

Développement méthodologique pour la quantification d'un composé pharmaceutique, le Furosémide, ainsi que ses produits de dégradation dans les boues de station de traitement des eaux usées

Présenté par Alfred NGUYEN

Maître de stage : Laure GARRIGUE-ANTAR

Encadrants de stage : Fidji SANDRÉ, Émilie CAUPOS, Emmanuelle MEBOLD, Chandirane PARTIBANE

Plan de présentation

- I. Présentation du sujet
- II. Matériel et méthodes
- III. Résultats et discussion
- IV. Conclusion
- V. Perspectives

I. Présentation du sujet

- Présence de **micropolluants** nombreux et variés dans l'environnement
- **Composés pharmaceutiques** présents dans les eaux usées car peu abattus par les Stations de Traitement des Eaux Usées (STEU)
- Produits de dégradation mal caractérisés
- Impact potentiel sur la **santé humaine** et sur les **écosystèmes**

*Station de traitement des eaux usées de
Seine Amont à Valenton (Val-de-Marne)*

www.siaap.fr

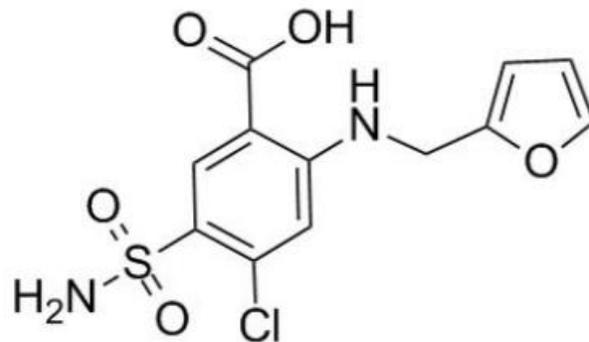


I. Présentation du sujet

Parmi ces composés pharmaceutiques :

- Le **Furosémide**, diurétique courant, se retrouve dans les eaux de surface (jusqu'à la centaine de ng/L dans les rivières)⁽¹⁾

Furosémide



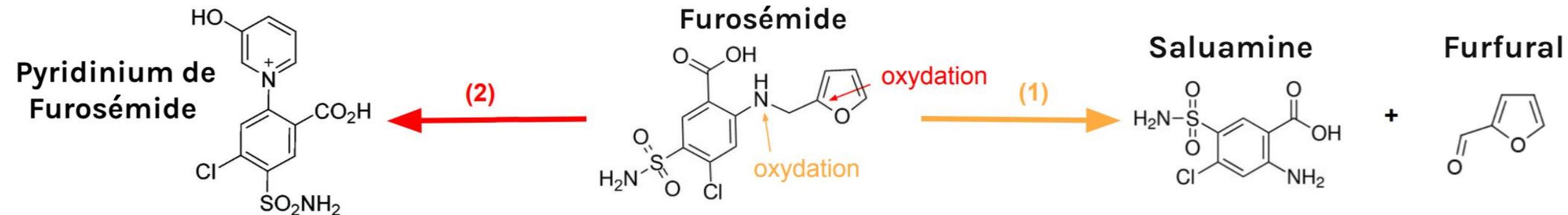
⁽¹⁾(Calamari et al., 2003, Valcárcel et al., 2011)

I. Présentation du sujet

Parmi ces composés pharmaceutiques :

- Le **Furosémide**, diurétique courant, se retrouve dans les eaux de surface (jusqu'à la centaine de ng/L dans les rivières)⁽¹⁾

Ses produits de dégradation sont :



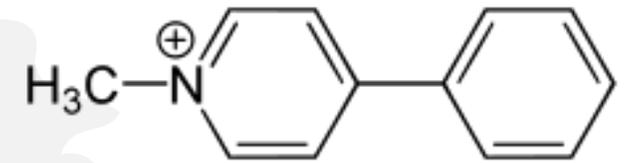
Transformation du Furosémide en ses produits de dégradation

⁽¹⁾(Calamari et al., 2003, Valcárcel et al., 2011)

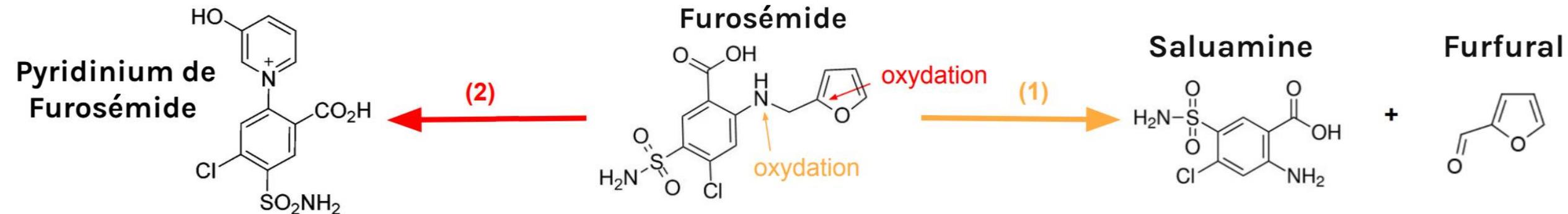
I. Présentation du sujet

Parmi ces composés pharmaceutiques :

- Le **Furosémide**, diurétique courant, se retrouve dans les eaux de surface (jusqu'à la centaine de ng/L dans les rivières)⁽¹⁾
- Au LEESU, Pyridinium de Furosémide capable d'induire les marqueurs de la maladie de Parkinson chez les rongeurs à forte dose⁽²⁾
- Peu de données toxicologiques sur les trois produits de dégradation



Formule du pyridinium d'1-méthyl-4-phényl ou MPP+



Transformation du Furosémide en ses produits de dégradation

⁽¹⁾(Calamari et al., 2003, Valcárcel et al., 2011) ⁽²⁾(Laurencé et al, 2019)

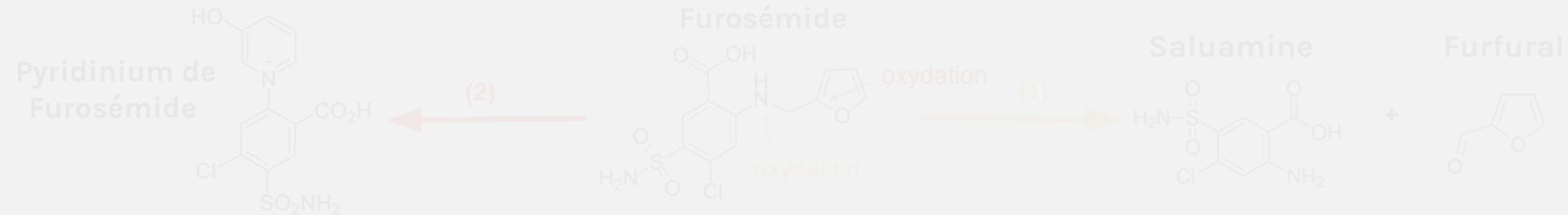
I. Présentation du sujet

- Présence de micropolluants nombreux et variés dans l'environnement
- Les résidus de médicaments dans les eaux usées et peu abattus par les Stations de Traitement des Eaux Usées (STEU).
- Impact potentiel sur la santé humaine et sur les écosystèmes
- Le Furosémide, diurétique courant, se retrouve dans les eaux de surface (jusqu'à la centaine de ng/L dans les rivières)⁽¹⁾
- Au LEESU, pyridinium de Furosémide capable d'induire les marqueurs de la maladie de Parkinson chez les rongeurs à forte dose⁽²⁾
- Peu de données toxicologiques sur les trois produits de dégradation



Formule du pyridinium d'1-méthyl-4-phényl ou MPP+

Quelles sont les concentrations environnementales ?



Transformation du Furosémide en ses produits de dégradation

⁽¹⁾(Colamari et al., 2003, Valcárcel et al., 2011) ⁽²⁾(Laurencé et al., 2019)

II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse

Pour des échantillons de matrice solide :

