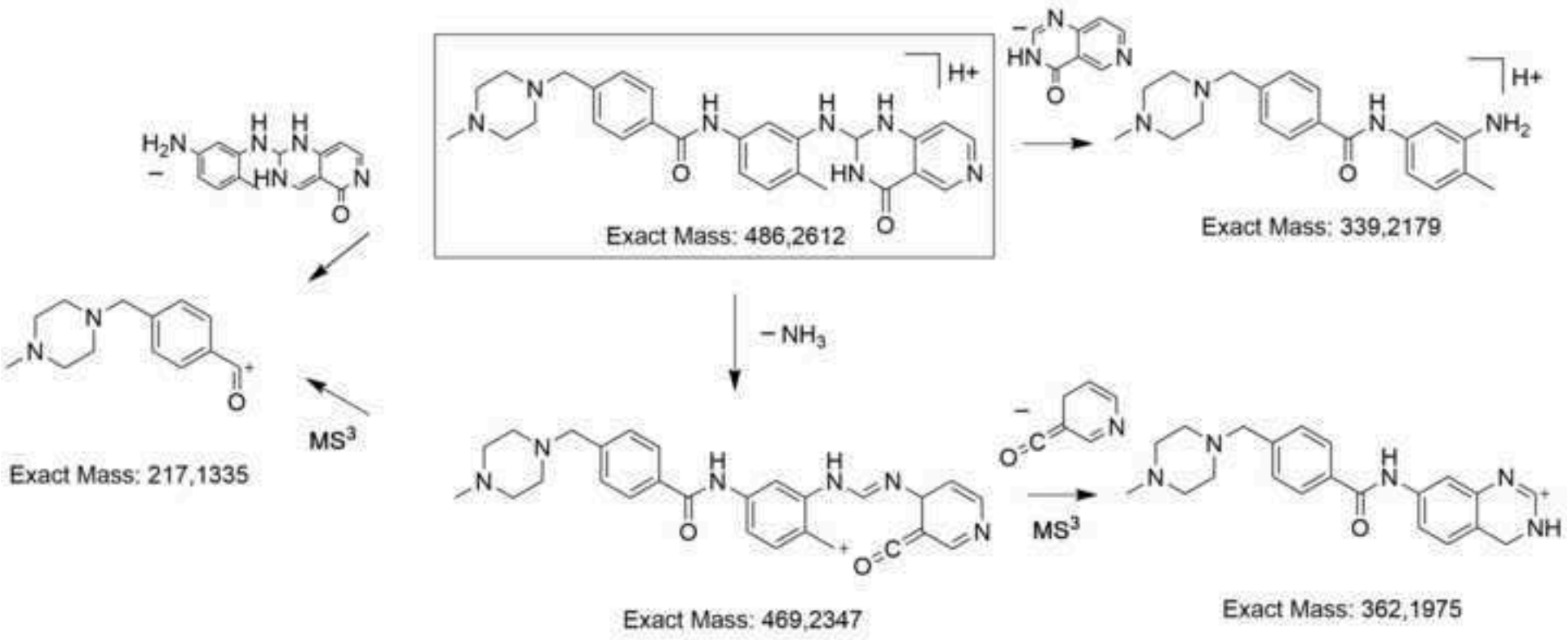


Fig. 5: Proposed fragmentation pattern of protonated TP_{485}.