EXTRACTION

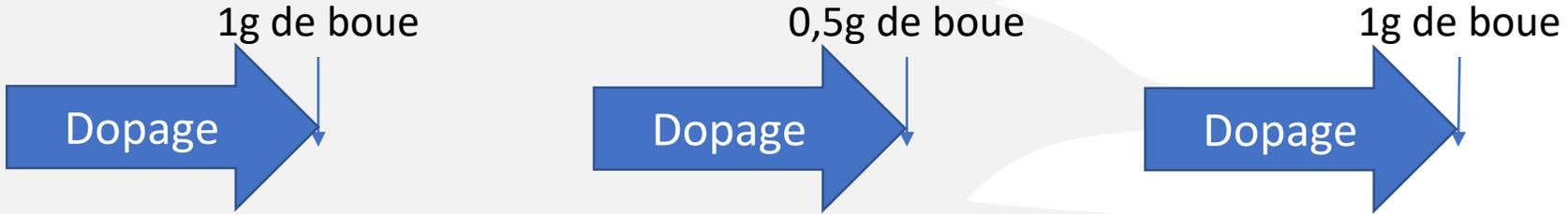
Ultrasons

Micro-ondes

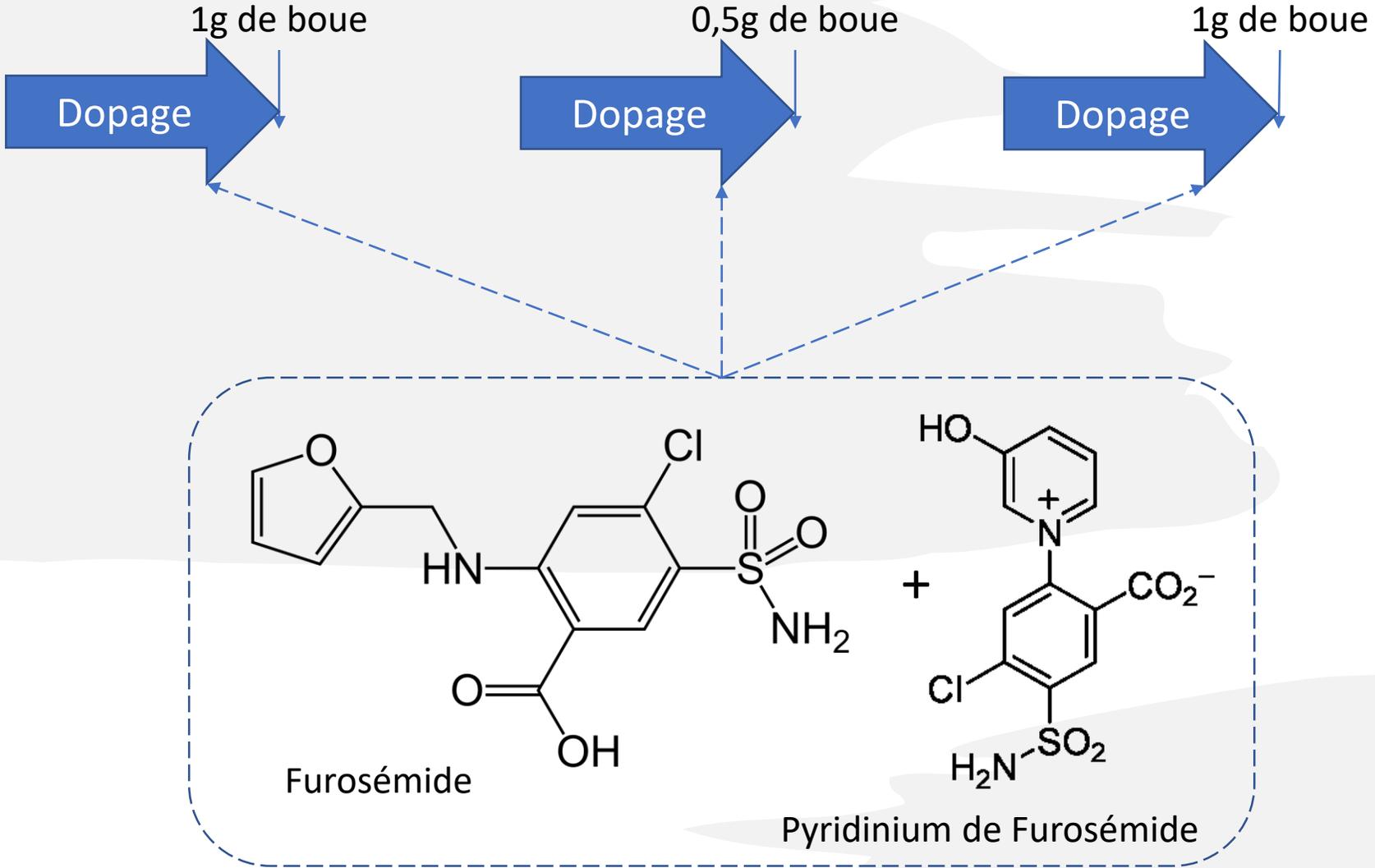
PSE

*Pressurized Solvent Extraction

II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse

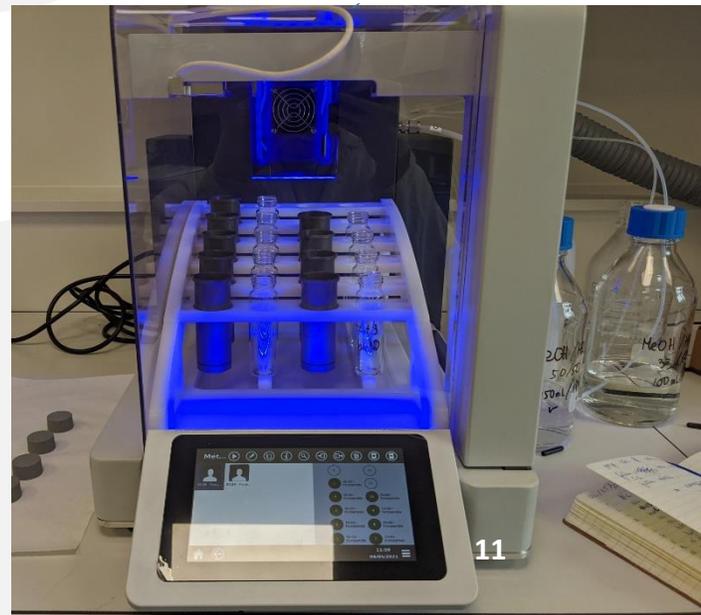
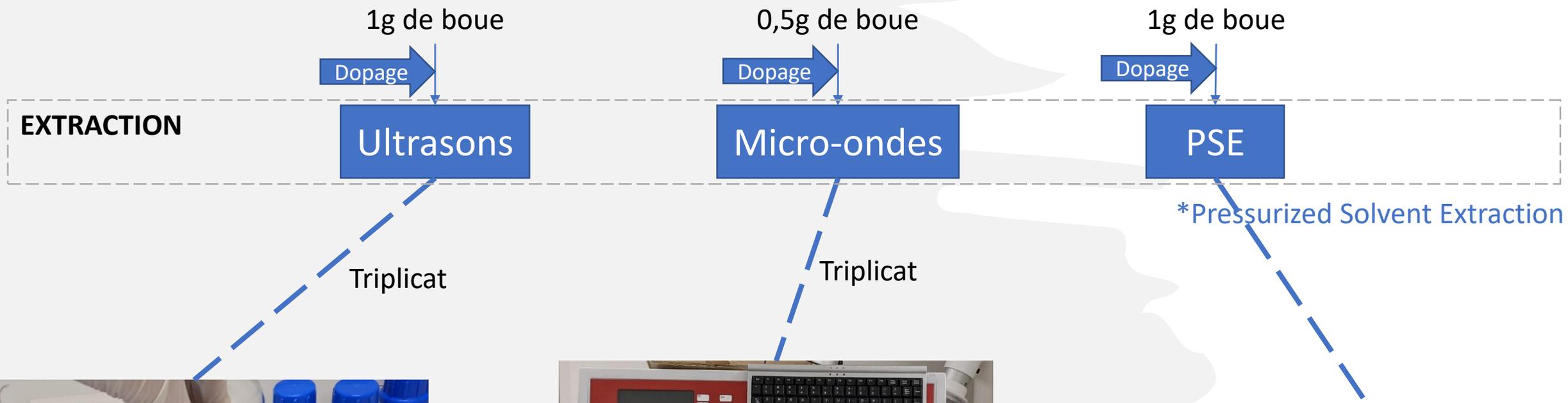


II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse

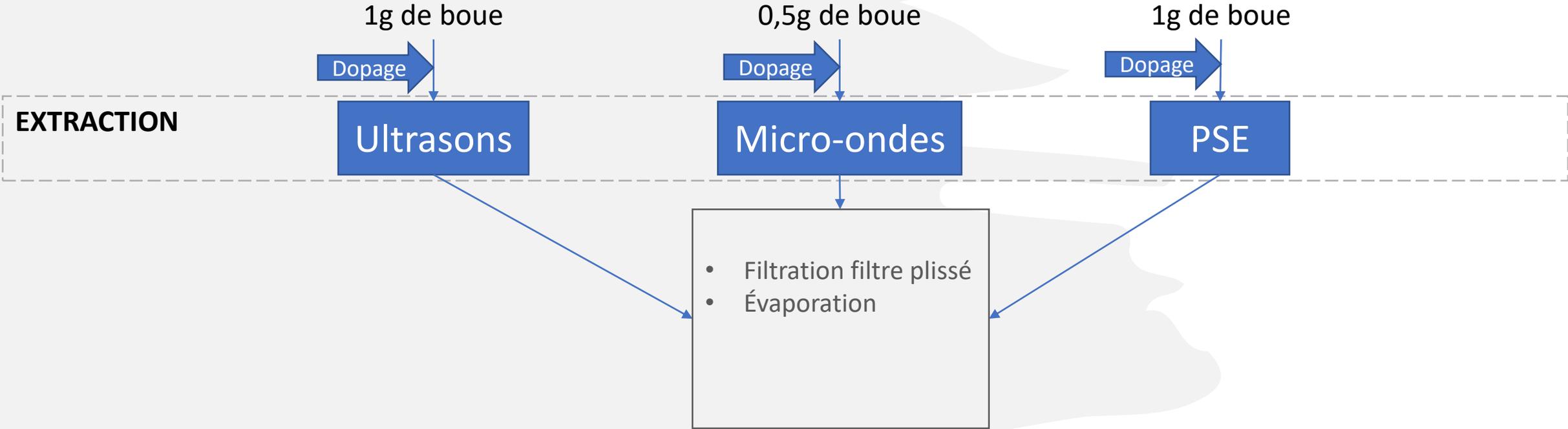


Dopage de **200 ng** de Furosémide et Pyridinium de Furosémide chacun

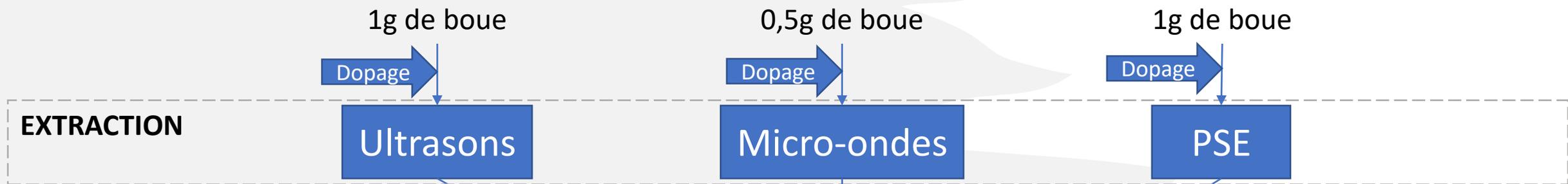
II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



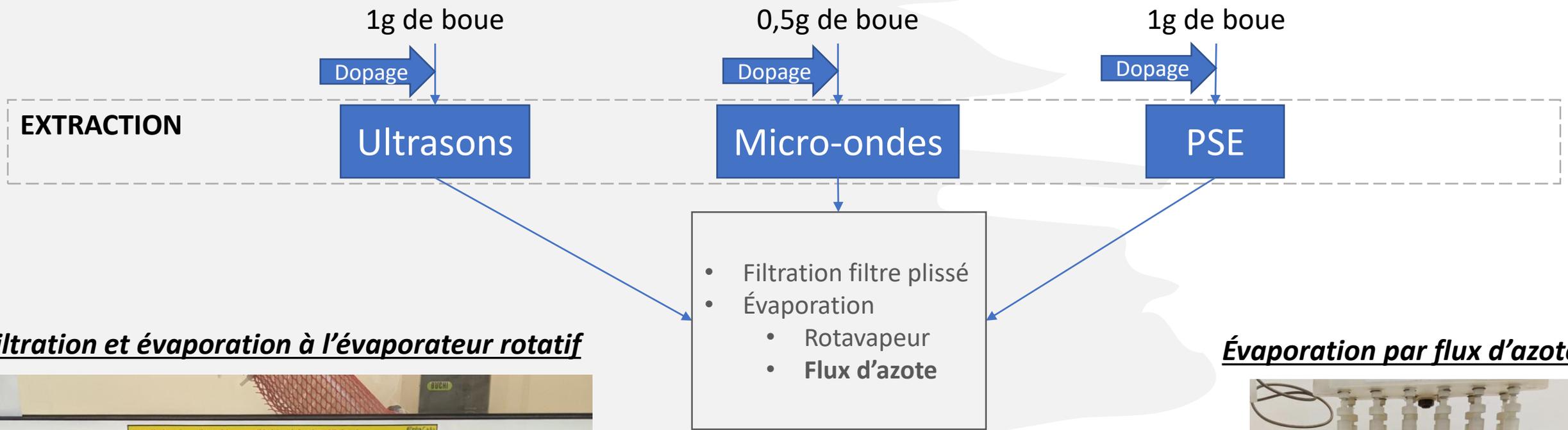
II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



Filtration et évaporation à l'évaporateur rotatif



II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



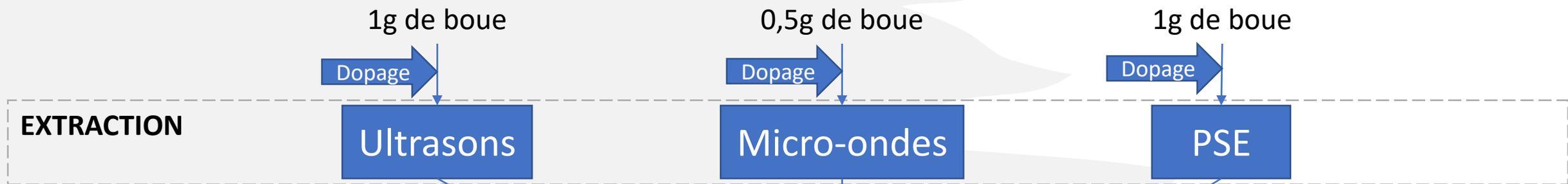
Filtration et évaporation à l'évaporateur rotatif



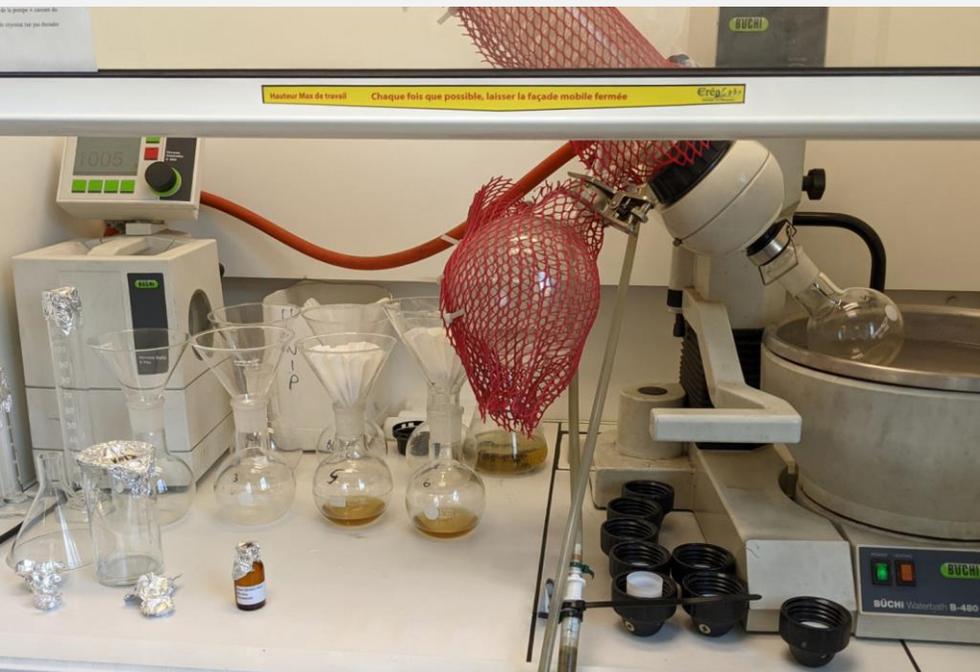
Évaporation par flux d'azote



II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



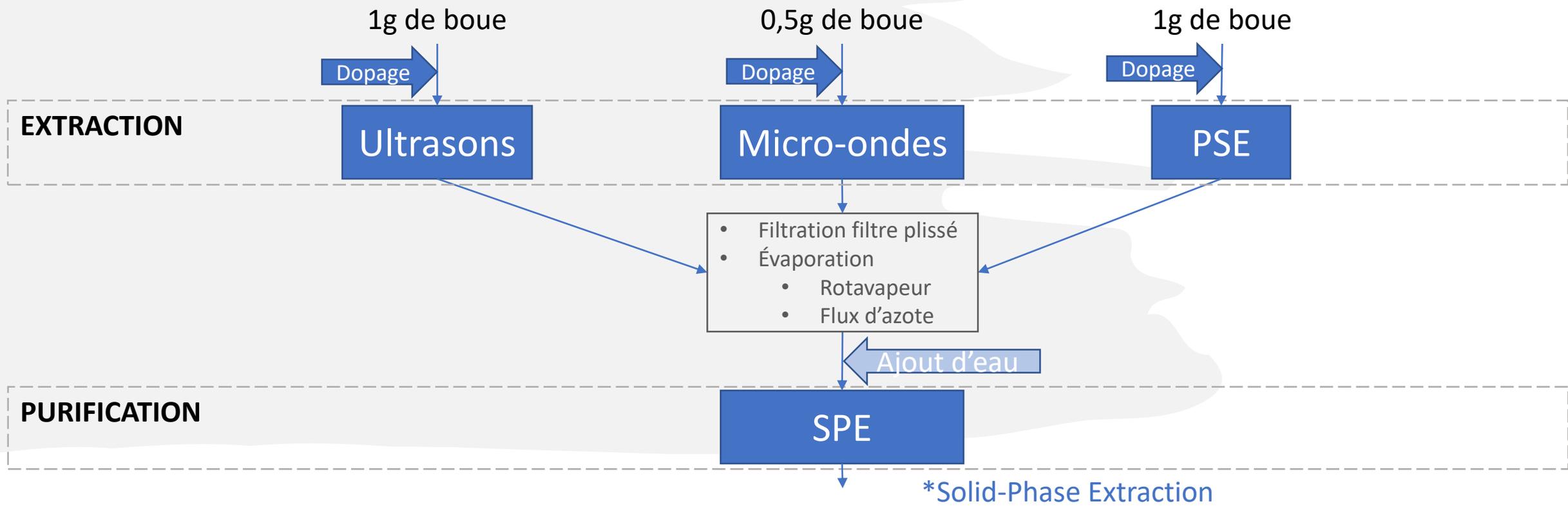
Filtration et évaporation à l'évaporateur rotatif



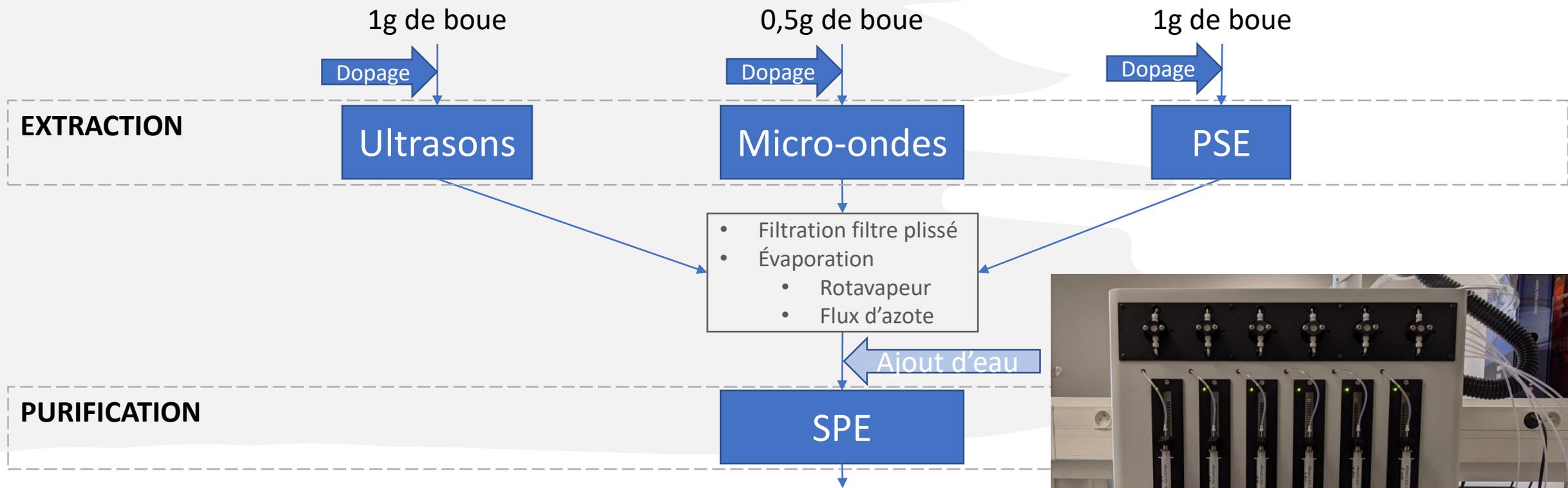
Évaporation par flux d'azote



II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse

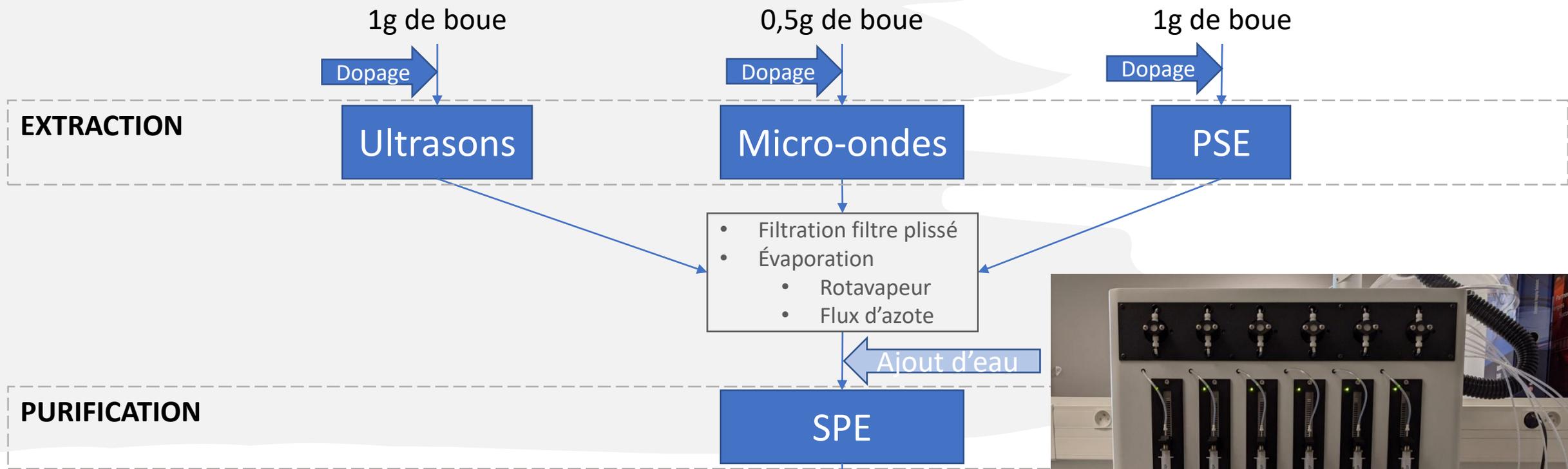


II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



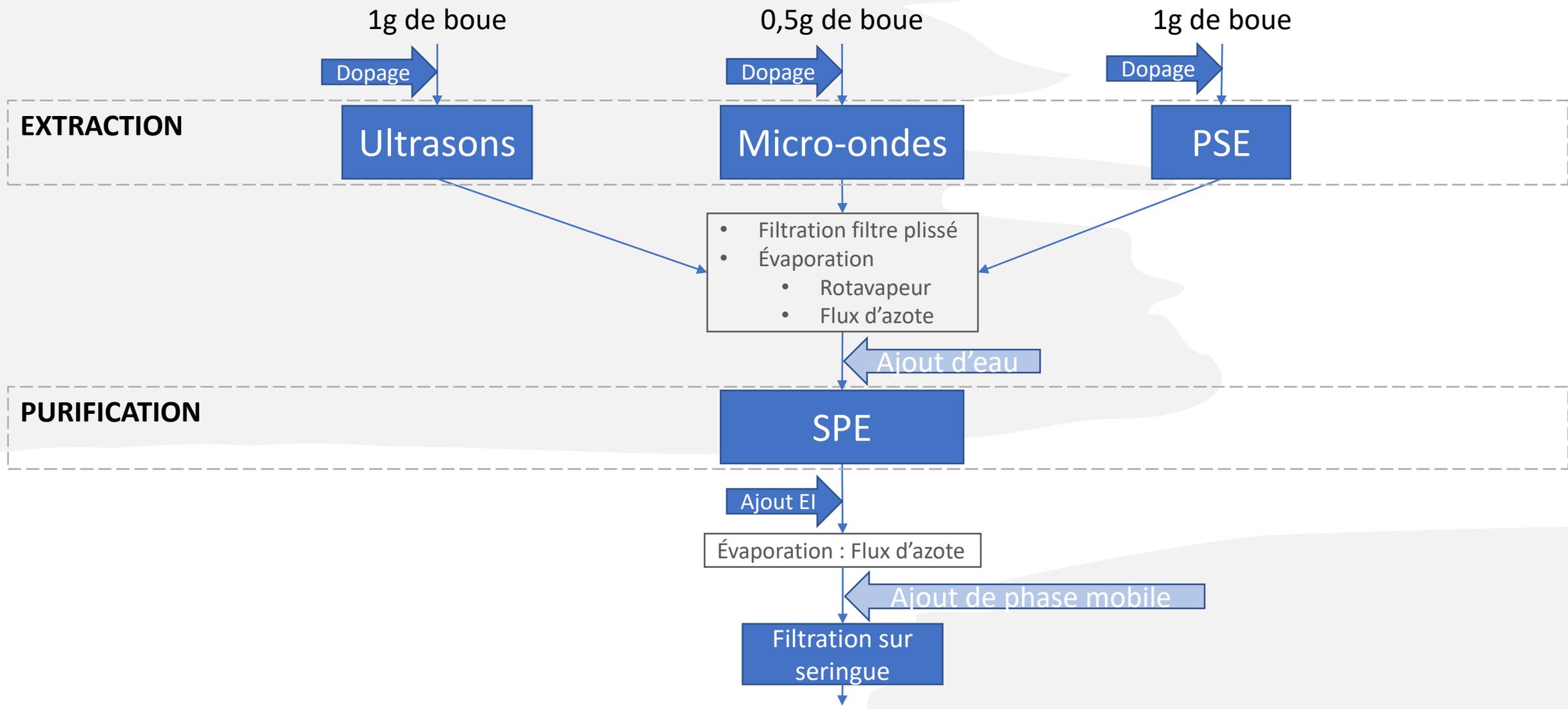
Appareil de purification pour une SPE

II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse

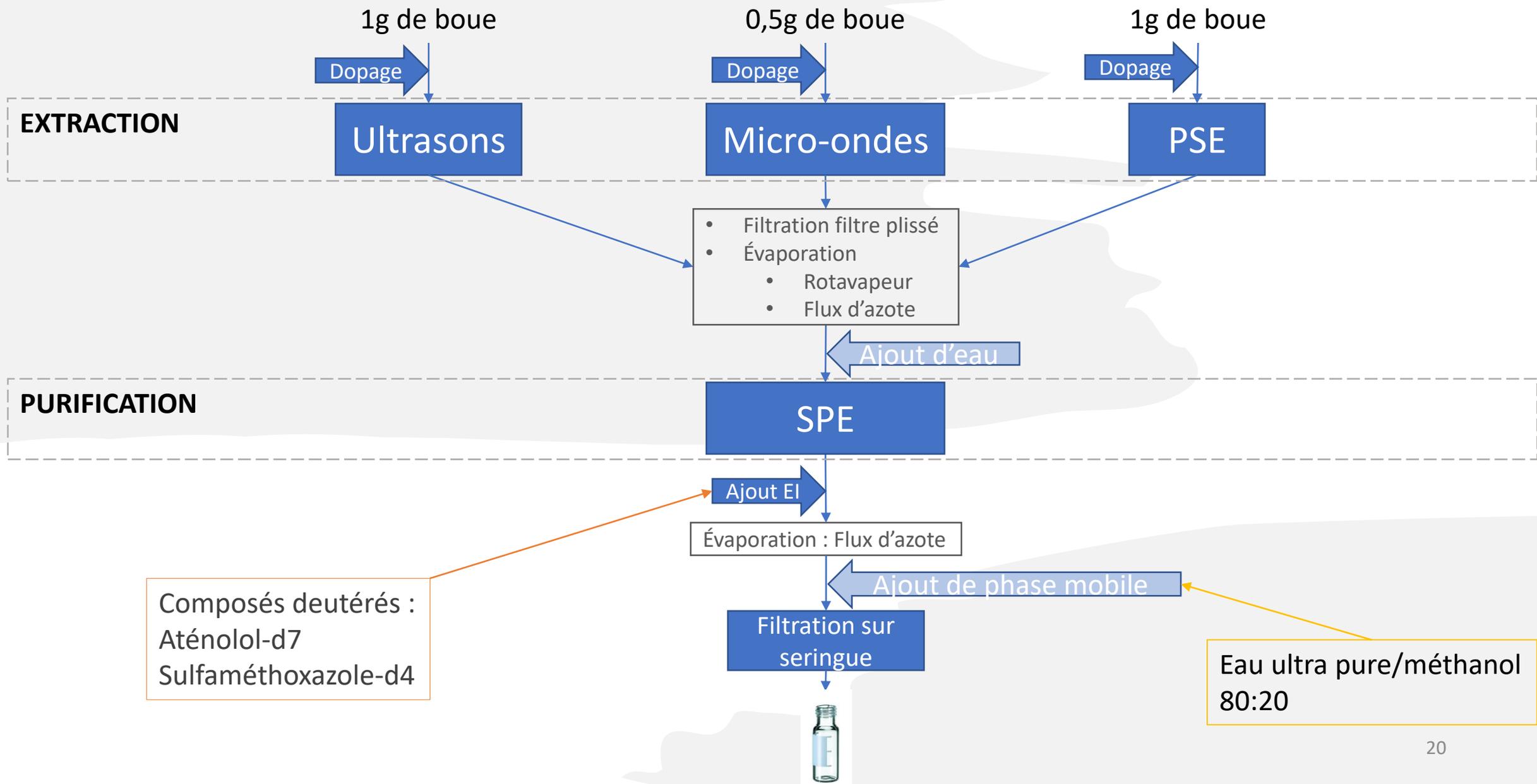


Appareil de purification pour une SPE

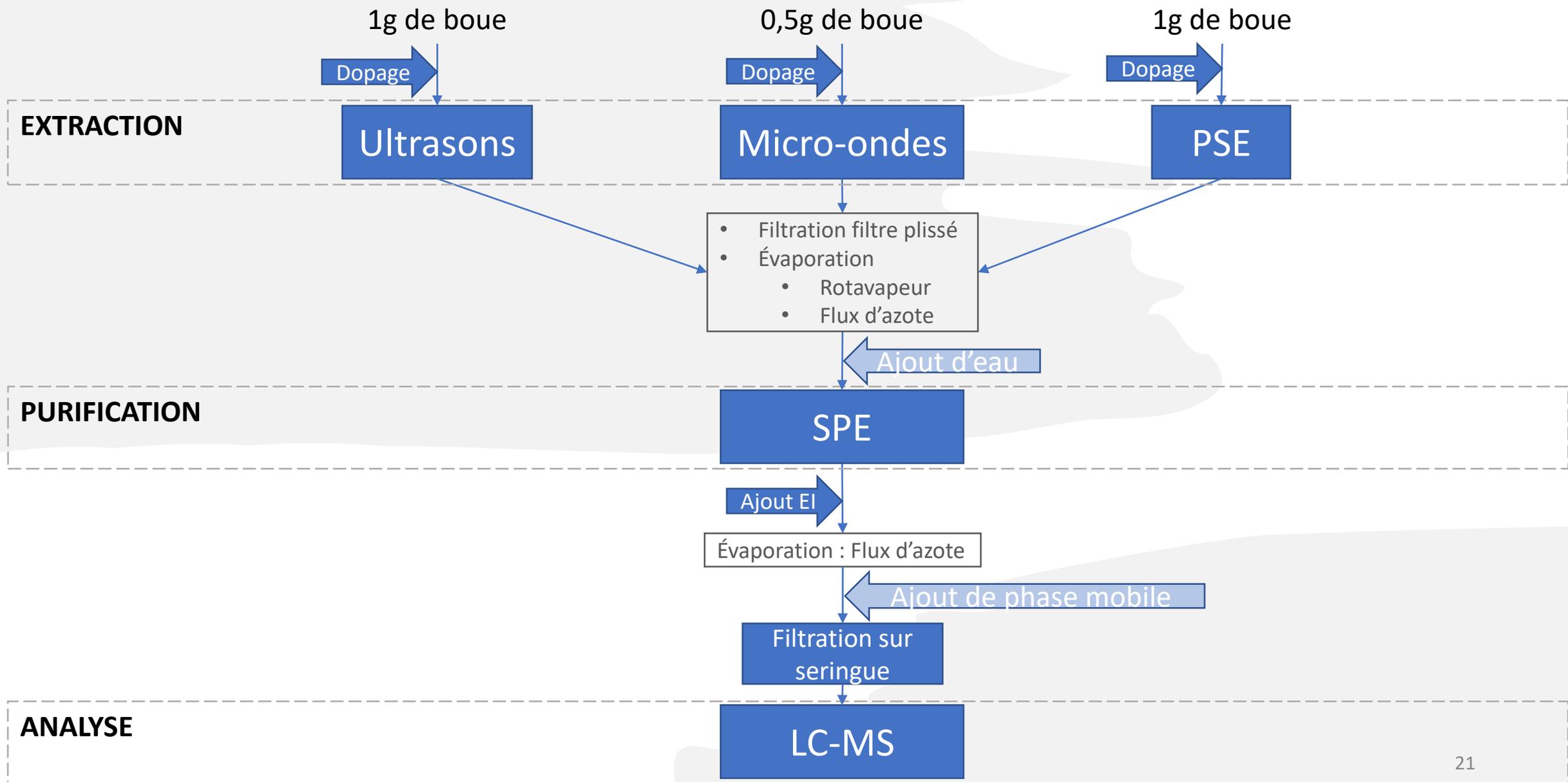
II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse



II. Matériel et méthodes : Extraction, Purification et Analyse

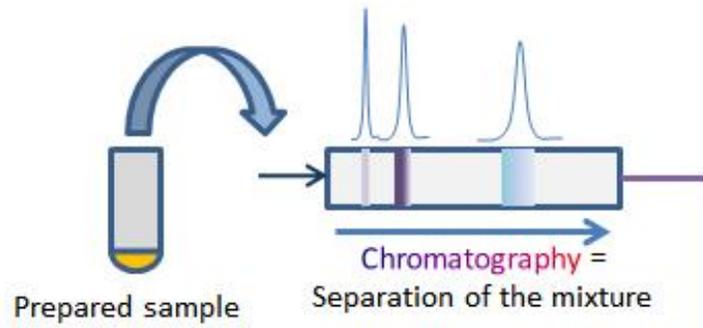


II. Matériel et méthodes :

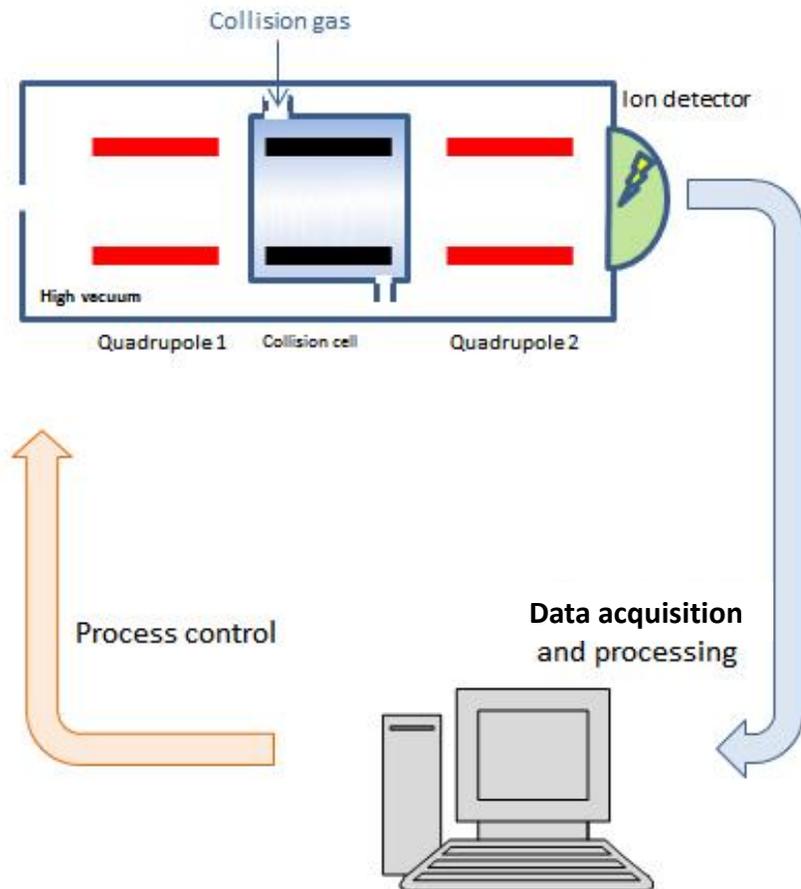
Analyse en Chromatographie Liquide et Spectrométrie de Masse (LC-MS)

- Les analytes sont **organiques, faiblement apolaires** et facilement **solubles dans les solvants courants**

LC:



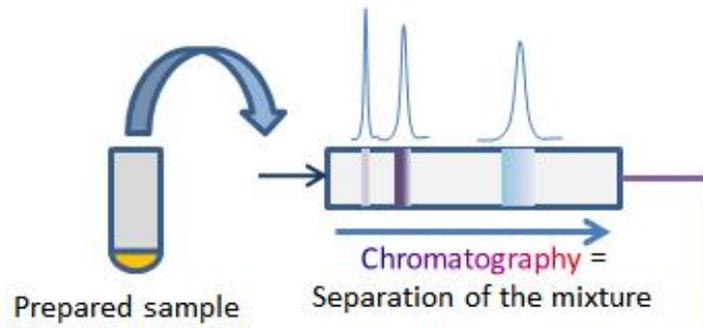
MS/MS:



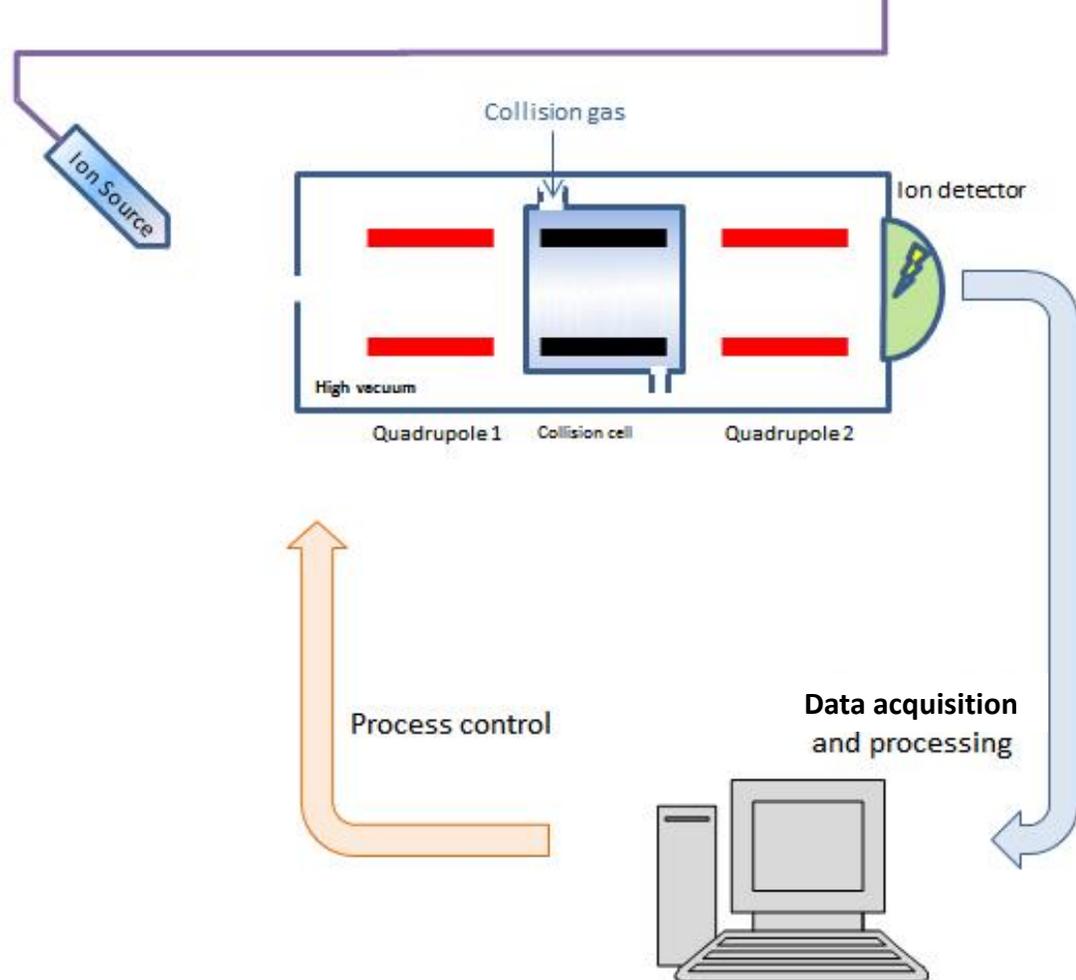
Appareil de LC-MS

III. Résultats et discussion : Analyse en Chromatographie Liquide (LC)

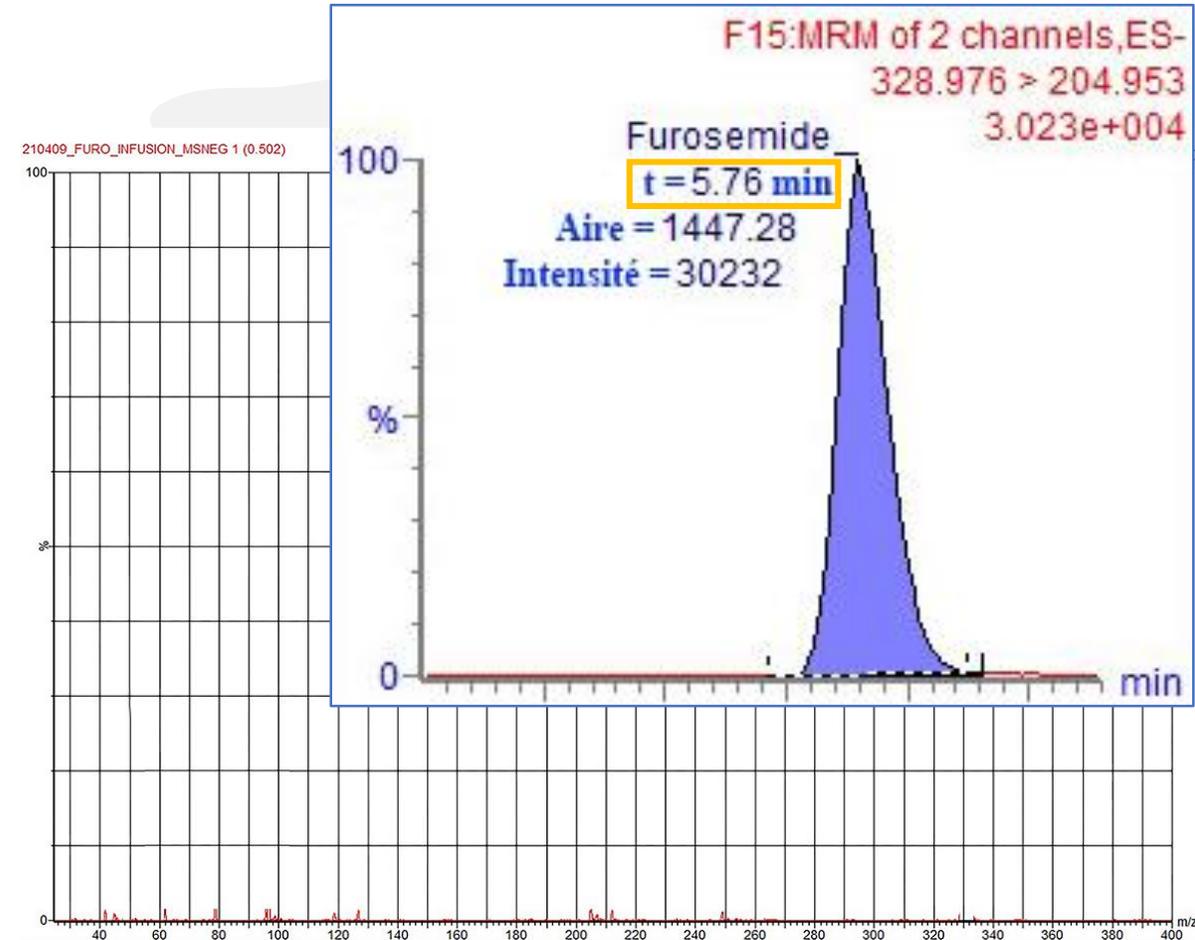
LC:



MS/MS:

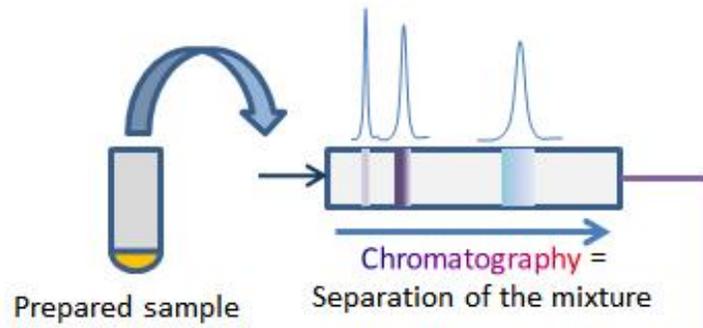


Exemple du Furosémide

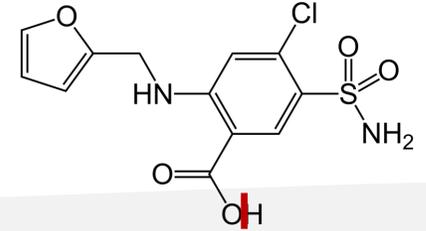


III. Résultats et discussion : Infusion en Spectrométrie de Masse (MS)

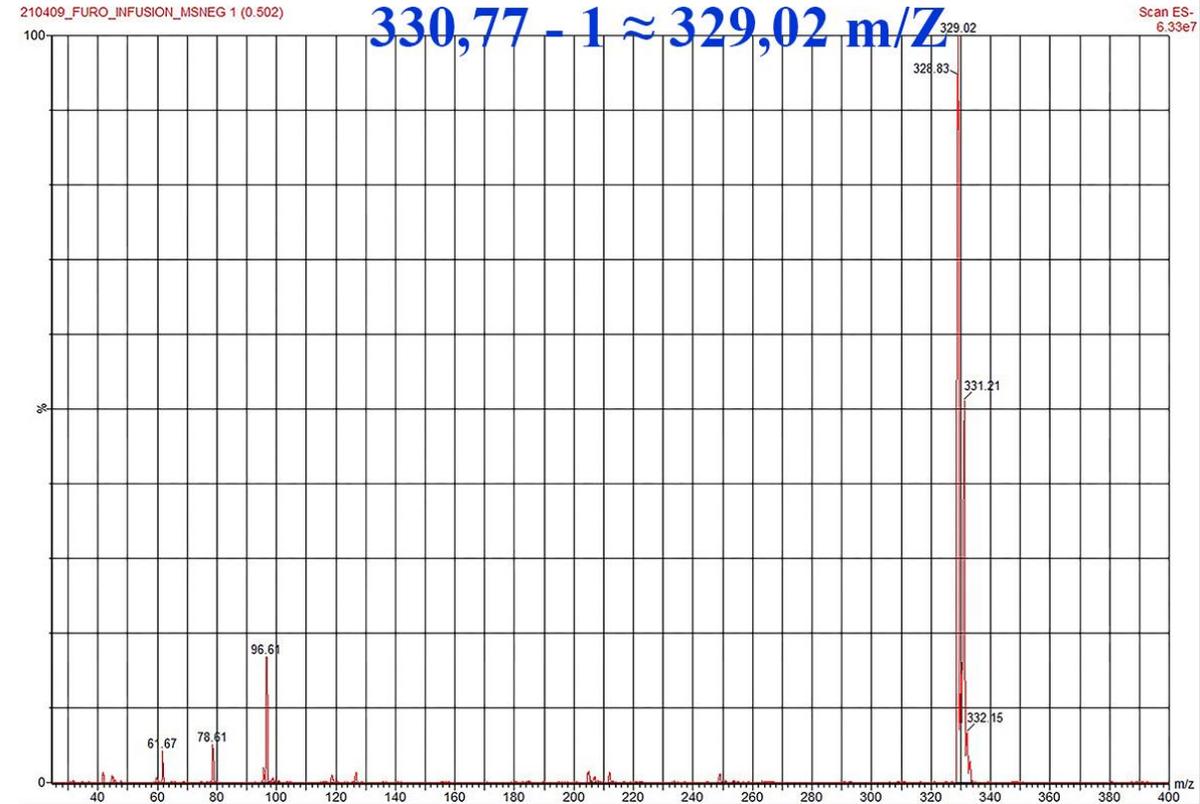
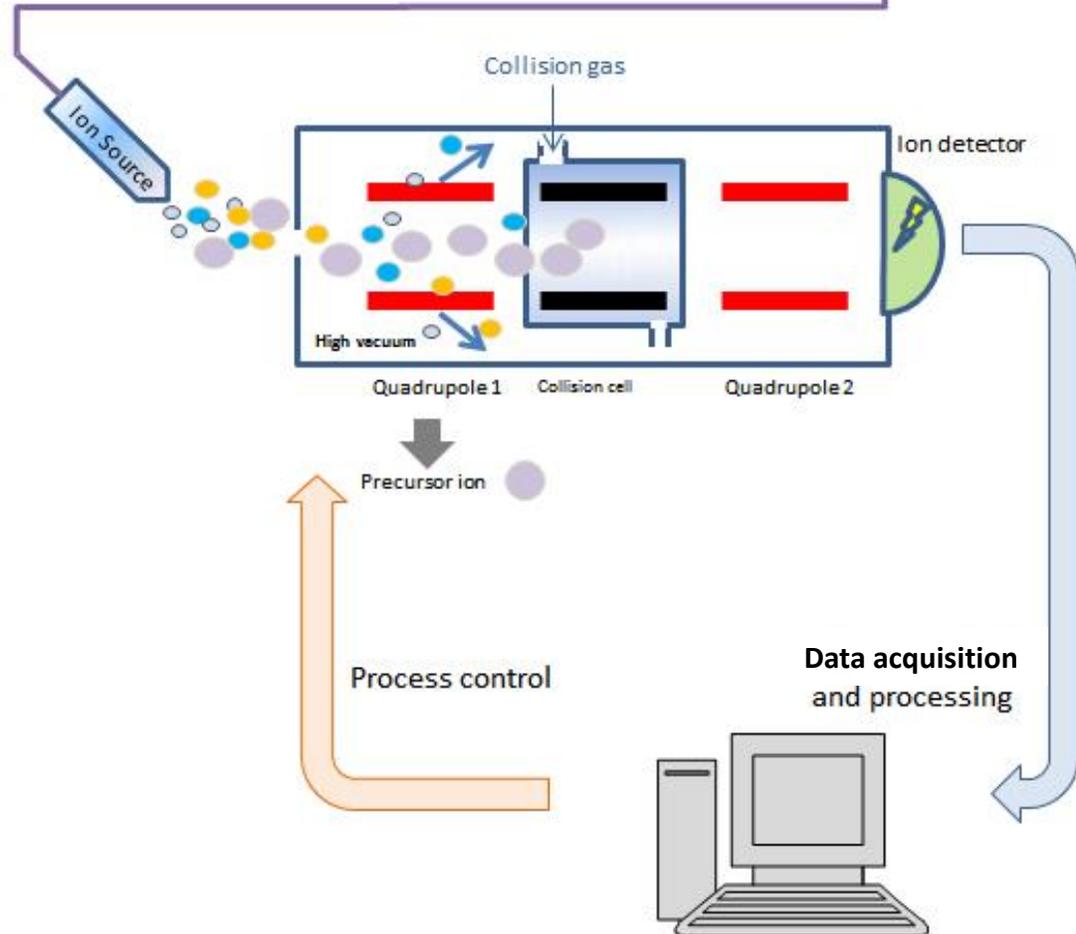
LC:



Pour le Furosémide

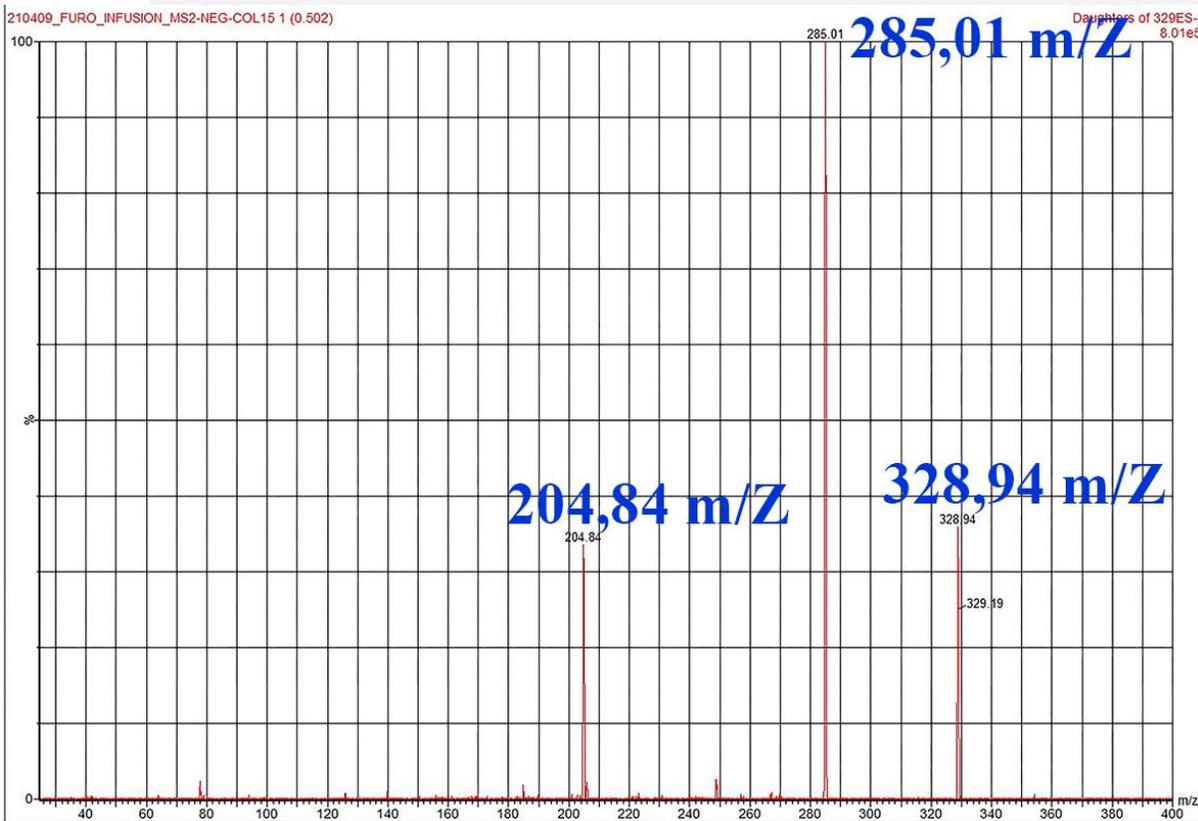
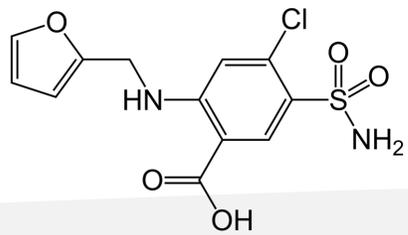


MS/MS:

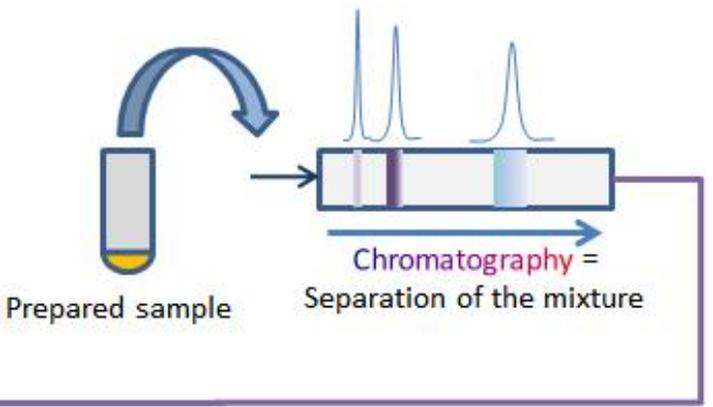


III. Résultats et discussion : Infusion en Spectrométrie de Masse en tandem (MS/MS)

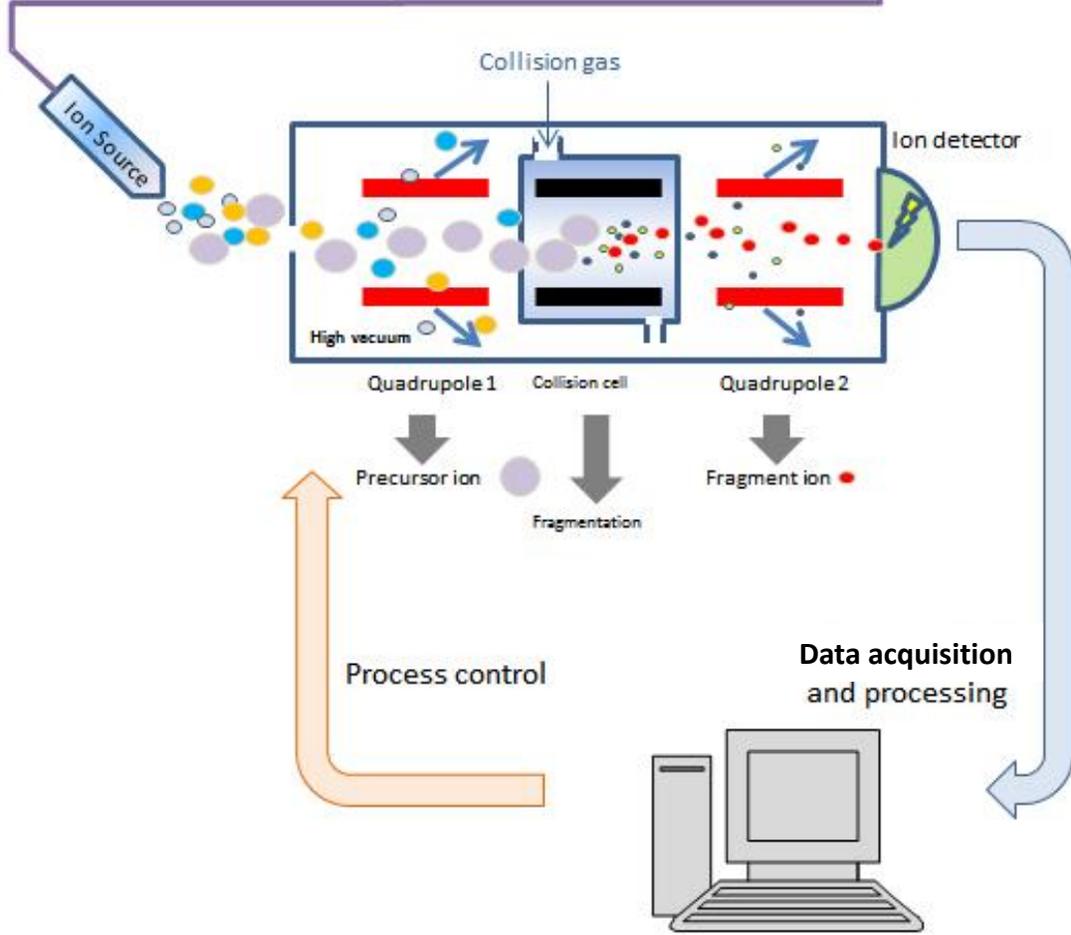
Pour le Furosémide



LC:



MS/MS:



III. Résultats et discussion :

Analyse en LC-MS

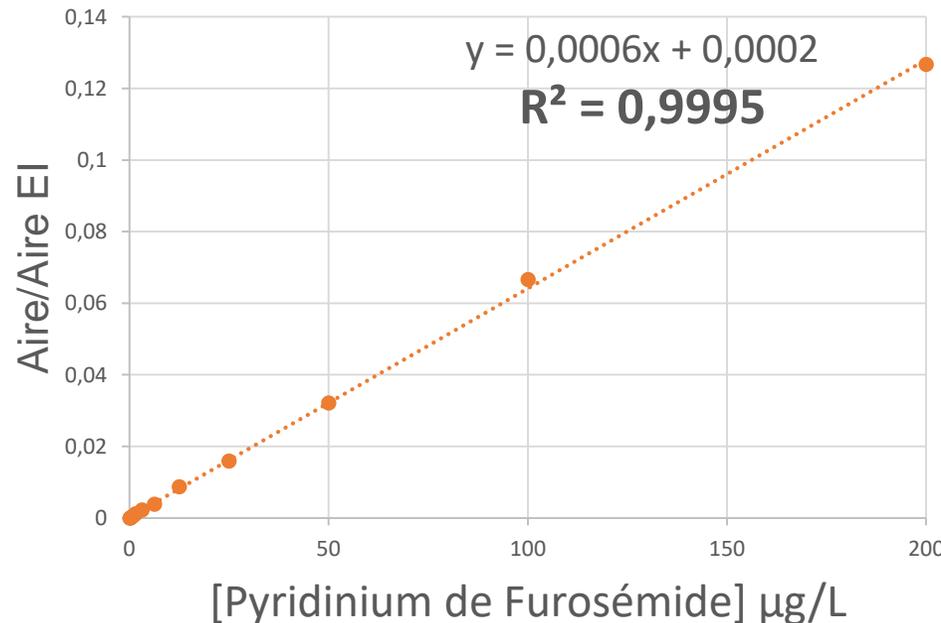
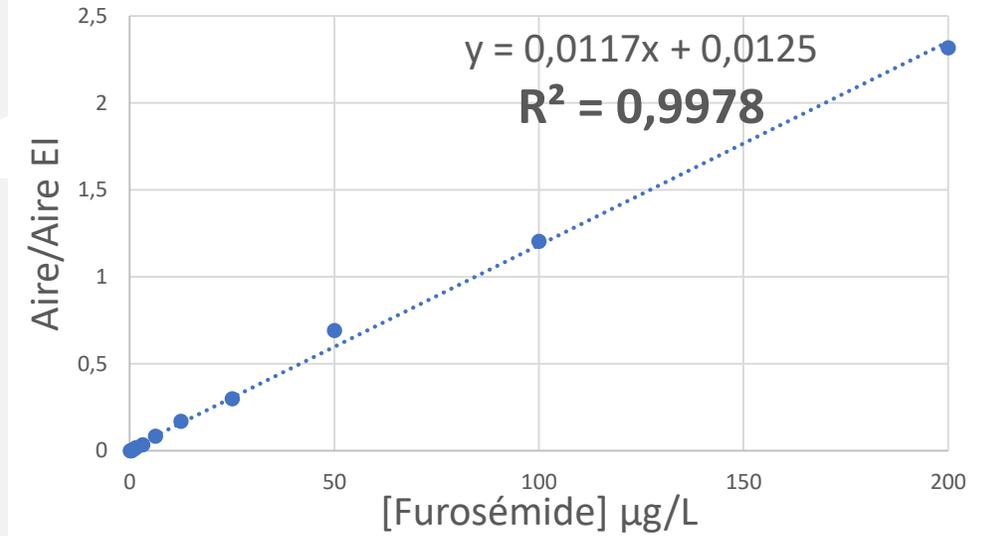
- Ces analyses ont été répétées pour le Pyridinium de Furosémide et la Saluamine

	Masse molaire (g/mol)	Temps de rétention (min)	Électrospray +/-	Masse du fragment ionique analysé (m/Z)	Étalon interne
Pyridinium de Furosémide	328,72	0,74	+	249,02	Aténolol-d7
Saluamine	250,66	1,43	+	233,10	Aténolol-d7
Furosémide	330,74	5,70	-	204,84	Sulfaméthoxazole- d4

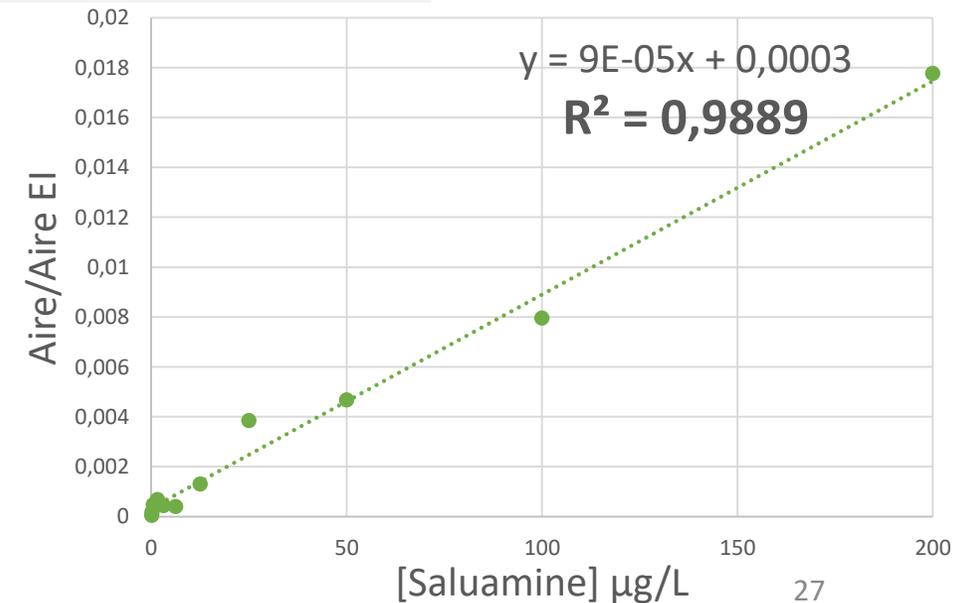
III. Résultats et discussion :

Droites d'étalonnage

- Gamme : 13 points de Furosémide, Pyridinium de Furosémide et Saluamine
- La gamme de solutions a été injectée en LC-MS puis, après intégration des aires et linéarisation, trois droites ont été tracées

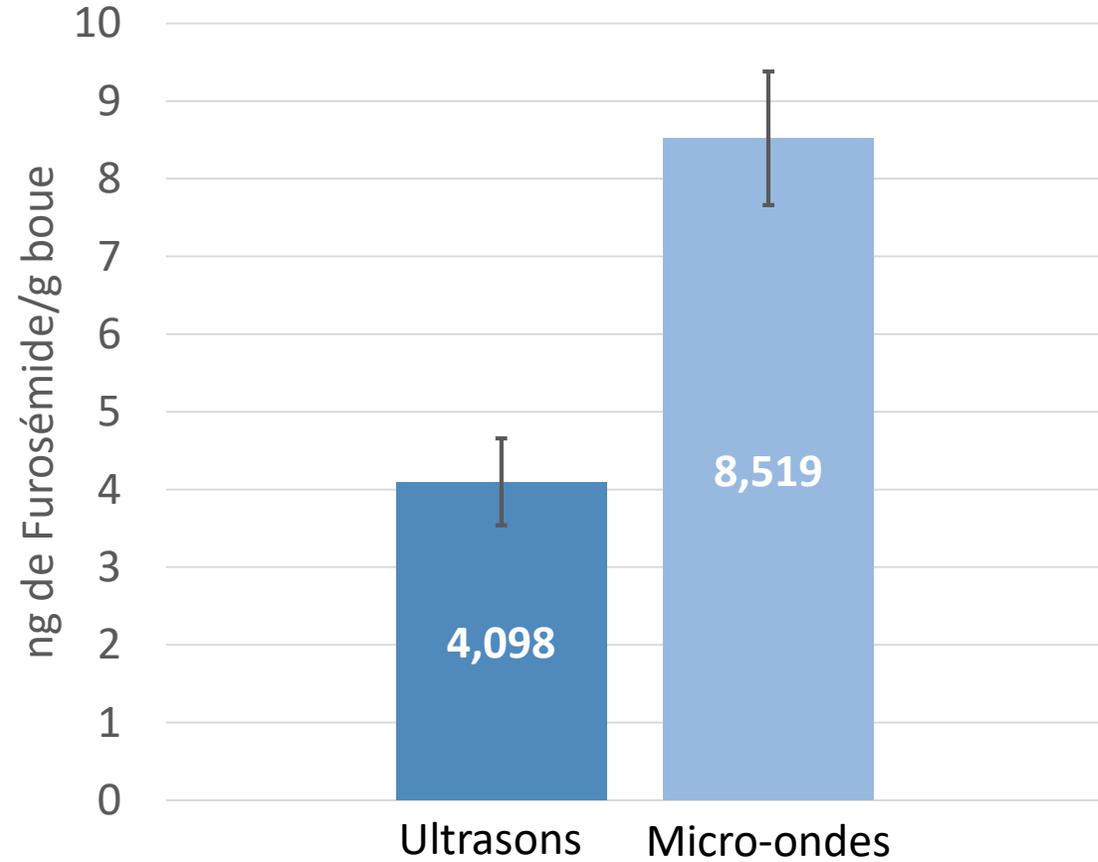


*Droites d'étalonnage
du Furosémide, du
Pyridinium de
Furosémide et de la
Saluamine en LC-MS*