Figure 6

Click here to download high resolution image

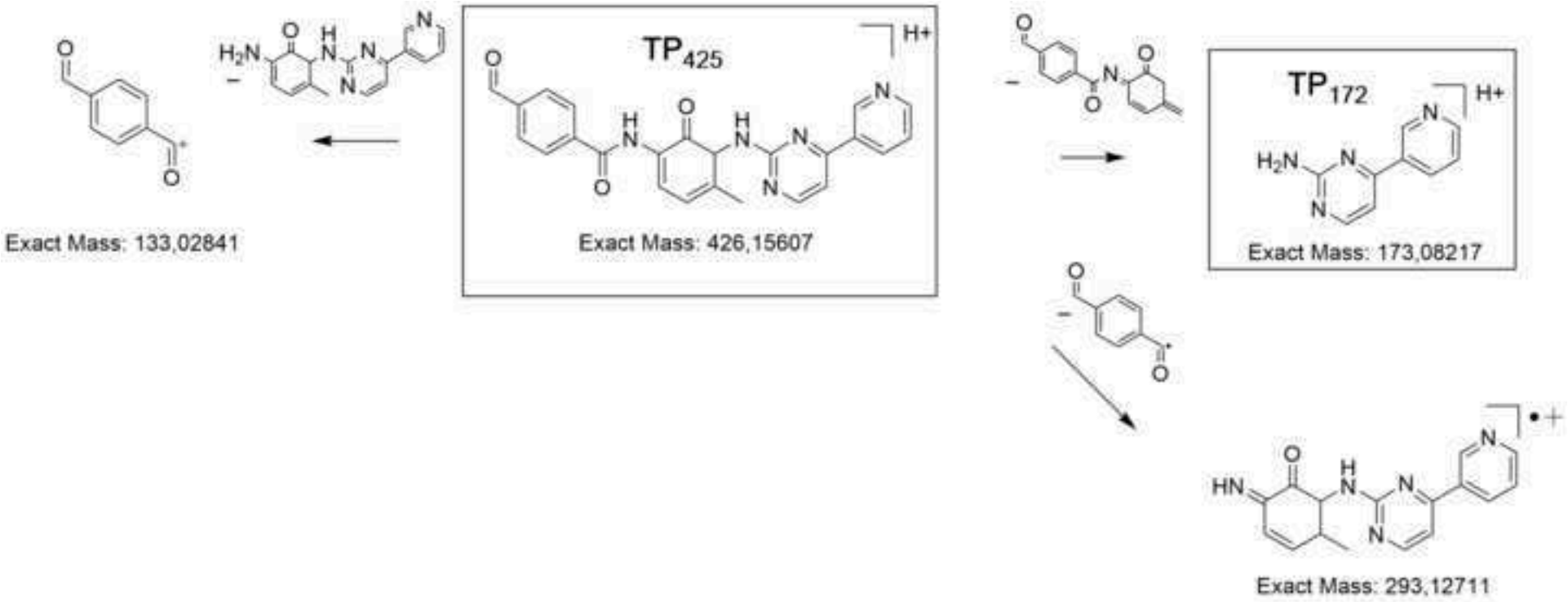


Fig. 6: Proposed fragmentation pattern of protonated TP_{425} et TP_{172}

Figure 7

Click here to download high resolution image

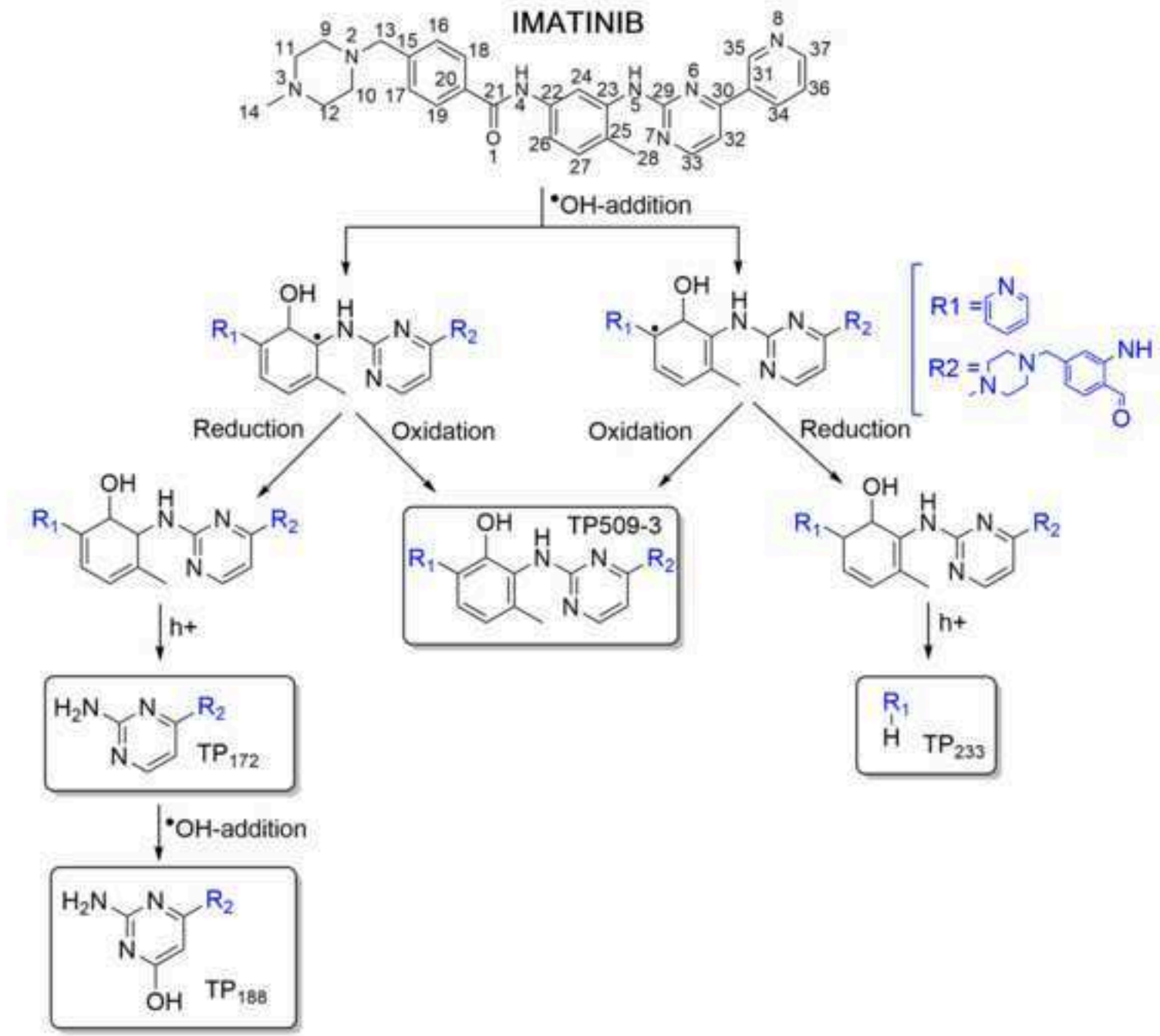


Figure 7: Proposed ˙OH-addition route in the initial reaction of IMA with ˙OH (Pathway 1).