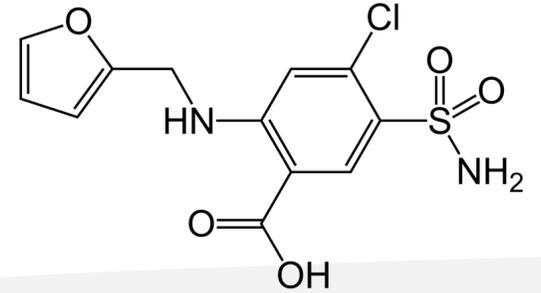


III. Résultats et discussion :

Comparaison de méthode d'extraction – Micro-ondes ou Ultrasons



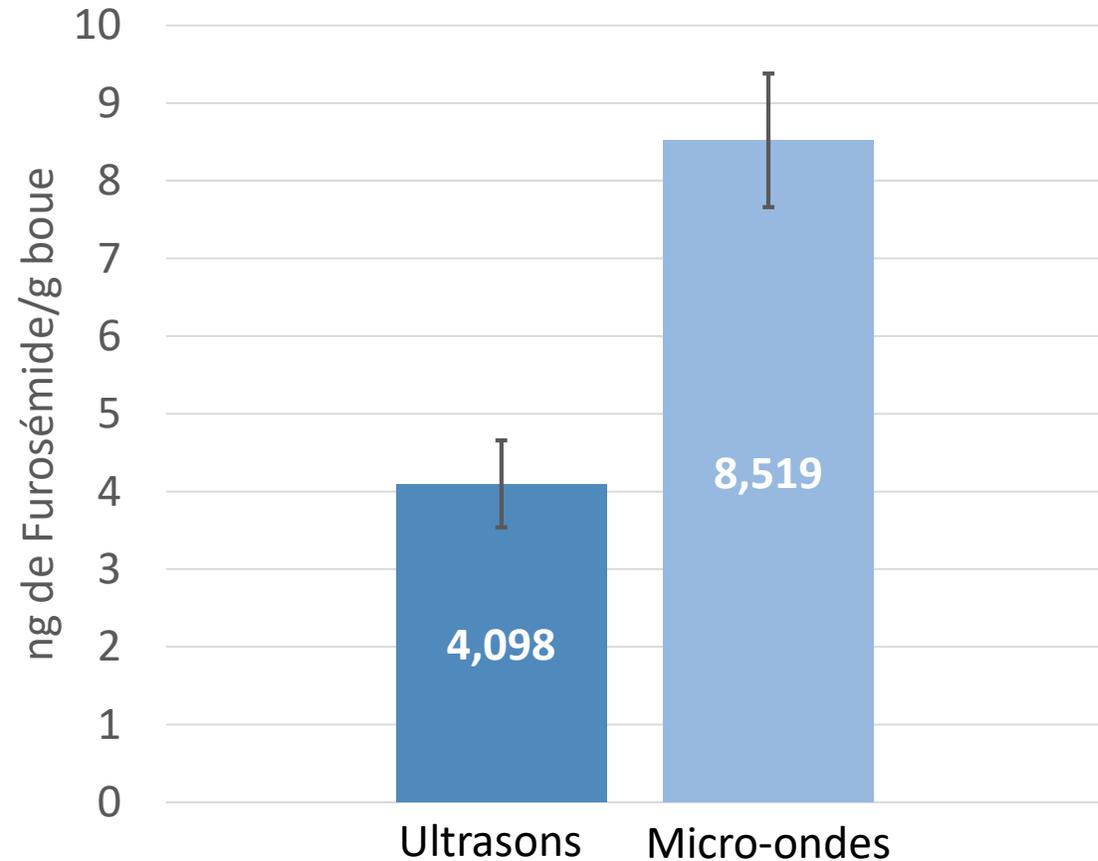
Exemple du Furosémide



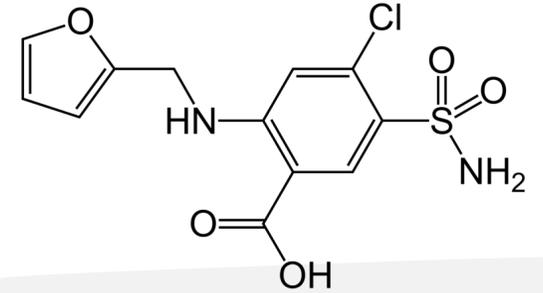
Comparaison entre ultrasons et micro-ondes pour l'extraction du Furosémide

III. Résultats et discussion :

Comparaison de méthode d'extraction – Micro-ondes ou Ultrasons



Exemple du Furosémide



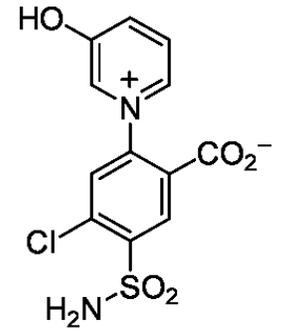
La méthode aux micro-ondes extrait environ **deux fois plus** de Furosémide que les ultrasons.

Comparaison entre ultrasons et micro-ondes pour l'extraction du Furosémide

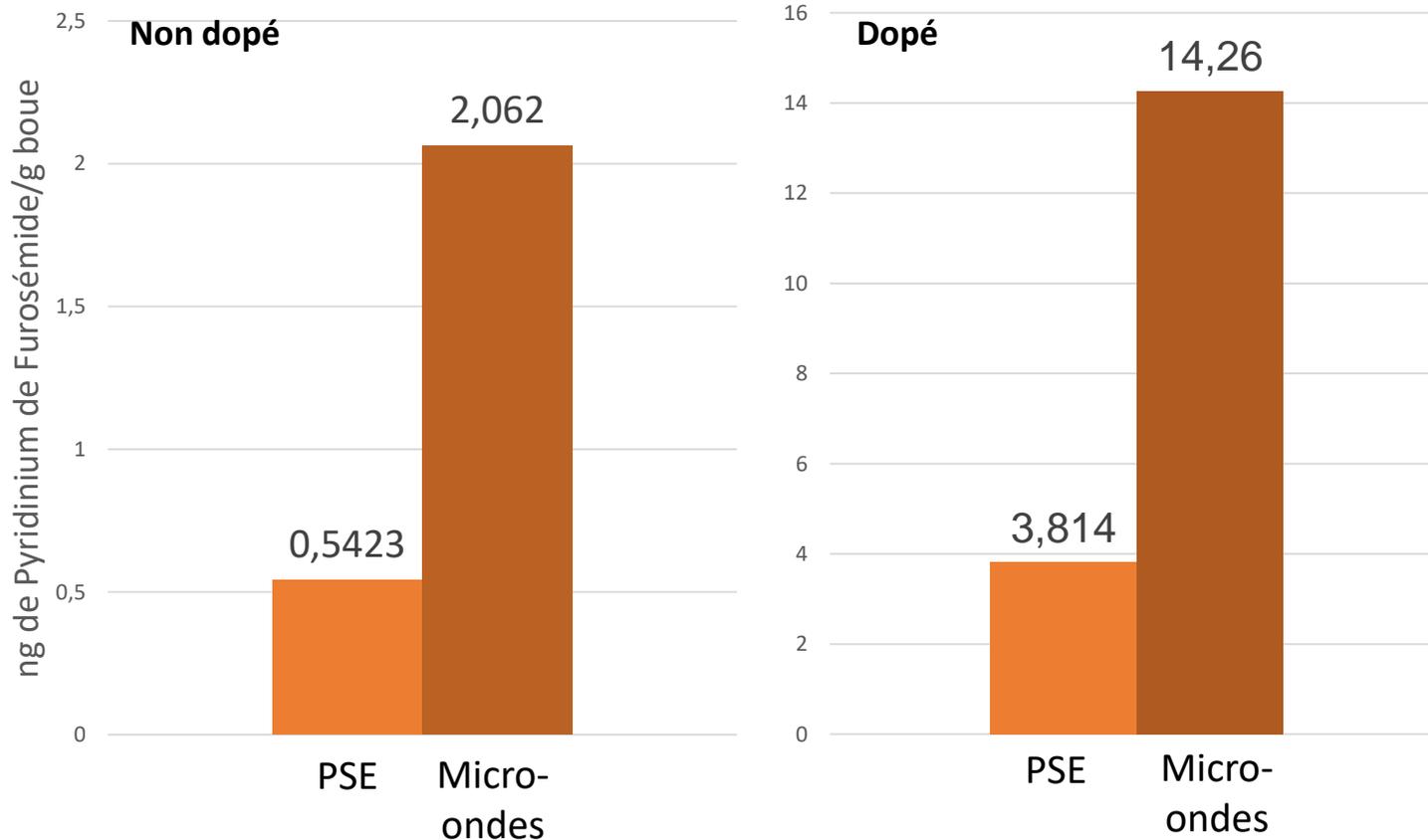
III. Résultats et discussion :

Comparaison de méthode d'extraction – Micro-ondes ou PSE

Exemple du Pyridinium de Furosémide



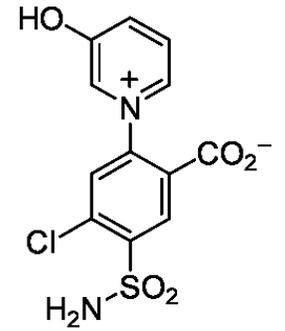
Comparaisons entre la PSE et les micro-ondes pour d'extraction du Pyridinium de Furosémide dans la boue n°2



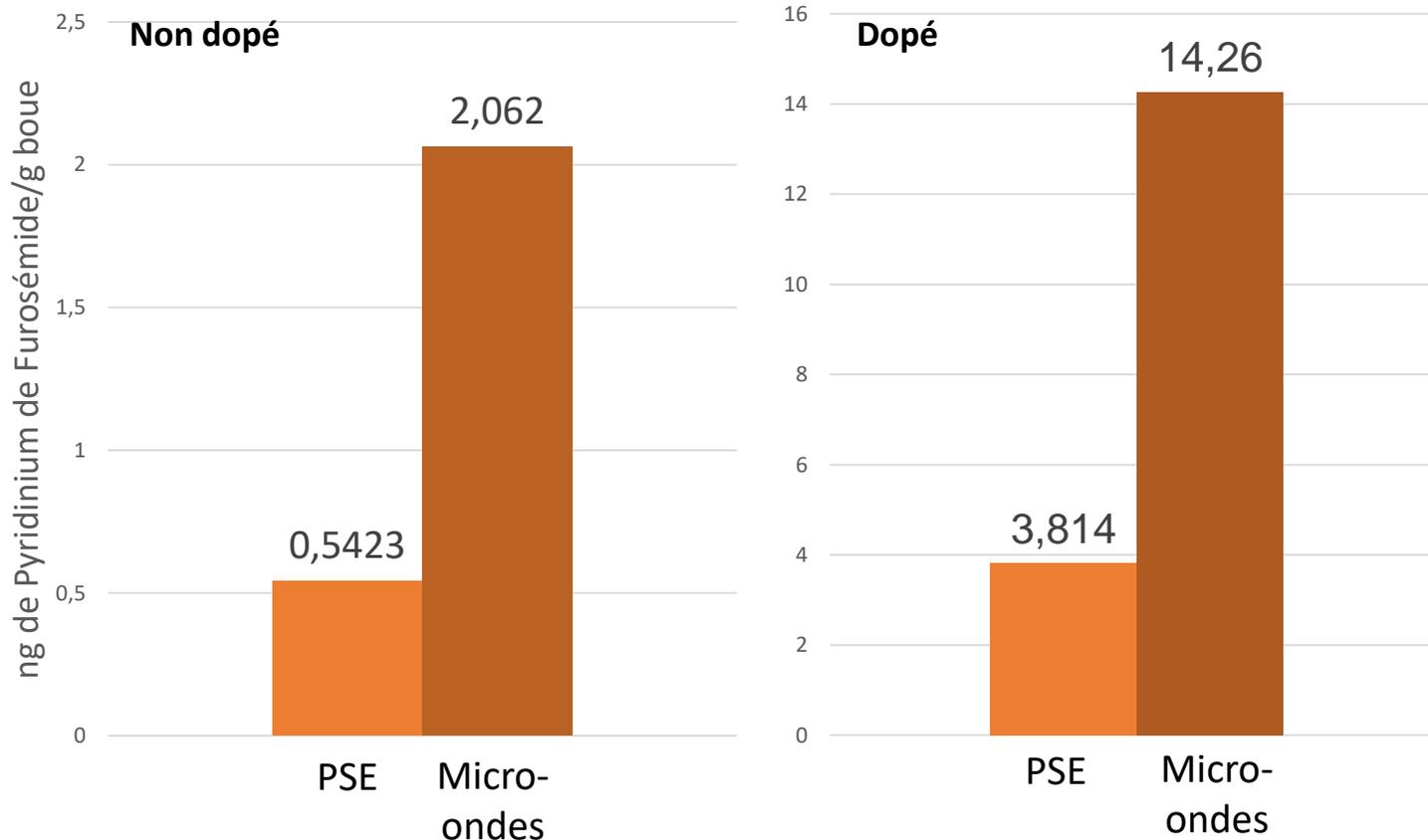
III. Résultats et discussion :

Comparaison de méthode d'extraction – Micro-ondes ou PSE

Exemple du Pyridinium de Furosémide



Comparaisons entre la PSE et les micro-ondes pour d'extraction du Pyridinium de Furosémide dans la boue n°2

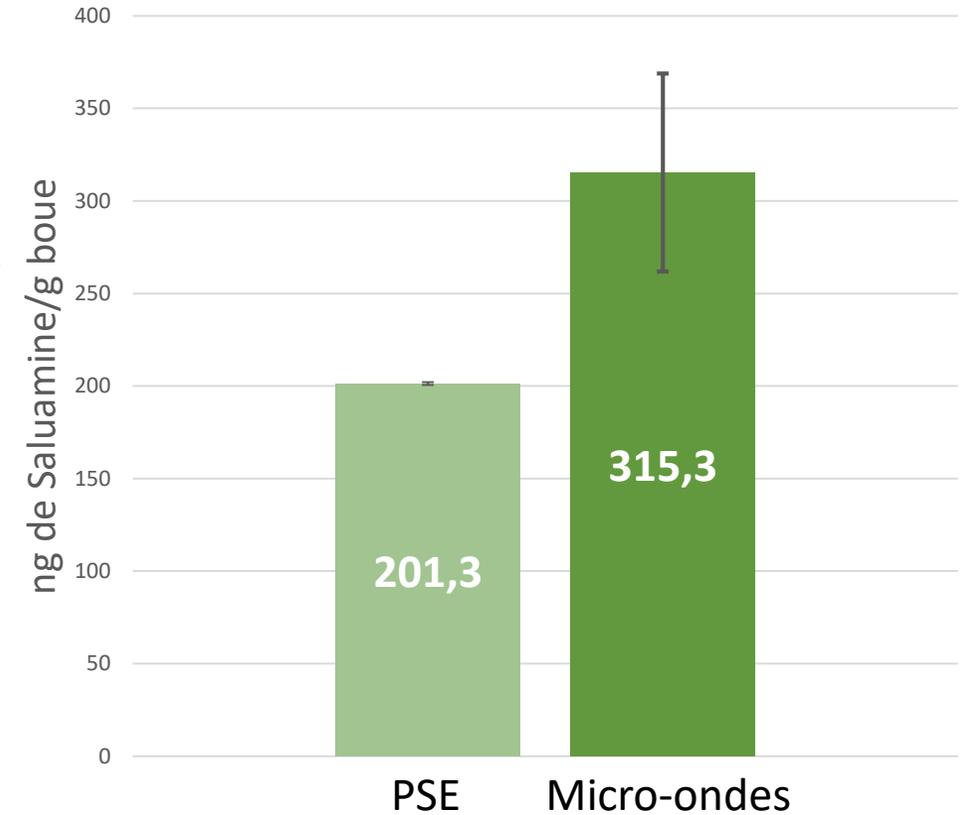
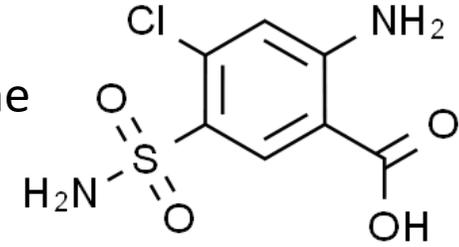


La méthode aux micro-ondes extrait environ **quatre fois plus** de Pyridinium de Furosémide par extraction PSE, avec ou sans dopage.