Figure 8
Click here to download high resolution image

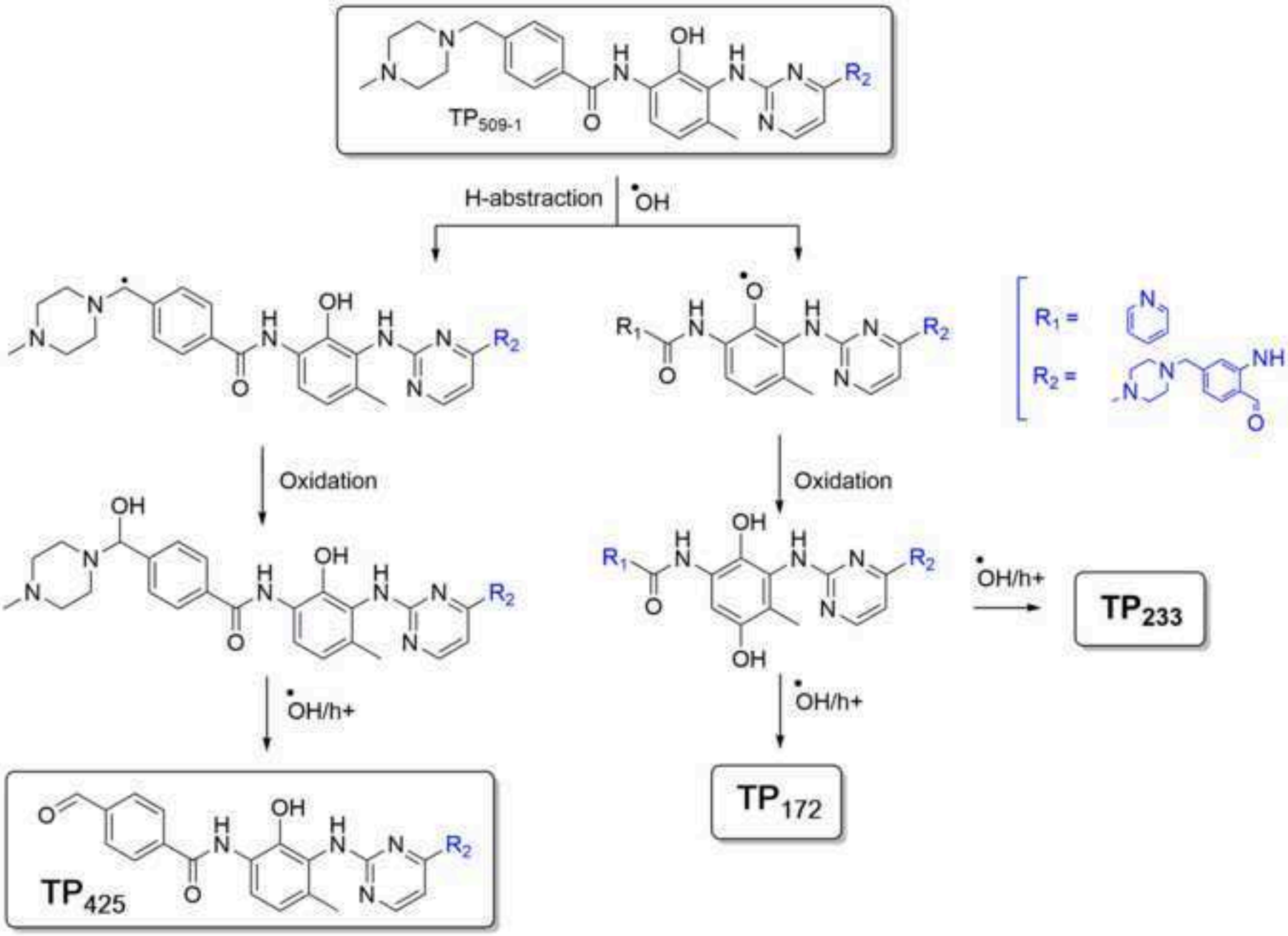


Fig. 8: Proposed degradation pathway of $TP_{509\text{-}1}$.

Figure 9

Click here to download high resolution image

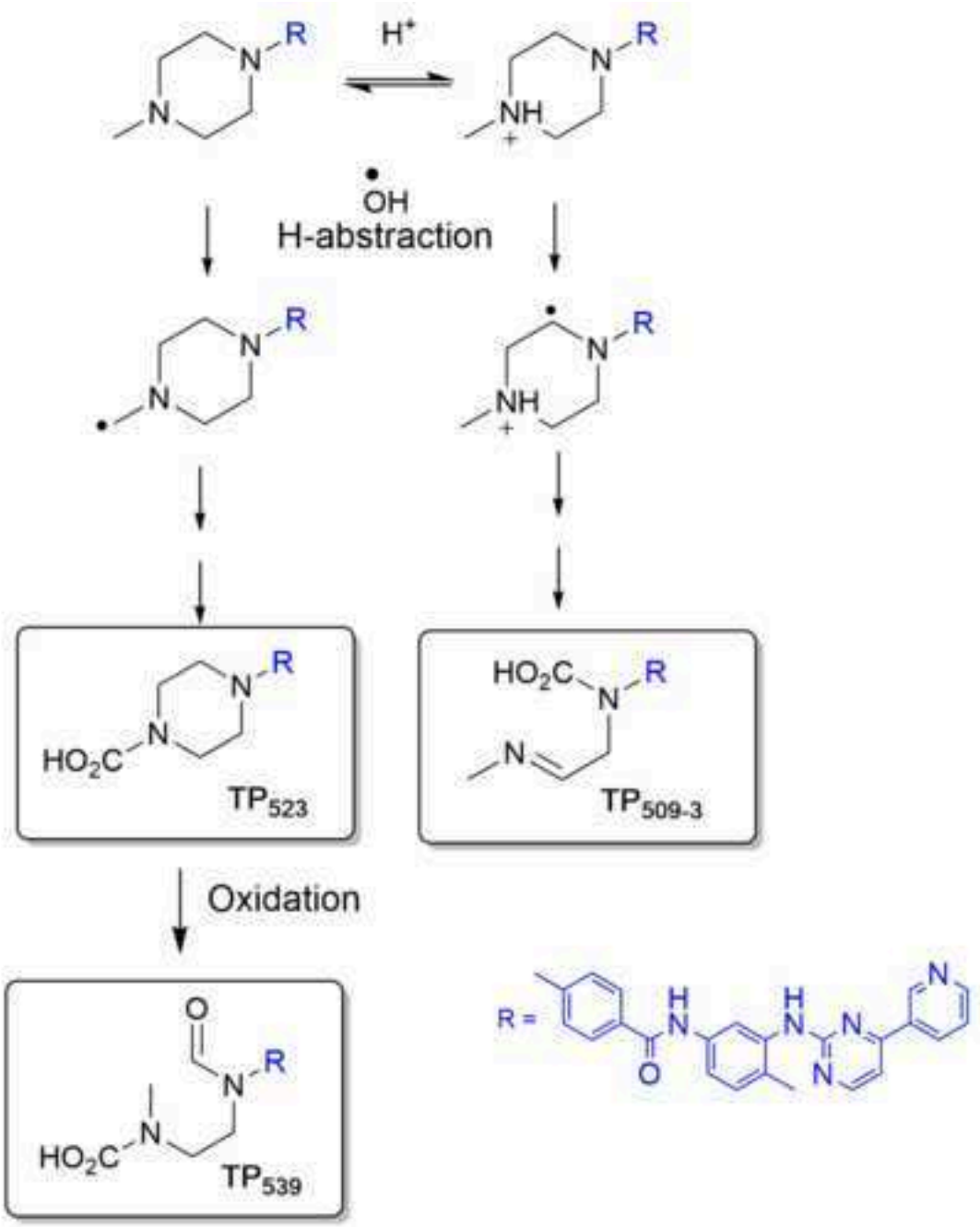


Fig. 9: Proposed H-abstraction route in the initial reaction of IMA with $^{\bullet}OH$ (Pathway 2).

Figure 10

Click here to download high resolution image

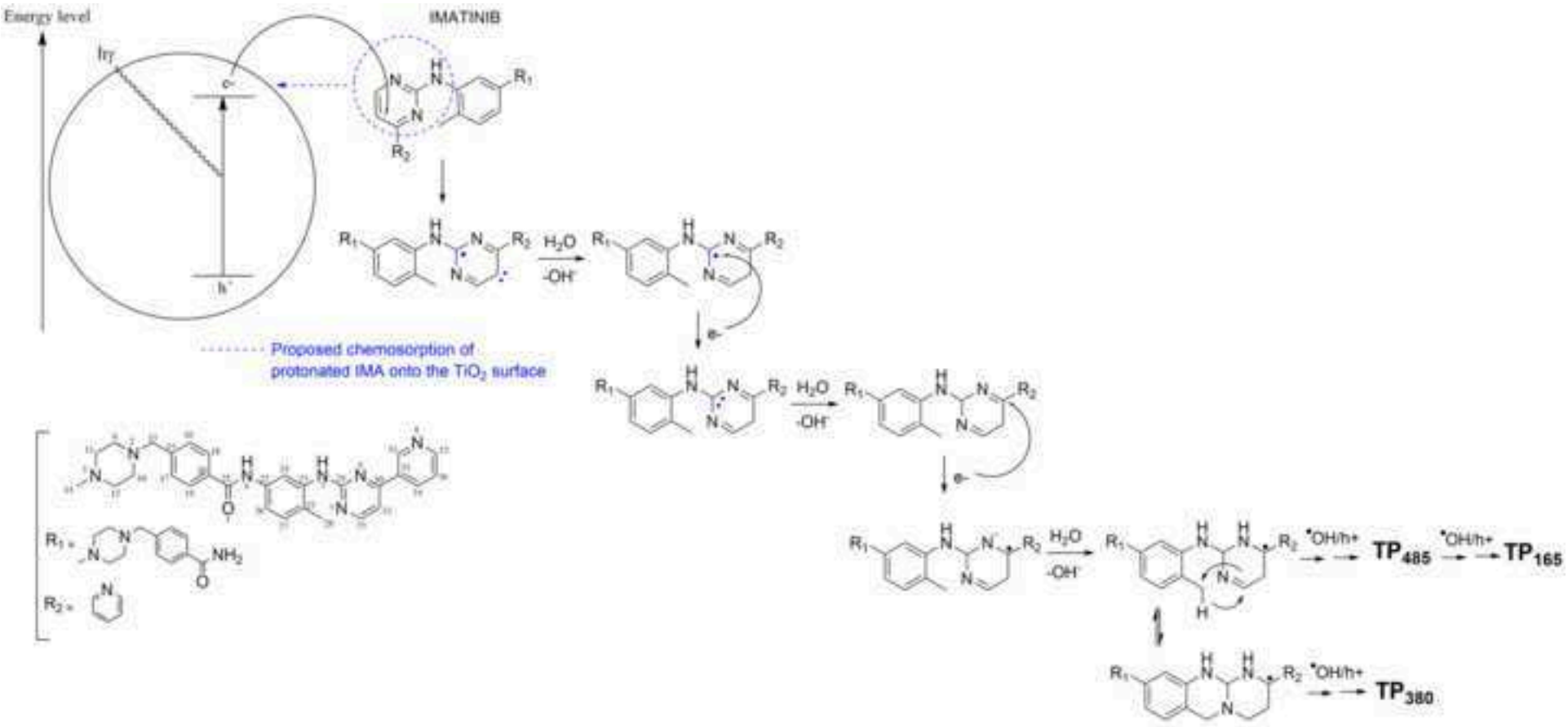


Fig. 10: Proposed single electron transfer route in the initial reaction of IMA with TiO2 (Pathway 3)

Figure 11
Click here to download Figure: Fig 11..pdf

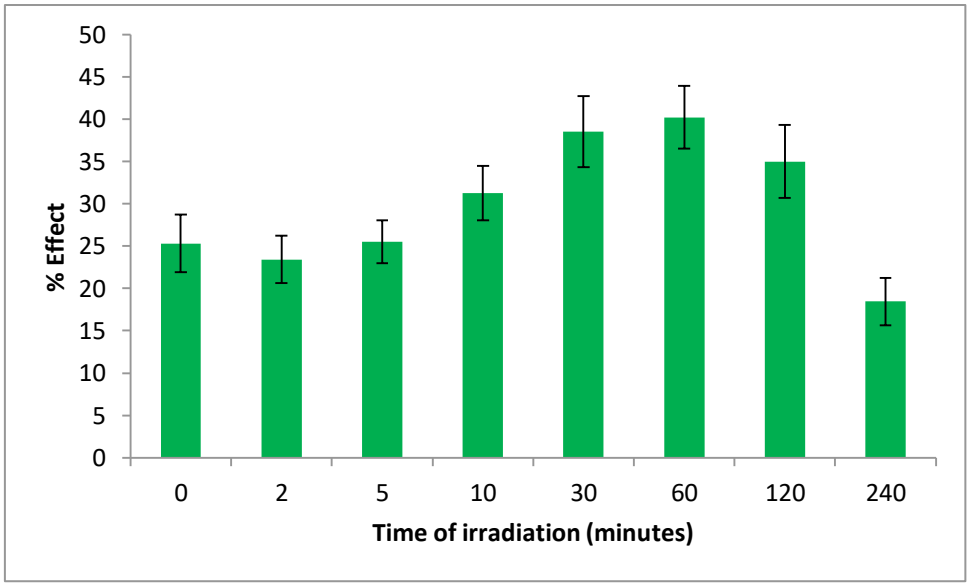


Fig 11: Inhibition of the *V. Fischeri* bioluminescence as a function of the irradiation time

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Titre : caractérisation des processus de dégradation de nouveaux anticoagulants et d'un cytotoxique en milieu aqueux avec évaluation des impacts pharmaceutiques et environnementaux

Mots clés : Médicament, Dégradation, spectrométrie de masse, *ab initio*, *in silico*

Résumé : Au cours de son cycle de vie, le principe actif se retrouve en solution dans différentes situations : dans des formes pharmaceutiques liquides, dans l'organisme et dans les eaux usées. Or, par rapport à l'état solide, la mise en solution du principe actif l'expose davantage à des facteurs susceptibles de conduire à sa dégradation. Les transformations modifient sa structure chimique et donc potentiellement ses activités pharmacologiques et toxicologiques.

L'objectif de ce travail de thèse est de présenter une méthodologie et des études visant à prédire le devenir en solution de principes actifs et les impacts potentiels consécutifs à leur dégradation. Trois principes actifs ont été sélectionnés pour la réalisation de ce travail. Ils ont en commun de présenter, d'une part, une activité pharmacologique élevée corrélée à une toxicité potentielle de leurs produits de dégradation et, d'autre part, l'absence de données sur leurs comportements en solution. Dans tous les cas, bien que le contexte soit singulier pour chaque molécule, l'approche méthodologique suivie intègre aussi bien des travaux expérimentaux que des études *ab initio* et *in silico*.

La première étude porte sur le devenir de l'apixaban, principe actif actuellement commercialisé sous forme orale solide, en solution aqueuse. Les données expérimentales ont mis en évidence des groupements chimiques du principe actif pouvant contribuer à son instabilité. L'approche *ab initio* a permis d'expliquer la régio-spécificité de la réaction d'hydrolyse dépendamment du pH. À partir de la structure des produits de dégradation caractérisés, l'étude de leur potentiel toxique a été réalisée par approche in silico. Ces données concourent à la démarche d'analyse et évaluation des risques déployée lors de développements de formes pharmaceutiques liquides ou des situations particulières impliquant la mise en solution de l'apixaban au moment de l'administration.

De telles approches ont également été employées pour caractériser les mécanismes de photodégradation de l'argatroban et évaluer le potentiel toxique des produits de dégradation. Les processus initiant la photodégradation ont fait l'objet d'études complémentaires reposant sur des calculs d'énergies. Ces connaissances pourront apporter le rationnel nécessaire au choix de procédés capables de réduire la photodégradation de l'argatroban et son impact sur les patients. Elles pourront également servir à anticiper les situations d'écarts pouvant mettre en jeu le rapport bénéfice risque du médicament tels que le mésusage ou la modification de la forme pharmaceutique administrée.

Enfin, dans un contexte autre que le contexte pharmaceutique, une étude de dégradation du pémétrexed par photocatalyse via un procédé d'oxydation avancée a été réalisée. Il s'agit d'un procédé particulièrement étudié pour sa capacité à réduire l'empreinte environnementale de composés organiques en accélérant leur dégradation. Le choix de ce principe actif utilisé comme anticancéreux a été justifié par son caractère toxique et rémanent dans les eaux de surface, ce qui en fait un produit à haut risque environnemental. Ce travail a montré que des produits de plus faible masse résultant de la transformation photocatalytique du pémétrexed sont malheureusement plus toxiques et encore plus rémanents que la molécule mère elle-même. Ces résultats contribuent donc à souligner que les procédés d'oxydation avancée, bien qu'efficaces pour l'élimination des polluants médicamenteux, sont à évaluer au regard de l'existence d'un risque accru pour l'environnement avant toute perspective d'utilisation à grande échelle.

Les approches et les résultats présentés dans cette thèse pourront être employés pour d'autres études visant à prédire, prévenir et réduire l'impact de la dégradation du principe actif sur le patient et l'environnement.

Title : characterization of the degradation process of new anticoagulants and cytotoxic drugs in aqueous media and assessment of pharmaceutical and environmental impacts

Keywords : Drug, degradation, mass spectrometry, *ab initio*, *in silico*

Abstract : During its life cycle, an active substance is in solution for various reasons: in a liquid pharmaceutical form, in the body and in wastewater. However, compared to the solid state, the active substance in solution exposes it more to factors likely to cause its degradation. The transformations modify its chemical structure and thus potentially its pharmacological and toxicological activities.

The objective of this thesis is to present a methodology and studies aiming to predict the fate in solution of active substances and the potential impacts following their degradation.Three active ingredients have been selected for this work. They have in common, on the one hand, a high pharmacological activity correlated to a potential toxicity of their degradation products and, on the other hand, the fact that there is little information on their behaviour in solution. In all cases, although the context is specific to each molecule, the methodological approach followed integrates both experimental work and ab initio and in silico studies.

The first study concerns the fate of apixaban, an active substance currently marketed in solid oral form, in aqueous solutions. The experimental data made it possible to highlight chemical groups of the active ingredient that could contribute to its own instability. The *ab initio* approach explained the regio-specificity of the hydrolysis reaction as a function of pH. Based on the structure of the characterized degradation products, their toxic potential was studied using an in silico approach. These data contribute to the risk analysis and evaluation process deployed at different stages of development of liquid pharmaceutical forms or in particular situations involving the solution of apixaban at the time of administration.

Such approaches have also been used to characterize the photodegradation mechanisms of argatroban and assess the toxic potential of degradation products. The processes that initiate photodegradation were also addressed by calculating the energies potentially involved. This knowledge provides a rational basis for the choice of processes and formulations to limit photodegradation of argatroban and its impact on patients. They also make it possible to anticipate situations where the benefit/risk ratio of the medicinal product may be modified, such as incorrect handling or modification of the pharmaceutical form administered.

Finally, in a context other than the pharmaceutical context, a study of degradation of pemetrexed by photocatalysis via an advanced oxidation process was carried out. This process is particularly studied for its ability to reduce the environmental footprint of organic compounds by accelerating their degradation. The choice of this active substance as an anti-cancer agent was justified by its toxic and persistent nature in surface waters, making it a product with a high environmental risk. This work has shown that products of lower mass produced by photocatalytic transformation of pemetrexed are unfortunately more toxic and even more persistent than the parent molecule itself. These results underline the fact that advanced oxidation processes, although effective in removing drug pollutants, must be evaluated because of an increased risk to the environment before any prospect of large-scale use.

The approaches and results presented in this thesis can be used for other studies to predict, prevent and reduce the impact of active ingredient degradation on the patient and the environment.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France