III. Résultats et discussion :

Comparaison de méthode d'extraction – Micro-ondes ou PSE

Exemple de la Saluamine



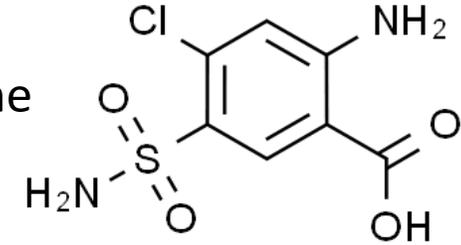
*Comparaison entre la PSE et les
micro-ondes pour l'extraction de la
Saluamine dans la boue n°2*

III. Résultats et discussion :

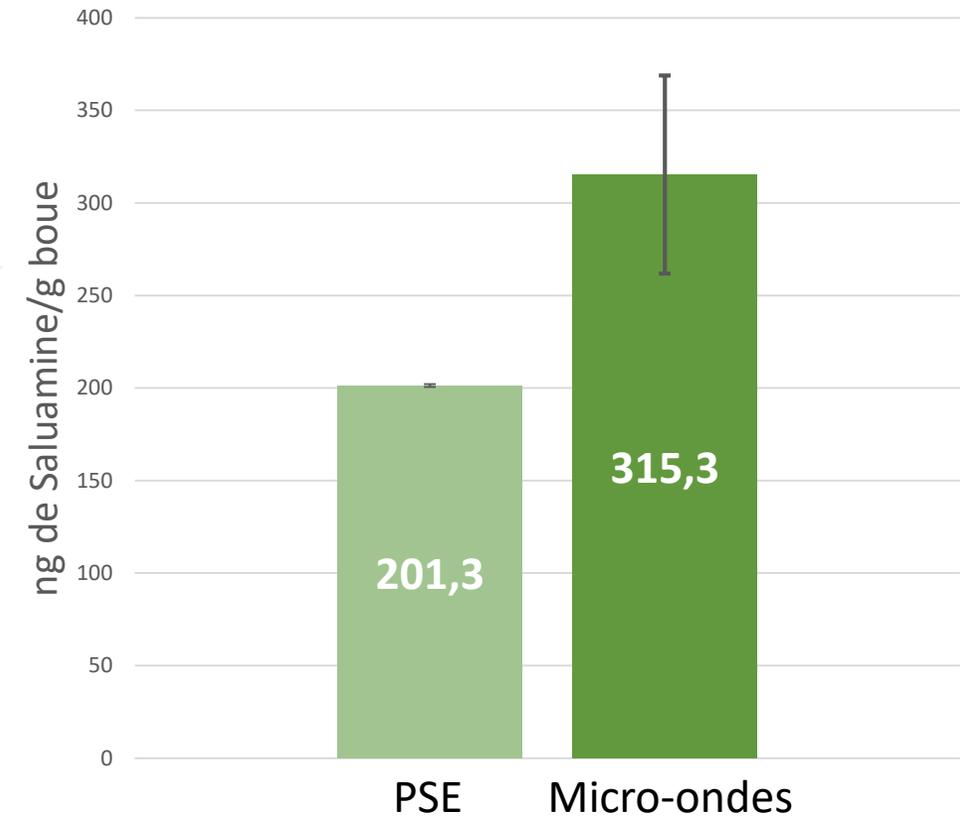
Comparaison de méthode d'extraction – Micro-ondes ou PSE

La méthode aux micro-ondes extrait environ
1,5 fois plus de Saluamine en extraction PSE.

Exemple de la Saluamine



Comparaison entre la PSE et les
micro-ondes pour l'extraction de la
Saluamine dans la boue n°2



III. Résultats et discussion :

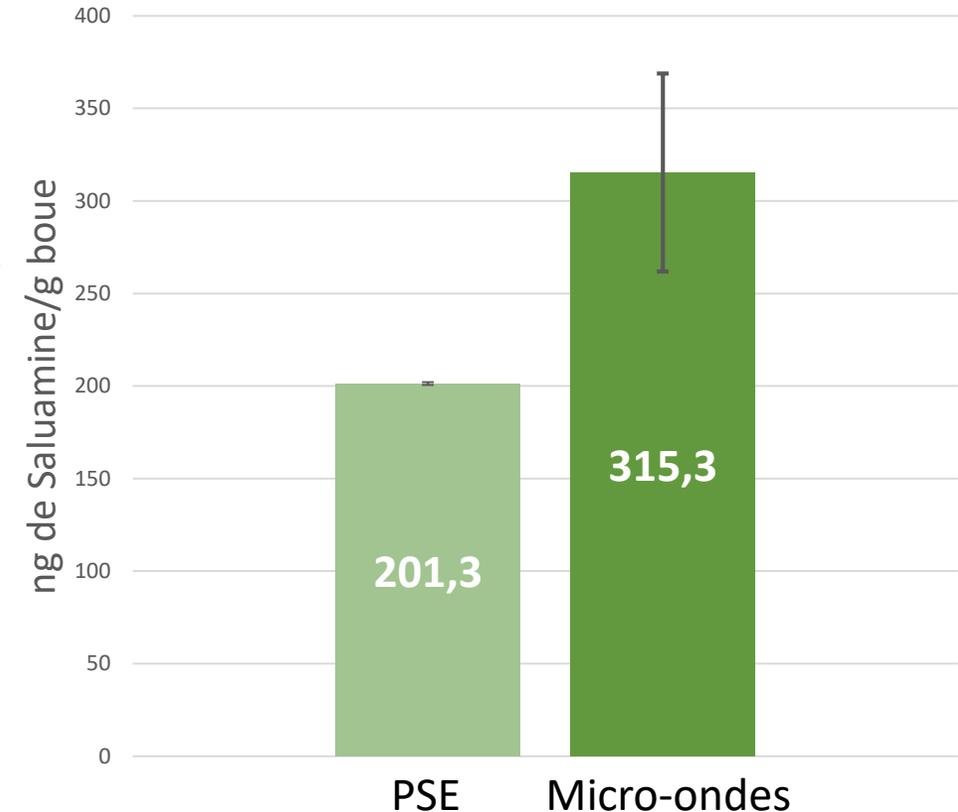
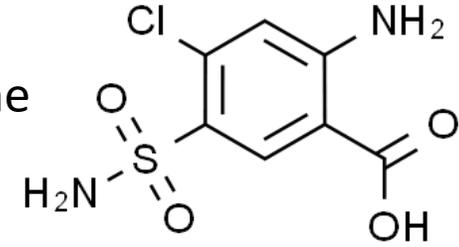
Comparaison de méthode d'extraction – Micro-ondes ou PSE

La méthode aux micro-ondes extrait environ **1,5 fois plus** de Saluamine en extraction PSE.

- Cette différence due à l'effet de matrice qui réduit la qualité d'extraction lorsque les quantités extraites sont élevées (centaines de ng contre dizaines de ng)
- Il faut évaluer cet effet de matrice

*Comparaison entre la PSE et les
micro-ondes pour l'extraction de la
Saluamine dans la boue n°2*

Exemple de la Saluamine



IV. Conclusions :

Concentrations trouvées et comparaison avec la littérature

- La méthode aux micro-ondes extrait plus de Furosémide, Pyridinium de Furosémide et Saluamine que les méthodes aux ultrasons et PSE

	Boue n°1 (ng/g)		Boue n°2 (ng/g)		Eau de Seine (ng/L)	Données Littérature	
	Micro-Ondes	Ultrasons	Micro-ondes	PSE		Boue (ng/g)	Rivière (ng/L)
Furosémide	8,519	4,098	-	-	34,48	10,1-33 ⁽³⁾	1,72-254,7 ⁽⁴⁾
Pyridinium de Furosémide	-	-	2,1	0,54	4,1	-	-
Saluamine	-	-	315,3	201,3	59,42	-	-

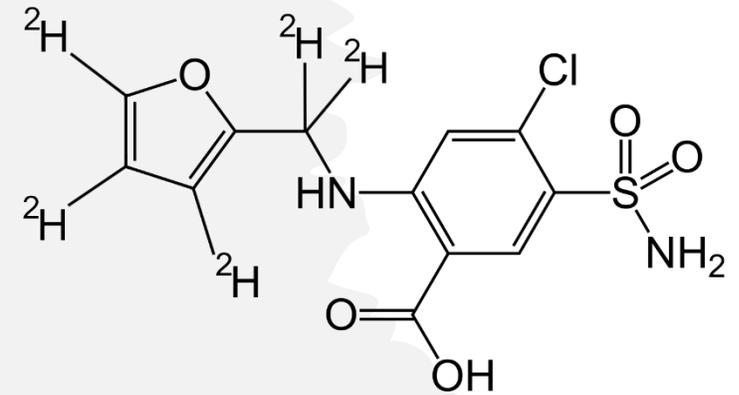
- Les concentrations trouvées en Furosémide en-dessous des concentrations d'effet trouvées dans la littérature (ou LOEC = 0,312 mg/L pour *C. dubia*, algue pour laquelle la LOEC est la plus basse)⁽⁵⁾
- Pyridinium de Furosémide et Saluamine peu caractérisés d'un point de vue toxicologique
- Leur étude écotoxicologique est en cours au LEESU

*LOEC = Lowest Observed Effect Concentration

Perspectives

Amélioration du protocole :

- Le Furosémide-d5 comme étalon interne, qui pourrait être utilisé comme étalon d'extraction pour déterminer un rendement
- Changement de la phase mobile en LC-MS afin de mieux éluer les molécules notamment la Saluamine
- Résultats préliminaires donc réplicats nécessaires
- Poursuivre avec l'analyse d'échantillons d'eau et de boue
- Limites de détection et quantification



Formule du Furosémide-d5



Merci de votre
attention

Références bibliographiques

Calamari, D. *et al.* (2003) 'Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in Northern Italy', *Environmental Science and Technology*, 37(7), pp. 1241–1248. doi: 10.1021/es020158e.

Isidori, M. *et al.* (2006) 'A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: Furosemide and its photoproduct', *Chemosphere*, 63(5), pp. 785–793. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.07.078.

Jelić, A., Petrović, M. and Barceló, D. (2009) 'Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry', *Talanta*, 80(1), pp. 363–371. doi: 10.1016/j.talanta.2009.06.077.

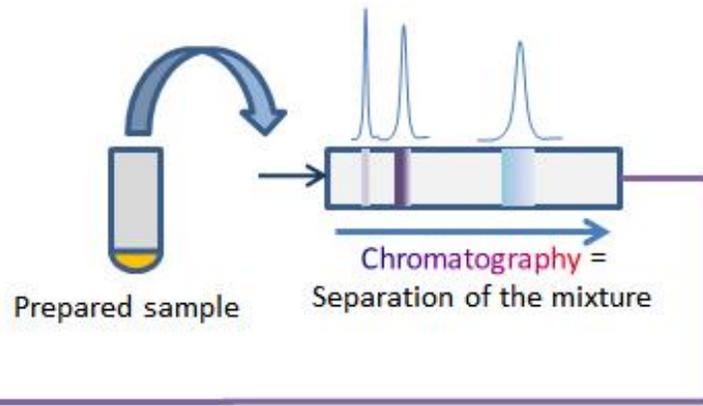
Laurencé, C. *et al.* (2019) 'A new human pyridinium metabolite of furosemide, inhibitor of mitochondrial complex I, is a candidate inducer of neurodegeneration', *Biochemical Pharmacology*, 160, pp. 14–23. doi: 10.1016/j.bcp.2018.12.007.

Narumiya, M. *et al.* (2013) 'Phase distribution and removal of pharmaceuticals and personal care products during anaerobic sludge digestion', *Journal of Hazardous Materials*, 260, pp. 305–312. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.05.032.

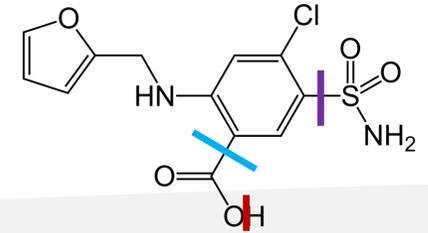
Valcárcel, Y. *et al.* (2011) 'Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain', *Chemosphere*, 82(7), pp. 1062–1071. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.10.041.

III. Résultats et discussion : Analyse en MS – Infusion en MS/MS

LC:



Pour le Furosémide



MS/MS:

