



HAL
open science

Développement d'outils analytiques et méthodologiques pour l'analyse et le suivi de composés vétérinaires et stéroïdes hormonaux à l'état de traces dans l'eau et le sol

Marie-Virginie Salvia

► To cite this version:

Marie-Virginie Salvia. Développement d'outils analytiques et méthodologiques pour l'analyse et le suivi de composés vétérinaires et stéroïdes hormonaux à l'état de traces dans l'eau et le sol. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2013. Français. NNT : 2013LYO10036 . tel-01174857

HAL Id: tel-01174857

<https://theses.hal.science/tel-01174857>

Submitted on 10 Jul 2015

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

par

Marie-Virginie SALVIA

Spécialité : Chimie Analytique

Développement d'outils analytiques et méthodologiques pour l'analyse et le suivi de composés vétérinaires et stéroïdes hormonaux à l'état de traces dans l'eau et le sol

Date de soutenance : 5 avril 2013

Directrice de thèse : Cécile CREN-OLIVE

Co-encadrante : Emmanuelle VULLIET

JURY :

D. LEONARD, Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1, président

F. KOLTALO, Maître de conférences à l'Université de Rouen, rapporteur

J.F. COOPER, Professeur à l'Université de Perpignan, rapporteur

A. RICHARD, Directeur du Laboratoire d'Analyse des Sols, INRA examinateur

C. CREN-OLIVE, Chargée de recherche au CNRS, ISA UMR 5280, directrice

E. VULLIET, Chargée de recherche au CNRS, ISA UMR 5280, co-encadrante

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Secrétaire Général

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. BERNARD

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements :

Je ne saurais oublier que ce travail de thèse s'est déroulé au Service Central d'Analyse du CNRS. J'ai plaisir à remercier Monsieur Jean-Jacques Lebrun directeur du centre pour m'avoir accueilli dans ce cadre renommé.

Je tiens à exprimer mes très sincères remerciements à Mesdames Cécile Cren-Olivé et Emmanuelle Vulliet qui ont respectivement dirigé et co-dirigé ce travail. Qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude pour leurs conseils multiples et leurs disponibilités.

Laure Wiest et Robert Baudot m'ont accompagné quotidiennement dans ma vie de chercheuse, avec compétence, infiniment de dévouement et de bonne humeur. Je tiens à les assurer de mon amicale reconnaissance.

L'aide d'Eric Legros et de Frédéric Desroches m'a été indispensable pour la réalisation et l'exploitation des colonnes de sol. Qu'ils en soient sincèrement remerciés.

Dans les situations difficiles ou d'urgence concernant le matériel, la disponibilité et le soutien de Béatrice Brion et de David Tantagelo ne m'ont jamais fait défaut, je leur dois beaucoup !

Je remercie très vivement le Docteur Florence Koltalo, le Professeur Jean-François Cooper, le Professeur Didier Léonard et Monsieur Antoine Richard, directeur du laboratoire d'Analyses des Sols de l'INRA d'Arras, qui ont accepté d'examiner ce mémoire. Leurs regards et leurs commentaires me seront évidemment précieux pour mettre ce travail en perspective.

Merci encore à tous les étudiants et titulaires du laboratoire avec qui j'ai partagé ces studieuses et joyeuses années....

Je souhaite aussi remercier Monsieur Ruben Vera du centre de Diffractométrie de l'Université Claude Bernard Lyon 1 qui m'a initiée à l'analyse structurale des argiles, composante essentielle des sols, par diffraction X.

RESUME en français

De nombreux produits chimiques se retrouvent dispersés dans l'environnement avec des conséquences parfois néfastes pour les hommes et les écosystèmes. Parmi ces substances figurent les antibiotiques et les stéroïdes hormonaux. Peu de données sont disponibles quant à la présence et le devenir de ces substances dans l'environnement notamment pour le sol, par manque de méthodologies. Nous avons donc mis au point des procédures d'analyse de traces de ces contaminants émergents, dans l'eau et le sol.

Nous avons développé des méthodes multi-résidus et inter-familles basées sur des analyses LC-MS/MS. Pour les échantillons aqueux, l'extraction est menée sur phase solide (SPE, OASIS HLB). Les MLQs sont comprises entre 0.09 et 34 ng/L. Pour la matrice solide, la procédure d'extraction est inspirée de la méthode appelée QuEChERS suivie d'une purification SPE. Elle a été validée et des MLQs entre 0.013 et 3 ng/g ont été atteintes. Les tétracyclines et les fluoroquinolones, ont été étudiées séparément car elles ont des propriétés physico-chimiques bien spécifiques les rendant difficiles à extraire correctement du sol avec une méthode inter-familles.

La méthode développée sur la matrice sol a permis une étude statistique mettant en exergue l'impact de certains paramètres du sol sur les rendements d'extraction et les effets matrice.

Les méthodes ont été appliquées à une étude en colonnes de sol pour obtenir des données sur le transfert, l'accumulation et la dégradation des composés dans le sol.

TITRE en anglais

Development of methodological and analytical tools for the analysis and the monitoring of veterinary antibiotics and hormonal steroids at trace levels in water and soil.

RESUME en anglais

Several chemical products are dispersed in the environment and the consequences can be sometimes harmful for humans and the ecosystems. Among these substances appear the antibiotics and the hormonal steroids. Nowadays, only few data are available on the presence and the fate of these substances in the environment in particular for solid matrices, mainly due to a lack of methodologies. Consequently, methods to analyze traces of « emergent » contaminants in water and soil were carried out.

Therefore, multi-residues and inter-families procedures based on LC-MS/MS analysis were established. Concerning the aqueous samples, 23 analytes are extracted with the SPE technique (OASIS HLB). MLQs are between 0.09 and 34 ng/L. For the solid matrix, the extraction procedure of 31 compounds is inspired from the method called QuEChERS and followed by a purification step. This methodology was validated and MLQs between 0.013 and 3 ng/g were obtained. Two antibiotics families, tetracyclines and fluoroquinolones, were studied separately as they have specific physical/chemical properties and are therefore difficult to extract from soil with an inter-families method.

Then, the method developed for the soil matrix allowed a statistic study which showed the impact of the soil parameters on the recoveries and matrix effects.

Finally, the methodologies were applied to a soil column study which allowed obtaining data on the transfer, accumulation and degradation of the substances in soil.

DISCIPLINE

Ecole Doctorale de Chimie spécialité : Chimie analytique

MOTS-CLES

sol, eau, polluants émergents, traces, préparation d'échantillon, LC-MS/MS, colonne de sol
soil, water, emergents pollutants, traces, sample preparation, LC-MS/MS, soil column

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut des Sciences Analytiques, Département Service Central d'Analyse, UMR5280, Equipe TRACES, CNRS, 5 rue de la Doua, F-69100, Villeurbanne, France

Publications et communications :

Publications dans des journaux internationaux :

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé, 2012. Development of a multi-residue method based on quechers extraction followed by LC-MS/MS for the analysis of steroids, veterinary and human drugs at traces level in soil. *Journal of Chromatography A* 1245, 122 (Annexe 13).

Publications en préparation :

M.V. Salvia, C. Cren-Olivé, E. Vulliet. Statistical evaluation of the influence of soil parameters on the recoveries and the matrix effects during the analysis of veterinary antibiotics and steroids by QuEChERS-LC-MS/MS. *Environmental Science and Pollution Research*.

M.V. Salvia, C. Cren-Olivé, E. Vulliet. Fate of steroids and veterinary antibiotics in soil: study of transfer and degradation in soil columns. *Chemosphère*.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Comparison of two extraction methods for the analysis of traces of veterinary antibiotics and steroids presents in soil: Pressurised Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.

Communications orales dans des congrès internationaux :

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Development of an analytical method for the determination of emergent contaminants in soil. 37th *International Symposium on Environmental Analytical Chemistry*, Anvers (Belgique), 22-25 mai 2012.

Communications orales dans des congrès nationaux :

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Développement d'une méthode d'analyse basée sur une extraction QuEChERS simple et rapide suivie d'une analyse par LC-MS/MS pour la détermination d'hormones et composés vétérinaires à l'état de traces dans le sol. 9^{ème} *Congrès francophone de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages*, Toulouse, 23-25 mars 2011.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé, Analyse de stéroïdes hormonaux et composés vétérinaires à l'état de traces dans le sol par PLE – LC/MS/MS. *11^{èmes} Journées Francophones des Jeunes Physico-Chimistes*, Grenoble, 17-21 octobre 2010.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Analyse de stéroïdes hormonaux et composés vétérinaires à l'état de trace dans le sol par PLE-LC/MS/MS. *III^{ème} journées du Club Jeunes AFSEP*, Paris, 14 octobre 2010.

Communications par affiche dans des congrès internationaux :

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Behavior of steroids and veterinary antibiotics in soil: study of transfer and degradation in soil columns, *37th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry*, Anvers (Belgique), 22-25 mai 2012.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Analysis of steroids and veterinary antibiotics in soil using QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS, *6th SETAC world congress, SETAC Europe 22nd annual meeting*, Berlin (Allemagne), 20-24 mai 2012.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Behavior of steroids and veterinary antibiotics in soil: study of transfer and degradation in soil columns, *6th SETAC world congress, SETAC Europe 22nd annual meeting*, Berlin (Allemagne), 20-24 mai 2012.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Innovative sample preparation steps for the analysis of hormonal steroids and veterinary antibiotics in soil. *EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment*, Zurich (Suisse), 11-15 septembre 2011.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Development of an analytical method based on QuEChERS-LC-MS/MS for the analysis of hormones and veterinary antibiotics at traces level in soil. *12th European Meeting of Environmental Chemistry*, Clermont-Ferrand (France), 7-10 décembre 2011.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Development of a multi-residue methodology for the analysis of hormonal steroids and veterinary compounds traces in soil. *12th SBCN*, Ecully (France), 19-22 octobre 2010.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Development of a multi-residue methodology for the analysis of hormonal steroids and veterinary compounds traces in soil. *ISC 2010*, Valence (Espagne), 12-16 septembre 2010.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Development of an environmental analytical method for the determination of hormonal steroids and veterinary compounds traces in soil. *36th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry*, Rome (Italie), 5-9 octobre 2010.

Communications par affiche dans des congrès nationaux :

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Développement d'une méthode analytique pour l'analyse d'antibiotiques vétérinaires et humains et stéroïdes hormonaux dans le sol. *29^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse*, Orléans, 17-20 septembre 2012.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Développement d'une méthodologie analytique par PLE/SPE-LC-MS/MS pour l'analyse de deux familles d'antibiotiques vétérinaires : les tétracyclines et les fluoroquinolones. *9^{ème} Congrès francophone de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages*, Toulouse, 23-25 mars 2011.

M.V. Salvia, E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, C. Cren-Olivé. Développement d'une méthodologie multi-résidus pour l'analyse de stéroïdes hormonaux et composés vétérinaires à l'état de traces dans le sol. *27^{èmes} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse*, Clermont-Ferrand, 13-16 septembre 2010.

Liste des abréviations :

ANCOVA : analyse de la covariance

AOAC : Association of Analytical Communities

APCI : Atmospheric-Pressure Chemical Ionization

CE_x: Concentration avec Effets sur x% des espèces étudiées

CEC : Cation Exchange Capacity

CI : Chemical Ionization

CL_x : Concentration Létale, concentration causant la mort de x% des individus étudiés

CMEO : Concentration Minimale avec Effets Observés

CV : Coefficient de Variation

DVB : divinylbenzène

dSPE : dispersive Solid Phase Extraction

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

EI : Electron Ionization

ESI : Electrospray Ionization

FIA : Flow Injection Analysis

GC : Gaz chromatography

GPC : Gel Permeation Chromatography

GS1 : gaz de nébulisation

GS2 : gaz de désolvatation

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

ICH : International Conference on Harmonisation

ILOD: Instrumental Limit of Detection

ILOQ: Instrumental Limit of Quantification

K_d : coefficient de distribution d'une molécule entre la phase dissoute et la phase particulaire

LC : Liquid Chromatography

LLE : Liquid Liquid Extraction

Log K_{ow} : coefficient de partage octanol/eau

MAE : Microwave-Assisted Extraction

MAX : Mixed-mode Anion eXchange

MCX: Mixed-mode Cation eXchange

MIP : Molecularly Imprinted polymer

MLD : Methodological Limit of Detection
MLQ : Methodological Limit of Quantification
MMLLE : Microporous Membrane Liquid Liquid Extraction
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS: Mass Spectrometry
MS/MS : Tandem Mass Spectrometry
NQE : Norme de Qualité Environnementale
PDMS : polydiméthylsiloxane
PLE : Pressurized Liquid Extraction
PSA : Primary Secondary Amine
QToF: Quadrupole Time-Of-Flight
QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
REACH: enRegistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques
SAX : Strong Anion eXchange
SBSE : Stir-Bar Sorptive Extraction
SFE : Supercritical Fluid Extraction
SLM : Supported Liquid Membrane
SPE : Solid Phase Extraction
SPLE : Selective Pressurized Liquid Extraction
SPME : Solid Phase Micro Extraction
STEP : station d'épuration
 $t_{1/2}$: temps de demi-vie
UAE : Ultrasonic-Assisted Extraction
UV : ultraviolet

Table des matières :

INTRODUCTION GENERALE.....	8
Références bibliographiques :.....	14
PARTIE I : Synthèse bibliographique : description et suivi des antibiotiques vétérinaires et stéroïdes hormonaux dans les eaux et le sol sol	15
I. Présentation des molécules sélectionnées au cours de la thèse : antibiotiques vétérinaires, stéroïdes hormonaux, contaminants humains : 16	
A. Présentation des trois familles :	16
1. Les antibiotiques vétérinaires :.....	16
a. Description :	16
b. Consommation :	17
c. Propriétés physico-chimiques :.....	18
2. Les stéroïdes hormonaux :.....	26
a. Présentation :	26
b. Source et utilisation :.....	27
c. Propriétés physico-chimiques :.....	29
3. Les contaminants humains :	31
a. Description et consommation :.....	31
b. Propriétés physico-chimiques :.....	32
B. Toxicité des résidus de ces substances sur l'homme et l'animal :	33
1. Les antibiotiques vétérinaires :.....	33
2. Les stéroïdes hormonaux :.....	34
3. Les contaminants humains :	39
C. Occurrence des antibiotiques vétérinaires et stéroïdes hormonaux dans l'environnement :.....	40
1. Voie d'introduction dans l'environnement :.....	40
2. Présence des antibiotiques vétérinaires dans l'environnement :.....	42
a. Dans l'eau :.....	42
b. Dans le sol :	44
3. Présence des stéroïdes hormonaux dans l'environnement :	44
a. Dans l'eau :.....	44

b.	Dans le sol :	47
4.	Présence des contaminants humains dans l'environnement :	47
a.	Dans l'eau :	47
b.	Dans le sol :	49
II.	Présentation de la matrice principale choisie pour l'étude : le sol :	49
A.	Introduction :	49
B.	Les compartiments du sol :	50
1.	La phase solide :	50
a.	La matière organique :	50
b.	Les minéraux :	52
c.	Le triangle des textures :	53
2.	Les phases liquide et gazeuse, l'espace poral :	53
3.	Les organismes vivants :	54
C.	Conclusion :	54
III.	Etat de l'art : méthodes analytiques utilisées :	55
A.	Prétraitement des échantillons :	55
1.	Matrices aqueuses :	55
2.	Matrices solides :	56
B.	Préparation d'échantillon :	56
1.	Matrices aqueuses :	57
a.	Extraction sur phase solide (SPE) :	57
b.	Microextraction sur phase solide (SPME) :	60
c.	Extraction par adsorption sur barreau d'agitation (SBSE):	61
d.	Extraction liquide-liquide (LLE) et extraction sur membrane :	62
e.	Extraction par fluide supercritique (SFE) :	64
2.	Matrices solides :	64
a.	Extraction :	64
i	Extraction liquide/solide sous agitation :	64
ii	Extraction Soxhlet :	65
iii	Extraction assistée par ultrasons (UAE) :	66
iv	Extraction assistée par micro-ondes (MAE) :	66
v	Extraction par liquide pressurisé (PLE) :	68
vi	Extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe):	68
vii	Extraction par fluide supercritique (SFE)	69
b.	Purification :	70

i	Extraction sur phase solide (SPE) :	70
ii	Extraction liquide-liquide (LLE), chromatographie par perméation de gel (GPC) et chromatographie liquide semi-préparative :	70
iii	Extraction par liquide pressurisé sélective (SPLE) :	70
C.	Méthodes d'analyses :	71
IV.	Devenir de ces substances dans les sols :	73
A.	Transformation :	73
B.	Rétention / transfert dans le sol :	76
V.	Conclusion.....	78
	Références bibliographiques :	79
	PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	90
I.	Choix des standards analytiques et autres références :	91
II.	Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem :	92
A.	Principe :	92
1.	Séparation par chromatographie liquide :	92
2.	Détection par spectrométrie de masse en tandem :	93
a.	Spectrométrie de masse :	93
i	Source d'ionisation :	93
ii	Analyseur :	94
b.	Spectrométrie de masse en tandem :	95
B.	Méthode optimisée :	96
1.	Etude multi-résidus et multi-familles :	96
2.	Cas particulier des tétracyclines et des fluoroquinolones :	100
C.	Analyse des données :	101
III.	Préparation d'échantillon :	102
A.	Echantillons en phase aqueuse :	102
1.	Principe de l'extraction sur phase solide (SPE) :	102
2.	Méthode optimisée :	103
B.	Echantillons en phase solide :	104
1.	Etude multi-résidus et multi-familles :	104
a.	Extraction :	104
i	Extraction par PLE (Pressurized Liquid Extraction) :	104

i.1	Développement d'une méthode PLE :.....	104
i.2	Méthode optimisée :.....	105
ii	Extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) :.....	106
ii.1	Développement d'une méthode QuEChERS :.....	106
ii.2	Méthode optimisée :.....	107
b.	Purification :.....	107
i	SPLE (Selective Pressurized Liquid Extraction) :.....	107
i.1	Principe :.....	107
i.2	Tests :.....	108
ii	dSPE (Dispersive SPE) :.....	108
ii.1	Principe :.....	108
ii.2	Tests :.....	108
iii	SPE (Solid Phase Extraction) employée pour purifier les éluats QuEChERS et PLE : 109	
2.	Cas particulier des tétracyclines et des fluoroquinolones :.....	110
a.	Extraction :.....	110
b.	Purification :.....	111
IV.	Analyse par diffraction X :.....	112
A.	Principe :.....	112
B.	Manipulation :.....	112
V.	Validation de la méthode QuEChERS :.....	113
VI.	Etude en colonnes de sol:.....	115
A.	Protocole de l'étude en colonnes de sol :.....	115
B.	Analyse des lixiviats et des colonnes de sol :.....	117
1.	Lixiviats :.....	117
2.	Colonnes de sol :.....	117
	Références bibliographiques :.....	118
	PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	119
	CHAPITRE I : Développement de la méthodologie pour l'analyse des composés en phase liquide.....	120
I.	Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem :.....	121
A.	Séparation et détection des composés ionisés positivement :.....	121

B.	Séparation et détection des composés ionisés négativement :	126
II.	Préparation d'échantillon :	132
A.	Développement de la méthode :	132
B.	Résultats : rendements d'extraction, effets matrice, linéarité, limites de détection et de quantification :	144
III.	Conclusion :	149
	Références bibliographiques :	150
	CHAPITRE II : Développement de la méthodologie pour l'analyse des composés en phase solide	152
I.	Préparation d'échantillon :	153
A.	PLE (Pressurized Liquid Extraction) :	154
1.	Extraction par PLE :	154
2.	Purification par SPLE (Selective Pressurized Liquid Extraction) :	160
B.	QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) :	166
1.	Extraction QuEChERS :	166
2.	Purification dSPE (Dispersive Solid Phase Extraction) :	173
C.	Comparaison PLE / QuEChERS :	177
1.	Optimisation de la purification :	177
2.	Application de la purification aux extraits PLE et QuEChERS :	184
II.	Validation de la méthode :	187
III.	Etude statistique : influence des paramètres du sol sur les rendements d'extraction et les effets matrice :	195
A.	Extraction des différents sols :	196
B.	Etude statistique des résultats :	199
1.	Méthodes statistiques utilisées :	199
a.	Corrélation de Pearson :	199
b.	Analyse de covariance : ANCOVA :	201
2.	Analyse des résultats :	202
a.	Effet de la variable explicative sur la variable dépendante :	202
i	Rendements d'extraction :	202
i.1	Influence du pourcentage en argile sur les rendements d'extraction :	203
i.2	Influence de la CEC sur les rendements d'extraction :	207
i.3	Influence du carbone organique sur les rendements d'extraction :	210

ii	Effets matrice :	212
b.	Effet d'interaction :	215
i	Rendements d'extraction :	215
ii	Effets matrice :	217
3.	Conclusion de la partie statistique :	219
IV.	Conclusion.....	219
	Références bibliographiques :	221
	CHAPITRE III: Cas particulier des tétracyclines et des fluoroquinolones	225
I.	Enjeux de ces molécules : adsorption sur l'argile.....	226
A.	Analyse de travaux antérieurs :	228
B.	Caractérisation du sol utilisé pour le développement de la méthode	231
II.	Séparation et détection des tétracyclines et des fluoroquinolones :.....	233
III.	Extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones du sol :.....	236
A.	Extraction QuEChERS :	236
B.	Extraction par PLE :	237
IV.	Conclusion :	241
	Références bibliographiques :	243
	CHAPITRE IV : Application des méthodes développées.....	245
I.	Analyse d'échantillons réels d'eaux :	246
A.	Description des différentes eaux :	246
B.	Choix de l'étalonnage :	247
C.	Analyse d'échantillons d'eaux :	248
II.	Analyse des échantillons réels de sols :	253
A.	Présentation des sites :	253
B.	Choix de l'étalonnage :	253
C.	Occurrence des substances dans les sols analysés :	254
III.	Etude du transfert, accumulation et dégradation des composés dans le sol : expérience en colonnes de sol :	259
A.	Description des sols utilisés pour cette étude :	259
B.	Choix des conditions expérimentales :	260

C.	Analyse des lixiviats et des horizons de sol :.....	262
1.	Analyse des lixiviats :.....	262
2.	Analyse des colonnes de sol :.....	263
D.	Etude du transfert :	264
E.	Etude de la dégradation :	270
IV.	Conclusion :	274
	Références bibliographiques :.....	275
	CONCLUSION GENERALE.....	278
	ANNEXES	283

INTRODUCTION GENERALE

De nombreuses substances chimiques sont de plus en plus utilisées dans la vie quotidienne ainsi que pour les activités industrielles et agricoles. Ces composés se retrouvent ainsi dispersés dans les différents compartiments environnementaux. Par exemple, de nombreux médicaments et principes actifs sont présents dans l'environnement. Ils font partie des contaminants dits « émergents », c'est-à-dire des contaminants ne faisant encore l'objet d'aucune réglementation, non nécessairement persistants dans l'environnement, mais introduits de manière continue à des concentrations faibles [1]. Parmi ces polluants qui préoccupent la communauté scientifique figurent les antibiotiques vétérinaires et les stéroïdes hormonaux. Les antibiotiques sont utilisés pour la médecine vétérinaire à la fois pour combattre les maladies et promouvoir la croissance [2]. Des stéroïdes hormonaux sont également administrés aux hommes et aux animaux pour des raisons pharmaceutiques en complément de ceux produits par l'organisme [3-5]. Ces substances sont, par la suite, excrétées par les hommes et les animaux et se retrouvent dans les stations d'épuration où elles ne sont que partiellement éliminées [2, 6, 7]. Ces composés sont alors présents dans les effluents et également dans les lisiers et boues de station d'épuration épandus sur les terrains agricoles [8, 9]. La dissémination de ces substances dans l'environnement est un sujet très préoccupant car elle peut présenter, à terme, divers dangers.

En effet, la présence d'antibiotiques dans l'environnement peut entraîner la prolifération de micro-organismes résistants ce qui représente une réelle menace pour la santé humaine [2, 10]. De plus, ils peuvent avoir des effets toxiques sur les écosystèmes [11]. Les stéroïdes hormonaux, quant à eux, ont des propriétés qui peuvent perturber le système hormonal d'un organisme. Par exemple, depuis une quinzaine d'années, des effets néfastes de certaines de ces substances ont été observés sur l'appareil sexuel humain (cancer des testicules chez l'homme, élévation de la fréquence du cancer du sein chez la femme) [12]. Ces derniers agissent également sur l'écosystème (baisse de la production spermatique, intersexuation, effets sur la mobilité, la reproduction, le développement embryonnaire...) [13-15].

Pour faire face à ces dangers potentiels et dans le cadre de la protection de l'Homme et de son environnement, l'Union Européenne a émis un certain nombre de directives importantes concernant « l'état chimique » des eaux et des sols. Nous noterons par exemple :

- la directive-cadre eau (directive 2000/60/CE) du 23 octobre 2000 [16] qui attache une importance particulière au bon état des eaux et à la restauration des milieux aquatiques (eaux souterraines, eaux de surface, eaux intérieures, rivière, lac,...). En effet, elle fixe des objectifs pour atteindre, à l'horizon 2015, le bon état chimique et écologique des eaux. L'un d'entre eux, par exemple, consiste à respecter les seuils de concentration des polluants dans les milieux aquatiques (norme de qualité environnementale ou NQE), un autre s'intéresse au bon fonctionnement des écosystèmes aquatiques associés aux eaux de surface [17, 18]. Actuellement, cette directive concerne la surveillance chimique de 41 composés dans les eaux, divisés en deux groupes : les substances prioritaires (33) et les substances prioritaires dangereuses (11), elles-mêmes réparties en quatre familles : les pesticides, les métaux lourds (Cd, Hg, Ni, Pb), les polluants industriels (benzène, nonylphénol, octylphénol,...) et les autres polluants (pesticides cyclodiènes,...) [19, 20]. Des substances prioritaires supplémentaires (au nombre de 15) ont été proposées en 2012. Parmi ces dernières, apparaissent des composés phytopharmaceutiques, des biocides, des composés chimiques industriels, des dérivés de combustion et des substances pharmaceutiques incluant deux stéroïdes hormonaux (la 17 α -éthinyloestradiol et la 17 β -estradiol) [20].

- une directive-cadre sur la protection des sols (COM(2006)232final) proposée le 22 septembre 2006, adoptée en première lecture en 2007, mais non adoptée définitivement [21]. En effet, il s'agit, à l'heure actuelle, uniquement d'un projet de directive cadre. Elle est particulièrement importante puisque le sol est le dernier milieu biologique, à côté de l'air et de l'eau à ne pas être protégé par un texte juridique, ni en droit français, ni en droit européen. Cette directive vise à prévenir la dégradation des sols et à remettre en état les sols pollués ou dégradés. En ce qui concerne la contamination des sols, la directive prévoit que les états membres prennent des mesures pour éviter leur contamination par des substances dangereuses. De plus, elle envisage un inventaire des sols pollués par de telles substances (impact de l'agriculture, de la pollution routière, des retombées de Tchernobyl,...). Enfin, elle prévoiera à un assainissement des sols pollués. Cependant aucune liste de molécules à surveiller n'a été déterminée. Pour cela, elle envisagera, tout d'abord, de compléter des directives déjà en vigueur telles que celle sur les boues de station d'épuration (86/278/CEE) [22] dans laquelle l'Union Européenne réglemente l'utilisation en agriculture de manière à éviter les effets nocifs sur les sols, la végétation, les hommes et les animaux. Elle interdit l'épandage de boues lorsque la concentration en métaux lourds dans les sols dépasse une

valeur limite (**Annexe 1**) ou quand les boues dépassent un seuil de métaux (**Annexe 1**). Cette directive sur les boues précise également les quantités annuelles de métaux lourds pouvant être introduites dans les sols (**Annexe 1**) [23]. La directive boues de 1986 a fixé les premières règles pour les métaux lourds, sans connaître réellement les impacts environnementaux des boues, dont la composition a en outre pu changer depuis (nouveaux produits dangereux tels que les pesticides, les résidus médicamenteux,...). Une nouvelle directive sur les boues est en préparation.

- le système REACH (enRégistrement, Evaluation et Autorisation des substances CHimiques) qui a pour objectif de mettre en place un dispositif global de surveillance et de contrôle de l'ensemble des substances chimiques élaborées, mises sur le marché ou utilisées en Europe. Il oblige les fabricants, les importateurs et les fournisseurs à répondre de la sécurité de leurs produits. Dans le même esprit, mais dans un contexte plus industriel que les directives précédentes, le but est de protéger l'Homme et son environnement contre les risques que peuvent poser certains produits chimiques. La mise en place de ce règlement s'effectue en plusieurs étapes. Tout d'abord, les composés fabriqués ou importés à des quantités supérieures à une tonne par an doivent être enregistrés dans une base de données. Si une substance n'est pas enregistrée, elle ne sera pas commercialisable. Des dates limites d'enregistrement de la substance doivent être respectées par les importateurs ou les fabricants. Ainsi, des composés vendus ou importés à plus de 1000 tonnes par an ont du être enregistrés avant le 30 novembre 2010. Pour le cas des substances produites ou importées entre 100 et 1000 tonnes par an et entre 1 et 100 tonnes par an, elles sont à enregistrer avant le 31 mai 2013 et le 31 mai 2018 respectivement. La deuxième étape consiste en l'évaluation du dossier c'est-à-dire vérifier s'il contient les informations demandées sur la substance tel que les propriétés physico-chimiques ou encore des données toxicologiques et écotoxicologiques. Si le dossier n'est pas complet, les autorités exigent que les industriels fassent des tests supplémentaires pour obtenir plus d'informations sur la substance. Enfin, une autorisation pour la fabrication, mise sur le marché ou utilisation d'une substance doit être demandée. Si une substance est utile dans un procédé de fabrication mais que cette dernière est reconnue ou suspectée être dangereuse pour l'Homme et son environnement, elle sera substituée par un autre composé qui pourra convenir à l'application [24].

L'évaluation de l'état chimique de l'eau ainsi que celle du sol est réalisée aujourd'hui principalement par la mesure de la concentration de substances polluantes. Les contaminants dits « émergents » (composés antibiotiques, stéroïdes hormonaux, détergents, cosmétiques,...) seront de plus en plus ciblés dans les années à venir par les différentes directives, en constante évolution afin de protéger l'Homme et son environnement. Les normes de qualité environnementale évoluant sans cesse, et les composés recherchés pouvant être présents dans l'environnement en très faibles quantités, il apparaît donc nécessaire de développer des outils permettant d'analyser ces contaminants à l'état de traces dans les différents compartiments de l'environnement (eaux et sols).

Dans ce contexte, nous nous sommes plus particulièrement intéressés, dans notre étude, à certains antibiotiques vétérinaires (familles des tétracyclines, fluoroquinolones, sulfonamides, diaminopyrimidines, macrolides, β -lactames, antiparasitaires et phénicolés) et stéroïdes hormonaux (incluant des androgènes, des progestagènes et des estrogènes). Quelques contaminants humains considérés comme marqueurs de pollution (médicaments et un plastifiant) ont également été ajoutés à notre liste puisque souvent utilisés et retrouvés dans l'environnement. De nombreuses méthodes ont d'ores et déjà été développées pour l'analyse de ces composés dans l'eau. En revanche, il existe peu de procédures pour le sol qui est une matrice relativement complexe (plus d'interférents, nécessité de rompre les interactions entre les substances et la matrice). De plus, les exemples de la littérature se limitent généralement à une classe de polluants. Peu ou pas de méthodologies inter-familles ont été développées pour la matrice solide. Or, il est indispensable de détecter et de quantifier, en un nombre réduit d'analyses, et donc en un temps raisonnable, diverses familles chimiques sur un même échantillon. Il est donc nécessaire de mettre en place des procédures permettant de détecter simultanément des composés ayant des propriétés physico-chimiques très différentes. Enfin, la répartition et le devenir de ces composés organiques émergents introduits régulièrement dans le sol sont loin d'être connus et caractérisés. Sur la base de méthodes d'analyses robustes et sensibles, des études doivent être mises en place afin d'évaluer le transfert, l'accumulation et la dégradation de ces substances dans la matrice solide.

L'objectif principal de ce travail a donc été de développer des méthodologies multi-résidus et multi-familles utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour l'analyse de traces d'antibiotiques vétérinaires et stéroïdes hormonaux

en phase aqueuse et en phase solide. Ces méthodes ont été appliquées à l'analyse d'échantillons environnementaux et à des études de suivi des contaminants au laboratoire, dans le cadre d'étude en colonnes de sol.

Après une étude bibliographique (partie I) et une présentation des matériels et des méthodes (partie II), nous développerons et discuterons les résultats obtenus (partie III). Cette dernière partie est divisée en quatre chapitres. Le premier traite du développement de la méthode multi-résidus et inter-familles pour l'analyse des composés en phase liquide. La procédure pour la phase solide sera développée au chapitre II dans lequel nous comparerons deux méthodes d'extraction, la PLE (Pressurized Liquid Extraction) et une procédure plus récente, QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). La méthodologie finale a été validée puis utilisée pour évaluer l'impact des paramètres du sol sur les rendements d'extraction et les effets matrice, grâce à une étude statistique (ANCOVA et r de Pearson). Le chapitre III sera consacré au cas particulier de l'analyse des tétracyclines et des fluoroquinolones dans la matrice solide. Le chapitre IV exposera les applications des deux méthodes (phases liquide et solide) à des échantillons réels ainsi qu'à une étude en colonne de sol. Enfin, nous concluons sur le travail réalisé durant cette thèse et ouvrirons sur des perspectives de recherche.

Références bibliographiques :

- [1]: http://sigessn.brgm.fr/IMG/pdf/Polluants_emergents.pdf, 11/12/2012.
- [2]: **K. Kumar, S. C. Gupta, Y. Chander, A. K. Singh**, 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87, 1.
- [3]: <http://e.hormone.tulane.edu/learning/estrogens.html>, 17/09/2012.
- [4]: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/mono100A-19.pdf>, 17/09/2012.
- [5]: **M. C. Audy, P. Vacher, B. Duly**, 1996. 17 beta-estradiol stimulates a rapid Ca²⁺ influx in LNCaP human prostate cancer cells. *European Journal of Endocrinology* 135, 367.
- [6]: **M. P. Schlüsener, K. Bester**, 2008. Behavior of Steroid Hormones and Conjugates During Wastewater Treatment – A Comparison of Three Sewage Treatment Plants. *Clean – Soil, Air, Water* 36, 25.
- [7]: **W. Xu, G. Zhang, X. Li, S. Zou, P. Li, Z. Hu, J. Li**, 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *water research* 41, 4526.
- [8]: **A. Bialk-Bielinska, J. Kumirska, R. Palavinskas, P. Stepnowski**, 2009. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta* 80, 947.
- [9]: **Y. Y. Yang**, Degradation and transport pathways of steroid hormones from human and animal waste. Colorado State University, For the Degree of Doctor of Philosophy.
- [10]: **A. E. V. d. Bogaard, E. E. Stobberingh**, 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 327.
- [11]: http://www.onema.fr/IMG/pdf/R_09_06381C_Action29_final.pdf, 31/01/2013.
- [12]: **P. T. C. Harrison, P. Holmes, C. D. N. Humfrey**, 1997. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *The Science of the Total Environment* 205, 97.
- [13]: 2002. Feminisation of fish. The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature.
- [14]: **L. G. Parks, C. S. Lambright, E. F. Orlando, L. J. Guillette, G. T. Ankley, L. E. Gray**, 2001. Masculinization of Female Mosquitofish in Kraft Mill Effluent-Contaminated Fenholloway River Water Is Associated with Androgen Receptor Agonist Activity. *Toxicological Sciences* 62, 257.
- [15]: http://www.usherbrooke.ca/environnement/fileadmin/sites/environnement/documents/Es_sais2011/de_Champlain_M__01-06-2011_.pdf,
- [16]: 2000. Directive 2000/60/CE du parlement européen et du conseil.
- [17]: http://sigessn.brgm.fr/IMG/pdf/Polluants_emergents.pdf, 18/09/2012.
- [18]: www.fne.asso.fr/breves_pdf/eau/dossier-dce.pdf, 18/09/2012.
- [19]: http://envlit.ifremer.fr/surveillance/directive_cadre_sur_l_eau_dce/etat_chimique, 18/09/2012.
- [20]: http://www.hydreos.fr/ckfinder/userfiles/files/06-%20L_Mouteaux_DCE%20RSDE,%20Hydr%C3%A9os,%20Oreau,%201er%20mars%202012.pdf, 18/09/2012.
- [21]: http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/128181_fr.htm, 07/09/2012.
- [22]: http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/128088_fr.htm, 07/09/2012.
- [23]: 1986. Directive du conseil relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture (86/278/CEE).
- [24]: <http://www.sequovia.com/guide-de-la-reglementation-reach.php>, 20/10/2012.

PARTIE I

Synthèse bibliographique : description et suivi des antibiotiques vétérinaires et stéroïdes hormonaux dans les eaux et le sol

I. Présentation des molécules sélectionnées au cours de la thèse : antibiotiques vétérinaires, stéroïdes hormonaux, contaminants humains :

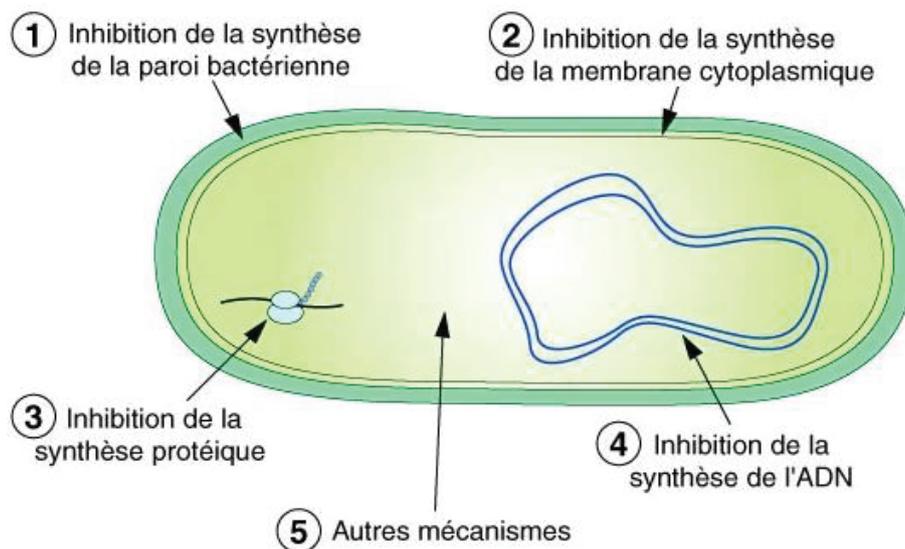
A. Présentation des trois familles :

1. Les antibiotiques vétérinaires :

a. Description :

Les antibiotiques, découverts dans la première moitié du XXe siècle, sont des substances chimiques organiques d'origine naturelle ou synthétique inhibant et tuant les bactéries. Les antibiotiques peuvent être classés selon leur origine (produit naturel ou de synthèse), leur spectre d'activité (liste des espèces pathogènes sur lesquelles les antibiotiques sont actifs), leur nature chimique ou enfin selon leur mode d'action [1]. Cette dernière classification est la plus souvent choisie. Tous les antibiotiques agissent à l'échelle moléculaire au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie d'une bactérie. Cependant, chaque antibiotique agit à un endroit spécifique de la bactérie. Certains inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (β -lactames), d'autres agissent sur la membrane cytoplasmique (polymyxines), d'autres interfèrent avec la synthèse protéique bactérienne (tétracyclines, macrolides, phénicolés,...) et enfin, des antibiotiques inhibent le métabolisme des acides nucléiques (sulfonamides, fluoroquinolones,...) (**Figure I.1**) [2].

Figure I.1 : Cibles de l'action des antibiotiques [2]



Ils ont d'abord été employés pour traiter des maladies infectieuses graves. De nos jours, ces composés sont également utilisés comme additifs dans la nourriture des animaux ce qui permet de promouvoir leur croissance.

Une partie des antibiotiques administrés n'est pas complètement métabolisée par l'organisme et est rejetée *via* les urines et les fèces, partiellement sous forme inchangée (molécule native), l'autre partie étant sous forme de métabolites (il existe des métabolites de phase I sous forme non conjuguée issus d'oxydation, réduction, hydrolyse qui sont actifs et des métabolites de phase II conjugués, par exemple acétyles, qui sont rendus inactifs par cette conjugaison) [3, 4]. Toutes ces substances sont donc susceptibles de se retrouver dans les différents compartiments environnementaux.

Un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires (2001/82/CE) a été mis en application. Il regroupe les dispositions en vigueur en matière de production, de mise sur le marché, de distribution et d'utilisation de ces médicaments pour un usage vétérinaire. Il permet notamment de limiter les risques pour les humains et l'environnement. Cependant, cette réglementation ne tient pas compte des aliments médicamenteux ou encore de certains additifs incorporés aux aliments des animaux [5, 6].

b. Consommation :

D'après le rapport ANMV (Agence National du Médicament Vétérinaire), le volume total de ventes en France s'élève à 1014 tonnes d'antibiotiques vétérinaires en 2010 [7]. Comme pour les enquêtes des années précédentes, les tétracyclines, les sulfonamides, les macrolides et les pénicillines représentent 80% du total. La famille des tétracyclines représente, à elle seule, plus de la moitié des ventes [7]. Le triméthoprime, appartenant à la famille des diaminopyrimidines est également très utilisé dans la médecine vétérinaire puisque 26 tonnes ont été vendues en 2010 ce qui correspond à 2.6% des ventes pour ce produit seul [7]. Le volume des ventes des fluoroquinolones pour un usage vétérinaire est plus faible (5.2 tonnes soit 0.5% du total des ventes). Cependant, elles sont souvent utilisées en médecine humaine pour traiter certaines maladies infectieuses, comme les infections des os, des articulations, de la peau ou encore des bronchites ou pneumonies. De plus, le total des ventes des fluoroquinolones tend à augmenter progressivement. Il est passé de 3.3 tonnes à 5.2 tonnes entre 1999 et 2010 [7]. Ce sont donc des substances de plus en plus susceptibles de se retrouver dans l'environnement.

Les antiparasitaires sont également fréquemment utilisés dans la médecine vétérinaire. Dans l'élevage, les infestations parasitaires ont un fort impact sur la productivité et la rentabilité. En

effet, les pertes infligées aux producteurs se chiffrent, à l'échelle mondiale, en milliards de dollars. La demande pour ces produits est très importante, par exemple 1.8 milliards de dollars ont été investis en 2008 pour prendre en charge l'achat d'antiparasitaires administrés aux animaux d'élevage [8]. C'est donc un des secteurs importants du marché des produits de la santé animale [9].

Le tonnage d'antibiotiques vendus en 2010 est le plus faible depuis le début du suivi des ventes en 1999. Il a diminué de 3.6 % par rapport à 2009 et globalement de 23.7% depuis 1999. Ce sont les ventes des tétracyclines et des sulfonamides qui ont le plus chuté : 625 tonnes de tétracyclines et 260 tonnes de sulfonamides étaient vendues en 1999 contre 472 tonnes et 174 tonnes respectivement en 2010 [7].

c. Propriétés physico-chimiques :

Des antibiotiques appartenant à différentes familles chimiques ont été choisis en fonction de leur consommation en médecine vétérinaire.

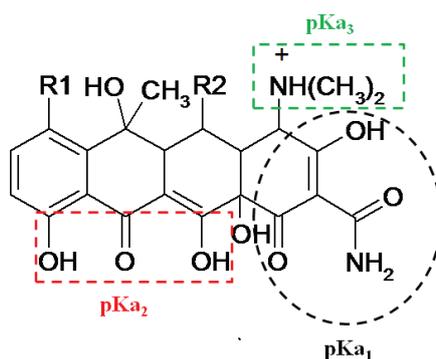
Tétracyclines :

Ces molécules ont pour caractéristique de posséder quatre cycles associés (**Figure I.2**). Elles sont substituées par des groupements plus ou moins hydrophiles (hydroxyle, amide, cétone) qui forment des chélates avec les cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) présents dans le milieu [10, 11]. Les tétracyclines auront alors tendance à se complexer avec les cations di ou tri-valents présents dans le sol et donc à être fortement adsorbées sur cette matrice et donc peu relarguées.

De plus, ces molécules ont un caractère amphotère. Effectivement, elles ont trois sites ionisables (**Figure I.2**) et peuvent exister sous formes cationique, anionique ou zwitterionique. Les tétracyclines seront donc plus ou moins adsorbées par le sol selon le pH, l'échange cationique étant connu pour être un processus d'adsorption très important [11, 12].

Enfin, ces substances sont polaires puisque leurs $\log K_{ow}$ sont compris entre -1.30 et -0.02. En effet, le $\log K_{ow}$ permet d'évaluer le caractère polaire des molécules. Si le $\log K_{ow}$ est inférieur à 1.5, les substances sont polaires alors que si il est supérieur à 3, les composés sont apolaires. Etant donné leur caractère polaire, les tétracyclines sont donc solubles dans l'eau.

Figure I.2 : Squelette de base de la famille des tétracyclines



Les tétracyclines étant très utilisées en médecine vétérinaire, quatre substances appartenant à cette famille ont été choisies pour notre étude : la tétracycline, l'oxytétracycline, la chlortétracycline et la doxycycline. Leurs propriétés sont rassemblées dans le **Tableau I.1**.

Tableau I.1 : Propriétés physico-chimiques des tétracyclines sélectionnées pour notre étude
[12-14]

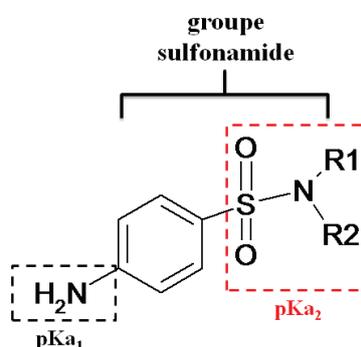
Composé	Formule semi-développée	log K_{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK _a
chlortétracycline		-0.62	630 (25°C)	pK _{a1} = 3.30 pK _{a2} = 7.44 pK _{a3} = 9.27
doxycycline		-0.02	630 (25°C)	pK _{a1} = 3.50 pK _{a2} = 7.70 pK _{a3} = 9.50
oxytétracycline		-0.90	313 (25°C)	pK _{a1} = 3.27 pK _{a2} = 7.32 pK _{a3} = 9.11
tétracycline		-1.30	231 (25°C)	pK _{a1} = 3.30 pK _{a2} = 7.68 pK _{a3} = 9.30

log K_{ow} = coefficient de partage octanol / eau

Sulfonamides et molécule associée (triméthoprimine) :

Les substances appartenant à la famille des sulfonamides possèdent un groupement sulfonamide (**Figure I.3**) qui leur confère un caractère polaire ($\log K_{ow}$ entre -0.62 et 1.63). Ces composés sont donc relativement solubles dans l'eau. Comme les tétracyclines, les sulfonamides sont des substances amphotères avec deux fonctions ionisables, l'amine aromatique étant faiblement basique et l'amide sulfoné étant, quant à lui, faiblement acide (**Figure I.3**). Les sulfonamides seront donc plus ou moins mobiles en fonction du pH dans les matrices environnementales, les composés sous leur forme anionique étant plus solubles dans l'eau [15].

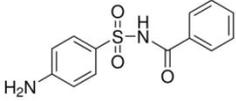
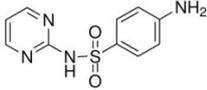
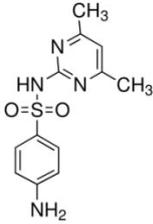
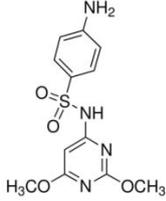
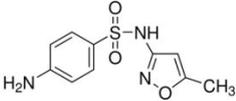
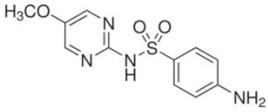
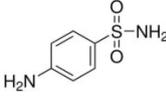
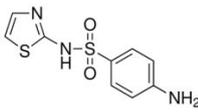
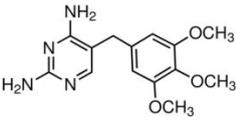
Figure I.3 : Squelette de base de la famille des sulfonamides



Etant donné que les sulfonamides sont très fréquemment administrés aux animaux, nous avons choisi d'introduire huit composés appartenant à cette famille d'antibiotiques dans notre étude : le sulfathiazole, la sulfadiméthoxine, la sulfadimérazine, la sulfanilamide, la sulfadiazine, la sulfabenzamide, la sulfaméthoxydiazine et le sulfaméthoxazole.

Le triméthoprimine a été inclus dans notre liste de substance ciblée car il s'agit d'un antibiotique très souvent utilisé en association avec un sulfonamide, notamment le sulfaméthoxazole. Cette combinaison représente une méthode efficace pour combattre les bactéries. Le triméthoprimine appartient à la famille des diaminopyrimidines qui incluent deux groupes aminés et un cycle pyrimidine. Ces substances ont un caractère basique lié aux deux groupements aminés. Le triméthoprimine est relativement polaire et soluble dans l'eau, présentant ainsi des propriétés physico-chimiques très proches des sulfonamides. Les propriétés des sulfonamides et du triméthoprimine sont données dans le **Tableau I.2**.

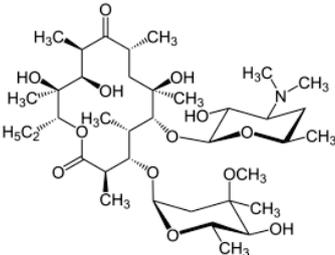
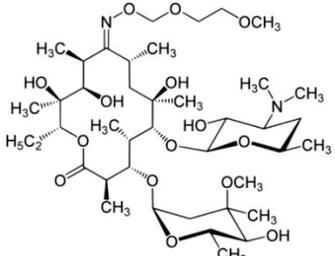
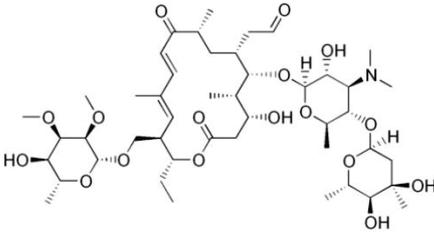
Tableau I.2 : Propriétés physico-chimiques des sulfonamides et du triméthoprime sélectionnés pour notre étude [13, 16-21]

Composé	Formule semi-développée	log K _{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK _a
sulfabenzamide		1.30	310 (30°C)	pK _{a1} = 1.20 pK _{a2} = 4.60
sulfadiazine		-0.09	77 (25°C)	pK _{a1} = 2.00 pK _{a2} = 6.50
sulfadimérazine		0.89	1500 (29°C)	pK _{a1} = 2.40 pK _{a2} = 7.40
sulfadiméthoxine		1.63	343 (25°C)	pK _{a1} = 2.00 pK _{a2} = 6.70
sulfaméthoxazole		0.89	610 (30°C)	pK _{a1} = 1.90 pK _{a2} = 6.00
sulfaméthoxydiazine		0.41	730 (30°C)	pK _{a1} = 1.48 pK _{a2} = 6.69
sulfanilamide		-0.62	7500 (25°C)	pK _{a1} = 2.40 pK _{a2} = 10.40
sulfathiazole		0.05	373 (25°C)	pK _{a1} = 2.40 pK _{a2} = 7.10
triméthoprime		0.91	400 (25°C)	pK _{a1} = 1.32 pK _{a2} = 7.45

Macrolides :

Les macrolides sont des molécules antibiotiques présentant des macrocycles lactoniques comprenant un ensemble de 14, 15 ou 16 atomes. Pour la plupart des macrolides, ce cycle est associé à un sucre aminé (désosamine) d'une part et à un sucre neutre d'autre part. Les lactones volumineuses sont substituées par un nombre réduit d'hydroxyles et de groupements polaires. Ces substances antibiotiques sont donc très peu polaires et peu solubles dans l'eau. Enfin, ces composés ont un caractère basique (pKa entre 7 et 9, amines tertiaires), la fonction amine de la désosamine étant protonée à $\text{pH} < \text{pKa}$ [22, 23]. Les macrolides seront donc susceptibles d'être peu mobiles dans les matrices environnementales puisque ces substances sont plutôt apolaires et généralement sous forme cationique, ce qui favorise leurs interactions avec les fractions particulières. Nous avons inclus trois macrolides dans notre étude : l'érythromycine, la roxithromycine et la tylosine. Leurs propriétés sont exposées dans le **Tableau I.3**.

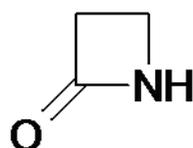
Tableau I.3 : Propriétés physico-chimiques des macrolides sélectionnées pour notre étude
[13, 24]

Composé	Formule semi-développée	log K_{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pKa
érythromycine		3.06	1.44 (25°C)	8.80
roxithromycine		2.75	0.02 (25°C)	9.17
tylosine		1.63	5 (25°C)	7.73

β-lactames :

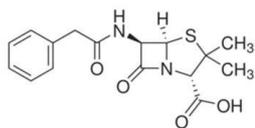
Ces antibiotiques possèdent un noyau (cycle β-lactame, amide cyclique, **Figure I.4**) qui est la partie biologiquement active de la molécule. Des variations au niveau de la chaîne latérale permettent de modifier les propriétés de la molécule antibiotique.

Figure I.4 : Cycle β-lactame (amide cyclique)



Nous avons choisi d'étudier la pénicilline G dont les propriétés sont présentées dans le **Tableau I.4**. Cette substance possède un groupement acide qui lui confère un caractère polaire. Elle existe sous plusieurs formes (neutre à $\text{pH} < \text{pK}_a$ et anionique à $\text{pH} > \text{pK}_a$), et se comporte donc différemment dans les compartiments de l'environnement en fonction du pH du milieu.

Tableau I.4 : Propriétés physico-chimiques de la pénicilline G sélectionnée pour notre étude
[13, 24, 25]

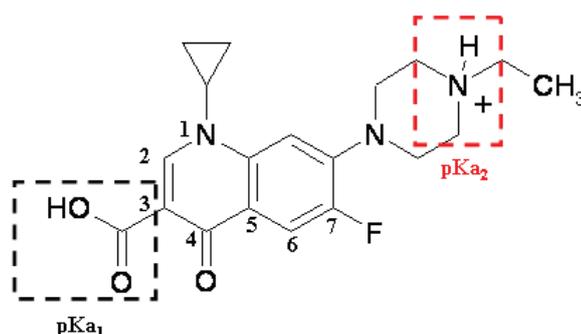
Composé	Formule semi-développée	$\log K_{ow}$	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK_a
pénicilline G		1.70	82900 (25°C)	2.80

Fluoroquinolones :

Les quinolones présentent une structure bicyclique avec un azote en position 1, une fonction acide carboxylique en position 3 et un carbonyle en position 4. Les fluoroquinolones contiennent, en plus, un fluor en position 7 (**Figure I.5**). La présence du fluor ainsi que d'une fonction acide carboxylique confère aux molécules un caractère polaire ($\log K_{ow}$ entre -1.03 et 0.89), elles sont donc relativement solubles dans l'eau. Comme les tétracyclines, ces substances forment des complexes stables avec les cations di et tri-valents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+}) : des interactions s'établissent également entre l'ion, l'oxygène de la cétone en position 4 et la fonction acide carboxylique ionisée (position 3) [26]. Les fluoroquinolones auront donc

tendance à s'adsorber sur le sol. De plus, ces composés ont pour la plupart deux fonctions ionisables, le groupe carboxyle et l'atome d'azote dans le cycle (**Figure I.5**). Différentes formes, cationique, zwitterionique et anionique seront présentes dans le milieu selon son pH ce qui influera sur sa mobilité.

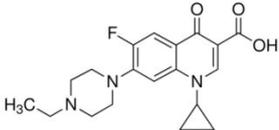
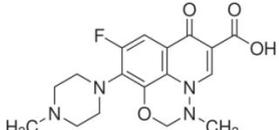
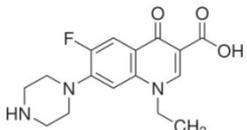
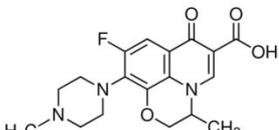
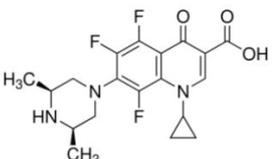
Figure I.5 : Exemple de l'enrofloxacin



Nous avons choisi d'étudier huit fluoroquinolones : la ciprofloxacine, l'enrofloxacin, l'ofloxacine, la norfloxacine, la danofloxacine, la marbofloxacine, l'orbifloxacine et la difloxacine. Leurs propriétés sont rassemblées dans le **Tableau I.5**.

Tableau I.5 : Propriétés physico-chimiques des fluoroquinolones sélectionnées pour notre étude [13, 26-30]

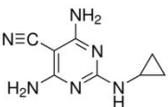
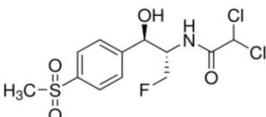
Composé	Formule semi-développée	log K _{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK _a
ciprofloxacine		0.28	30000 (20°C)	pK _{a1} = 5.90 pK _{a2} = 8.89
danofloxacine		-0.3	172000 (25°C)	pK _{a1} = 6.07 pK _{a2} = 8.56
difloxacine		0.89	1330 (25°C)	pK _{a1} = 4.33 pK _{a2} = 9.05

enrofloxacin		0.70	3400 (25°C)	pK _{a1} = 6.27 pK _{a2} = 8.30
marbofloxacin		-0.83	7520 (25°C)	pK _{a1} = 5.77 pK _{a2} = 8.22
norfloxacin		-1.03	178000 (25°C)	pK _{a1} = 6.23 pK _{a2} = 8.55
ofloxacin		-0.39	28300 (25°C)	pK _{a1} = 5.97 pK _{a2} = 8.28
orbifloxacin		-0.78	909 (25°C)	pK _{a1} = 5.95 pK _{a2} = 9.01

Antiparasitaire et phénicolé:

Pour finir, nous avons sélectionné un antiparasitaire et un phénicolé afin d'élargir le panel des familles d'antibiotiques étudiés. Ainsi nous avons choisi le dicyclanile qui est un antiparasitaire fréquemment utilisé chez les animaux, et le florfenicol. Leurs propriétés sont données dans le **Tableau I.6**. Le dicyclanile est peu polaire, à caractère basique (molécule protonée à pH < pK_a). Le florfenicol, quant à lui, est neutre et polaire ce qui est probablement dû à la présence du fluor, des atomes de chlore ou encore du SO₂ dans la molécule.

Tableau I.6 : Propriétés physico-chimiques du dicyclanile et du florfenicol [31-33]

Composé	Formule semi-développée	log K _{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK _a
dicyclanile		2.90	50000 (20°C)	4.58
florfenicol		-0.12	1300 (25°C)	9.03

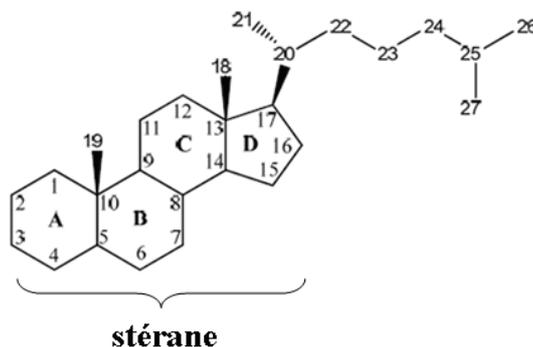
2. Les stéroïdes hormonaux :

a. Présentation :

Les stéroïdes hormonaux sont produits naturellement par les organismes vertébrés ou invertébrés (substances endogènes). La première étape dans leur production est la synthèse de la prégnénolone à partir du cholestérol dans les mitochondries des cellules sous l'action d'enzymes spécifiques. Par la suite, d'autres étapes transforment la prégnénolone en hormones stéroïdiennes [34]. Ces composés peuvent également être synthétisés en laboratoire (substances exogènes) pour ensuite être administrés aux hommes et aux animaux pour des usages pharmaceutiques.

Trois classes de stéroïdes hormonaux existent, les androgènes, les progestagènes et les estrogènes, qui diffèrent par leurs structures chimiques. La **Figure I.6** représente le cholestane qui est un hydrocarbure tétracyclique (stérane : trois cyclohexanes et un cyclopentane) saturé à 27 atomes de carbone fournissant le squelette fondamental de nombreux stéroïdes naturels.

Figure I.6 : Structure des stéroïdes (cholestane)



Stéroïdes classés en différentes sous-familles selon leur squelette hydrocarboné :

Estrane (C₁₈) : les estrogènes incluent tous les stéroïdes avec un squelette estrane

Androstane (C₁₉) : les androgènes incluent tous les stéroïdes avec un squelette androstane

Pregnane (C₂₁) : les progestagènes incluent tous les stéroïdes avec un squelette pregnane

Comme les antibiotiques, les stéroïdes hormonaux sont rejetés par les hommes et les animaux à la fois sous forme native et/ou conjugués inactives (glucuronides et/ou sulfatés) [35, 36] et sont donc susceptibles d'être retrouvés dans l'environnement.

b. Source et utilisation :

Chez les vertébrés, les androgènes naturels permettent le développement et le maintien des caractéristiques masculines (poil, voix,...) ou encore la reproduction (maintien de la spermatogénèse). La testostérone et la 5 α -dihydrotestostérone sont les androgènes naturels qui jouent les rôles les plus importants, ce sont les principales hormones sexuelles. L'androstènedione et la déhydroépiandrosterone (DHEA), quant à eux, sont produits en plus petites quantités [37].

Les estrogènes permettent le développement des caractéristiques féminines. Ils jouent également un rôle dans la reproduction (fonctionnement du cycle gonadique). Le plus abondant et le plus puissant est le 17 β -estradiol, il est présent à de fortes concentrations lors de l'ovulation. L'estrone et l'estriol sont les deux autres types d'estrogènes naturels [38].

Enfin, la progestérone est le seul progestagène naturel. Elle est impliquée dans le cycle menstruel féminin en apparaissant juste avant l'ovulation puis au cours de la deuxième partie du cycle. Elle joue également un rôle lors de la grossesse et l'embryogénèse des humains et d'autres espèces. Cependant des progestagènes de synthèse existent tels que le lévonorgestrel, la noréthindrone et le gestodène, utilisés comme contraceptifs.

Ces substances sont ensuite rejetées par l'organisme *via* les urines et les fèces. Les femmes excrètent environ 5 μ g/jour d'estradiol et d'estrone. Cependant la quantité d'estrogènes excrétée par une femme enceinte peut être mille fois plus élevée selon le stade de la grossesse [39]. De plus, les femmes excrètent entre 3 et 30 mg de progestérone par jour [40]. Les hommes, quant à eux, rejettent en moyenne 10 mg/jour d'androgènes, principalement de la testostérone et de l'androstènedione [39].

Tous les animaux excrètent également des hormones endogènes mais leurs quantités varient selon les espèces, l'âge, le sexe et le stade de la reproduction. Le **Tableau I.7** présente une estimation de l'excrétion annuelle d'hormones stéroïdiennes par des animaux de ferme. Les stéroïdes les plus retrouvés dans les fèces sont l'estrone, la 17 α - et la 17 β -estradiol pour les estrogènes, la testostérone et l'androstènedione pour les androgènes et enfin, la progestérone pour les progestagènes [41].

Tableau I.7 : Estimation de l'excrétion annuelle d'hormones stéroïdiennes par les animaux de ferme [41]

Espèces	Catégorie	Estrogènes (mg)	Androgènes (mg)	Progestagènes (mg)
BOVINS	veau (mâle)	16	120	
	taureau	200	390	
	femelle (cycle)	110		3200
	femelle (gestation)	990		4400
PORCS	sanglier	830	670	
	femelle (cycle)	43		1700
	femelle (gestation)	70		3900
MOUTONS	bélier	9.1		
	femelle (cycle)	8.4		730
	femelle (gestation)	19		850

Comme pour les vertébrés, le système endocrinien des invertébrés régule la croissance, le développement et la reproduction mais il est plus varié et moins connu que celui des vertébrés. Les mêmes hormones, la testostérone, la 17 β -estradiol, l'estrone et la progestérone ont été signalées mais leurs rôles ne sont pas encore parfaitement compris [42].

Des stéroïdes hormonaux naturellement présents dans l'organisme ou synthétiques peuvent également être administrés aux humains ainsi qu'aux animaux dans un but thérapeutique. Ces substances sont administrées aux humains pour la contraception. La plupart des pilules contraceptives contiennent une combinaison d'estrogènes et de progestagènes [38]. L'estrogène le plus utilisé pour la contraception est la 17 α -éthynylestradiol, cependant d'autres estrogènes sont également employés comme le mestranol et plus récemment l'estradiol. Plusieurs progestagènes sont utilisés : la progestérone, le noréthynodrel, la noréthindrone, le lévonorgestrel, la norgestimate, le gestodène et le désogestrel [43]. Les stéroïdes sont également prescrits aux humains pour des soins palliatifs lors de cancers. Par exemple, l'estradiol est utilisé pour le cancer de la prostate [44].

Des hormones sont également administrées aux animaux pour promouvoir la croissance ainsi que la synchronisation de l'ovulation. Les hormones utilisées sont principalement la testostérone, la progestérone, la 17 β -estradiol et deux hormones synthétiques, la trenbolone et le melengestrol [45]. Une directive du parlement européen (96/22/CE) concernant l'interdiction d'utilisation de ces substances à effet hormonal comme stimulateur de croissance a été mise en application. Elle vise à protéger la santé humaine des dangers liés à la consommation d'aliments provenant d'animaux traités avec des hormones (viande, lait...). Elle comprend une liste A de composés interdits (dont la 17 β -estradiol) et une liste B de

substances autorisées uniquement pour le traitement thérapeutique des animaux. D'autres composés, dont la testostérone et la progestérone, restent provisoirement interdits tant que des informations complémentaires ne permettent pas d'avoir une vision plus claire des risques potentiels. Cependant cette directive concerne uniquement le danger lié à l'alimentation humaine. Aucune réglementation n'a été mise en place dans le but de limiter la pollution des différents compartiments de l'environnement due aux rejets des animaux traités avec des substances hormonales [46, 47].

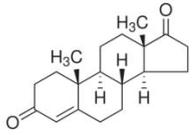
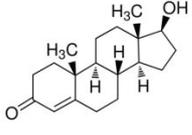
c. Propriétés physico-chimiques :

Différents stéroïdes hormonaux naturels et synthétiques ont été choisis, appartenant aux trois familles androgènes, progestagènes et estrogènes, sélectionnés parmi les plus produits/excrétés ou utilisés. Comme mentionné plus haut, ils se caractérisent par un noyau cyclopentanophénanthrénique (stérane) hydrophobe. Les stéroïdes hormonaux sont donc peu polaires. Ces propriétés sont communes à l'ensemble des familles étudiées.

Androgènes :

Nous avons choisi deux androgènes naturels, l'androstènedione et la testostérone dont les propriétés sont données dans le **Tableau I.8**.

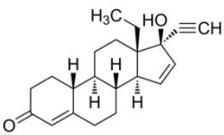
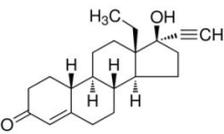
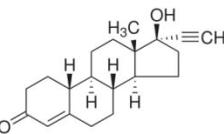
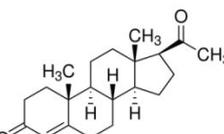
Tableau I.8 : Propriétés physico-chimiques des androgènes [13]

Composé	Formule semi-développée	log K _{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK _a
androstènedione		2.75	57.8 (25°C)	-
testostérone		3.32	23.4 (25°C)	-

Progestagènes :

Quatre progestagènes ont été étudiés dont trois synthétiques, le lévonorgestrel, la noréthindrone, le gestodène et un naturel, la progestérone. Le **Tableau I.9** rassemble leurs propriétés.

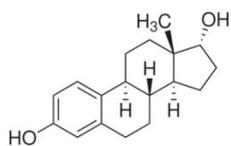
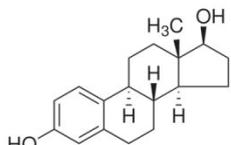
Tableau I.9 : Propriétés physico-chimiques des progestagènes [13, 48]

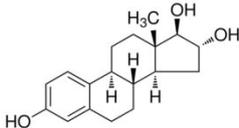
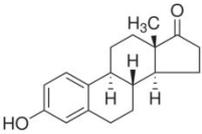
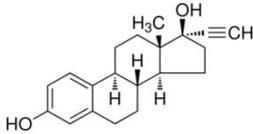
Composé	Formule semi-développée	log K _{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK _a
gestodène		3.26	8.12 (25°C)	-
lévonorgestrel		3.48	2.05 (25°C)	-
noréthindrone		2.97	7.04 (25°C)	-
progestérone		3.87	8.81 (25°C)	-

Estrogènes :

Nous avons choisi cinq estrogènes dont quatre naturels, la 17 α -estradiol, la 17 β -estradiol, l'estrone, l'estriol et un synthétique, la 17 α -éthynylestradiol. Leurs propriétés sont présentées dans le **Tableau I.10**.

Tableau I.10 : Propriétés physico-chimiques des estrogènes [13, 14, 49]

Composé	Formule semi-développée	log K _{ow}	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK _a
17 α -estradiol		3.94	2.9 (25°C)	10.70
17 β -estradiol		4.01	3.6 (25°C)	10.71

estriol		2.45	441 (25°C)	10.40
estrone		3.13	30 (25°C)	10.77
17 α -éthynylestradiol		3.67	11.3 (25°C)	10.05

3. Les contaminants humains :

a. Description et consommation :

En plus des antibiotiques vétérinaires et des stéroïdes hormonaux, quelques contaminants humains ont été intégrés à l'étude. Nous avons sélectionné des substances considérées comme marqueurs de pollution car fréquemment utilisées dans la vie quotidienne et retrouvées régulièrement dans l'environnement.

Parmi celles-ci figurent quatre médicaments humains : le paracétamol et l'ibuprofène (deux analgésiques), la carbamazépine (psycholeptique et antiépileptique) et la fluvoxamine (psycholeptique). En effet, les médicaments les plus fréquemment achetés par les français en officine sont les analgésiques qui représentent 21.2% des ventes en 2009. D'après le rapport de l'Afssap publié en 2011, le doliprane, le dafalgan et l'effergal, contenant tous les trois du paracétamol, ont été les médicaments les plus vendus en France en 2009. Les psycholeptiques arrivent à la deuxième place des ventes en pharmacies (5.1%) [50]. Comme les antibiotiques et les stéroïdes hormonaux, ces substances sont excrétées *via* les urines et les selles sous forme inchangée ou de métabolites. Ces composés proviennent principalement d'un usage domestique mais aussi des rejets d'industries chimiques pharmaceutiques et d'établissements de soins [51]. Enfin, nous avons choisi un plastifiant, le bisphénol A, utilisé pour réaliser des produits tels que du polycarbonate ou des résines époxy. Sa production mondiale annuelle en 2006 a été estimée à 3.8 millions de tonnes [52]. Il est rejeté dans l'environnement principalement lors du processus de fabrication. Ce composé, qui fait actuellement l'objet de restrictions d'usage, a été pendant longtemps présent dans un grand nombre de secteurs d'activités : dans la plupart des conditionnements d'aliments et de boissons, les jouets et les

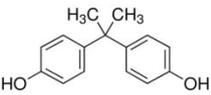
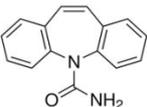
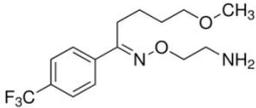
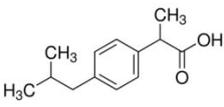
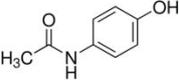
articles de puériculture, voire les tickets de caisse des supermarchés et, dans certains cas, le matériel médical [53].

b. Propriétés physico-chimiques :

Les propriétés des cinq contaminants humains choisis (bisphénol A, carbamazépine, fluvoxamine, ibuprofène et paracétamol) sont rassemblées dans le **Tableau I.11**. Ces substances sont plutôt apolaires ($\log K_{ow}$ entre 2.5 et 4) sauf le paracétamol qui est polaire ($\log K_{ow} = 0.46$) du fait de la présence de la liaison amide (CO-NH) très polaire et du groupement hydroxyle. Ces contaminants humains sont donc peu solubles dans l'eau hormis le paracétamol et l'ibuprofène, probablement grâce à sa fonction acide carboxylique.

La carbamazépine est une substance neutre, la fluvoxamine est un composé basique qui sera protoné à $\text{pH} < \text{pKa}$. Le paracétamol, l'ibuprofène et le bisphénol A sont, quant à eux, acides et donc ionisés négativement à $\text{pH} > \text{pKa}$. En conclusion, ces substances seront donc plus ou moins mobiles dans le sol en fonction de leur polarité et de leur solubilité dans l'eau, mais également du pH du milieu.

Tableau I.11 : Propriétés physico-chimiques des contaminants humains [13, 54-56]

Composé	Formule semi-développée	$\log K_{ow}$	Solubilité dans l'eau (mg/L)	pK_a
bisphénol A		3.64	120 (25°C)	9.59
carbamazépine		2.45	17.7 (25°C)	13.90
fluvoxamine		2.80	7.3 (25°C)	9.40
ibuprofène		3.97	21000 (25°C)	5.20
paracétamol		0.46	14000 (25°C)	9.90

B. Toxicité des résidus de ces substances sur l'homme et l'animal :

1. Les antibiotiques vétérinaires :

L'utilisation d'antibiotiques pour traiter les infections ou comme additifs alimentaires peut engendrer un problème de développement de micro-organismes résistants aux antibiotiques. Des résistances à des fluoroquinolones, tétracyclines ou encore pénicillines ont déjà été observées, comme l'illustre le **Tableau I.12** qui résume les études comparant l'effet d'antibiotiques dans l'alimentation des animaux sur la résistance microbienne. Tous ces travaux mettent en évidence que les lisiers des animaux dont l'alimentation est enrichie en antibiotiques contiennent plus de bactéries résistantes que ceux des animaux non nourris avec des antibiotiques. L'ajout d'antibiotiques augmente donc le risque de présence de souches résistantes dans l'environnement, ce qui représente une réelle menace pour la santé humaine et des animaux [57, 58].

Tableau I.12 : Présence de bactéries résistantes aux antibiotiques dans les lisiers provenant d'animaux nourris avec des antibiotiques ou d'animaux non traités [57]

Type de lisier / fèces	résistance (%)	résistance (%)	pays	type de résistance	références
	avec antibiotiques	sans antibiotiques			
excréments de poulet	92	17	Danemark	Vancomycine	[59]
excréments de porc	71	9	USA	Pénicilline Tétracycline	[57]
excréments de porc	84	22	USA	Pénicilline Tétracycline	[57]
excréments de dinde	60	8	Hollande	Vancomycine	[60]
Nombre de CFU*/gramme [*CFU : Colony Forming Units (bactéries)]					
lisier de porc	2.9×10^7	7.5×10^6	Danemark	Tétracycline	[61]
litière de volaille	10^1 à 10^5	10^1 à 10^2	USA	Fluoroquinolone	[62]

Par ailleurs, les antibiotiques peuvent avoir des effets toxiques sur les écosystèmes. Bien que pour ces substances, la littérature mentionne que des effets aigus (à court terme) ne sont observés qu'à des concentrations supérieures à celles mesurées dans l'environnement [63-67], nous ne pouvons pas conclure quant à la non toxicité de ces composés. En effet, les données écotoxicologiques sont encore peu nombreuses et notamment en ce qui concerne les effets chroniques (à long terme) [63, 68]. De plus, des études reconnaissent les limites des tests

écotoxicologiques [63]. Effectivement, et par exemple pour le milieu aquatique, des tests ont été effectués récemment en mettant au point de nouveaux critères d'évaluation des effets tels que la production d'œufs, le rythme cardiaque, le comportement qui sont en lien direct avec les importantes fonctions écologiques telles que la reproduction, la croissance et la prédation. Pour ces derniers exemples, des effets sont observés à des concentrations comparables à celles retrouvées dans l'environnement. Ces substances présentent donc un risque. Il paraît nécessaire d'approfondir les recherches expérimentales pour mieux comprendre les effets des antibiotiques, en particulier à long terme, sur l'état des écosystèmes [63].

2. Les stéroïdes hormonaux :

Certains stéroïdes hormonaux ont des propriétés perturbatrices du système endocrinien, système composé de l'ensemble des organes qui possèdent une fonction de sécrétion d'hormones. Le système endocrinien permet de réguler les fonctions biologiques telles que l'homéostasie (pour maintenir stable les propriétés du corps telles que la température ou le pH par exemple), la croissance ou la reproduction. Les perturbateurs endocriniens augmentent ou inhibent l'action des hormones endogènes.

Chez les humains, l'augmentation, ces dernières décennies, de cancers des testicules et de la prostate chez l'homme et du sein chez la femme peut être en partie expliquée par la présence, dans l'environnement, de ces substances perturbant le système endocrinien. Les composés incriminés seraient des substances qui auraient des activités estrogéniques ou bien d'autres activités hormonales [69].

De nombreux effets néfastes ont été observés sur les écosystèmes. Par exemple, chez les animaux, la féminisation de mâles a été constatée. Effectivement, la présence de 17β -estradiol à 5 ng/L dans des effluents d'eaux usées (exposition contrôlée de poissons mis en cage) a induit la production de vitellogénine chez les mâles (protéine qui amorce la formation de jaune d'œufs, non présente chez les mâles) [70]. Un phénomène d'intersexuation (apparition d'organes sexuels féminins dans les organes reproducteurs mâles) a été observé chez le poisson pour une concentration de 10 ng/L seulement de 17β -estradiol [70]. Pour des concentrations plus élevées, des effets aux niveaux des testicules ont été constatés. Par exemple des problèmes dans le développement des cellules germinales (susceptibles de former des spermatozoïdes) ont été observés pour des concentrations en 17β -estradiol supérieures à 100 ng/L [70]. La formation de jaune d'œuf et l'intersexuation ont également été remarqués chez le poisson lors de la présence d'estrone dans les effluents d'eaux usées à des concentrations de 10 ng/L et 30 ng/L [70]. Ce phénomène de féminisation de poissons

mâles a été observé dans des effluents de stations d'épuration en Europe (Angleterre, Suède, Norvège, Hollande, France, Espagne et Danemark), aux Etats-Unis et au Japon. Suite à ces observations, la féminisation a été étudiée dans des eaux de surface et dans l'eau de mer, sur différentes espèces de poissons sauvages : gardons, goujons, carpes, brèmes, chevaines, truites, loquettes et gobies présentes [70]. Si les signes de la féminisation sont les mêmes dans tous les lieux étudiés (production de vittellogénine, intersexuation,...), des pays semblent plus ou moins touchés par ce phénomène. Par exemple, la féminisation a été plus largement détectée en Angleterre que dans les autres pays d'Europe [70].

D'un autre côté, la testostérone et l'androstènedione peuvent induire une masculinisation des poissons femelles. Par exemple, la présence de ces hormones mâles dans des rivières aux Etats-Unis entraîne la masculinisation des nageoires anales (gonopode, organe qui permet la reproduction) des gambusies femelles [71].

D'autres effets, en plus de l'intersexuation ont été observés sur les espèces aquatiques en présence de stéroïdes hormonaux tels que l'inhibition du développement du nauplius (premier stade larvaire après l'éclosion) ou de la mobilité. Des effets sur les phéromones, le développement embryonnaire et la reproduction ont également été constatés [72].

Le **Tableau I.13** présente les effets toxiques des stéroïdes hormonaux sur des espèces aquatiques ainsi que quelques valeurs de CL_{50} (toxicité létale d'une substance qui correspond à la concentration occasionnant la mort de 50% des individus étudiés), CME0 (concentration minimale avec effets observés) et CE_{50} (concentration avec effets sur 50% des espèces).

Tableau I.13 : Toxicité des stéroïdes hormonaux sur des espèces aquatiques

Composés	Espèces	Durée du test	Toxicité	Effets	Références
ANDROGENES					
testostérone	<i>Acartia tonsa</i> (microcrustacés)	48 h	CL ₅₀ = 5,6 mg/L	mortalité	
		7 jours	CE ₅₀ = 1,5 mg/L	inhibition du développement du nauplius	[72]
	<i>Petromyzon marinus</i> (poisson lamproie)		CME0 = 3 ng/L	effets sur les phéromones	
	<i>Oryzias latipes</i>	6 jours	CME0 = 100 µg/L	présence de gonades intersexuées	
PROGESTAGENES					
progestérone	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (oursin)	96 h	CE ₅₀ = 0,55 ng/L	effet sur le développement embryonnaire	[72]
ESTROGENES					
estradiol	invertébrés (microcrustacés, oursins, ...)	48 h - 14 jours	CE ₅₀ = 0,01 ng/L – 2,87 mg/L	inhibition du développement, de la mobilité, du développement embryonnaire	[72]
	vertébrés (amphibiens, poissons)	96 h - 100 jours	CME0 = 1 ng/L – 1 µg/L	changement dans le ratio de sexe en faveur des femelles, présence de gonades intersexuées,	

estriol	invertébrés (oursins)	96 h	CE ₅₀ = 1,52 ng/L	réduction de la croissance testiculaire, féminisation des poissons, induction de la vitellogénèse, développement d'ovules dans les testicules
				développement embryonnaire
				induction de la vitellogénèse [72]
				changement dans le ratio de sexe en faveur des mâles
estrone	Neomysis integer (microcrustacés)	96 h	CL ₅₀ > 10 mg/L	développement d'ovules dans les testicules
				mortalité
				inhibition du développement du nauplius [72]
estrone	invertébrés (microcrustacés, oursins)	96 h - 7 jours	CE ₅₀ = 0,41 mg/L	effet sur le développement
				CE ₅₀ = 0,6 ng/L

Partie I : Synthèse bibliographique

17 α -ethinylestradiol	vertébrés invertébrés (microcrustacés, oursins)	CE ₅₀ = 60 ng/L – 3.68 μ g/L CL ₅₀ = 1,1-5,7 mg/L	embryonnaire induction de la vitellogénèse mortalité
	48 h – 96 h		
	96 h -7 jours	CE ₅₀ = 0.03 ng/L - 105 μ g/L	effet sur le développement embryonnaire, inhibition du développement du nauplius, effet sur la reproduction [72]
		CL ₅₀ = 1,6 mg/L	mortalité
	vertébrés (poissons)		
	96 h		
	1 - 21 jours	CE ₅₀ = 2.96 – 8.89 ng/L	diminution des protéines immunitaires, du nombre des leucocytes

Nous remarquons que les toxicités sublétales (CMEO et CE₅₀) sont relativement faibles (inférieures au ng/L) pour certaines espèces ce qui peut être inférieures aux concentrations retrouvées dans l'environnement. Les stéroïdes hormonaux présentent un réel risque pour l'écosystème aquatique.

Aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature sur la toxicité dans le sol.

Il est à noter que les effets des stéroïdes hormonaux, à court ou long terme, sur la santé des hommes et des écosystèmes sont encore peu connus et compris. Des effets additifs, synergiques ou antagonistes peuvent être observés, difficiles à prévoir à partir des données toxicologiques des substances étudiées individuellement. Cet « effet cocktail » représente un véritable défi pour les scientifiques [45, 73].

3. Les contaminants humains :

Pour finir, nous allons aborder la toxicité des cinq contaminants humains choisis. Le paracétamol semble avoir des effets nocifs uniquement à des concentrations très supérieures à celles retrouvées dans l'environnement [63]. Cependant, il a été montré que l'ibuprofène a des effets sur le développement embryonnaire et la reproduction chez certains poissons aux concentrations retrouvées en sortie de station d'épuration [51]. La carbamazépine peut également affecter le développement embryonnaire (malformation de la queue par exemple) chez les poissons (les tests ont été effectués sur des *Danio rerio*) [74]. Cependant, comme dans le cas des antibiotiques, les tests écotoxicologiques concernant les composés pharmaceutiques doivent être approfondis pour évaluer au mieux les risques de ces substances sur les écosystèmes [63].

Le bisphénol A, quant à lui, est avéré toxique. Des études ont été effectuées à des doses inférieures à 5 mg/kg/jour (voie orale) sur des animaux (amphibiens ou rongeurs tels que les souris et les rats). Tout d'abord, des effets sur le système reproducteur mâle ont été identifiés : chez un animal adulte, l'exposition au bisphénol A pendant cinq semaines induit une diminution du nombre de spermatozoïdes. Peu de données sont disponibles pour le système reproducteur femelle [75]. L'exposition au bisphénol A pendant les périodes pré- ou périnatales peut également avoir des effets sur le cerveau et le comportement (anxiété) chez les animaux [75]. Pour ces derniers, il peut aussi provoquer un accroissement de la quantité de glandes mammaires susceptibles de développer ultérieurement des tumeurs mammaires ou encore une augmentation du poids de la prostate qui pourrait engendrer une hyperplasie. Cette substance a également un effet sur la thyroïde chez les amphibiens et les rongeurs [75]. En conclusion, pour les animaux étudiés, le bisphénol A est susceptible d'induire des

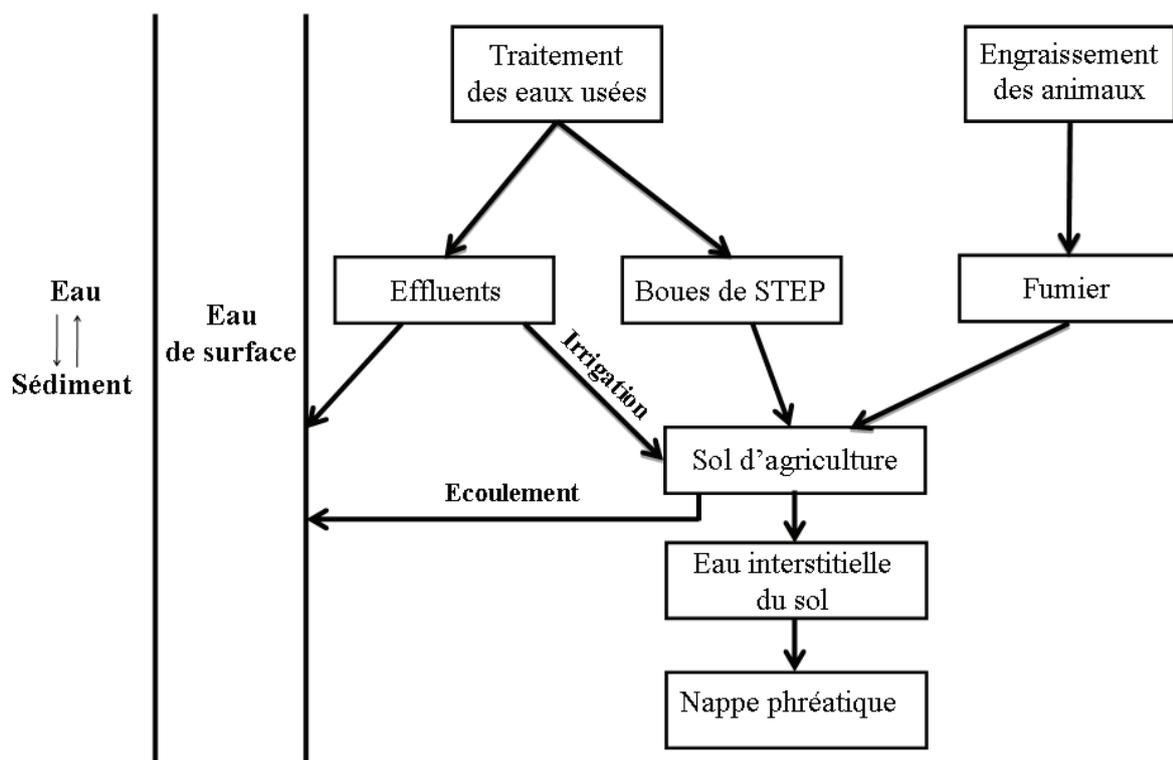
modifications physiologiques importantes *via* son activité estrogénique. L'axe thyroïdien semble également sensible à ce composé. En l'absence de données chez l'homme, les experts retiennent les effets avérés chez l'animal et suspectés chez l'homme pour l'établissement de l'évaluation des risques [75].

C. Occurrence des antibiotiques vétérinaires et stéroïdes hormonaux dans l'environnement :

1. Voie d'introduction dans l'environnement :

La Figure I.7 représente les différentes sources de contamination de l'environnement par les antibiotiques vétérinaires et les stéroïdes hormonaux.

Figure I.7 : Représentation schématique des différentes sources de contamination adapté de [73]



Boues de STEP = Boues de station d'épuration

Grâce aux progrès dans l'analyse physico-chimique ces dix dernières années, la présence de traces d'antibiotiques et d'hormones a été largement établie à l'échelle mondiale, dans les

effluents, les eaux souterraines et de surface, les boues de station d'épuration et les sols, ce qui a permis d'élucider leurs voies d'introduction dans l'environnement.

Les effluents des stations d'épuration sont une des principales sources de contamination des eaux. Les déchets d'antibiotiques non utilisés ainsi que les antibiotiques et hormones rejetés par les humains et les animaux à la fois sous forme non métabolisée et sous formes conjuguées parviennent jusqu'aux stations d'épuration. Une partie de ces composés n'est pas éliminée lors du traitement des eaux. Effectivement, M. P. Schlüsener et K. Bester ont rapporté une élimination partielle des stéroïdes hormonaux dans les stations d'épuration, entre 64% et 82% pour l'estriol par exemple [76]. D'après K. Kumar *et al.*, elle varie entre 54% et 99% pour la plupart des antibiotiques [57]. W. Xu *et al.* ont mesuré le taux d'élimination des fluoroquinolones, sulfonamides et macrolides dans quatre stations d'épuration situées en Chine. Il est de 57% et 66% en moyenne pour l'ofloxacin et la norfloxacine respectivement. Concernant les macrolides, il est de 48% et 26% en moyenne pour la roxithromycine et l'érythromycine respectivement. Enfin, il est de 64% au maximum pour le sulfaméthoxazole. Le taux d'abattement dépend donc fortement de la substance. De plus, les pourcentages d'élimination dans les différentes stations d'épuration résultent de beaucoup de facteurs tels que le type de procédé utilisé, la température ou encore l'apport en eau de pluie. Ils varient donc d'une station à une autre mais également entre différentes périodes pour une même station [77]. En outre, la forme conjuguée est souvent clivée pour redonner la molécule native lors du passage de ces composés dans les stations d'épuration [35, 36]. Les substances sont donc retrouvées dans les effluents et les boues de station d'épuration majoritairement sous forme du composé parent.

Comme les boues de station d'épuration, les fumiers contiennent des antibiotiques et des hormones en grande partie sous formes non conjuguées [78]. En effet, il a été montré que les formes sulfatées ou glucuronidées redonnent la molécule mère lors du stockage du fumier [3, 36]. Pour la fertilisation des sols, ces derniers sont souvent traités avec du fumier ou des boues de station d'épuration. L'épandage des boues représente 62% de l'élimination des boues municipales produites en France (1.18 million de tonnes de matières sèches en 2008) [79]. Les sols sont donc potentiellement contaminés par les antibiotiques et les hormones suite à un transfert des composés de la boue ou du fumier jusqu'au sol [80].

Les épandages de boues sont réglementés, ils sont les plus encadrés de tous les épandages de matières sur les sols (fumier, engrais,...) [79]. Nous pouvons citer par exemple la directive sur les boues de station d'épuration (86/278/CEE) [81] qui concerne uniquement les métaux

lourds (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Hg, Cr). Cependant les réglementations ne prennent pas en compte la présence de polluants organiques (à l'exception des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphényles (PCB)). Plus récemment, la directive-cadre sur la protection des sols (COM(2006)232final) a été proposée afin de lutter contre la régression et la dégradation des sols. Toutefois, ce n'est encore qu'un projet de directive cadre. En particulier, des mesures doivent être adoptées pour limiter l'introduction de substances dangereuses dans le sol qui entraîneraient des risques pour la santé humaine ou pour l'environnement. Cependant, à l'heure actuelle, aucune liste de composés dangereux susceptibles de polluer les sols n'a été élaborée [82]. Enfin, aucune réglementation sur l'épandage de fumier n'a été mise en place pour limiter l'introduction de contaminants.

L'écoulement d'eaux provenant de sols contaminés représente également une source de contamination des eaux de surface. Les polluants peuvent également être entraînés en profondeur par lixiviation et ainsi atteindre les nappes phréatiques ou les eaux souterraines [73].

Pour finir, la pollution des sols par les retombées atmosphériques (sèches ou humides) représente une source importante de contamination (voire souvent la plus importante).

2. Présence des antibiotiques vétérinaires dans l'environnement :

a. Dans l'eau :

De nombreux composés antibiotiques ont été retrouvés dans les eaux (**Tableau I.14**). En effet, les tétracyclines, les sulfonamides, le triméthoprime, les fluoroquinolones et la tylosine sont présents dans des eaux de surface ou effluents de différents pays. Ceci n'est pas surprenant car ces substances sont polaires ($\log K_{ow}$ entre -1.30 et 1.63). L'érythromycine, peu polaire ($\log K_{ow} = 3.06$) a également été détectée dans des rivières d'Italie. Cependant, les concentrations de ce composé restent assez faibles (souvent inférieure au ng/L et pouvant atteindre au maximum quelques dizaines de ng/L). Les teneurs les plus élevées sont retrouvées dans les effluents de station d'épuration mais surtout dans les effluents d'hôpitaux.

Tableau I.14 : Teneurs en antibiotiques dans des eaux

Composés	Pays	Echantillons	Concentrations	Références
tétracyclines, sulfonamides, macrolides, fluoroquinolones	Etats-Unis	Rivières	quelques dizaines - quelques centaines de ng/L	[83]
sulfaméthoxazole	Espagne	fleuve (Ebre)	< MLQ	[84]

triméthopri­me			1 - 20 ng/L	
triméthopri­me	Serbie	Rivière	20 ng/L	[85]
érythromycine	Italie	rivière (Lambro)	jusqu'à 17.4 ng/L	[86]
		fleuve (Pô)	0.7 - 0.9 ng/L	
		eau potable	0.6 - 1.7 ng/L	
tylosine		rivière (Lambro)	jusqu'à 2.2 ng/L	
ciprofloxacine	Suisse	effluents de station	45 - 331 ng/L	[87]
norfloxacine		d'épuration	48 - 367 ng/L	
fluoroquinolones	Allemagne	effluents d'hôpitaux	0.7- 124.5 µg/L	[80]

Dans le cadre d'études menées en France, F. Tamtam *et al.*, par exemple, ont étudié l'occurrence d'antibiotiques à divers endroits de la Seine [88]. Ils ont ciblés deux sulfonamides (la sulfadimérazine et le sulfaméthoxazole), le triméthopri­me et des fluoroquinolones. Les résultats montrent que la sulfadimérazine n'est que très peu retrouvée alors que le sulfaméthoxazole et le triméthopri­me sont souvent présents dans les eaux analysées. Ceci n'est pas étonnant car ils sont très souvent utilisés en association. De plus, les teneurs retrouvées en sulfonamides et triméthopri­me dans la Seine sont comparables à celles détectées dans les autres pays (quelques dizaines de ng/L). Dans cette même étude, les fluoroquinolones sont très peu retrouvées, ce qui confirme les résultats obtenus sur les rivières des Etats-Unis dans lesquelles entre 0 et 3% des eaux seulement contenaient des fluoroquinolones [74]. Les teneurs en antibiotiques détectées dans la Seine sont présentées dans le **Tableau I.15**.

Tableau I.15 : Teneurs en sulfonamides, triméthopri­me et fluoroquinolones dans la Seine [88]

Composés (fréquence, %)	Concentrations
sulfadimérazine (0 – 40%)	< 10 ng/L - 69 ng/L
sulfaméthoxazole (100%)	
triméthopri­me (16 – 70%)	11 - 27 ng/L
fluoroquinolones (0 – 10%)	19 - 30 ng/L

Ce travail représente une des rares études effectuées sur la présence d'antibiotiques dans les eaux de France. C'est pourquoi il est important de développer de nouvelles méthodologies pour évaluer la contamination des eaux françaises par les antibiotiques.

b. Dans le sol :

Seulement très peu de données sont disponibles pour le sol. Les résultats sont présentés dans le **Tableau I.16**.

Tableau I.16 : Teneurs en antibiotiques dans des sols

Composés	Pays	Echantillons	Concentrations	Références
tétracyclines	Allemagne	sols traité avec du lisier	jusqu'à 0.2 ng/g	[80, 89]
tétracycline	Allemagne	sols traité avec du lisier	200 ng/g	[90]
chlortétracycline			4.6 - 7.3 ng/g	
macrolides	Allemagne	sols agricoles	13 - 67 ng/g	[91]
fluoroquinolones	Suisse	sols traité avec du lisier	jusqu'à 300 ng/g	[90]
		sols traité avec des boues		

3. Présence des stéroïdes hormonaux dans l'environnement :

a. Dans l'eau :

En ce qui concerne les stéroïdes hormonaux, des androgènes, progestagènes et estrogènes ont été signalés dans différents types d'eaux (eaux de surface, effluents de station d'épuration). Pour les androgènes (androstènedione, testostérone), les teneurs retrouvées dans des eaux de rivière varient entre 1.2 ng/L et 116 ng/L selon les substances et les pays. Les progestagènes (lévonorgestrel, noréthindrone, progestérone) sont également présents dans des eaux de surface à des concentrations entre 0.5 ng/L et 110 ng/L. Enfin, des estrogènes (17 α -estradiol, 17 β -estradiol, estrone, estriol et 17 α -éthynylestradiol) sont détectés dans des eaux de surface à des concentrations comprises entre 0.1 ng/L et 74 ng/L et des effluents de station d'épuration à des concentrations entre 0.1 et 80 ng/L. Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau I.17**.

Tableau I.17 : Teneurs en stéroïdes hormonaux contenus dans les eaux

Composés	Pays	Echantillons	Concentrations (fréquence, %)	Références
testostérone	Etats-Unis	Rivières	116 ng/L (5%)	[45, 83]
noréthindrone			48 ng/L (13%)	
progestérone			110 ng/L (5%)	
estrogènes			9 - 74 ng/L (6 - 22 %)	
androstènedione	Chine	rivière (Danshui)	8.1 - 8.6 ng/L	[92]
testostérone			1.2 ng/L	
lévonorgestrel			3.7 - 22.2 ng/L	

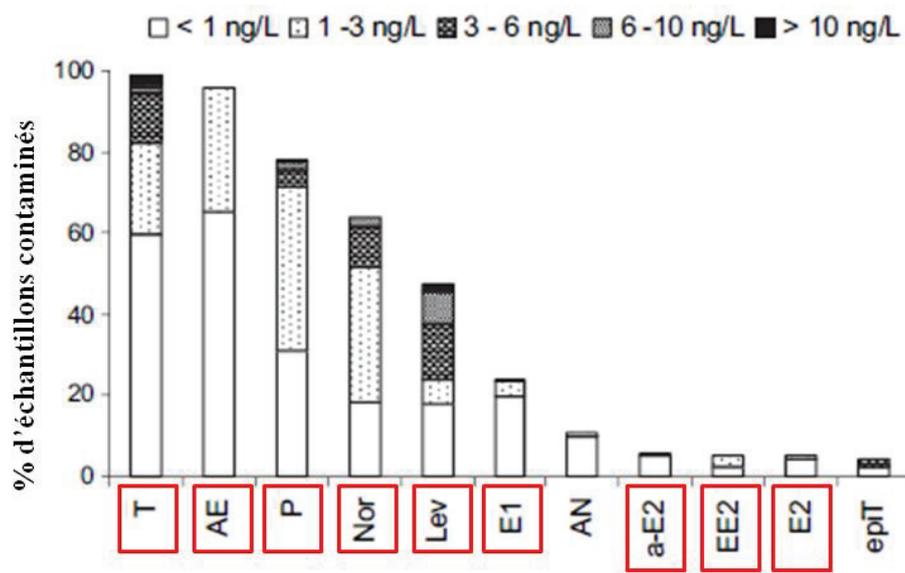
progestérone			0.5 - 2.5 ng/L	
estrone			6.0 - 13.3 ng/L	
estrogènes	Hollande	effluents de station d'épuration eaux de surface	0.1 - 47 ng/L < 0.1 - 5.5 ng/L	[45, 93]
17β-estradiol			1 - 50 ng/L	
estrone	Royaume-Uni	effluents de station d'épuration	1 - 80 ng/L > 7 ng/L	[45]
17α-éthinyloestradiol				

Hormis l'étude menée dans les rivières des Etats-Unis (screening à l'échelle nationale effectué entre 1999 et 2000) qui présente des résultats globalement plus élevés, les substances retrouvées et les teneurs relevées sont semblables dans les différents pays.

Dans certains cas, les teneurs en stéroïdes hormonaux présentes dans les eaux sont supérieures aux seuils de toxicité (des valeurs de toxicité sublétales sont inférieures au ng/L). Les stéroïdes hormonaux présentent donc des risques pour les espèces aquatiques.

Nous pouvons comparer ces résultats avec une étude récente effectuée en France par E. Vulliet et C. Cren-Olivé qui ont étudié l'occurrence de stéroïdes hormonaux dans 70 eaux de surface et 71 eaux souterraines. Cette étude complète les données obtenues précédemment en incluant une large gamme d'androgènes et progestagènes, contrairement à la plupart des études précédentes surtout dirigées vers l'analyse des estrogènes. Les résultats sont présentés sous forme de graphique (**Figure I.8**) [40].

Figure I.8 : Teneurs en stéroïdes hormonaux dans des eaux de surface et souterraines en France (T : testostérone, AE : androstènedione, P : progestérone, Nor :norethindrone, E1 : estrone, a-E2 : 17 α -estradiol, EE2 : 17 α -éthinyloestradiol, E2 : 17 β -estradiol, les composés encadrés en rouge correspondent à ceux sélectionnés dans notre étude [40])



Tout d'abord, nous remarquons que les quantités d'androgènes, progestagènes et estrogènes retrouvées dans les eaux en France sont du même ordre de grandeur que les teneurs détectées dans les autres pays (**Tableau I.17**). Nous pouvons également remarquer que les androgènes et les progestagènes sont plus fréquemment présents dans les eaux que les estrogènes, ce qui n'avait pas pu être conclu avec les travaux précédents. Ceci est en accord avec l'excrétion des hormones par les hommes et les animaux. En effet, comme mentionné dans la partie A.2.b., les femmes excrètent 5 $\mu\text{g}/\text{jour}$ d'estradiol et d'estrone (estrogènes) et entre 3 et 30 mg/jour de progestérone (progestagènes); les hommes excrètent en moyenne 10 mg/jour d'androgènes. Les animaux, quant à eux, excrètent quelques centaines de mg d'estrogènes et d'androgènes et quelques milliers de mg de progestagènes par an. Enfin, comme dans le cas précédent, les teneurs retrouvées pour certains composés sont supérieures aux seuils de toxicité sublétales ce qui présente un réel risque pour les écosystèmes aquatiques.

b. Dans le sol :

Pour la matrice solide, les rares données disponibles montrent une contamination des sols avec des hormones pouvant atteindre une centaine de ng/kg [39, 73, 94]. Quelques résultats sont présentés dans le **Tableau I.18**.

Tableau I.18 : Teneurs en stéroïdes hormonaux contenus dans les sols

Composés	Pays	Echantillons	Concentrations	Références
estradiol	Etats-Unis	sol traité avec du lisier	675 ng/kg	[39, 73, 94]
testostérone			260 ng/kg	

4. Présence des contaminants humains dans l'environnement :

a. Dans l'eau :

Enfin, nous avons étudié la présence, dans les eaux, des contaminants humains ciblés dans notre étude. Les résultats sont exposés dans le **Tableau I.19**.

Tableau I.19 : Teneurs en contaminants dans les eaux

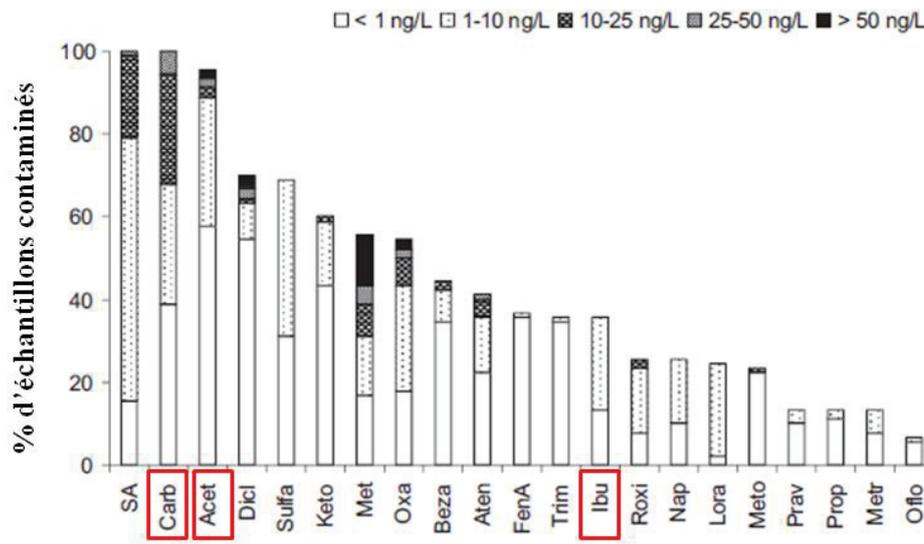
Composés	Pays	Echantillons	Concentrations (occurrence, %)	Références
carbamazépine	Espagne	fleuve (Ebre)	2 - 110 ng/L	[84]
	Serbie	rivière	8 - 130 ng/L (80%)	[85]
paracétamol	Espagne	fleuve (Ebre)	< MLD - 250 ng/L	[84]
	Serbie	rivière	78 - 610 ng/L (15%)	[85]
	Etats-Unis	rivière	110 ng/L (23.8%)	[83]
ibuprofène	Italie	fleuve (Pô) et rivières (Lambro, Adda)	1 - 92.4 ng/L	[86]
	Etats-Unis	rivières	200 ng/L (9.5%)	[83]
bisphénol A	Etats-Unis	rivières	114 ng/L (41.2%)	[83]
	Chine	bouteille d'eau	18 - 324 ng/L	[95]
		eau du robinet	2 - 317 ng/L	[95]

Nous remarquons que ces contaminants humains sont présents dans les eaux de surface à des teneurs comprises entre le ng/L et quelques centaines de ng/L. La carbamazépine est la plus fréquemment retrouvée (80% des échantillons en Serbie). Le bisphénol A est également souvent détecté (41.2% des eaux analysées aux Etats-Unis). Le paracétamol est moins présent

(15% et 23.8% en Serbie et aux Etats-Unis respectivement). Enfin, l'ibuprofène est le moins détecté (9.5% aux Etats-Unis) des quatre contaminants ciblés.

Nous allons comparer ces résultats avec les valeurs trouvées par E. Vulliet et C. Cren-Olivé qui ont évalué la présence de la carbamazépine, du paracétamol et de l'ibuprofène dans 70 eaux de surface ainsi que 71 eaux souterraines de France [40]. Les résultats obtenus sont exposés sous forme de graphique (**Figure I.9**).

Figure I.9 : Teneurs en médicaments dans des eaux de surface et souterraines en France (Carb = carbamazépine, Acet = acétaminophène = paracétamol, Ibu = ibuprofène, les composés encadrés en rouge correspondent à ceux sélectionnés dans notre étude) [40]



Tout d'abord, nous remarquons que ces trois contaminants sont détectés dans les eaux françaises à des teneurs comparables à celles trouvées dans les autres pays (< 1 ng/L - 71 ng/L) Nous observons que, comme pour les autres pays, la carbamazépine est la plus fréquemment retrouvée dans les eaux puis le paracétamol et, dans une moindre mesure, l'ibuprofène. Ce classement peut se justifier par le fait que les psycholeptiques sont beaucoup consommés par les français et que les analgésiques à base de paracétamol sont les plus vendus en pharmacie en France.

b. Dans le sol :

Très peu de données sont disponibles sur la présence de contaminants humains dans le sol. Les données disponibles sont rassemblées dans le **Tableau I.20**.

Tableau I.20 : Teneurs en contaminants dans les sols

Composés	Pays	Echantillons	Concentrations	Références
bisphénol A	Espagne	sédiments de rivière	50 ng/g	[96]
carbamazépine ibuprofène	Mexique	sols irrigués avec des eaux usées	5 - 7 ng/g < ng/g	[97]

Le manque d'études sur l'occurrence des antibiotiques, stéroïdes hormonaux et contaminants humains dans le sol s'explique par le manque de méthodes analytiques disponibles à l'heure actuelle. C'est pourquoi, il est nécessaire d'optimiser des méthodes sensibles et sélectives pour analyser ces contaminants émergents dans les sols. Elles permettront non seulement d'acquérir plus de données sur l'état de contamination des sols, mais permettront également d'étudier le devenir de ces substances dans cette matrice (transfert, accumulation, dégradation).

II. Présentation de la matrice principale choisie pour l'étude : le sol :

A. Introduction :

Le sol, et plus particulièrement la phase inorganique du sol, se forme à partir d'une roche sous l'action des agents climatiques, des organismes vivants et de l'homme.

L'épaisseur du sol varie de quelques dizaines de centimètres à plusieurs mètres. Le sol recouvre la surface des continents. Il a permis, au cours du temps, le développement des végétaux supérieurs et l'extension de la vie. Il permet la production des aliments et assure la biodiversité.

Grâce au remaniement du sous-sol par divers évènements géologiques et/ou géochimiques et au recyclage à long terme de constituants organiques, il assure la fourniture de matériaux pour l'énergie (charbon, pétrole, gaz...) et plus généralement pour l'industrie (minerais...) et la construction (pierres, graviers...). Le sol peut être un réservoir de substances polluantes inorganiques (éléments métalliques...) ou organiques (pesticides, antibiotiques, stéroïdes

hormonaux...) contaminant ainsi les eaux souterraines et de surface ainsi que les végétaux mais il peut également être considéré comme un puits pour ces composés en les retenant et les dégradant. Enfin, il a la capacité de stocker du carbone ce qui permet de limiter l'effet de serre, le sol peut donc contribuer à la qualité de l'environnement [98].

B. Les compartiments du sol :

Le sol est un milieu à trois phases (solide, liquide et gazeuse) contenant des organismes vivants. Les proportions de ces phases varient en fonction de l'état hydrique des sols et des contraintes mécaniques qu'ils subissent. La phase solide occupe entre 40 et 70% du volume total du sol, la partie restante correspondant aux phases fluides. La phase gazeuse est présente uniquement dans les sols secs, l'eau devenant largement majoritaire dans un sol hydraté [98].

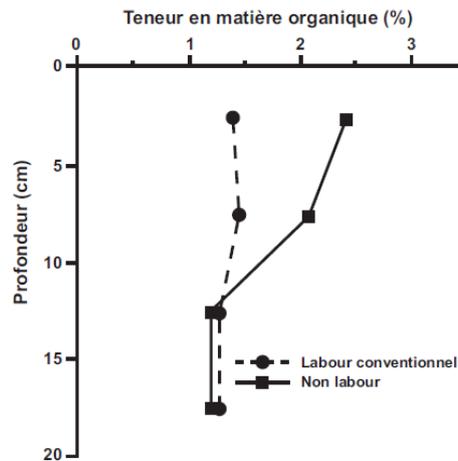
1. La phase solide :

La phase solide du sol est constituée de matières organiques (matière vivante, humus qui est la couche supérieure du sol, constituer de la matière organique en décomposition) et de minéraux (quartz, silicate...) en proportions variables [98].

a. La matière organique :

La matière organique du sol peut être définie comme une matière carbonée provenant de la décomposition et du métabolisme d'êtres vivants végétaux, animaux, fongiques et microbiens. Leur quantité dépend du climat ou encore de la végétation, elle est donc liée à l'endroit géographique. Son abondance est également variable en fonction du type de sol et très étroitement reliée aux conditions de la pédogénèse (ensemble des processus physiques, chimiques et biologiques responsables de la transformation au cours du temps d'une roche mère en sol, puis de l'évolution de ce sol). De plus, la teneur en matière organique est aussi fonction du traitement du sol [98]. Par exemple, le travail de ce dernier perturbe sa structure. En effet, le labour engendre une augmentation du taux d'oxygène et de la température ce qui expose la matière organique, auparavant protégée, à la minéralisation en surface [99]. Le taux de matière organique pour les sols cultivés diminue donc en surface tandis que le taux reste constant en profondeur par rapport aux sols non travaillés (**Figure I.10**) [100].

Figure I.10 : Effet du labour sur la teneur en matière organique dans le sol [100]

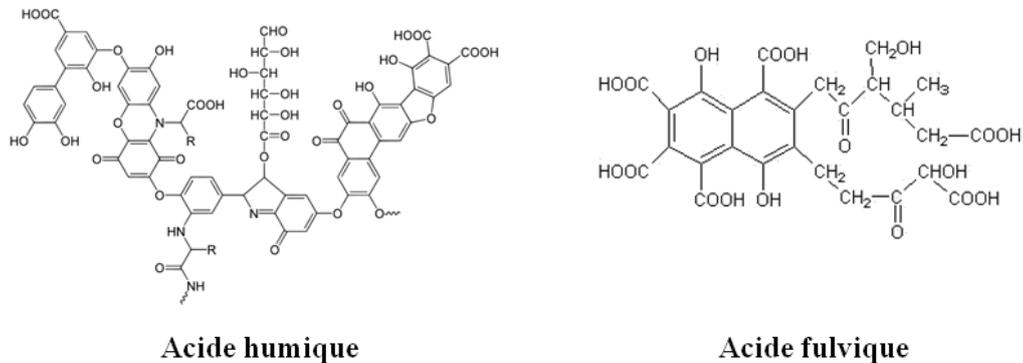


Les sols cultivés contiennent entre 0 et 20% de carbone organique et beaucoup ont des teneurs entre 1 et 10% [98]. Comme le montre la **Figure I.10**, les matières organiques ne sont pas réparties de manière uniforme dans les sols et leur teneur décroît en profondeur. De plus, cette répartition dépend également du type de sol.

La matière organique se répartit en deux catégories d'importance très inégale selon leur stabilité dans les sols. Tout d'abord, nous retrouvons les constituants inertes (charbon de bois, graphite) qui ne se transforment pas et n'évoluent donc pas. Ils ne constituent qu'une proportion négligeable des sols. La partie la plus importante comprend des constituants susceptibles de subir des transformations et d'être dégradés ; ce sont les matières organiques particulières et moléculaires. La matière organique moléculaire est elle-même divisée en deux parties. Tout d'abord, elle comprend des substances non humiques qui sont des biomolécules provenant soit de la dégradation de constituants cellulaires, soit de synthèse microbienne. L'autre partie est constituée de substances humiques qui sont des macromolécules acides, de taille variable, de composition chimique et de structure complexes. Ces substances humiques comprennent des acides humiques et fulviques et l'humine qui sont les constituants organiques du sol les plus importants (environ 60% de la matière organique) [98, 101]. La structure des acides humiques et fulviques est analogue (**Figure I.11**). Elle présente des noyaux aromatiques reliés par des chaînes aliphatiques et des groupements fonctionnels à caractère acide. L'humine étant insoluble en solution aqueuse à tous les pHs, ce constituant est peu connu. Il n'existe pas encore de consensus sur la nature chimique de ce composé et diverses conceptions ont été avancées. Ainsi, l'humine serait, selon les auteurs, des acides

humiques avec quelques différences, des polymères ligno-protéiques de masse moléculaire élevée ou encore constituée par des polysaccharides complexes [98].

Figure I.11 : Structure des acides humique et fulvique



b. Les minéraux :

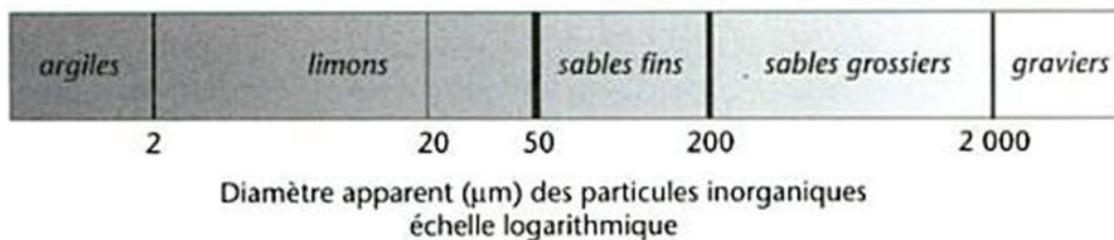
La fraction minérale est faite des fragments de roche issus du sous-sol comprenant, du plus gros au plus fins, des sables, des limons et des argiles [102]. Les constituants du sable et du limon sont variables en fonction de la roche originelle et de son évolution mais pour l'essentiel, il s'agit de quartz. La classe « argile » est constituée en majeure partie de phyllosilicates aux propriétés variables (kaolinites, pyrophyllite, smectites, illites, vermiculites, chlorites, micas, montmorillonites...) [98, 103].

Les particules sont classées de la façon suivante, en fonction de leur diamètre [103] :

- sables : de 2 mm à 50 µm (sables grossiers : 2 mm à 0.2 mm ; sables fins : 0.2 mm à 50 µm)
- limons : de 50 µm à 2 µm (limons grossiers : 50 µm à 20 µm ; limons fins : 20 µm à 2 µm)
- fraction fine, principalement les argiles : < 2 µm

La **Figure I.12** illustre et résume les classes granulométriques.

Figure I.12 : Classes granulométriques (norme française, AFNOR 1998) [98]

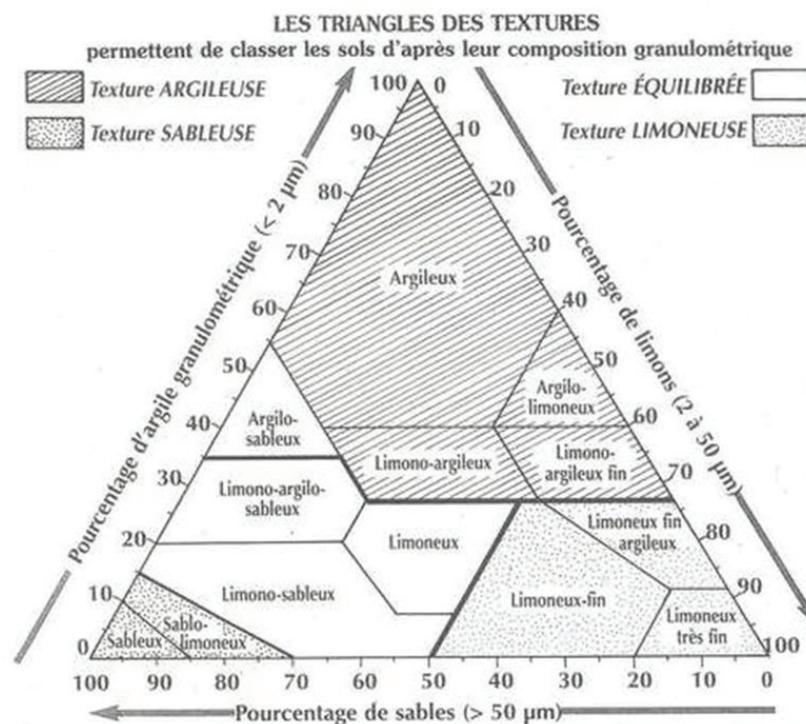


Enfin, des ions tels que les anions phosphate (PO_4^{3-}), sulfate (SO_4^{2-}) et nitrate (NO_3^-) sont également présents dans la fraction minérale.

c. Le triangle des textures :

Les propriétés physiques, mécaniques ou hydriques des sols dépendent de leur composition granulométrique. Cette composition peut se représenter par un point dans un diagramme ternaire ou triangle des textures où chaque côté du triangle représente respectivement les teneurs (exprimées en %) en sable, limon et argile (**Figure I.13**).

Figure I.13 : Triangle des textures [104]



Les diagrammes de texture sont très utilisés pour décrire les propriétés du sol mais ils ne prennent pas en compte plusieurs facteurs susceptibles d'avoir une influence importante sur les propriétés physiques du sol tel que la quantité de matière organique [98].

2. Les phases liquide et gazeuse, l'espace poral :

La phase liquide du sol est une solution dont la composition est complexe et très variable contenant des substances dissoutes organiques et inorganiques. Elle est souvent désignée par l'expression « solution du sol ». La phase gazeuse du sol aussi appelée « l'atmosphère du

sol » a une composition voisine de celle de l'air qui est variable dans l'espace et dans le temps [98].

Ces phases sont principalement contenues dans la partie poreuse du sol. Deux types de pores coexistent dans le sol : les macropores dont la taille varie de quelques centimètres à quelques centaines de micromètres et les micropores compris entre quelques micromètres et quelques nanomètres où circulent l'eau et plus généralement les liquides et les gaz. Les macropores permettent la circulation de l'eau, mais ce sont les micropores qui en assurent le stockage [105].

3. Les organismes vivants :

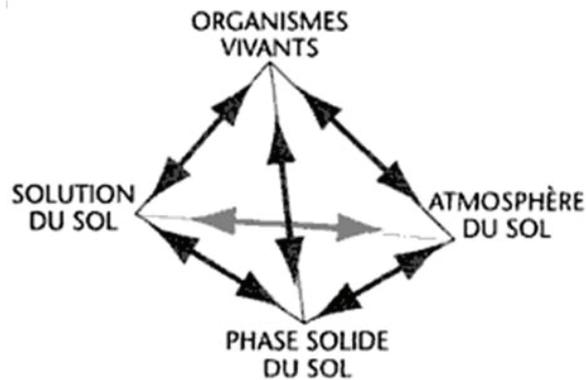
Le sol héberge de très nombreux organismes vivants qui sont de nature très variée. Ils confèrent au sol des caractéristiques importantes, un sol ne peut donc exister en leur absence. Ces organismes vivants participent en effet activement à la pédogénèse ainsi qu'à différentes autres fonctions du sol. Leur quantité et leur nature dépendent du type de sol, de la végétation, du climat et des diverses actions anthropiques. Nous pouvons distinguer :

- les macro-organismes animaux et végétaux qui incluent : les lombrics, les mollusques, les enchytréides, arthropodes et nématodes sans oublier les racines.
- les micro-organismes : protozoaires, algues, champignons et bactéries [98].

C. Conclusion :

Le sol est donc un système très complexe composé de quatre compartiments, les trois phases, solide, liquide et gazeuse et les organismes vivants. Ces compartiments sont en interaction permanente grâce à des échanges d'énergie et de matière (**Figure I.14**). Ce phénomène induit en particulier la pédogénèse des sols.

Figure I.14 : Le système sol [98]



Les doubles flèches indiquent l'existence de transferts de matière et d'énergie entre les compartiments. Par exemple, pour le système sol :

transfert d'ions de la phase liquide vers la phase solide = adsorption

transfert d'ions de la phase solide vers la phase liquide = désorption

transfert d'oxygène de l'atmosphère vers les organismes vivants du sol = respiration

transfert d'oxyde d'azote des organismes vivants du sol vers l'atmosphère = dénitrification

III. Etat de l'art : méthodes analytiques utilisées :

De nombreuses méthodes analytiques existent pour l'analyse de substances vétérinaires et de stéroïdes hormonaux dans des matrices aqueuses mais beaucoup moins de procédures ont été développées pour analyser ces mêmes composés dans le sol.

Le protocole analytique est constitué de plusieurs étapes. Tout d'abord, un prétraitement de l'échantillon est nécessaire. Par la suite, une étape de préparation d'échantillon est effectuée, qui consiste à extraire et/ou concentrer les substances d'intérêt tout en limitant la présence d'interférents. Les extraits obtenus sont ensuite analysés, généralement par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.

Ce paragraphe résume les techniques de préparation d'échantillon / séparation / détection les plus souvent employées pour analyser les substances vétérinaires et les stéroïdes hormonaux dans les eaux et les sols.

A. Prétraitement des échantillons :

1. Matrices aqueuses :

Dans les eaux prélevées, les contaminants sont présents dans la fraction dissoute et/ou particulaire (matières en suspension). Les eaux environnementales sont donc filtrées à travers un filtre de microfibrilles de verre (généralement inférieur à 1 μm) [106-108]. Les parties

liquide et solide sont ensuite traitées et analysées séparément. Afin de limiter la prolifération bactérienne qui pourrait conduire à des dégradations avant analyse, différents additifs peuvent être utilisés : azide de sodium (NaN_3), différents acides (par exemple HCl , HNO_3 , H_2SO_4), soude, formaldéhyde [109-111].

2. Matrices solides :

Le sol est une matrice hétérogène, une étape de prétraitement est donc indispensable pour obtenir des résultats analytiques représentatifs.

Les solides à analyser contiennent de l'eau en proportions variables. Pour garantir la reproductibilité de la méthode, la teneur en eau doit être constante. De plus, le résultat analytique est souvent exprimé en quantité de matière sèche. Un séchage est donc indispensable. Celui-ci peut être effectué par lyophilisation, à l'étuve ou encore par séchage à l'air. Lorsque la lyophilisation est employée, les substances à analyser ne doivent pas être volatiles alors que dans les deux derniers cas, la température ne doit pas excéder 40°C (pour éviter la « modification » des différentes parties du sol telles que la matière organique par exemple) [112].

De plus, l'échantillon doit être homogénéisé pour assurer la répétabilité des résultats. Pour cela, le sol sera donc tout d'abord broyé pour réduire la taille des particules puis tamisé, la taille des particules devant être inférieures ou égales à 2 mm [112, 113]. Un échantillon homogène composé de fines particules est donc obtenu. Cette préparation permettra, en outre, une extraction efficace car le solvant pourra être facilement en contact avec une grande surface d'échantillon.

B. Préparation d'échantillon :

L'étape de préparation d'échantillon peut être effectuée en utilisant différentes techniques mais toutes ont les mêmes objectifs :

- extraire la substance d'intérêt de la matrice
- augmenter la concentration des analytes cibles
- supprimer les interférents potentiels

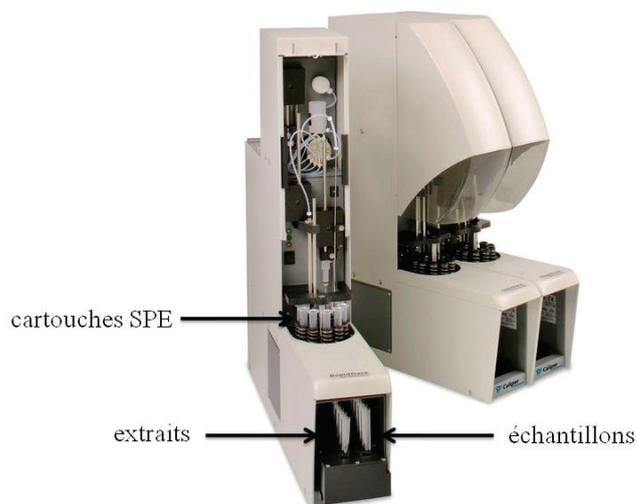
La tendance de ces dernières années est de limiter l'utilisation de solvant organique ainsi que d'employer des techniques les plus automatisées possible [114].

1. Matrices aqueuses :

a. Extraction sur phase solide (SPE) :

Plusieurs techniques d'extraction, de purification et de concentration sont utilisées pour les matrices aqueuses. La plus employée est, de loin, la méthode SPE (Solid Phase Extraction) dont le principe est basé sur les interactions entre une phase solide contenue dans une cartouche, la phase mobile (matrice aqueuse, solution éluante) et les composés à extraire. La SPE consiste à faire percoler l'échantillon aqueux à travers la cartouche pour piéger les analytes recherchés ou les interférents. Les différentes étapes d'une extraction de type SPE sont détaillées au paragraphe IV de la partie II. Sa rapidité, son efficacité et le large choix de phases adsorbantes disponibles expliquent son large succès. De plus, elle nécessite une faible quantité de solvant ce qui est, à l'ère de la chimie verte, un avantage non négligeable.

Figure I.15 : Appareil de SPE



Plusieurs types de phases sont utilisés pour extraire les antibiotiques et les hormones de matrices aqueuses [114] :

- des sorbants à base de silice C18 [84, 93, 106, 107, 115-121]. Cette phase est utilisée plutôt pour des substances peu ou pas polaires.
- des matériaux polymères. Les cartouches les plus employées sont : la OASIS HLB, copolymère composé de divinylbenzène lipophile et de N-vinylpyrrolidone hydrophile (**Figure I.16**), ainsi que la StrataX dont le monomère est un styrène modifié avec un groupement pyrrolidone (**Figure I.17**) [40, 84, 85, 92, 106-108, 117-120, 122-135]. Des interactions π - π peuvent s'établir entre les composés à extraire et le cycle benzénique présent

dans les phases polymères. Les substances peuvent également interagir avec le groupement pyrrolidone, en formant des liaisons hydrogènes ou par interactions dipôle-dipôle (forces de Keesom). Enfin, des interactions apolaires (forces de London) peuvent se créer (avec la chaîne alcane et le cycle benzénique). Ces deux phases permettent donc d'extraire tout type de composé, du polaire à l'apolaire.

Figure I.16 : Structure de la cartouche OASIS HLB

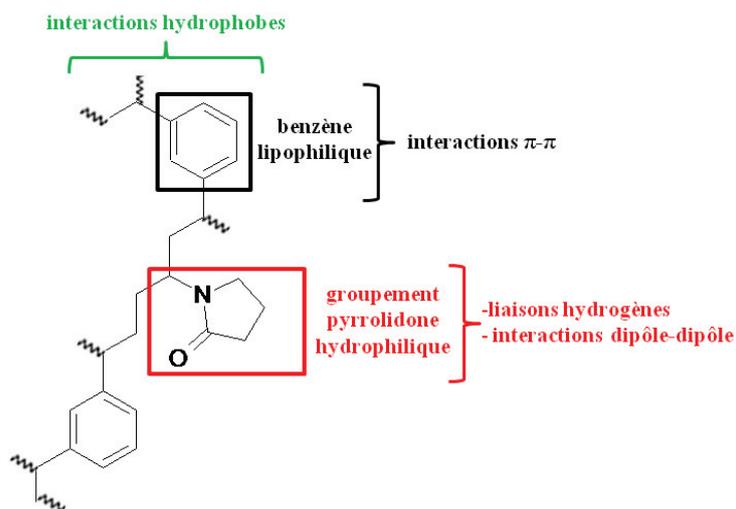
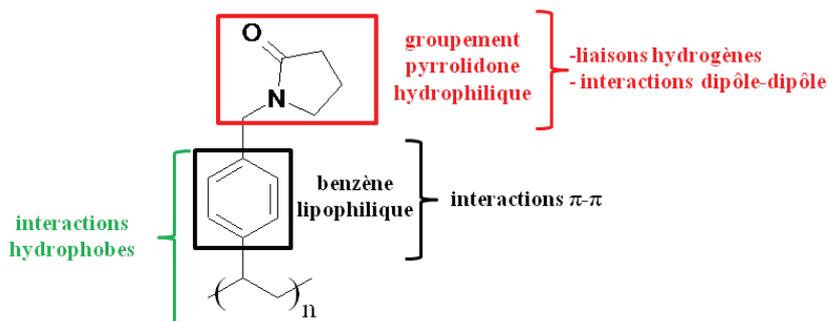


Figure I.17 : Structure de la cartouche StrataX



Des cartouches polymères avec des surfaces modifiées sont aussi employées :

- copolymère constitué de styrène et de divinylbenzène modifiés résultant en une surface ayant des propriétés non polaires : la PPL Bond Elut. Cette phase a été employée pour extraire des composés pharmaceutiques appartenant à des analgésiques et des β -bloquants d'échantillons d'eaux souterraines [115].
- cartouches Lichrolut EN, chromabond EASY, ENV+ et Bond Elut Plexa, composées de polystyrène et de divinylbenzène modifiées à la surface, les deux dernières étant

hydroxylés [84, 107, 115, 118, 119]. Par exemple, la Lichrolut EN a été utilisée pour extraire des produits de contraste à base d'iode présents dans des eaux souterraines. La cartouche ENV+ a été employée, quant à elle, pour extraire des substances appartenant aux sulfonamides, macrolides et pénicillines des mêmes eaux souterraines [115]. Des essais ont été effectués avec la chromabond EASY et la Bond Elut Plexa pour extraire des sulfonamides, des analgésiques, des tétracyclines et des hormones d'eaux usées et de surface mais la cartouche OASIS HLB a été préférée [118].

- des matériaux à échange cationique (HLB-MCX (Mixed Mode Cation eXchange)) [84, 106, 119]. Il s'agit à la fois d'une phase inverse et à échange cationique. Ce mode mixte permet d'utiliser cette cartouche pour des composés neutres et basiques. Cependant, elle a essentiellement été conçue pour extraire des substances basiques de matrices complexes.

- des immunoabsorbants peuvent aussi être choisis comme phase de cartouches SPE. Ce sont des supports sélectifs à base d'anticorps, qui mettent en jeu des interactions antigènes-anticorps : des anticorps spécifiques d'une famille de polluants sont immobilisés sur une phase solide (silice activée) et utilisés comme support d'extraction. Cette technique a été utilisée pour extraire des estrogènes d'échantillons aqueux [106]. Un désavantage majeur de cette technique pour des études multi-familles est qu'elle est très spécifique. Cependant, sa spécificité est un avantage majeur pour d'autres applications. Pour des analyses très ciblées elle permettra d'obtenir de très bons rendements d'extraction et des extraits très propres puisque seuls les composés complémentaires aux anticorps seront retenus sur la cartouche.

- des MIPs (Molecularly Imprinted Polymers) peuvent également être employés. La phase consiste en un polymère rigide ayant des cavités bien définies complémentaires en forme et en groupements fonctionnels aux composés à extraire, ce qui permet de les retenir. Comme les immunosorbants, cette technique n'est utilisable que pour une famille ciblée. Les MIPs ont déjà été utilisés pour extraire et concentrer des sulfonamides présents dans des eaux [114]. Cette méthode a également été utilisée pour extraire des stéroïdes d'échantillons d'eaux et de sédiments [116].

Afin d'améliorer le procédé de purification, des cartouches peuvent être mises en tandem en combinant une cartouche à échange ionique avec une cartouche polymère [136]. La cartouche ionique permet de réduire la quantité d'acides humiques et fulviques contenus dans l'extrait alors que la cartouche polymère retient les composés cibles. Les auteurs couplent la cartouche OASIS MAX (Mixed Mode Strong Anion eXchange) [108, 119] ou la cartouche SAX (Strong

Anion eXchange) [127] avec l'OASIS HLB. La cartouche StrataX peut également être employée à la place de l'OASIS HLB. Les résultats obtenus en utilisant ces combinaisons semblent comparables. La StrataX semble toutefois donner des rendements plus reproductibles et est plus tolérante à la présence de solvant organique dans l'échantillon [137]. Cette méthode en tandem est employée pour extraire et purifier des échantillons d'eaux mais elle est essentiellement utilisée pour purifier des extraits de sols contenant des antibiotiques tels que les tétracyclines, les sulfonamides ou encore les macrolides [127].

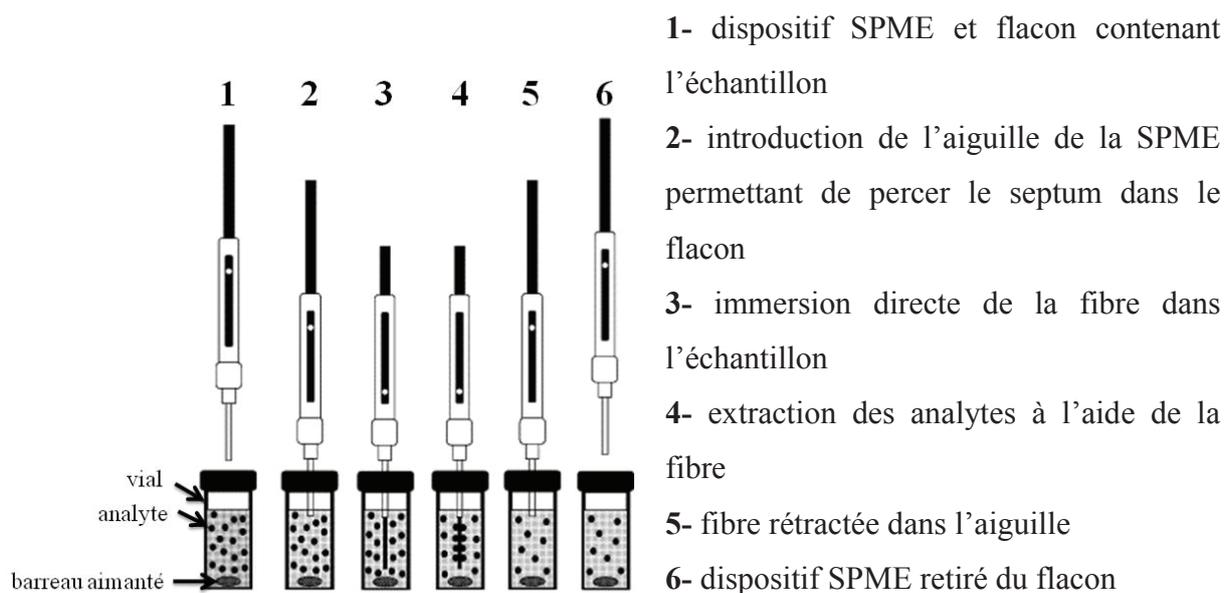
Dans le cas de l'analyse d'hormones, les cartouches C18 et NH₂ sont parfois couplées, la seconde jouant le rôle de cartouche à échange anionique [93, 121].

La SPE peut être manuelle ou complètement automatisée. La seconde offre l'avantage de demander moins de manipulation pour l'expérimentateur ce qui évite les pertes et les risques de contamination de l'échantillon. De plus, elle permet d'obtenir une meilleure reproductibilité [119].

b. Microextraction sur phase solide (SPME) :

La SPME (Solid Phase MicroExtraction) est une méthode qui permet également d'isoler et de préconcentrer des molécules organiques d'échantillons liquides [106, 114, 119, 133, 138]. Les composés sont extraits par adsorption sur une fibre en silice sur laquelle est greffée la phase stationnaire. Les revêtements les plus employés sont le polyacrylate, le PDMS-DVB (polydiméthylsiloxane – divinylbenzène) ou la phase C18 [119]. Les analytes cibles adsorbés sur la phase SPME sont désorbés par élution avec un solvant organique, comme pour la SPE, ou par désorption thermique lorsque la chromatographie gazeuse est utilisée. La **Figure I.18** représente le schéma de principe de la SPME.

Figure I.18 : Schéma de principe de la SPME [139]



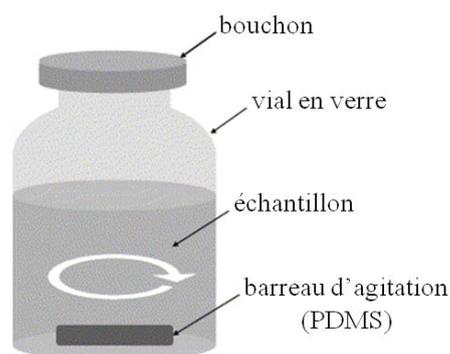
Le volume de sorbant étant plus petit que pour la SPE, la SPME nécessite moins d'échantillon et de solvant. Cependant la SPE permet d'obtenir de plus importants facteurs de concentration comme l'ont illustré V.K. Balakrishnan *et al.* lors d'une comparaison de la SPME et la SPE pour l'extraction de sulfonamides dans des eaux usées. Les facteurs de concentration étaient de 100 et 2000 pour la SPME et la SPE respectivement. Les auteurs ont obtenu des MLDs de 1000 à 20000 fois plus faibles avec la SPE, en partie dû au plus important facteur de concentration avec la SPE mais également parce que la SPME est une technique d'équilibre. Les composés sont partagés entre le sorbant et la solution dans laquelle est immergée la fibre et seulement une partie des substances sont adsorbées sur la phase, alors que la SPE est une extraction quantitative pour laquelle la totalité de la solution est passée à travers la cartouche qui retient les composés [138].

Enfin, contrairement à la SPE, très peu de phases sont disponibles pour la SPME, son utilisation est donc plus limitée [106].

c. Extraction par adsorption sur barreau d'agitation (SBSE):

La SBSE (Stir-Bar Sorptive Extraction) est une technique d'extraction basée sur le même principe que celui de la SPME. Cependant la phase polymère, généralement du PDMS, recouvre un barreau d'agitation. La **Figure I.19** représente le schéma de principe de la SBSE.

Figure I.19 : Schéma de principe de la SBSE [140]



Les mêmes limitations que la SPME sont donc retrouvées. Effectivement, le facteur de concentration est plus faible que pour la SPE, et les substances se partagent entre la solution et le barreau recouvert de PDMS. Les limites de détection seront donc plus élevées comparé à la SPE. Un autre désavantage non négligeable est que cette méthode n'est utilisable que pour des composés hydrophobes ($\log K_{ow} > 2$). Elle ne permettra donc pas de réaliser l'extraction d'une vaste gamme de composés, de tout type de polarité. Il sera donc difficile d'employer cette procédure pour des études multi-résidus et multi-familles.

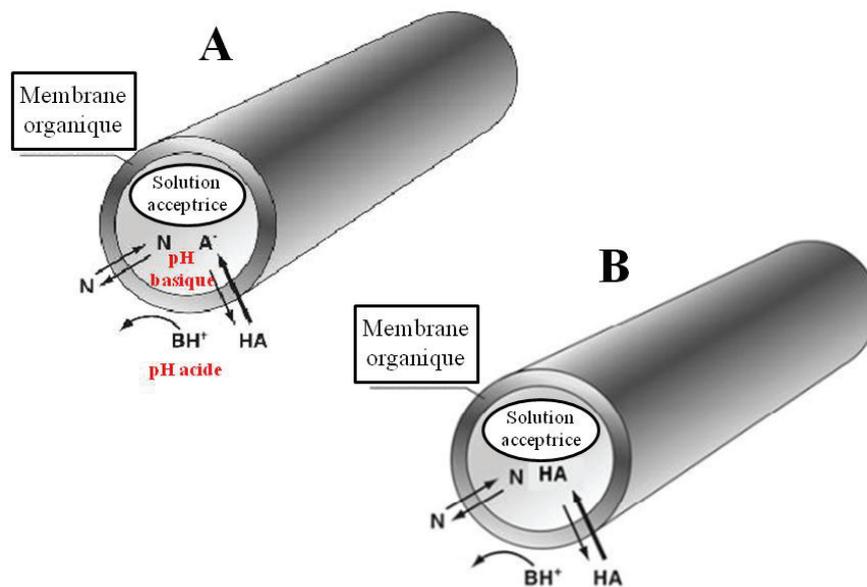
d. Extraction liquide-liquide (LLE) et extraction sur membrane :

L'extraction liquide-liquide (LLE : Liquid Liquid Extraction) est également utilisée pour extraire des antibiotiques et des stéroïdes hormonaux de matrices aqueuses [83, 133, 134, 138, 141]. Son principe est basé sur le transfert des analytes entre deux phases liquides. Un inconvénient est qu'elle utilise une grande quantité de solvant organique [141].

L'extraction sur membrane dérive de la LLE. La technique la plus importante est l'extraction à trois phases (aqueuse / organique / aqueuse) ou encore appelée « Supported Liquid Membrane (SLM) extraction ». Une phase organique est contenue dans un polymère poreux hydrophobe et placé entre deux liquides aqueux (le donneur et l'accepteur). Différents mécanismes de transport peuvent être mis en jeu, les analytes ne pouvant passer dans la membrane organique par diffusion uniquement sous forme non chargée.

La deuxième technique d'extraction par membrane est la « microporous membrane LLE (MMLLE) » basée sur un système à deux phases (aqueuse / organique). La phase acceptrice est un solvant organique qui remplit également les pores de la membrane hydrophobe. Dans ce dernier cas, les extraits sont organiques et non aqueux contrairement à la méthode SLM. Les principes de la SLM et de la MMLLE sont illustrés sur la **Figure I.20** [114, 142].

Figure I.20 : Principes de la SLM (A) dans le cas de composés acides et de la MMLLE (B)
[142]



La SLM est employée pour des composés ayant une polarité forte ou modérée. Par exemple, cette technique a été utilisée pour l'extraction de fluoroquinolones d'eau distillée ou d'eaux de surface. Les limites de détections obtenues varient entre 3 et 25 ng/L selon la substance et le type d'eau [143]. Des sulfonamides contenus dans de l'eau ont également déjà été extraits en utilisant cette méthodologie [144].

La MMLLE (B) permet d'extraire des composés hydrophobes de préférence non chargés c'est-à-dire ceux qui ne peuvent pas être extraits avec la SLM [114, 142]. Par exemple, elle a déjà été employée pour extraire la 4-isobutylacétophénone, un produit de dégradation de l'ibuprofène, d'eaux usées et de surface. Des MLDs de 7 ng/L et 14 ng/L ont été obtenues selon la nature de l'eau [145].

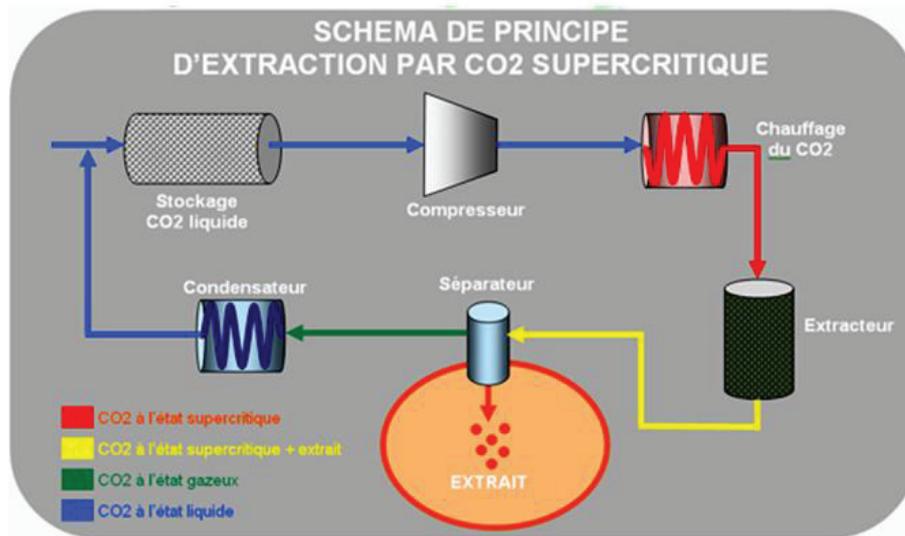
Ces techniques SLM et MMLLE présentent de nombreux avantages par rapport à la technique LLE comme une meilleure sélectivité, un facteur de concentration plus important, des extraits plus propres, peu de consommation de solvant organique et enfin une automatisation plus facile [114].

Chaque procédure permet d'extraire des substances de polarités bien spécifiques, il sera donc difficile d'effectuer des méthodes multi-résidus et inter-familles avec une seule procédure. A ma connaissance, ces méthodes n'ont jamais été utilisées pour des études multi-familles.

e. Extraction par fluide supercritique (SFE) :

L'extraction par fluide supercritique (SFE : Supercritical Fluid Extraction) permet également d'extraire des composés de matrices liquides. Cette technique est une alternative à la LLE, qui utilise des fluides supercritiques (principalement CO₂) à la place de solvants organiques. Le principe de la SFE est présenté sur la **Figure I.21**.

Figure I.21 : Schéma de principe de la SFE [146]



Ses principaux avantages sont qu'elle est peu coûteuse et rapide. De plus, les fluides supercritiques utilisés sont moins toxiques que les solvants organiques. La SFE n'a été que très peu rapportée pour l'extraction de pharmaceutiques de matrices environnementales. Cette procédure n'a pas été mise en oeuvre pour extraire des antibiotiques ou des stéroïdes hormonaux de ces types de matrice [114, 147].

2. Matrices solides :

a. Extraction :

La première étape de la préparation d'échantillons solides est d'extraire les composés cibles contenus dans la matrice avec un solvant organique adapté. Plusieurs méthodes d'extraction existent.

i Extraction liquide/solide sous agitation :

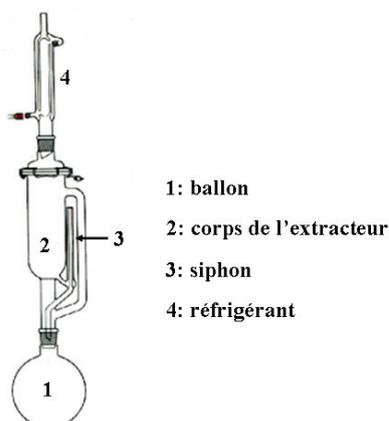
Les antibiotiques et hormones peuvent être extraits par simple agitation dans un solvant adéquat suivi d'une centrifugation [26, 89, 90, 106, 107, 148]. L'avantage de cette technique

est qu'elle est rapide. Cependant, elle nécessite la plupart du temps deux ou trois extractions consécutives pour atteindre un taux d'extraction correct. De plus, cette technique est fastidieuse car non automatisée [149].

ii Extraction Soxhlet :

L'extraction Soxhlet, dont le principe repose sur une extraction continue par un solvant à sa température d'ébullition est représentée à la **Figure I.22**. Créée par Soxhlet dès 1979, il s'agit encore souvent de la méthode considérée comme référence pour l'extraction de substances organiques de matrices solides.

Figure I.22 : Extracteur Soxhlet [150]



Son inconvénient majeur est qu'elle consomme une importante quantité de solvant (entre 150 et 500 mL) et nécessite beaucoup de temps (par exemple entre 16 et 24 heures pour extraire des hormones du sol, une extraction par Soxhlet pouvant durer jusqu'à 48 heures) [151]. Cependant, cette procédure permet d'obtenir de bons rendements d'extraction, et a donc été largement employée pour extraire des composés organiques de matrices solides [149]. Par exemple, cette méthode a déjà été utilisée pour extraire des hormones (androgènes, progestagènes et estrogènes) du sol [151] ou du bisphénol A de boues [149]. En 1994, une extraction automatisée Soxhlet a été mise en place : le Soxtec. Cette technique a de nombreux avantages. En effet, elle permet une extraction plus rapide (entre 1 à 4 heures), plus économique (meilleure récupération de solvant, entre 50 et 100 mL de solvant) et plus sûre (dissociation des unités de chauffage et d'extraction) [149].

iii Extraction assistée par ultrasons (UAE) :

L'extraction assistée par ultrasons (UAE : Ultrasonic-Assisted Extraction) est également employée pour extraire les antibiotiques et stéroïdes hormonaux de la matrice solide [26, 90, 106, 107, 114, 136, 137, 152-158]. Un tube contenant l'échantillon et le solvant d'extraction est immergé dans un bain à ultrasons (**Figure I.23**).

Figure I.23 : Bain à ultrasons [159]



Les analytes extraits sont ensuite séparés de la matrice soit par filtration sous vide, soit par centrifugation. Cette procédure est une alternative à l'extraction Soxhlet, l'utilisation des ultrasons permettant de réduire le temps d'extraction (10 - 30 minutes) et le volume de solvant utilisé (4 - 60 mL). Cependant, cette méthode par UAE est moins reproductible que l'extraction Soxhlet car l'énergie des ultrasons n'est pas uniforme [149, 155]. Elle a été utilisée, par exemple, pour extraire des antibiotiques (oxytétracycline, sulfachloropyridazine et la tylosine) du sol [155].

Les techniques par Soxhlet et ultrasons sont de plus en plus remplacées par des méthodes plus efficaces telles que l'extraction assistée par micro-ondes (MAE : Microwave-Assisted Extraction) et l'extraction par PLE [26, 136].

iv Extraction assistée par micro-ondes (MAE) :

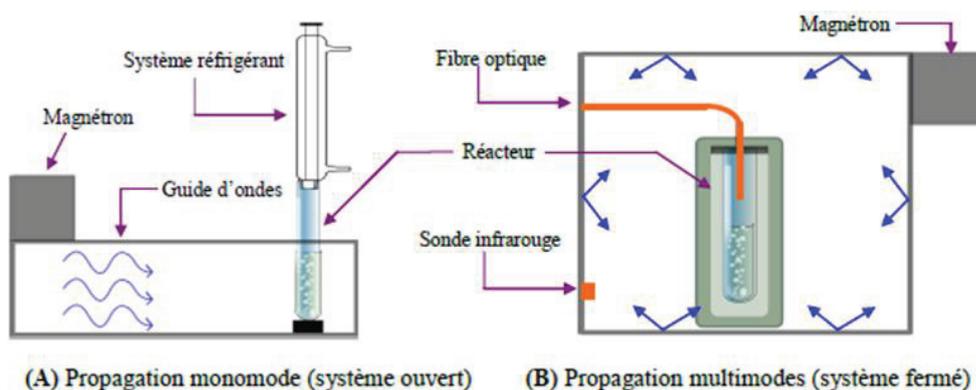
La MAE a déjà été utilisée pour extraire certains antibiotiques (fluoroquinolones) et des estrogènes du sol ou de sédiments [26, 114, 136, 160], ou encore des estrogènes ou du bisphénol A de boues [114, 136, 149, 160, 161].

Un tube contenant l'échantillon et le solvant d'extraction est introduit dans une enceinte soumise à des micro-ondes émises par un générateur de micro-ondes aussi appelé magnétron. Deux types de MAE existent. En effet, l'irradiation micro-onde peut-être réalisée avec un

applicateur d'onde monomode ou avec un applicateur à cavité multimodes (**Figure I.24**). Dans le cas de l'applicateur monomode (ondes orientées par un guide d'onde), la radiation micro-onde est restreinte à une certaine zone dans laquelle se trouve l'échantillon. L'applicateur multimodes, quant à lui, permet la dispersion de manière aléatoire des ondes à l'intérieur d'une cavité, l'échantillon qui est agité est donc irradié de manière homogène [162].

De plus, la MAE peut s'effectuer soit à pression atmosphérique (Focused MAE) soit sous atmosphère pressurisée (Pressurized MAE) ce qui permet de travailler à des températures supérieures au point d'ébullition des solvants utilisés [162].

Figure I.24 : Représentation schématique de la « Focused MAE » (système ouvert) (A) et de la « Pressurized MAE » (système fermé) (B) dans des conditions d'irradiations micro-ondes monomode (A) et multimodes (B) [162]



L'augmentation de la température et dans certains cas de la pression permet d'accélérer le processus d'extraction (entre 2 et 35 minutes pour extraire des composés organiques de boues par exemple) ainsi que d'atteindre une bonne performance tout en limitant la consommation de solvant (entre 5 et 50 mL pour des travaux sur des boues). Une des limitations de cette technique est que seuls les solvants qui absorbent les micro-ondes (avec un dipôle) peuvent être utilisés. Toutefois, des mélanges de solvants avec et sans dipôles peuvent aussi être employés ce qui augmente les possibilités de solvants d'extraction. De plus, cette technique est applicable uniquement à des composés stables thermiquement. Il sera donc difficile d'appliquer cette procédure d'extraction aux tétracyclines par exemple qui se dégradent à la chaleur.

v **Extraction par liquide pressurisé (PLE) :**

La PLE est une extraction à haute température et à haute pression. La température élevée permet une meilleure solubilisation des solutés dans le solvant alors que la haute pression permet de maintenir le solvant au dessous de son point d'ébullition. Dans ces conditions, le solvant pénètre mieux à l'intérieur de l'échantillon permettant une extraction plus efficace en utilisant un volume minimum. De plus, c'est une technique très reproductible et rapide (environ 30 minutes par échantillon). L'inconvénient de cette procédure est que la préparation des cellules PLE est longue et manuelle. La **Figure II.8** (partie II) présente un schéma d'un extracteur à haute pression et à haute température. Cette méthode est, depuis de nombreuses années, très largement employée pour extraire des polluants organiques persistants tels que le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) ou les PCB (polychlorobiphényles) contenus dans des matrices environnementales. Au cours de la dernière décennie, cette technique a été utilisée pour extraire des contaminants émergents de sols, de sédiments, de boues de station d'épuration ou encore de fumier. Par exemple, elle est très souvent rapportée pour l'extraction des antibiotiques (tétracyclines, fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides...) et des hormones du sol [26, 90, 97, 106, 107, 114, 136, 137, 148, 163-171].

vi **Extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe):**

Enfin, l'extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), basée sur le principe d'une extraction liquide-liquide avec un solvant organique en présence de sels et de tampons, a été récemment utilisée pour des matrices solides environnementales. Après extraction des composés par le solvant, des sels et un tampon induisent une séparation des phases aqueuses et organiques. Une deuxième étape consiste à purifier l'extrait obtenu précédemment par SPE dispersive (dSPE). Plusieurs phases purificatrices existent telles que la PSA (Primary Secondary Amine) ou la PSA/C18 qui sont les plus couramment utilisées [172-175]. Cette méthode a été développée en 2003 par M. Anastassiades *et al.* pour extraire des résidus de pesticides de matrices alimentaires telles que les fruits, légumes ou céréales, ceci de manière simple, efficace et rapide [176]. Cette procédure a, par la suite, été utilisée pour extraire des insecticides [172], des pesticides [173, 174, 177, 178] et d'autres composés [175, 179, 180] tels que des alkylphénols, nitrophénols du sol. C'est une méthode innovante, simple, rapide (environ 10 minutes pour extraire un échantillon) et économique (entre 2.5 mL et 20 mL de solvant pour la plupart des extractions de composés organiques du sol).

vii Extraction par fluide supercritique (SFE)

Enfin, la SFE permet également d'extraire des composés de matrices solides comme décrit dans le cas des matrices liquides (voir partie 1. Matrices aqueuses).

Le **Tableau I.21** résume les avantages et les inconvénients des différentes techniques d'extraction.

Tableau I.21 : Avantages et inconvénients des techniques d'extraction

Techniques	Avantages	Inconvénients
Soxhlet	- méthode de référence - très bons rendements d'extraction	- temps d'extraction long (4 à 48 heures) - volume de solvant consommé important (150 à 500 mL)
Soxtec	- Soxhlet automatisé	- temps d'extraction encore long (1 à 4 heures) - volume de solvant utilisé encore important (50 à 100 mL)
Agitation	- rapide - facile	- méthode peu efficace : plusieurs extractions successives sont nécessaires donc plus de consommation de solvant
UAE	- extraction rapide (10 à 30 minutes) - volume de solvant consommé raisonnable (4 à 60 mL)	- peu reproductible - contrôle de la température
MAE	- temps d'extraction relativement court (2 à 35 minutes) - peu de consommation de solvant (5 à 50 mL)	- le solvant doit posséder un dipôle - les composés à extraire doivent être stables thermiquement
PLE	- extraction assez rapide (environ 30 minutes) - consommation de solvant réduite - très reproductible - automatisée	- préparation des cellules PLE longue et manuelle - les composés à extraire doivent être stables thermiquement
QuEChERS	- extraction très rapide (environ 10 minutes) - peu de solvant consommé (2.5 à 20 mL) - facile	- pas de système entièrement automatisé
SFE	- rapide - utilisation de fluide supercritique moins toxique que les solvants organiques - peu coûteuse	- nombreux paramètres à optimiser

b. Purification :

Après l'étape d'extraction, une étape supplémentaire est souvent nécessaire pour purifier et concentrer un extrait de sol.

i Extraction sur phase solide (SPE) :

La méthode SPE est la plus souvent employée, avec les mêmes types de cartouches que ceux utilisés pour extraire, purifier et concentrer des échantillons d'eaux environnementales :

- des cartouches C18 sont employées à la fois pour les hormones et les antibiotiques [106, 136, 152].
- des cartouches polymères OASIS HLB, StrataX et Lichrolut EN sont également utilisés pour purifier et concentrer des extraits de sol contenant des antibiotiques [90, 136, 148].
- des cartouches à échange ionique (MCX) peuvent être utilisées. La SAX peut également être couplée à une cartouche polymère, l'OASIS HLB ou la StrataX.
- enfin, des MIPs peuvent être utilisées. Ces phases ont déjà été employées pour un grand nombre de « clean-up » [136].

ii Extraction liquide-liquide (LLE), chromatographie par perméation de gel (GPC) et chromatographie liquide semi-préparative :

La LLE [106], la chromatographie par perméation de gel (GPC) [106] qui permet de séparer les analytes par rapport à leur taille ou encore la chromatographie liquide semi-préparative [106] qui sépare l'échantillon en plusieurs fractions, peuvent également être utilisées pour purifier des extraits de sol. Cependant, leur emploi est assez rare. En effet, la SPE est souvent préférée car elle est plus rapide, consomme moins de solvant organique et présente un moindre risque de contamination des échantillons.

iii Extraction par liquide pressurisé sélective (SPLE) :

En ce qui concerne l'extraction par PLE, l'ajout de phase purificatrice à l'intérieur de la cellule pour empêcher la co-extraction des interférents peut également être employé. Cette méthode appelée « Selective Pressurized Liquide Extraction (SPLE) » a très peu été utilisée pour les antibiotiques. Une des rares applications est l'extraction de pharmaceutiques contenus dans une matrice alimentaire. Dans ce cas, une phase C18 a été ajoutée dans la cellule PLE [168]. Le principe de cette procédure est détaillé au paragraphe IV de la partie II. L'avantage non négligeable de cette technique est que l'extraction et la purification sont couplées, l'étape de préparation d'échantillon est donc plus facile et plus rapide par rapport

aux autres techniques. Cependant, la difficulté majeure est de trouver les combinaisons phases/solvants les plus adaptées pour extraire les composés cibles, sans qu'ils soient retenus sur la phase et empêcher la co-extraction des interférents ; ces derniers devant avoir plus d'affinité avec la phase purificatrice qu'avec le solvant d'extraction.

A l'heure actuelle, les méthodes mises en place permettent de détecter sélectivement les antibiotiques ou les hormones à l'état de traces dans les matrices environnementales : de l'ordre du ng/L ou ng/g voire même du pg/L ou pg/g [106, 136]. Le but de notre étude est de mettre au point des méthodologies multi-résidus et multi-familles, pas ou peu développées auparavant, pour la matrice sol.

C. Méthodes d'analyses :

Pour identifier et quantifier une substance dans une matrice donnée, la chromatographie liquide (LC) ou gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse simple (MS) [26, 83, 106, 115, 119, 121, 128, 133, 134, 141, 148, 169, 181, 182] ou en tandem (MS/MS) [26, 40, 84, 85, 87, 90-93, 106-108, 117-119, 122-124, 126, 129, 130, 134, 141, 152, 164, 165, 169, 181, 183-185] sont très souvent employées. D'autres détecteurs tels que l'UV (ultra-violet) [26, 91, 106, 127, 132, 137, 154, 155, 157] ou à fluorescence [26, 87, 91, 106, 136, 137, 154] peuvent également être utilisés mais ces deux derniers sont assez peu adaptés à des analyses environnementales car ils ne permettent pas d'atteindre la sélectivité et les limites de détection nécessaires [137].

Les stéroïdes hormonaux et les antibiotiques sont souvent polaires, solubles dans l'eau et non volatiles, et de ce fait une ou plusieurs étapes de dérivatisation sont nécessaires avant leur analyse par chromatographie gazeuse pour rendre les molécules volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition [136]. Ces étapes augmentent le temps d'analyse et représentent des sources potentielles de perte d'échantillon ou de contamination. La chromatographie liquide est donc la plus souvent choisie [106, 119, 136, 141].

En ce qui concerne les colonnes utilisées en chromatographie liquide, le procédé par phase inverse, dont le principe sera brièvement expliqué dans le paragraphe II de la partie II, est généralement employé. Des colonnes C8 [126] ou C18 sont citées [137] mais la phase C18 est la plus utilisée pour analyser les antibiotiques vétérinaires ainsi que les stéroïdes hormonaux [84, 85, 87, 92, 106, 108, 117, 118, 121-124, 127-130, 132, 133, 136, 152, 164, 165, 184].

En conclusion, la LC-MS ou la LC-MS/MS sont les méthodes les plus adaptées à l'analyse de composés vétérinaires ou d'hormones. En ce qui concerne la détection par spectrométrie de masse, deux modes d'ionisation, l'APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique) [164, 166] et l'ESI (ionisation électrospray) sont les plus fréquemment employés [106, 136]. Malgré le fait que le mode APCI permette, dans certains cas, de limiter les effets matrices (suppression ou augmentation de signal dû aux interférents de la matrice), le mode ESI est le plus souvent choisi pour analyser les substances antibiotiques (tétracyclines, fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides, pénicillines) et les stéroïdes hormonaux. En effet certains de ces composés ne sont que peu voire pas ionisés avec l'APCI [136, 186]. Par exemple, M.J.L. de Alda *et al.* ont mentionné que la sensibilité obtenue pour l'analyse d'estrogènes dans des eaux environnementales est meilleure en utilisant le mode ESI que le mode APCI [106].

En ce qui concerne l'analyseur, le triple quadripôle est généralement choisi [106, 136] mais la trappe ionique est également utilisée dans certaines études pour l'analyse de produits pharmaceutiques [85, 90]. L'analyseur quadripolaire est préféré lorsque de hautes sensibilités et sélectivités sont nécessaires. Effectivement, D.D. Snow *et al.* [187] ont montré que le triple quadripôle apporte des sensibilités et sélectivités supérieures à celles obtenues avec la trappe ionique. Par exemple, les limites de détection instrumentales obtenues avec la trappe ionique pour des antibiotiques sont comprises entre 5 et 50 pg alors que celles atteintes avec le triple quadripôle sont inférieures au pg. De même, l'utilisation d'une trappe ionique lors de l'analyse d'extraits d'eaux souterraines contenant des tétracyclines a permis d'atteindre des limites de détection méthodologiques d'environ 0.2 µg/L alors qu'elles se situent autour de 0.010 µg/L quand le triple quadripôle est employé [187].

La LC-ESI-MS et notamment la LC-ESI-MS/MS sont des techniques sélectives et sensibles. Ce sont donc des techniques de choix pour analyser à la fois des antibiotiques vétérinaires et des stéroïdes hormonaux contenus dans des matrices environnementales. Un inconvénient de ces techniques est qu'elles sont sensibles à la suppression d'ionisation ou à l'augmentation de signal dues aux interférents de la matrice [119, 137, 149]. Or, les matrices environnementales (eaux et sols) contiennent, entre autres, des acides humiques et fulviques qui peuvent être co-extraits et interférer avec les analytes cibles lors de l'analyse. Des méthodes d'extraction / purification adaptées doivent donc être mises en place pour limiter leur présence dans les extraits injectés par la suite en LC-MS ou LC-MS/MS.

IV. Devenir de ces substances dans les sols :

La pollution de l'environnement par des composés organiques est souvent associée uniquement à leur présence dans les eaux et les denrées alimentaires. Cependant, beaucoup d'entre eux passent par les sols et leur comportement dans cette matrice détermine leur caractère plus ou moins polluant. Comme le disent E. Barriuso *et al.*, il faut « comprendre le phénomène pour prévoir le risque » [188]. Dès leur introduction dans le sol, les contaminants sont soumis à des transformations biotiques et/ou abiotiques. Ces processus contribuent à l'élimination des substances de l'écosystème, c'est ce que l'on appelle le pouvoir épurateur du sol. Cependant, il ne faut pas oublier que lors de ce processus de transformation, des produits de dégradation plus toxiques et/ou plus persistants peuvent être formés. D'autre part, ces contaminants peuvent également se disperser et/ou s'accumuler dans les différents compartiments (sol, eau). L'accumulation des contaminants dans les sols peut permettre, à court terme, d'épargner les ressources en eaux mais il faut tenir compte de l'éventuelle libération de ces polluants stockés ainsi qu'aux conséquences de leur accumulation à long terme [188].

A. Transformation :

Les contaminants présents dans l'environnement peuvent être transformés par différentes réactions de nature chimique (hydrolyse, réactions d'oxydo-réduction,...), photochimique ou biotique (biodégradation, métabolisation). Ces transformations peuvent conduire jusqu'à une minéralisation totale des contaminants.

La cinétique de dégradation est souvent décrite par une simple loi exponentielle du 1^{er} ordre.

$$C = C_0 e^{-kt}$$

Avec C, la concentration au temps t, C₀, la concentration initiale et k la constante de vitesse.

La vitesse de dégradation est souvent exprimée par le temps de demi-vie, t_{1/2}, qui correspond à la durée nécessaire pour que la moitié de la dose initiale d'une substance ait disparue.

La vitesse de dégradation dépend de plusieurs paramètres environnementaux : la température, le rayonnement UV, le pH, l'aération du sol, la présence d'oxygène (réactions aérobies ou anaérobies), le type de sol (quantité en carbone organique, argile et matière organique), l'humidité du sol ainsi que la présence de micro-organismes. La concentration initiale de

substance ainsi que ses propriétés physico-chimiques ont également un impact sur la dégradation [3, 36, 45, 57, 73, 189-191].

Ce sont les transformations biotiques qui sont généralement les plus importantes dans les sols. Les micro-organismes du sol (bactéries, champignons, algues, levures,...) disposent d'un ensemble d'enzymes qui agissent comme catalyseurs des réactions de transformation. La biodégradation correspond à la décomposition du composé organique pour former des composés minéraux simples tels que H_2O , H_2 , CO_2 , NO_3^- ... La biotransformation, quant à elle, est beaucoup plus complexe. Elle passe par des étapes intermédiaires et conduit à la formation de métabolites qui peuvent s'avérer plus toxiques et/ou plus persistants que la molécule de départ. Si leur présence a été mise en évidence, leur toxicité et/ou persistance n'a été que peu étudié. En ce qui concerne les antibiotiques, quelques travaux ont été effectués sur la dégradation des tétracyclines dans le sol. En particulier, B. Halling-Sorensen *et al.* ont étudié la dégradation de l'oxytétracycline dans des conditions anaérobies ce qui leur a permis de réduire la vitesse de dégradation et ainsi d'observer plus facilement les produits formés. Ces manipulations ont été effectuées en présence puis en absence de lumière, ce qui a révélé des $t_{1/2}$ de 38.6 jours et 29.6 jours respectivement pour l'oxytétracycline. Ils ont identifié plusieurs produits de dégradation dont certains sont formés uniquement en présence de lumière [192]. Cependant, la persistance et la toxicité des produits formés n'ont pas été étudiées.

En plus de la dégradation biotique, des dégradations abiotiques peuvent avoir lieu, comme dans l'exemple cité précédemment, où une dégradation photochimique des tétracyclines a été observée.

En effet, les radiations solaires peuvent parfois contribuer de manière significative à l'élimination de polluants dans les sols, en particulier dans le cas de molécules comportant un ou plusieurs chromophore (carbonyle, noyau aromatique,...) susceptibles d'absorber les rayonnements solaires ($295 < \lambda < 700$ nm). Ces transformations photochimiques n'ont lieu qu'à la surface du sol où les photons d'origine solaire peuvent être absorbés. Bien que cette zone soit limitée, ces réactions photochimiques peuvent représenter des voies de dégradation importantes. La dégradation photochimique peut être de deux types : directe ou indirecte. La dégradation photochimique directe est possible lorsque le polluant absorbe lui-même l'énergie lumineuse. La molécule devient alors électroniquement excitée, ce qui peut provoquer une

photolyse qui correspond à la rupture des liaisons chimiques. La photodégradation indirecte a lieu lorsqu'un autre composé présent dans le sol absorbe la lumière et devient photoinducteur. Les substances principales impliquées dans la dégradation photochimique indirecte sont les espèces humiques, les nitrates et le Fe(III) [45].

Quelques travaux ont mis en évidence la dégradation photochimique des tétracyclines [192] ou des fluoroquinolones [26] dans le sol. Dans ce dernier cas, la défluorination des composés a été observée. Enfin, les stéroïdes hormonaux peuvent subir également une photodégradation [36, 45, 73] puisque de nombreuses hormones absorbent la lumière dans la tranche 295 - 400 nm.

La dégradation photochimique à la surface des sols n'est encore que très peu connue. En effet peu d'études ont été menées en partie à cause de la difficulté analytique liée à la matrice solide.

Enfin, l'hydrolyse acide ou basique représente une autre transformation abiotique susceptible d'avoir lieu dans le sol. Les sulfonamides, les macrolides et les β -lactames, par exemple, sont très sensibles à ce genre de dégradation [3, 190, 191] qui dépend fortement du pH. Par exemple, dans le cas des sulfonamides, l'hydrolyse est rapide dans les conditions acides [3, 191] lorsque les molécules sont sous leurs formes neutre ou cationique. Dans ce cas, la rupture de la liaison sulfonamide est favorisée et conduit à l'acide sulfanilique et à un dérivé aminé [3].

Pour tous les types de dégradation biotique et abiotique, les données actuelles concernant les produits de dégradation susceptibles d'être trouvés sont encore très limitées dans le cas des contaminants émergents. En particulier les produits de dégradation ne sont pas toujours identifiés et leurs mécanismes et cinétiques de formation sont rarement connus. Par exemple, en ce qui concerne les stéroïdes hormonaux, la dégradation des estrogènes a été étudiée par plusieurs équipes, mais peu ou pas de données sont disponibles pour les androgènes et les progestagènes [45]. Concernant les antibiotiques, beaucoup de travail reste à faire sur l'identification de leurs produits de transformation [168]. Ces éléments sont pourtant nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation et d'épuration de ces composés, et donc d'évaluer leur incidence sur la qualité des écosystèmes.

B. Rétention / transfert dans le sol :

Dès leur arrivée au sol, les polluants organiques se distribuent entre les trois phases : solide, liquide et vapeur selon leurs constantes d'équilibre d'adsorption, de désorption et de volatilisation. L'accumulation et le transfert des contaminants organiques dans le sol dépend donc à la fois de leurs propriétés intrinsèques (hydrophobicité, solubilité, volatilité, potentiel d'ionisation, capacité d'adsorption sur le sol,...) mais également des facteurs environnementaux tels que les caractéristiques du sol (les pourcentages en argile, en limon, en sable, en matière organique et en carbone organique, la capacité d'échange cationique (CEC), le pH) [26] ou encore des conditions climatiques [57, 193] puisque tous ces paramètres modifient les constantes d'équilibre.

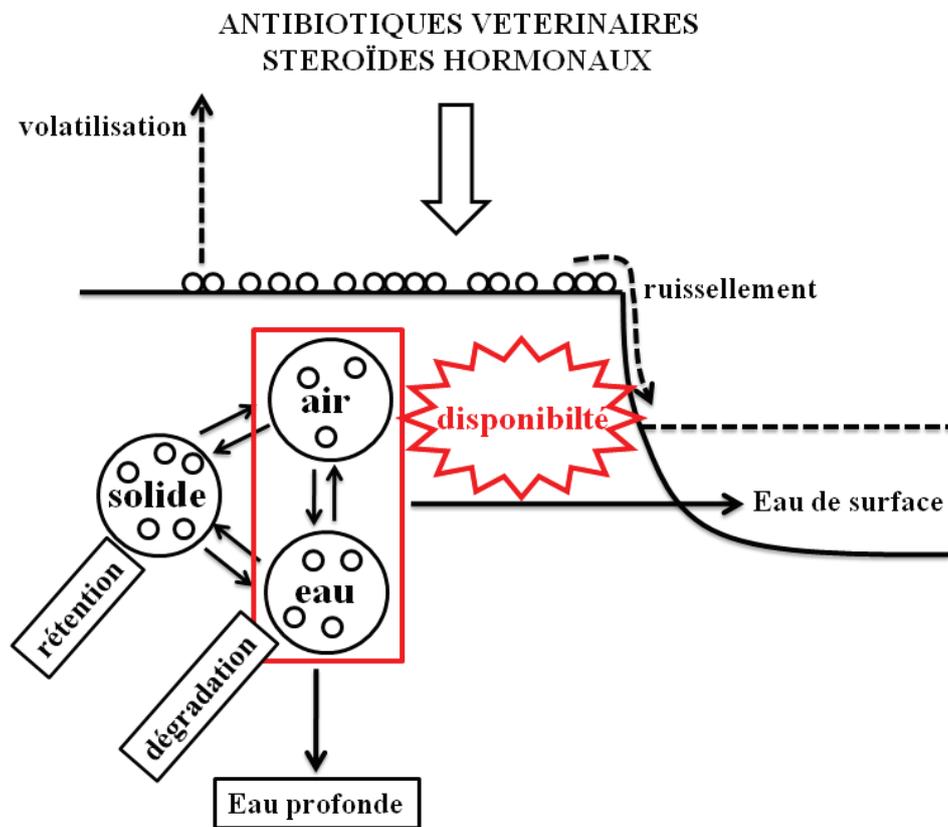
L'origine du processus d'adsorption sur le sol est l'attraction qui apparaît entre les groupements fonctionnels de la molécule et les composantes du sol (argiles, matière organique, oxydes...). La nature des liaisons intervenant dépend du mécanisme mis en jeu : liaisons covalentes, ioniques, hydrogène, transfert de charge, forces de Van der Waals. Par exemple, dans le cas des tétracyclines et des fluoroquinolones, des mécanismes d'échange cationiques (transfert de charge) peuvent avoir lieu entre les cations présents entre les couches d'argile et la charge positive de la molécule. Des complexes (combinaison entre liaisons covalentes et ioniques) entre les composés et les cations peuvent également se former. Enfin, des liaisons hydrogène peuvent aussi s'établir avec la surface de l'argile (cf. chapitre III de la partie III).

Les polluants non retenus, quant à eux, peuvent se disperser dans l'environnement par différents mécanismes de transport tels que le ruissellement, la volatilisation ou encore la lixiviation.

Les composés les plus mobiles présents dans les sols sont contenus dans les phases liquide et vapeur et font partie des polluants dits « disponibles ». Ce concept de disponibilité est très important car les substances disponibles sont susceptibles d'être dégradées par les microorganismes du sol ou d'être entraînées en profondeur et de contaminer les nappes phréatiques ou les eaux profondes et éventuellement les eaux de surface. La rétention des polluants dans le sol diminue les risques de leur dispersion mais cela peut rendre difficile leur complète élimination puisque l'immobilité des composés réduit leur biodisponibilité. Ces derniers seront donc moins facilement transformés par les microorganismes présents dans les sols [45]. Enfin, les polluants non adsorbés, présents à la surface du sol peuvent être volatilisés ou lessivés au cours d'un événement pluvieux ce qui pollue les eaux de surface [188].

Les différents mécanismes d'accumulation et de transfert des polluants dans le sol sont résumés sur la **Figure I.25**.

Figure I.25 : Mécanismes de transport des polluants dans l'environnement [188]



De nombreux travaux ont été menés, dans les conditions du laboratoire, afin d'évaluer les capacités d'adsorption des antibiotiques vétérinaires, des stéroïdes hormonaux et des contaminants humains sur le sol [194-199]. Le transfert, quant à lui, peut s'étudier soit en conditions réelles soit au laboratoire sous forme de colonnes de sol reconstituées. Très peu d'équipes ont étudié la rétention / transfert des antibiotiques et stéroïdes hormonaux dans le sol à l'aide d'études en colonnes de sol. De plus, ce genre de travaux se limite à un nombre restreint de molécules (2 à 3) [73, 200, 201]. Les contaminants émergents ont été très peu étudiés par rapport aux polluants classiques du sol tels que les pesticides qui ont été examinés depuis plus longtemps et pour lesquels plus de données sont disponibles. Effectivement, de nombreuses études en colonnes de sol ont été effectuées pour des herbicides par exemple [202, 203] comme la terbuthylazine, l'atrazine et la trifluraline.

V. Conclusion

Les antibiotiques vétérinaires, les stéroïdes hormonaux ainsi que les contaminants humains sont présents dans les différents compartiments de l'environnement (eaux, sol). Ces derniers risquent d'avoir des effets néfastes sur les écosystèmes. Pour étudier la présence de ces contaminants dits « émergents » dans l'environnement des méthodes d'analyse doivent être mises en place pour les matrices aqueuses et solides. Or, le sol est une matrice complexe qui est susceptible d'engendrer de forts effets matrice (suppression ou augmentation du signal des analytes lors de la détection). Des méthodes à la fois spécifiques et sensibles doivent donc être mises en place pour limiter ces effets et ainsi analyser des traces de composés présents dans le sol. De plus, les procédures développées à l'heure actuelle (pour les matrices aqueuses et solides) se concentrent en général, soit sur quelques familles d'antibiotiques soit sur les stéroïdes hormonaux. Et même dans ce dernier cas, les androgènes et progestagènes sont souvent peu représentés par rapport aux estrogènes. Très peu de travaux portent donc sur des analyses multi-familles. Ces procédures permettront, par la suite, d'étudier le comportement des polluants dans l'environnement et en particulier dans la matrice solide.

Références bibliographiques :

- [1]: <http://www.sante.dz/aarn/classification.pdf> 21/10/2012.
- [2]: <http://www.123bio.net/cours/antibio/modedaction.html>, 21/10/2012.
- [3]: **A. Bialk-Bielinska, S. Stolte, M. Matzke, A. Fabianska, J. Maszkowska, M. Kołodziejaska, B. Liberek, P. Stepnowski, J. Kumirska**, 2012. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials* 221– 222, 264.
- [4]:http://www.med.univ-montp1.fr/enseignement/cycle_2/Autres-Mod-Oblig/MB4/MB4_elimination.pdf, 21/10/2012.
- [5]:http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/animal_health/l21231_fr.htm, 21/10/2012.
- [6]:http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/upload/bibliotheque/604071694104886517217507413399/directive_2004_28_ce.pdf, 21/10/2012.
- [7]: **A. Chevance, G. Moulin**, Octobre 2011. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2010 (volumes et estimation de la consommation d'antibiotiques chez les animaux). anses - Agence Nationale du Médicament Vétérinaire.
- [8]: **D. J. Woods, C. S. Knauer**, 2010. Discovery of veterinary antiparasitic agents in the 21st Century: A view from industry. *International Journal for Parasitology* 40, 1177.
- [9]:http://www.pharmaceutical-market-research.com/publications/animal_veterinary/antiparasitics_animal_health_industry.html, 21/10/2012.
- [10]:<http://www.pharmaetudes.com/ressources/cours%20internat/section5/26-cyclines.pdf>, 21/10/2012.
- [11]: http://pharmtox.free.fr/pharmacie/antibacteriens/Inhib_prot/Cours.pdf, 21/10/2012.
- [12]: **S. A. Sassman, L. S. Li**, 2005. Sorption of Three Tetracyclines by Several Soils: Assessing the Role of pH and Cation Exchange. *Environmental Science and Technology* 39, 7452.
- [13]:SRC, Interactive PhysProp Database Demo (numéro CAS). <http://www.srcinc.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>, 16/09/2012.
- [14]:http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d9891pis.Par.0001.File.tmp/d9891pis.pdf, 16/09/2012.
- [15]: **S. T. Kurdwadkar, C. D. Adams, M. T. Meyer, D. W. Kolpin**, 2007. Effects of Sorbate Speciation on Sorption of Selected Sulfonamides in Three Loamy Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1370.
- [16]:http://web.squ.edu.om/med-Lib/MED_CD/E_CDs/A%20Practical%20Guide%20to%20Contemporary%20Pharmacy%20Practice/pdf/pKa-table.pdf, 16/09/2012.
- [17]: **S. Huq, K. Kallury**. Extraction and Analysis of Sulfonamides from Honey by LC/MS/MS using strataTMX-C Polymeric SPE Sorbent and GeminiTM C18 HPLC Column. Phenomenex.
- [18]: <http://www.druglead.com/cds/sulfabenzamide.html>, 16/09/2012.
- [19]:<http://www.scrigroup.com/limba/franceza/153/Les-sulfamides-PROPRIETES-PHYS23366.php>, 16/09/2012.
- [20]: **A. Shah, E. McCallum, A. Park, C. H. Huang, J. H. Kim**, 2005. Effect of Water Quality on Rejection of Selected Human and Veterinary Antibiotics by Nanofiltration and Reverse Osmosis Membranes. Membrane Tech. Conference.
- [21]: **J. J. S. Chinchilla**, 2007. Nuevas aportaciones al análisis de residuos de plaguicidas y antibióticos en aguas y alimentos. Universidad di Granada, PhD.

- [22]: <http://www.antiinfectieux.org/antiinfectieux/PLS/Macrolides/PLS-macrolides-structure-chimique.html>, 21/10/2012.
- [23]: <http://pharmatox.voila.net/cours/Macrolidesetantibiotiquesapparentes.pdf>, 21/10/2012.
- [24]: **D. B. Wunder**, 2010. Fate and Impact of Antibiotics in Slow-rate Biofiltration Processes. University of Minnesota, Doctor of Philosophy.
- [25]: **D. D. Glover, D. Lalka, G. R. G. Monif**, 1996. Ampicillin Vs Penicillin for In Utero Therapy. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 4, 43.
- [26]: **Y. Picó, V. Andreu**, 2007. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1287.
- [27]: <http://www.phenomenex.com/Compound?id=Unii-24Cu1Ys91D&culture=fr>, 16/09/2012.
- [28]: **S. Babic, A. J. M. Horvat, D. M. Pavlovic, M. Kastelan-Macan**, 2007. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 1043.
- [29]: **T. L. Bidgood**, 2004. Factors that influence the distribution of antimicrobials into the interstitial fluid as determined by in vivo ultrafiltration and pharmacokinetic modeling in dogs. North Carolina State University, Doctor of Philosophy.
- [30]: <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=18948>, 16/09/2012.
- [31]: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/vetdrug/41-13-dicyclanil.pdf>, 16/09/2012.
- [32]: **L. Zhao**. Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Agilent Technologies.
- [33]: <http://www.freepatentsonline.com/5082863.html>, 16/09/2012.
- [34]: <http://pathman.smpdb.ca/pathways/SMP00130/pathway>, 04/10/2012.
- [35]: **G. G. Ying, R. S. Kookana, Y. J. Ru**, 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International* 28, 545.
- [36]: **Y. Y. Yang**, Degradation and transport pathways of steroid hormones from human and animal waste. Colorado State University, For the Degree of Doctor of Philosophy.
- [37]: <http://e.hormone.tulane.edu/learning/androgens.html>, 17/09/2012.
- [38]: <http://e.hormone.tulane.edu/learning/estrogens.html>, 17/09/2012.
- [39]: **L. S. Shore, M. Shemesh**, 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure and Applied Chemistry* 75, 1859.
- [40]: **E. Vulliet, C. Cren-Olivé**, 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution* 159, 2929.
- [41]: **I. G. Lange, A. Daxenberger, B. Schiffer, H. Witters, D. Ibarreta, H. H. D. Meyer**, 2002. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta* 473, 27.
- [42]: **J. Oehlman, U. Schulte-Oehlmann**, 2003. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry* 75, 2207.
- [43]: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100A/mono100A-19.pdf>, 17/09/2012.
- [44]: **M. C. Audy, P. Vacher, B. Duly**, 1996. 17 beta-estradiol stimulates a rapid Ca²⁺ influx in LNCaP human prostate cancer cells. *European Journal of Endocrinology* 135, 367.
- [45]: **T. Borch, J. G. Davis, Y. Y. Yang, R. B. Young**, 2009. Occurrence of Steroid Sex Hormones in the Cache la Poudre River, and Pathways for their Removal in the Environment. Colorado Water Institute.
- [46]: http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/veterinary_checks_and_food_hygiene/112032b_fr.htm, 05/10/2012.
- [47]: <http://www.agrireseau.qc.ca/bovinsboucherie/documents/TM2003charriere.pdf>, 05/10/2012.
- [48]: http://www.chemicaldictionary.org/dic/G/Gestodene_826.html, 16/09/2012.

- [49]: **K. M. Lewis, R. D. Archer**, 1979. pKa values of estrone, 17 beta-estradiol and 2-methoxyestrone. *Steroids* 34, 485.
- [50]: **D. Maraninchi**, 2011. Analyse des ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France - 1999-2009. Affsaps.
- [51]: **M. Bialic, D. D. d. Segonzac, A. Faure, S. V. d. Swaelmen**. Ibuprofène, Paracétamol ou Aspirine : quels risques pour notre environnement ? Polytech Nice-Sophia, Département Génie Biologique.
- [52]: www.ineris.fr/substances/fr/substance/getDocument/3014, 21/10/2012.
- [53]: http://www.lexpress.fr/actualite/sciences/sante/le-bisphenol-a-est-toxique-meme-a-faible-dose_1034387.html, 27/09/2012.
- [54]: **L. Viglino, K. Aboufald, M. Prévost, S. Sauvé**. Detection of Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Pesticides in Water Resources by APCI-LC-MS/MS. Thermo Scientific.
- [55]: **T. Vasskog**. Occurrence of selected antidepressants in the Norwegian environment. Department of Pharmacy - Faculty of Medicine - University of Tromsø.
- [56]: **I. T. Cousins, C. A. Staples, G. M. Klecka, D. Mackay**, 2002. A Multimedia Assessment of the Environmental Fate of Bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment* 8, 1107.
- [57]: **K. Kumar, S. C. Gupta, Y. Chander, A. K. Singh**, 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87, 1.
- [58]: **A. E. V. d. Bogaard, E. E. Stobberingh**, 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* 14, 327.
- [59]: **M. M. F. Bager., J. Christensen, F.M. Aarestrup**, 1997. Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine* 3, 95.
- [60]: **E. Stobberingh, A. E. V. d. Bogaard, N. London, D. Christel, T. Janetta, R. Willems**, 1999. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and (sub)urban residents in South of the Netherlands: Evidence for transmission of Vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2215.
- [61]: **G. Sengelov, Agerso, B. Halling-Sorensen, S. B. Baloda, J. S. Andersen, L. B. Jensen**, 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International* 28, 587.
- [62]: **C. L. Hofacre, Allan, R. d. Cotret, J. J. Maurer, A. Garitty, S. G. Thayer**, 2000. Presence of fluoroquinolone-resistant coliforms in poultry litter. *Avian Diseases* 44, 963.
- [63]: http://www.onema.fr/IMG/pdf/R_09_06381C_Action29_final.pdf, 31/01/2013.
- [64]: http://www.usherbrooke.ca/environnement/fileadmin/sites/environnement/documents/Es_sais2006/JMPepin.pdf, 19/01/2013.
- [65]: **J. P. Besse**, 2010. Impact environnemental des médicaments à usage humain sur le milieu récepteur: évaluation de l'exposition et des effets biologiques pour les écosystèmes d'eau douce. Université de Metz, Thèse.
- [66]: **A. A. Robinson, J. B. Belden, M. J. Lydy**, 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 423.
- [67]: **H. Schmitt, J. Römbke**, 2008. Pharmaceuticals in the Environment. Springer.
- [68]: **K. Fent, A. A. Weston, D. Caminada**, 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76, 122.
- [69]: **P. T. C. Harrison, P. Holmes, C. D. N. Humfrey**, 1997. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trends associated with environmental chemical exposure? *The Science of the Total Environment* 205, 97.

- [70]: 2002. Feminisation of fish. The effect of estrogenic compounds and their fate in sewage treatment plants and nature.
- [71]: **L. G. Parks, C. S. Lambright, E. F. Orlando, L. J. Guillette, G. T. Ankley, L. E. Gray**, 2001. Masculinization of Female Mosquitofish in Kraft Mill Effluent-Contaminated Fenholloway River Water Is Associated with Androgen Receptor Agonist Activity. *Toxicological Sciences* 62, 257.
- [72]: http://www.usherbrooke.ca/environnement/fileadmin/sites/environnement/documents/Es_sais2011/de_Champlain_M__01-06-2011_.pdf,
- [73]: **T. Deksissa**, 2008. Fate and Transport of Steroid Hormones in the Environment. UCOWR Conference.
- [74]: http://www.jle.com/en/revues/sante_pub/ers/e-docs/00/04/1D/01/article.md, 12/12/2012.
- [75]: <http://www.cancer-environnement.fr/LinkClick.aspx?fileticket=jW67BLT0esA%3d&tabid=231&mid=1280>, 21/10/2012.
- [76]: **M. P. Schlüsener, K. Bester**, 2008. Behavior of Steroid Hormones and Conjugates During Wastewater Treatment – A Comparison of Three Sewage Treatment Plants. *Clean – Soil, Air, Water* 36, 25.
- [77]: **W. Xu, G. Zhang, X. Li, S. Zou, P. Li, Z. Hu, J. Li**, 2007. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China. *water research* 41, 4526.
- [78]: **P. Sukul, M. Spiteller**, 2006. Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 187, 67.
- [79]: 2009. Elements de contexte et réglementation française relatifs à la valorisation des boues issues du traitement des eaux usées.
- [80]: **K. Kümmerer**, 2003. Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 5.
- [81]: http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/128088_fr.htm, 07/09/2012.
- [82]: http://europa.eu/legislation_summaries/agriculture/environment/128181_fr.htm, 07/09/2012.
- [83]: **D. Kolpin, E. Furlong, M. Meyer, E. M. Thurman, S. Zaugg**, 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202.
- [84]: **M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo**, 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678.
- [85]: **S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic**, 2009. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4989.
- [86]: **E. Zuccato, D. Calamari, M. Natangelo, R. Fanelli**, 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The lancet* 335, 1789.
- [87]: **E. M. Golet, A. C. Alder, A. Hartmann, T. A. Ternes, W. Giger**, 2001. Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Analytical Chemistry* 73, 3632.
- [88]: **F. Tamtam, F. Mercier, B. L. Bot, J. Eurin, Q. T. Dinh, M. Clément, M. Chevreuil**, 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment* 393, 84.

- [89]: **G. Hamscher, S. Sczesny, H. Hoper, H. Nau**, 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 1509.
- [90]: **J. Beausse**, 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry* 23, 753.
- [91]: **S. Thiele-Bruhn**, 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166, 145.
- [92]: **S. Liu, G. G. Ying, J. L. Zhao, F. Chen, B. Yang, L. J. Zhou, H. J. Lai**, 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 1367.
- [93]: **A. C. Belfroid, A. V. d. Horst, A. D. Vethaak, A. J. Schafer, G. B. J. Rijs, J. Wegener, W. P. Cofino**, 1999. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *The Science of the Total Environment* 225, 101.
- [94]: **O. Finlay-Moore, P. G. Hartel, M. L. Cabrera**, 2000. 17 β -estradiol and testosterone in soil and runoff from grasslands amended with broiler litter. *Journal of Environmental Quality* 29, 1604.
- [95]: **X. Li, G. G. Ying, H. C. Su, X. B. Yang, L. Wang**, 2010. Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International* 36, 557.
- [96]: **J. Llorca-Pórcel, M. Martínez-Parreno, E. Martínez-Soriano, I. Valor**, 2009. Analysis of chlorophenols, bisphenol-A, 4-tert-octylphenol and 4-nonylphenols in soil by means of ultrasonic solvent extraction and stir bar sorptive extraction with in situ derivatisation. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5955.
- [97]: **J. C. Durán-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. S. Castro, B. Jiménez, R. Gibson**, 2009. The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 78, 1159.
- [98]: **R. Calvet**, 2003. Le Sol Propriétés et fonctions - Tome 1: Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. DUNOD.
- [99]: <http://www.inra.fr/internet/Directions/DIC/ACTUALITES/DOSSIERS/sol/labour-imp.html>, 22/10/2012.
- [100]: <ftp://ftp-sop.inria.fr/modemic/campillo/carbone/sequestration.pdf> 22/10/2012.
- [101]: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3001551/>, 22/10/2012.
- [102]: <http://www.jarrige.org/la-composition-du-sol/>, 17/09/2012.
- [103]: **P. Duchaufour**, 2001. Introduction à la science du sol. DUNOD.
- [104]: http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://lepotagerfacile.free.fr/images/triangle.jpg&imgrefurl=http://lepotagerfacile.free.fr/triangle.htm&h=427&w=480&sz=42&tbnid=vCz9wrp1cqmmIMM:&tbnh=86&tbnw=97&prev=/search%3Fq%3Dtriangle%2Bdes%2Btextures%26tbm%3Disch%26tbo%3Du&zoom=1&q=triangle+des+textures&usg=__gDO-Gus7uv9om4DslRf7FJ-cUnQ=&sa=X&ei=-t4kUMjkcIcMhAf-iICoBg&ved=0CBcQ9QEwAw, 22/10/2012.
- [105]: **P. Stengel, L. Bruckler, J. Balesdent, M. Tercé, D. Grail, M. A. Caillaud**, 2009. Le sol - Dossier INRA. INRA.
- [106]: **M. J. L. d. Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo**, 2003. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex

hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000, 503.

[107]: **M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo**, 2005. LC–MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 645.

[108]: **A. Jia, Y. Xiao, J. Hu, M. Asami, S. Kunikane**, 2009. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4655.

[109]: http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/documents/publications/echantillonnage/dr09_10eauxsurf.pdf, 13/12/2012.

[110]: http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/documents/publications/echantillonnage/dr09_04rl.pdf, 13/12/2012.

[111]: http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/documents/publications/echantillonnage/dr09_09eauxsout.pdf, 13/12/2012.

[112]: [http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/BT_TF151_WI_CSS99034_Pretreatment_\(E\)_672007.pdf](http://www.ecn.nl/docs/society/horizontal/BT_TF151_WI_CSS99034_Pretreatment_(E)_672007.pdf), 17/09/2012.

[113]: http://www.issep.be/files/files/Laboratoire_de_reference/compendium/Sol/s_i_1v1_pr_traitement_des_chantillons_pour_analyses_physico_chimiques_2_.pdf, 17/09/2012.

[114]: **D. M. Pavlovic, S. Babic, A. J. M. Horva, M. Kastelan-Macan**, 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 1062.

[115]: **F. Sacher, F. T. Lange, H. J. Brauch, I. Blankenhorn**, 2001. Pharmaceuticals in groundwaters Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany. *Journal of Chromatography A* 938, 199.

[116]: **D. Matejcek, A. Grycova, J. Vlcek**, 2013. The use of molecularly imprinted polymers for the multicomponent determination of endocrine-disrupting compounds in water and sediment. *Journal of Separation Science* 36, 1097.

[117]: **M. J. García-Galán, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló**, 2010. Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS). *Talanta* 81, 355.

[118]: **J.-Y. Pailler, A. Krein, L. Pfister, L. Hoffmann, C. Guignard**, 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment* 407, 4736.

[119]: **M. Kostopoulou, A. Nikolaou**, 2008. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 1023.

[120]: **E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, M. F. Grenier-Loustalot**, 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1210, 84.

[121]: **Y. Filali-Meknassi, M. Auriol, C. D. Adams, R. Y. Surampalli**, 2007. Quantification of Steroids Sex Hormones Using Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Water Environment Research* 79, 687.

[122]: **C. Lacey, G. McMahon, J. Bones, L. Barron, A. Morrissey, J. M. Tobin**, 2008. An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Talanta* 75, 1089.

[123]: **L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu**, 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090.

- [124]: **A. Y. C. Lin, Y. T. Tsai**, 2009. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities. *Science of the Total Environment* 407, 3793.
- [125]: **W. Ben, Z. Quiang, C. Adams, H. Zhang, L. Chen**, 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1202, 173.
- [126]: **R. Wei, F. Ge, S. Huang, M. Chen, R. Wang**, 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408.
- [127]: **P. A. Blackwell, H. C. H. Lutzhoft, H. P. Ma, B. Halling-Sorensen, A. B. A. Boxall, P. Kay**, 2004. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detector. *Journal of Chromatography A* 1045, 111.
- [128]: **K. J. Choi, S. G. Kim, C. W. Kim, S. H. Kim**, 2007. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. *Chemosphere* 66, 977.
- [129]: **M. J. Gomez, M. Petrovic, A. R. Fernandez-Alba, D. Barcelo**, 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1114, 224.
- [130]: **Q. T. Dinh, F. Alliot, E. Moreau-Guigon, J. Eurin, M. Chevreuil, P. Labadie**, 2011. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta* 85, 1238.
- [131]: **S. Abuin, R. Codony, R. Compano, M. Granados, M. D. Prat**, 2006. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1114, 73.
- [132]: **S. C. Kim, J. G. Davis, C. C. Truman, J. C. A. II, K. Carlson**, 2010. Simulated rainfall study for transport of veterinary antibiotics - mass balance analysis. *Journal of Hazardous Materials* 175, 836.
- [133]: **S. Reverté, F. Borull, E. Pocurull, R. M. Marcé**, 2003. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1010, 225.
- [134]: **J. Chen, J. Lichwa, M. Snehota, S. Mohanty, C. Ray**, 2006. Determination of Hormones and Non-ionic Surfactant Degradation Products in Small-Volume Aqueous Samples from Soil Columns Using LC-ESI-MS-MS and GC-MS. *Chromatographia* 64, 413.
- [135]: **P. Labadie, H. Budzinski**, 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 1199.
- [136]: **M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo**, 2007. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 637.
- [137]: **S. O'Connor, D. S. Aga**, 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 456.
- [138]: **V. K. Balakrishnan, K. A. Terry, J. Toito**, 2006. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *Journal of Chromatography A* 1131, 1.
- [139]: **T. Kumazawa, X.-P. Lee, K. Sato, O. Suzuki**, 2003. Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Analytica Chimica Acta* 492, 49.
- [140]: **M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa**, 2006. Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 40, 500.

- [141]: **L. Suna, W. Yong, X. Chu, J. M. Lina**, 2009. Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 541.
- [142]: http://www.kilu.lu.se/fileadmin/kilu/CAS/membrane_extraction.pdf, 17/09/2012.
- [143]: **A. Poliwoda, M. Krzyzak, P.P.Wieczorek**, 2010. Supported liquid membrane extraction with single hollow fiber for the analysis of fluoroquinolones from environmental surface water samples. *Journal of Chromatography A* 1217, 3590.
- [144]: **T. A. M. Msagati, M. M. Nindi**, 2004. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. *Talanta* 64, 87.
- [145]: **S. Zorita, T. Barri, L. Mathiasson**, 2007. A novel hollow-fibre microporous membrane liquid–liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1157, 30.
- [146]: <http://odeursparfumsetlhomme.blogspot.fr/p/ii-les-techniques-dextraction-des.html>, 12/12/2012.
- [147]: **Y. Yamini, M. Asghari-Khiavi, N. Bahramifar**, 2002. Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets. *Talanta* 58, 1003.
- [148]: **D. S. Aga, S. O'Connor, S. Ensley, J. O. Payero, D. Snow, D. Tarkalason**, 2005. Determination of the Persistence of Tetracycline Antibiotics and Their Degradates in Manure-Amended Soil Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7165.
- [149]: **O. Zuloaga, P. Navarro, E. Bizkarguenaga, A. Iparraguirre, A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto**, 2012. Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta* 736, 7.
- [150]: <http://www.amglassware.com/soxhletextraction.htm>, 15/10/2012.
- [151]: http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2008_01_03_methods_method_1698.pdf, 17/09/2012.
- [152]: **H. O. Pharmaceuticals**, 2006. Ruggedness of analytical methods developed for hormones, antibiotics and pharmaceutical products in sludge, soil and biowaste. CAE / ANJOU RECHERCHE, Veolia Water.
- [153]: **E. Martinez-Carballo, C. Gonzalez-Barreiro, S. Scharf, O. Gans**, 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570.
- [154]: **A. Karci, I. A. Balcioglu**, 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment* 407, 4652.
- [155]: **P. A. Blackwell, H. C. H. Lützhof, H. P. Ma, B. Halling-Sorensen, A. B. A. Boxall, P. Kay**, 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058.
- [156]: **J. Xu, L. Wu, W. Chen, A. C. Chang**, 2008. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1202, 189.
- [157]: **S. C. Kim, K. Carlson**, 2005. LC–MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 635.

- [158]: **M. Rabolle, N. H. Spliid**, 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40, 715.
- [159]: <http://www.hellopro.fr/REUS-88216-profil-fr-societe.html>, 12/12/2012.
- [160]: **R. Liu, J. L. Zhou, A. Wilding**, 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *Journal of Chromatography A* 1038, 19.
- [161]: **S. L. Rice, S. Mitra**, 2007. Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 589, 125.
- [162]: **T. Michel**, 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Université d'Orléans, Thèse.
- [163]: **J. Beausse, H. Pharmaceuticals**, 2004. Selected drugs in solid matrices : A review of environmental occurrence, determination and properties of principal substances. Anjou Recherche Veolia Water.
- [164]: **M. P. Schlusener, M. Spiteller, K. Bester**, 2003. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1003, 21.
- [165]: **A. M. Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev, S. H. Hansen**, 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1038, 157.
- [166]: **M. P. Schlusener, K. Bester**, 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution* 143, 565.
- [167]: **E. M. Golet, A. Strehler, A. C. Alder, W. Giger**, 2002. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction. *Analytical Chemistry* 74, 5455.
- [168]: **H. Runnqvist, S. A. Bak, M. Hansen, B. Styrishave, B. Halling-Sorensen, E. Björklund**, 2010. Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—Are we developing sound extraction methods? *Journal of Chromatography A* 1217, 2447.
- [169]: **M. Lillenberg, S. Yurchenko, K. Kipper, K. Herodes, V. Pihl, K. Sepp, R. Lõhmus, L. Nei**, 2009. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 5949.
- [170]: **I. Ferrer, E. T. Furlong**, 2002. Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples. *Analytical Chemistry* 74, 1275.
- [171]: **S. Armenta, S. Garrigues, M. d. I. Guardia**, 2008. Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 497.
- [172]: **D. Drozdzyński, J. Kowalska**, 2009. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 2241.
- [173]: **M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, L. M. Ravelo-Pérez, M. A. Rodríguez-Delgado**, 2010. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 2307.

- [174]: **C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker**, 2008. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry. *Talanta* 75, 284.
- [175]: **C. G. Pinto, M. E. F. Laespada, S. H. Martín, A. M. C. Ferreira, J. L. P. Pavon, B. M. Cordero**, 2010. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta* 81, 385.
- [176]: **M. Anastassiades, K. Mastovska, S. J. Lehotay**, 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* 1015, 163.
- [177]: **A. Rashid, S. Nawaz, H. Barker, I. Ahmad, M. Ashraf**, 2010. Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 2933.
- [178]: **F. Rouviere, A. Bulete, C. Cren-Olive, C. Arnaudguilhem**, 2012. Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. *Talanta* 93, 336.
- [179]: **S. H. Martín, C. G. Pinto, J. L. P. Pavon, B. M. Cordero**, 2010. Determination of trihalomethanes in soil matrices by simplified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction and fast gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography A* 1217, 4883.
- [180]: **J. A. Padilla-Sanchez, P. Plaza-Bolanos, R. Romero-Gonzalez, A. Garrido-Frenich, J. L. M. Vidal**, 2010. Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 5724.
- [181]: **R. Colin**, 2009. Les perturbateurs endocriniens dans l'eau Un enjeu environnemental et sanitaire. *L'eau, l'industrie, les nuisances*.
- [182]: **R. Jeannot, H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac, K. Dohrendorf**, 2002. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 974, 143.
- [183]: **T. Dagnac, S. Bristeau, C. Coton, C. Leroy, N. Fleury, R. Jeannot**, 2005. Analyse de polluants organiques et organométalliques dans l'environnement. convention Région Centre et BRGM.
- [184]: **M. Pedrouzo, F. Borrull, E. Pocurull, R. M. Marcé**, 2009. Estrogens and their conjugates: Determination in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 78, 1327.
- [185]: **K. Stoob, H. P. Singer, C. W. Goetz, M. Ruff, S. R. Mueller**, 2005. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry Quantification of sulfonamides antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *Journal of Chromatography A* 1097, 138.
- [186]: **K. Bester**, 2007. Personal Care Compounds in the Environment. Wiley.
- [187]: http://www.keepantibioticsworking.com/new/KAWfiles/64_2_37599.pdf, 22/10/2012.
- [188]: **E. Barriuso, R. Calvet, M. Schiavon, G. Soulas**, 1996. Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et Gestion des Sols* 3, 279.
- [189]: **A. B. A. Boxall, D. W. Kolpin, B. Halling-Sorensen, J. Tolls**, 2003. Are Veterinary Medicines Causing Environmental Risks? *Environmental Science and Technology* 37, 286 A.
- [190]: **J. F. Yang, G. G. Ying, L. H. Yang, J. L. Zhao, F. Liu, R. Tao, Z. Q. Yu, P. Peng**, 2009. Degradation behavior of sulfadiazine in soils under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 44, 241.

- [191]: **C. H. Huang, J. E. Renew, K. L. Smeby, K. Pinkston, D. L. Sedlak**, 2001. Assessment of Potential Antibiotic Contaminants in Water and Preliminary Occurrence Analysis. *Journal of Contemporary Water Research and Education* 120, 30.
- [192]: **B. Halling-Sørensen, A. Lykkeberg, F. Ingerslev, P. Blackwell, J. Tjørnelund**, 2003. Characterisation of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS. *Chemosphere* 50, 1331.
- [193]: **L. S. Lee, N. Carmosini, S. A. Sassman, H. M. Dion, M. S. S. Iveda**, 2007. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality. *Advances in Agronomy* 93, 1.
- [194]: **A. Karnjanapiboonwong, A. N. Morse, J. D. Maul, T. A. Anderson**, 2010. Sorption of estrogens, triclosan, and caffeine in a sandy loam and a silt loam soil. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1300.
- [195]: **J. L. Bonin, M. J. Simpson**, 2007. Sorption of steroid estrogens to soil and soil constituents in single and multi-sorbate system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2604.
- [196]: **Y. Kim, S. Lim, M. Han, J. Cho**, 2012. Sorption characteristics of oxytetracycline, amoxicillin, and sulfathiazole in two different soil types. *Geoderma* 185-186, 97.
- [197]: **J. L. Conkle, C. Lattao, J. R. White, R. L. Cook**, 2010. Competitive sorption and desorption behavior for three fluoroquinolone antibiotics in a wastewater treatment wetland soil. *Chemosphere* 80, 1353.
- [198]: **L. Yu, G. Fink, T. Wintgens, T. Melin, T. A. Ternes**, 2009. Sorption behavior of potential organic wastewater indicators with soils. *Water research* 43, 951.
- [199]: **J. Xu, L. Wu, A. C. Chang**, 2009. Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *chemosphere* 77, 1299.
- [200]: **P. Kay, P. A. Blackwell, A. B. A. Boxall**, 2005. Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere* 60, 497.
- [201]: **B. S. Das, L. S. Lee, P. S. Rao, R. P. Hultgren**, 2004. Sorption and degradation of steroid hormones in soils during transport: column studies and model evaluation. *Environmental Science and Technology* 38, 1460.
- [202]: **S. Dousset, C. Molvet**, 1997. Lessivage de la terbuthylazine et de l'atrazine en colonnes de sol au laboratoire. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Sciences de la terre et des planètes* 325, 335.
- [203]: **S. M. Novak, J. M. Portal, M. Schiavon**, 2000. Effet de la taille des agrégats sur le transport de deux herbicides et d'un traceur de l'eau. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Sciences de la terre et des planètes* 331, 111.

PARTIE II

MATERIELS ET METHODES

I. Choix des standards analytiques et autres références :

Pour réaliser des analyses quantitatives, des composés de grande pureté sont nécessaires. La plupart des standards analytiques utilisés pour notre étude sont de qualité Vetranal (V) ou certifiés USP (United States Pharmacopeia). Les substances suivantes ont ainsi été choisies : dicyclanile (V, 99.9%), sulfathiazole (99%), sulfadiméthoxine (V, > 98%), sulfadimérazine (V, 99.8%), sulfanilamide (V, 99.9%), sulfadiazine (V, 99.7%), sulfabenzamide (99.9%), sulfaméthoxydiazine (V, 99.9%), sulfaméthoxazole (V, > 98%), triméthoprime (V, 99.1%), érythromycine (USP, > 98%), roxithromycine (> 90%), tylosine tartrate (V, > 98%), pénicilline G (sel de potassium, V, 99.7%), florfénicol (> 98%), tétracycline (> 98%), doxycycline (HCl, > 98%), minocycline (HCl, > 98%), oxytétracycline (HCl, 98.1%), chlortétracycline (HCl, > 98%), norfloxacine (V, 99.7%), ciprofloxacine (V, 99.9%), danofloxacine (V, 99.8%), enrofloxacine (V, 99.1%), ofloxacine (V, 99.9%), marbofloxacine (V, 98.9%), orbifloxacine (V, 99.6%), difloxacine (HCl, V, 98.4%), carbamazépine (USP, 99.6%), fluvoxamine (100%), paracétamol (99%), ibuprofène (V, > 98%), bisphénol A (99%), androstènedione (V, 99.4%), lévonorgestrel (99%), noréthindrone (V, 99.5%), progestérone (> 99%), testostérone (V, 99%), 17 α -estradiol (V, 99.9%), 17 β -estradiol (> 98%), estrone (> 99%), estriol (V, 99.9%), 17 α -éthinyloestradiol (V, 99.3%). Ces composés ont été achetés chez Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Le gestodène (98%) a été fourni par AK Scientific (Californie, USA). Tous les composés utilisés sont d'une pureté supérieure à 98% sauf la roxithromycine qui affiche une pureté d'environ 90%. Pour cette dernière, une correction a été effectuée pour la quantification.

Nous avons également choisi des composés deutérés comme étalons internes. Ces composés ne sont disponibles commercialement que pour un nombre restreint de substances, nous avons toutefois réussi à obtenir au minimum un composé deutéré par famille. Le sulfaméthoxazole-d₄ (> 98%) a été utilisé pour les sulfonamides et le triméthoprime-d₃ (99.6%) pour le triméthoprime (diaminopyrimidine). Pour les macrolides, l'érythromycine ¹³C-d₃ (> 98%) a été choisie et la pénicilline G-d₇ (> 98%) a été utilisée pour la famille des β -lactames. Nous nous sommes également servis d'étalons deutérés pour quelques contaminants humains tels que la carbamazépine-d₁₀ (99%), la fluvoxamine-d₄ (98.2%) et le paracétamol-d₃ (99.1%). Enfin, des composés deutérés ont également été utilisés pour les stéroïdes hormonaux : androstènedione-d₇ (98.8%), lévonorgestrel-d₆ (99.4%), noréthindrone-d₆ (99.6%), progestérone-d₉ (99.1%), testostérone-d₂ (99.7%) et gestodène-d₆ (98.2%). Ces composés deutérés ont été fournis par C/D/N isotopes (Cluzeau, Sainte Foy La Grande, France) exceptés le sulfaméthoxazole-d₄, l'érythromycine ¹³C-d₃ et la pénicilline G-d₇ qui ont été achetés chez Toronto Research Chemicals Inc (TRC, Canada).

Des solutions mères individuelles de chacun des composés ont été préparées par pesée à des concentrations de 200 mg/L dans le méthanol et conservées à -23°C. Les solutions de travail ont été préparées par mélange de ces solutions mères et de dilutions adéquates.

Le méthanol, l'acétonitrile (grade LC-MS), l'heptane, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane (grade HPLC) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. L'eau a été obtenue à partir d'un système MilliQ de Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). L'acide formique (98%, grade LC-MS), l'acide acétique (grade LC-MS), le formate d'ammonium, la solution d'hydroxyde d'ammonium (NH₃, aq ; 25% dans l'eau), le sel disodique de l'acide éthylène diamine tétraacétique dihydraté (Na₂EDTA, 2 H₂O) et l'acide citrique monohydraté ont été fournis par Sigma-Aldrich. L'acide phosphorique (min 85%) et la soude ont été achetés chez Prolabo (Paris, France). Enfin, l'acétate de sodium a été fourni par Arcos (Geel, Belgique).

II. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem :

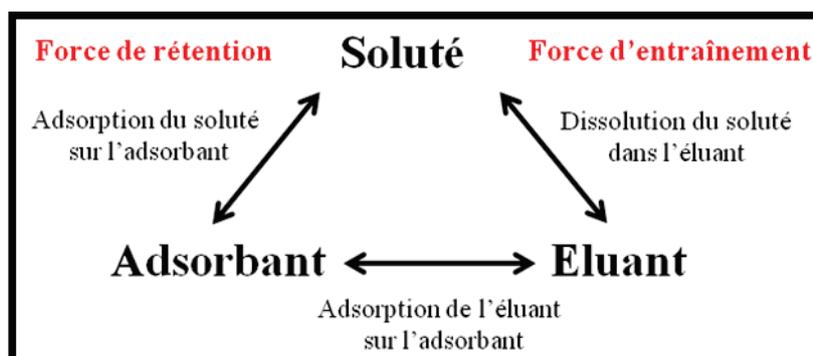
Après l'étape de préparation d'échantillon, les extraits sont analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem dont le principe est détaillé ci-dessous.

A. Principe :

1. Séparation par chromatographie liquide :

La chromatographie liquide est basée sur des interactions entre la phase stationnaire (adsorbant), la phase mobile (éluant) et les solutés comme le montre la **Figure II.1**.

Figure II.1 : Principe de la chromatographie liquide



L'échantillon est injecté dans une phase mobile liquide en contact avec la phase stationnaire contenue dans la colonne chromatographique. Les solutés se répartissent selon leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire et sont ainsi séparés.

Deux types de phases stationnaires existent. La phase normale est polaire et acide, constituée de gel de silice ayant à sa surface des groupes silanol (-OH) et siloxanes (-O-) permettant à la silice de retenir les composés à analyser par des liaisons hydrogènes. Cette phase sert principalement à séparer des composés polaires. Dans ce cas, un éluant apolaire est utilisé. La phase inverse est une phase normale sur laquelle des chaînes alkyles (C8 ou C18 le plus souvent) ont été greffées sur les groupements silanols. Dans ce cas, ce sont les composés polaires qui sont élués en premier. Un éluant polaire sera utilisé avec une phase inverse.

C'est une phase inverse qui sera utilisée dans notre étude. Plusieurs paramètres seront à optimiser pour séparer au mieux l'ensemble de nos composés : le choix de la phase stationnaire, la phase mobile qui est le plus souvent, dans le cas de la phase inverse, un mélange d'acétonitrile et/ou de méthanol avec de l'eau et enfin le gradient. Dans le cas le plus simple, le mode isocratique est employé c'est-à-dire que la composition de la phase mobile ne varie pas au cours de l'analyse. Mais le plus souvent, le mode gradient de solvant est utilisé, pour lequel la composition du solvant varie en cours d'analyse, permettant ainsi d'améliorer la séparation des solutés et de raccourcir le temps d'analyse.

2. Détection par spectrométrie de masse en tandem :

a. Spectrométrie de masse :

Un spectromètre de masse est composé de :

- une source d'ionisation permettant de volatiliser et d'ioniser les molécules pour obtenir des ions en phase gazeuse
- un analyseur permettant de séparer les ions en fonction de leur rapport m/z
- un détecteur qui permet de convertir le courant ionique en courant électrique proportionnel au nombre d'ions détectés

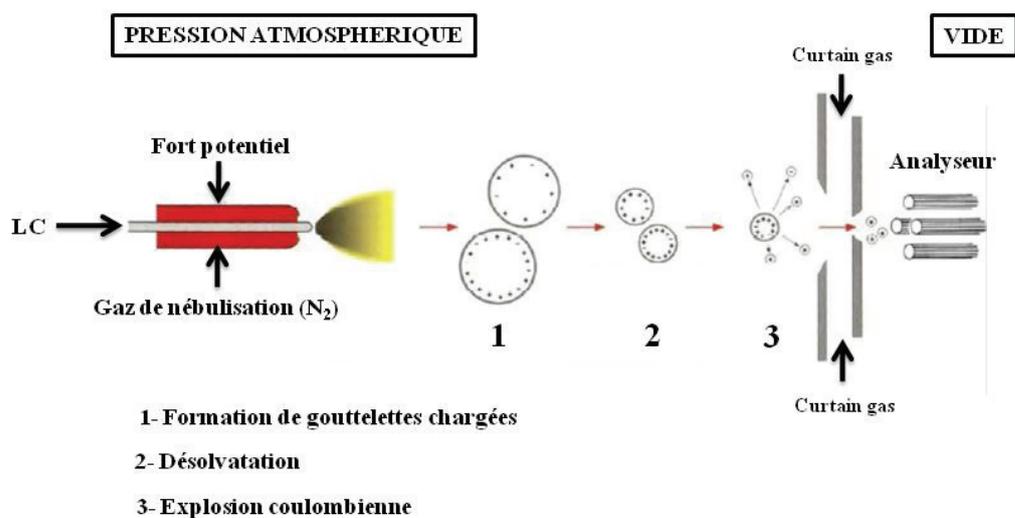
i Source d'ionisation :

Plusieurs modes d'ionisation existent plus ou moins doux tels que l'ionisation électronique (EI), l'ionisation chimique (CI), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou encore l'ionisation électrospray (ESI). C'est cette dernière source qui a été utilisée dans notre étude, seul le principe de l'ionisation électrospray est donc développé ci-dessous.

L'échantillon liquide traverse, à pression atmosphérique, un tube capillaire auquel est appliquée une différence de potentiel de 4000 à 6000 V, le champ électrique ainsi créé est de l'ordre de 10^6 V/m. A la sortie, un brouillard de gouttelettes de soluté forme un cône de Taylor (jet de particules chargées). Le champ électrique intense leur confère une densité de charge élevée (gouttelettes chargées suivant le mode d'ionisation, positif ou négatif). Sous l'effet d'un gaz chaud, le solvant s'évapore petit à petit. Leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes subissent une explosion coulombienne qui forme des gouttelettes encore plus petites. Le phénomène se poursuit jusqu'à l'obtention d'ions complètement désolvatés pouvant être ensuite dirigés vers l'analyseur (**Figure II.2**).

Avec une source électrospray, deux modes d'ionisation existent : ESI+ (positif) et ESI- (négatif). Ces modes permettent de produire respectivement des ions chargés positivement (par une protonation des molécules) ou des ions chargés négativement (par une déprotonation des molécules). Le choix du mode d'ionisation est guidé par la structure chimique de la molécule.

Figure II.2 : Principe de l'ionisation par une source électrospray [1]



ii Analyseur :

Plusieurs types d'analyseur existent : par exemple l'analyseur quadripolaire, la trappe ionique et l'analyseur à temps de vol. Le premier a été utilisé pour notre étude donc seul son principe est détaillé dans cette partie.

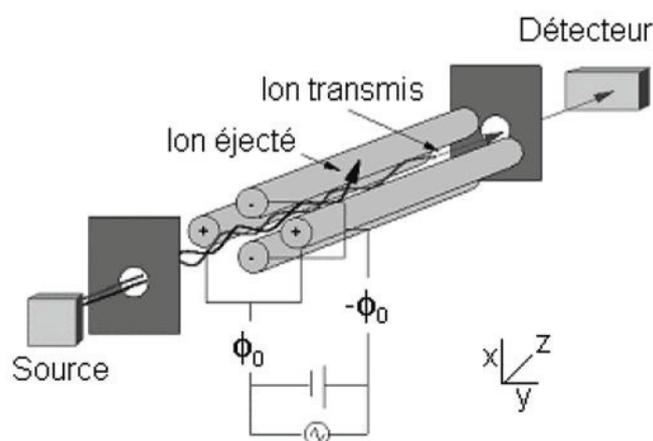
L'analyseur quadripolaire est constitué de quatre électrodes parallèles connectées deux à deux électriquement, séparant les ions en fonction de leur rapport m/z . Les ions traversant le quadripôle suivant l'axe z sont soumis à l'influence d'un champ électrique total (constitué d'un champ

alternatif quadripolaire superposé à un champ constant) résultant de l'application sur les barres des potentiels Φ_0 et $-\Phi_0$.

$\Phi_0 = U + V \cos(\omega t)$, avec U la composante continue et $V \cos(\omega t)$ la composante sinusoïdale.

Pour séparer les ions en fonction de leur rapport m/z , les valeurs de U et de V sont régulièrement changées tout en maintenant le rapport U/V constant. Les tensions appliquées affectent la trajectoire des ions traversant les quatre électrodes. Pour une valeur de U et de V , une valeur unique de m/z aura une trajectoire stable selon l'axe z . La **Figure II.3** illustre le principe de l'analyseur quadripolaire.

Figure II.3 : Principe de l'analyseur quadripolaire [2]



b. Spectrométrie de masse en tandem :

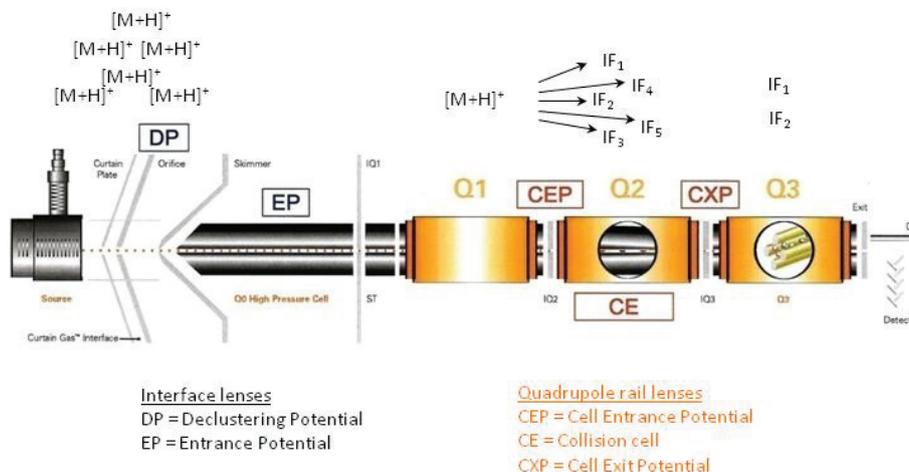
Un triple quadripôle a été utilisé dans notre étude. Il résulte de l'association de deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision.

Quatre modes différents existent selon l'information recherchée: le mode descendant pour obtenir des informations structurales, les deux modes ascendant et perte de neutre qui sont d'un usage plus restreint et qui permettent de mettre en évidence des ions ayant des particularités communes et enfin, le mode Multiple Reaction Monitoring ou MRM, dérivé du mode descendant qui est dédié à la quantification. C'est ce dernier mode qui sera utilisé dans notre étude.

En mode MRM (**Figure II.4**), l'ion parent ou précurseur (souvent l'ion pseudo-moléculaire $[M+H]^+$ en ESI+ et $[M-H]^-$ en ESI-) issu de la source d'ionisation est sélectionné par le premier quadripôle puis fragmenté dans la cellule de collision pour former des ions fils. Le second analyseur est, quant à lui, focalisé uniquement sur les ions fils. Ce mode présente une double sélectivité, au niveau des

sélections de l'ion parent et de l'ion produit. Dans ce mode, sont obtenues des transitions MRM de l'ion parent à l'ion fils.

Figure II.4 : Illustration du mode MRM



Le mode MS/MS est très sensible, cependant, il est utilisé pour des analyses ciblées. Pour réaliser des analyses non ciblées, le TOF (analyseur à temps de vol) est employé car il apporte des informations sur l'ensemble du spectre, en revanche sa sensibilité est plus faible

Etant donné qu'une étude ciblée est effectuée dans notre travail, la détection par spectrométrie de masse en tandem a été choisie.

B. Méthode optimisée :

1. Etude multi-résidus et multi-familles :

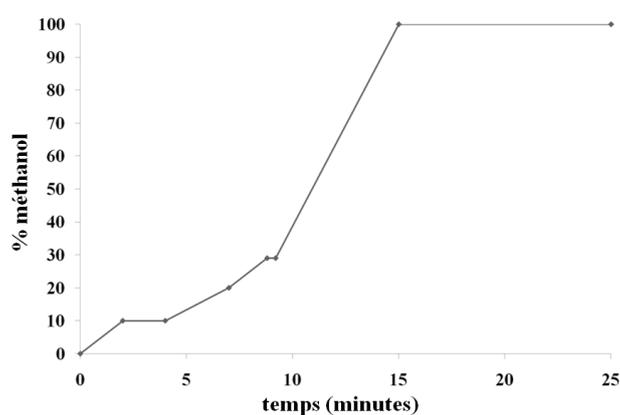
La chromatographie liquide a été effectuée sur une chaîne HPLC HP1100 (Agilent Technologies) équipée d'un dégazeur, d'une pompe binaire, d'un passeur d'échantillons et d'un four de colonne.



Les composés qui s'ionisent positivement sont analysés avec une colonne Zorbax Eclipse PLUS C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm, Agilent Technologies) munie d'une pré-colonne (Phenomenex,

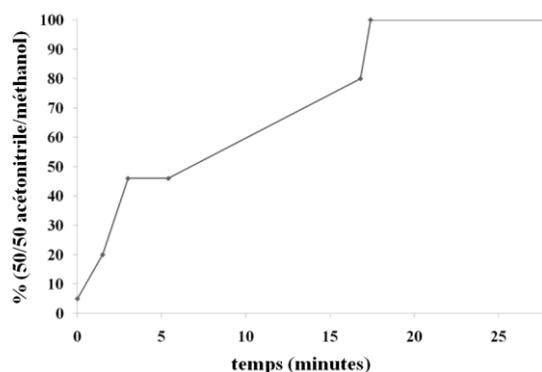
AF0-8497). Les phases mobiles sont (A) une solution à 0.01% d'acide formique dans de l'eau MilliQ (pH = 3.3) et (B) du méthanol, avec le gradient suivant : de 0% à 10% (B) en 2 minutes ; 10% (B) pendant 2 minutes ; de 10% à 20% (B) en 3 minutes ; de 20% à 29% (B) en 1.8 minutes ; 29% (B) pendant 0.4 minutes et de 29% à 100% (B) en 5.8 minutes. Avant chacune des analyses, la colonne chromatographique est pré-équilibrée à 100% (A) pendant 10 minutes et à la fin de chaque analyse, la colonne est nettoyée à 100% (B) pendant également 10 minutes (**Figure II.5**).

Figure II.5 : Gradient pour la séparation des composés qui s'ionisent positivement



En ce qui concerne les substances qui s'ionisent négativement, une colonne Zorbax Eclipse XDB C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μ m, Agilent Technologies) est utilisée, équipée du même type de pré-colonne que pour les composés ionisés positivement. Les phases mobiles sont (A) de l'eau MilliQ et (B) une solution à 50/50 acétonitrile/méthanol avec le gradient suivant : de 5% à 20% (B) en 1.5 minutes, de 20% à 46% (B) en 1.5 minutes ; 46% (B) pendant 2.4 minutes ; de 46% à 80% (B) en 11.4 minutes et de 80% à 100% (B) en 0.6 minutes. La colonne est également équilibrée avant l'analyse à 5% (B) et nettoyée avec 100% (B) à la fin de l'analyse (**Figure II.6**). Pour ces composés, une post-colonne (méthanol avec 0.1% NH_4OH (v/v)) a été rajoutée pour favoriser l'ionisation.

Figure II.6 : Gradient pour la séparation des composés qui s'ionisent négativement



Pour les deux séparations, la température du four a été fixée à 50°C, le débit à 0.3 mL/min et le volume d'injection à $V = 25 \mu\text{L}$.

La chaîne HPLC est couplée à un spectromètre de masse, triple quadripôle (3200 QTrap, ABSciex) avec une source électrospray (ESI, TurboV, ABSciex). L'azote est utilisé comme gaz de nébulisation.



Les données MS/MS ainsi que les paramètres de la source d'ionisation ESI ont été optimisés par infusion manuelle et injection de standards en flux continu (FIA) à des concentrations entre 0.5 et 2 mg/L selon les composés. Les conditions MS/MS et les paramètres de la source sont résumés dans les **Tableaux II.1 et II.2**.

Tableau II.1 : Paramètres MS/MS (ions parents et ions fils, énergie de collision (CE) et potentiel (DP))

Composés	Ion parent > Ion fils (CE (eV))	DP (V)
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES		
antiparasitaire		
dicyclanile	191 > 150 (27) et 191 > 109 (33)	46
sulfonamides / triméthoprime		
sulfathiazole	256 > 156 (19) et 256 > 92 (35)	36
sulfadiméthoxine	311 > 156 (27) et 311 > 92 (45)	46
sulfadimérazine	279 > 92 (43) et 279 > 124 (33)	41
sulfanilamide	173 > 156 (11) et 173 > 92 (23)	16
sulfadiazine	251 > 156 (19) et 251 > 92 (35)	36

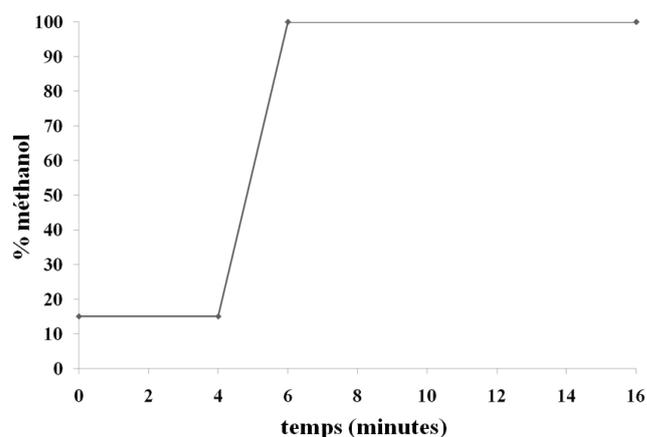
sulfabenzamide	277 > 156 (17) et 277 > 92 (37)	31
sulfaméthoxydiazine	281 > 92 (39) et 281 > 156 (23)	41
sulfaméthoxazole	254 > 156 (31) et 254 > 92 (37)	36
sulfaméthoxazole-d ₄	258.105 > 96.1 (37)	31
triméthoprime	291 > 230 (31) et 291 > 261 (37)	46
triméthoprime-d ₃	293.773 > 230.1 (33)	6
macrolides		
érythromycine	734 > 158 (47) et 734 > 83 (73)	46
érythromycine ¹³ C-d ₃	738.7 > 162.2 (39)	51
roxithromycine	837 > 679 (29) et 837 > 158 (43)	56
tylosine	916 > 174 (49) et 916 > 101 (67)	86
β-lactame		
pénicilline G	335 > 217 (19) et 335 > 91 (59)	71
pénicilline G-d ₇	342.185 > 98.2 (61)	51
phénicolé		
florfénicol	356 > 336 (-22) et 356 > 185 (-12)	-25
CONTAMINANTS HUMAINS		
médicaments humains		
carbamazépine	237 > 194 (27) et 237 > 165 (53)	41
carbamazépine-d ₁₀	247.243 > 204.3 (29)	46
fluvoxamine	319 > 71 (29) et 319 > 258 (15)	31
fluvoxamine-d ₄	323.128 > 71.1 (27)	26
paracétamol	152 > 110 (23) et 152 > 93 (31)	36
paracétamol-d ₃	155.102 > 111.1 (23)	46
ibuprofène	205 > 161 (-8) et 205 > 159 (-6)	-20
plastifiant		
bisphénol A	227 > 133 (-36) et 227 > 117 (-58)	-40
STEROIDES HORMONAUX		
androgènes		
androstènedione	287 > 97 (27) et 287 > 109 (29)	51
androstènedione-d ₇	294.315 > 100.1 (31)	46
testostérone	289 > 97 (31) et 289 > 109 (35)	46
testostérone-d ₂	291.274 > 111.1 (35)	36
progestagènes		
lévonorgestrel	313 > 91 (67) et 313 > 109 (39)	56
lévonorgestrel-d ₆	319.135 > 251 (23)	26
noréthindrone	299 > 109 (33) et 299 > 91 (57)	51
noréthindrone-d ₆	305.186 > 114.1 (37)	36
progestérone	315 > 97 (31) et 315 > 109 (31)	66
progestérone-d ₉	324.342 > 100.3 (31)	41
gestodène	311 > 109 (35) et 311 > 91 (63)	46
gestodène-d ₆	317.093 > 114.2 (47)	66
estrogènes		
17α-estradiol	271 > 145 (-52) et 271 > 143 (-66)	-90
17β-estradiol	271 > 145 (-54) et 271 > 183 (-52)	-70
estrone	269 > 145 (-50) et 269 > 143 (-78)	-65
estriol	287 > 145 (-52) et 287 > 171 (-50)	-85
17α-éthynylestradiol	295 > 145 (-56) et 295 > 143 (-58)	-75

Tableau II.2 : Paramètres de la source en modes positif et négatif

	ESI+	ESI-
Gaz de nébulisation (psi)	45	40
Gaz de désolvatation (psi)	55	50
Tension de spray (V)	5500	-4500
Température (°C)	600	500

2. Cas particulier des tétracyclines et des fluoroquinolones :

Les 12 tétracyclines et fluoroquinolones étudiées s'ionisent positivement. Elles sont analysées avec une colonne Zorbax Eclipse PLUS C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 µm, Agilent Technologies) munie d'une pré-colonne (Phenomenex, AF0-8497). Les phases mobiles sont (A) une solution à 0.01% d'acide formique dans de l'eau MilliQ (pH = 3.3) et (B) du méthanol, avec le gradient suivant : 15% (B) pendant 4 minutes et de 15% à 100% (B) en 2 minutes. Avant chacune des analyses, la colonne chromatographique est pré-équilibrée à 15% (B) pendant 10 minutes et à la fin de chaque analyse, la colonne est nettoyée à 100% (B) pendant également 10 minutes (**Figure II.7**).

Figure II.7 : Gradient pour la séparation des tétracyclines et de fluoroquinolones

Enfin, comme pour les deux séparations optimisées précédemment, la température du four a été fixée à 50°C, le débit à 0.3 mL/min et le volume d'injection à $V = 25 \mu\text{L}$.

Les données MS/MS ainsi que les paramètres de la source d'ionisation ESI ont été optimisés par infusion manuelle et injection de standards en flux continu (FIA) à des concentrations entre 0.5 et 4 mg/L selon les composés. Les paramètres MS/MS et de la source sont résumés dans les **Tableaux II.3 et II.4**.

Tableau II.3 : Paramètres MS/MS (ions parents et ions fils, énergie de collision (CE) et potentiel (DP)) des tétracyclines et fluoroquinolones

Composés	Ion parent > Ion fils (CE (eV))	DP (V)
tétracyclines		
tétracycline	445 > 410 (25) et 445 > 154 (35)	36
oxytétracycline	461 > 426 (25) et 461 > 443 (19)	36
chlortétracycline	479 > 444 (27) et 479 > 462 (23)	36
doxycycline	445 > 428 (23) et 445 > 154 (41)	41
fluoroquinolones		
ciprofloxacin	332 > 288 (23) et 332 > 231 (49)	51
enrofloxacin	360 > 316 (25) et 360 > 245 (35)	51
ofloxacin	362 > 261 (35) et 362 > 318 (23)	51
norfloxacin	320 > 276 (27) et 320 > 231 (51)	61
danofloxacin	358 > 340 (27) et 358 > 82 (67)	26
marbofloxacin	363 > 72 (37) et 363 > 320 (23)	21
orbifloxacin	396 > 295 (33) et 396 > 352 (23)	31
difloxacin	400 > 356 (25) et 400 > 299 (35)	41

Tableau II.4 : Paramètres de la source en mode positif pour les tétracyclines et fluoroquinolones

	ESI+
Gaz de nébulisation (psi)	45
Gaz de désolvatation (psi)	55
Tension de spray (V)	5500
Température (°C)	600

C. Analyse des données :

Les analytes sont identifiés à la fois par leurs caractéristiques chromatographiques et par leurs transitions MRM (fragmentation spécifique). En effet, sont comparés avec des standards les temps de rétention spécifiques des composés (tolérance de 2.5 % par rapport au temps de rétention du composé dans un standard), deux de leurs transitions caractéristiques et le ratio des aires des ions produits (déviations inférieures à 20% par rapport au ratio des standards). Ceci répond aux recommandations des normes européennes qui demandent l'emploi d'au moins 3 critères pour la confirmation de la détection et quantification des composés d'intérêt [3].

Les données ont été traitées avec le logiciel Analyst (version 1.5.1).

III. Préparation d'échantillon :

En ce qui concerne l'étape de préparation d'échantillon, elle s'effectue en deux étapes. En effet, l'extraction est généralement suivie d'une purification. Différentes méthodes d'extraction et de purification ont été testées.

A. Echantillons en phase aqueuse :

1. Principe de l'extraction sur phase solide (SPE) :

Comme mentionné dans la partie I, l'extraction sur phase solide est probablement la technique de purification, d'extraction et de concentration la plus couramment utilisée pour les matrices aqueuses ou extraits de matrice solide ou liquide dans un solvant.

La SPE est un processus de séparation. En effet les composés dissous dans le mélange liquide sont séparés d'autres substances contenues dans ce même mélange selon leurs propriétés physico-chimiques. Elle utilise l'affinité des solutés dans le liquide (phase mobile) pour une phase solide (phase stationnaire) à travers laquelle l'échantillon passe. Deux cas de figure sont possibles:

1- soit les analytes cibles sont retenus sur la phase stationnaire, dans ce cas les impuretés sont éliminées. Il faut alors une étape supplémentaire pour récupérer les analytes cibles en éluant la phase stationnaire avec un solvant approprié.

2- soit les impuretés non désirées sont retenues sur la cartouche, les composés d'intérêts sont donc récupérés dans l'extrait.

Les adsorbants utilisés sont de diverses natures, à base de silice greffée ou polymère. Différentes phases de SPE existent :

- la phase normale implique une matrice non polaire et une phase stationnaire polaire qui retient les analytes polaires qui peuvent être, par la suite, collectés dans un solvant plus polaire. Dans ce cas, des interactions polaires, π - π et des liaisons hydrogènes s'établissent.

- la phase inverse implique une matrice polaire (matrice aqueuse) et une phase non polaire retenant les composés peu ou pas polaires qui peuvent être récupérés en éluant la cartouche avec un solvant peu polaire. Les phases stationnaires sont généralement des chaînes alkyl (C8 ou C18) ou aryl greffées sur les groupements silanols. Dans ce cas, des interactions non polaires, hydrophobes ou de Wan-der-Waals (forces de London) entrent en jeu. Ces dernières années, de nouvelles cartouches polymères sont apparues sur le marché. Elles permettent l'extraction d'une vaste gamme de composés (substances neutres, acides ou basique) en une seule méthode mais en contrepartie, elles

peuvent retenir un grand nombre d'interférents. Des interactions apolaires, π - π et des liaisons hydrogènes s'établissent. L'utilisation de telles phases a permis l'essor du mode en phase inverse.

- l'échange ionique. Ce mode est basé sur des interactions électrostatiques entre l'analyte cible (ionisé ou ionisable) et le groupement chargé de la phase stationnaire.

2. Méthode optimisée :

Pour l'optimisation de l'extraction sur phase solide (SPE) de la matrice aqueuse, nous avons utilisé le lixiviat obtenu à partir d'un sol limono-argileux (sol A, **Tableau II.5**). Pour cela, une colonne de sol non dopé (cf. partie VI) a été arrosée quotidiennement avec 200 mL d'une solution à 0.01 M de CaCl_2 (représentative de l'eau de pluie) pendant 20 jours pour obtenir environ 3 L de lixiviat. Ce dernier a été récupéré en sortie de colonne dans des flacons ambrés.

Tableau II.5 : Propriétés du sol A utilisé pour obtenir du lixiviat

Sol	Texture sol	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	CO* (%)	N _{tot} * (%)	MO* (%)	pH	CEC (cmol/kg)
A	limono-argileux	32.4	45.1	22.5	1.73	0.173	2.99	6.25	15.6

* CO : Carbone Organique, * N_{tot} : Azote total, * MO : Matière Organique

La méthode permettant l'analyse d'échantillons aqueux (lixiviat, eaux de surface) a été mise au point pour les 23 composés ionisés positivement. La SPE est effectuée en utilisant un extracteur du type AutoTrace SPE Workstation Lifesciences de chez Dionex.



Un volume de 200 mL d'échantillon aqueux ou 20 mL de lixiviat dilués dans 180 mL d'eau MilliQ pour avoir un volume total de 200 mL sont utilisés. Cette solution est ensuite ajustée à pH = 7 avec une solution de NH_4OH . Les extractions, purifications et concentrations sont effectuées dans les conditions décrites dans le **Tableau II.6** en utilisant une cartouche OASIS HLB (60 mg, 3 mL, Waters, Watford, UK). Pour l'optimisation, les 200 mL de solution ont été dopés à 0.2 $\mu\text{g/L}$ avec quelques μL de solution de méthanol contenant les 23 composés.

Tableau II.6 : Paramètres de l'extraction et purification des échantillons aqueux

ETAPES	Solvant	Volume	Débit
Conditionnement	méthanol	5 mL	10 mL/min
Conditionnement	H ₂ O MilliQ	5 mL	10 mL/min
Chargement	échantillon	200 mL	5 mL/min
Rinçage	H ₂ O MilliQ pH = 7	5 mL	10 mL/min
Séchage	Temps = 30 minutes		
Elution	méthanol	10 mL	2 mL/min

Dans ce cas, les composés d'intérêts sont retenus par la cartouche puis élués par le méthanol alors que les impuretés sont non retenues.

Les 10 mL d'extrait de méthanol contenant les analytes sont évaporés à sec sous flux de N₂ à T = 40°C (évaporateur Liebisch) puis repris dans 200 µL d'une solution à 95/5 H₂O/méthanol pour être injectés en LC-MS/MS.

B. Echantillons en phase solide :

1. Etude multi-résidus et multi-familles :

a. Extraction :

Dans cette partie, nous allons décrire uniquement la PLE et l'extraction QuEChERS.

i Extraction par PLE (Pressurized Liquid Extraction) :

i.1 Développement d'une méthode PLE :

La PLE s'effectue à haute température et à haute pression. Plusieurs paramètres sont à optimiser :

- le choix du solvant qui doit être capable de solubiliser la totalité des analytes. Ainsi, la polarité de ce dernier doit se rapprocher de la polarité des composés. Un mélange de solvants de polarité différente peut être utilisé pour extraire des substances de polarité très différente.

- la température : plus la température est élevée, plus la viscosité du solvant diminue, ce qui favorise sa pénétration dans la matrice et solubilise mieux les composés.

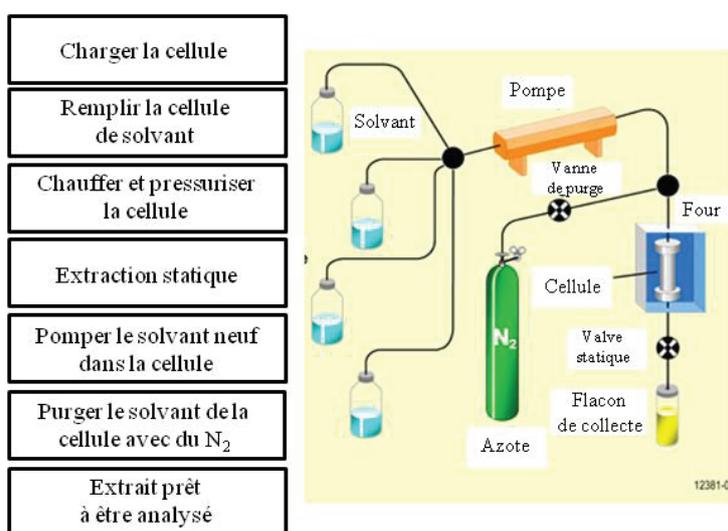
- la pression : elle doit être assez haute pour maintenir le solvant dans son état liquide.

- le temps statique correspond à la durée de l'extraction pendant laquelle la température et la pression sont stables. Certaines matrices retiennent les substances à extraire dans leurs pores. Augmenter le temps statique permet aux composés de mieux diffuser dans le solvant d'extraction.

- le nombre de cycles : il permet de multiplier le nombre de passage de solvant à travers l'échantillon et donc d'augmenter le taux de récupération.

L'échantillon broyé mélangé à un agent dispersant (terre de diatomée par exemple) est introduit dans une cellule en acier inox. Cette dernière est insérée dans l'appareil. Le principe de la PLE est détaillé à la **Figure II.8**

Figure II.8 : Schéma d'un extracteur à haute pression et haute température

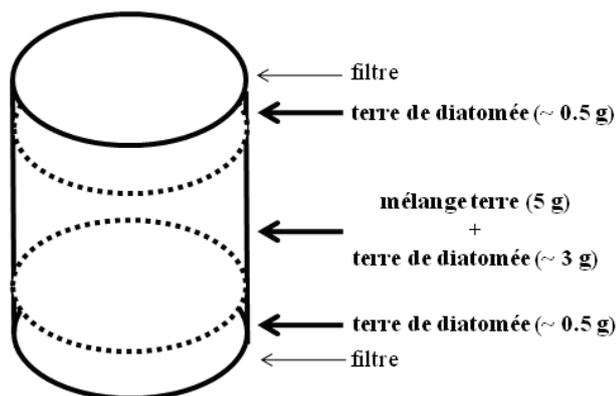


i.2 Méthode optimisée :

Pour l'optimisation de cette méthode, un sol limono-argileux (sol A, **Tableau II.5**) n'ayant jamais reçu d'épandage a été utilisé.

Une cellule PLE de 11 mL est remplie avec 5 g de sol (broyé et tamisé à 0.63 mm) et de la terre de diatomée (Sartorius, Allemagne) permettant un mélange compact. Des filtres en cellulose sont placés aux deux extrémités de la cellule. Le remplissage de la cellule est illustré sur la **Figure II.9**. Pour l'optimisation de la procédure, les cellules ont été dopées au centre à 50 ng/g avec une solution de méthanol contenant les 31 composés. Avant d'effectuer la PLE, les cellules sont laissées 7 à 8 heures à température ambiante pour que les substances imprègnent bien la matrice.

Figure II.9 : Remplissage de la cellule PLE



Les cellules sont ensuite introduites dans l'appareil (ASE 200, Dionex) et l'extraction s'effectue dans les conditions détaillées dans le **Tableau II.7**, 18 mL d'extrait sont alors obtenus. Ils seront purifiés par la méthode présentée dans le paragraphe B.1.b.iii. (purification SPE).



Tableau II.7 : Conditions de la PLE

Solvant	Méthanol
Température (°C)	80
Pression (bars)	120
Temps statique (minutes)	10
Nombre de cycles	2

ii Extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) :

ii.1 Développement d'une méthode QuEChERS :

Comme mentionné dans la partie I (synthèse bibliographique), la méthode QuEChERS est basée sur le principe d'une extraction liquide-liquide avec un solvant organique en présence de sels et de tampons. Plusieurs paramètres sont à optimiser :

- la quantité d'échantillon à extraire
- la nature du solvant qui permet d'extraire au mieux la totalité des composés. La difficulté provient du fait que les substances ont des propriétés physico-chimiques très différentes.
- la quantité de solvant : pour obtenir de bons rendements d'extraction tout en consommant le minimum de solvant.

- la nature du tampon : deux normes existent : la norme américaine AOAC [4] qui utilise le tampon acétate et la norme européenne EN 15662 [5] qui implique l'utilisation du tampon citrate.

- la quantité d'eau : d'après la norme NF EN 15662 [5], une quantité d'eau totale (eau contenue dans l'échantillon + eau rajoutée) de 10 g est préconisée pour l'extraction.

Une deuxième étape de purification, peut être mise en place. Cette purification est appelée Dispersive SPE (dSPE), son principe sera détaillé dans la partie B.1.b.ii.

ii.2 Méthode optimisée :

Comme pour la méthode PLE, nous avons utilisé un sol limono-argileux (sol A, **Tableau II.5**) pour l'optimisation de cette procédure QuEChERS.

5 g de sol (broyé et tamisé à 0.63 mm) sont introduits dans un tube à centrifuger en polypropylène de 50 mL puis dopés avec une solution de méthanol contenant les composés, soit à 50 ng/g en chacun des composés (pour l'optimisation - 31 substances) soit à 100 ng/g en deutérés pour l'étude en colonnes de sol. Les échantillons de sol après dopage sont laissés une nuit sous flux d'azote à température ambiante. Ensuite, 10 mL d'eau MilliQ et 15 mL d'acétonitrile sont ajoutés et le tube est agité à l'aide d'un vortex (Vortex Fisher Scientific FB15013 TopMix). Le tampon acétate AOAC (6 g de sulfate de magnésium et 1.5 g d'acétate de sodium, Agilent Technologies, Massy, France) est ensuite introduit et le tube est immédiatement agité manuellement pendant 30 secondes puis à l'aide d'un vortex également pendant 30 secondes. Puis, le tube est agité 3 minutes à 750 tours/min (SPEX Sample Prep, 2010 GenoGrinder, Delta Labo, Avigno, France). Après centrifugation à 5000 tour/min pendant 2 minutes (Sigma Laboratory Centrifuges 3K30H, Fisher Bioblock Scientific), 10 mL du surnageant acétonitrile sont récupérés.

b. Purification :

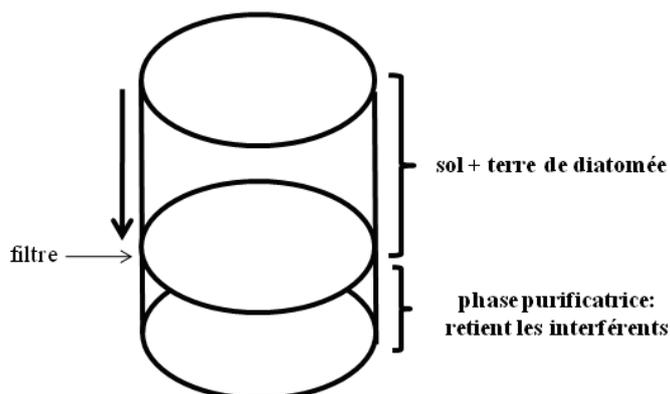
Plusieurs purifications ont été testées selon l'extraction mise en œuvre. L'étape de purification a pour but de limiter la présence d'interférents extraits en même temps que les composés d'intérêts et susceptibles de perturber l'analyse, phénomène couramment appelé effet matrice.

i SPLE (Selective Pressurized Liquid Extraction) :

i.1 Principe :

La méthode SPLE est basée sur le même principe que la PLE. Elle a pour objectif d'éliminer l'étape de purification qui suit l'extraction et ainsi d'effectuer, en une seule étape, l'extraction et le « clean-up ». Ceci est possible en incorporant une phase purificatrice dans la cellule PLE comme l'indique la **Figure II.10**.

Figure II.10 : Schéma de la SPLE : extraction + « clean-up »



L'ajout de phase purificatrice dans la cellule PLE permet de limiter l'extraction des interférents car ils sont retenus par cette phase. Il s'établit des interactions plus fortes entre les interférents et la phase purificatrice qu'entre les interférents et le(s) solvant(s) [6].

i.2 Tests :

Les phases testées au cours de l'étude sont : la florisil (SDS, Peypin, France), la silice, l'alumine (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), la Bondapak HC18 (Waters, Saint Quentin Yvelines, France) et la SampliQ Silica SAX (Strong Anion eXchange) SPE (Agilent Technologies, Massy, France).

ii dSPE (Dispersive SPE) :

ii.1 Principe :

Cette purification correspond à la deuxième étape de la procédure QuEChERS pour purifier l'extrait précédemment obtenu.

L'extrait récupéré est placé dans un tube de polypropylène de 15 mL contenant la phase purificatrice qui permet d'éliminer les interférents de la matrice et du $MgSO_4$ pour éliminer le résidu d'eau.



ii.2 Tests :

Plusieurs sorbants ont été testés. Les phases PSA (Primary and Secondary Amine) et PSA/C18 ont été essayées en premier lieu puisqu'elles sont disponibles commercialement chez Carlo Erba-SDS (Val de Reuil, France). La phase PSA contient 900 mg de $MgSO_4$ et 150 mg de PSA et la phase

PSA/C18 est composée de 900 mg de MgSO₄, 150 mg de PSA et 150 mg de CEC18 (C18, endcapped).

Les autres sorbants testés sont la florisil, la silice, l'alumine et la SAX (Strong Anion eXchange). Dans chaque cas, 900 mg de MgSO₄ (anhydrous, > 99.5%, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et 150 mg de sorbant sont introduits dans des tubes de polypropylène de 15 mL.

iii SPE (Solid Phase Extraction) employée pour purifier les éluats QuEChERS et PLE :

La SPE a été utilisée pour purifier les extraits de sol, obtenus après la PLE ou l'extraction QuEChERS.

Les 18 mL d'extrait obtenus par PLE sont évaporés à sec à T = 40°C sous vide (miVac, Genevac LTD, Ipswich, England). Les 10 mL d'extrait QuEChERS sont, eux, évaporés à sec sous flux de N₂. Les extraits sont ensuite dissous dans 10 mL de solution à 97/3 acide citrique (0.04M) / méthanol (pH = 2.5).

La purification s'effectue ensuite en deux étapes, utilisant le Rapid Trace SPE Workstation (Caliper).



La première étape correspond à la purification des 10 mL d'extrait aqueux par une phase SAX (500 mg, 3 mL, Agilent Technologies, Massy, France) et la deuxième étape est la purification/concentration de l'extrait récupéré précédemment par une cartouche StrataX (200 mg, 3 mL, Phenomenex, LePecq, France). La cartouche polymère StrataX a pour monomère un styrène modifié avec un groupement pyrrolidone (sa structure est donnée à la **Figure I.16**, synthèse bibliographique). Les paramètres des deux extractions sont détaillés dans les **Tableaux II.8** et **II.9**.

Tableau II.8 : Paramètres de la purification étape 1 : SAX

ETAPES	Solvant	Volume	Débit
Conditionnement	méthanol	5 mL	4 mL/min
Conditionnement	0.04M acide citrique	5 mL	4 mL/min
Chargement	échantillon	10 mL	1 mL/min

Dans cette étape, les interférents de la matrice sont retenus sur la cartouche SAX et les composés d'intérêts restent dans l'extrait aqueux qui est passé par la suite à travers la cartouche StrataX.

Tableau II.9 : Paramètres de la purification étape 2 : StrataX

ETAPES	Solvant	Volume	Débit
Conditionnement	méthanol	5 mL	4 mL/min
Conditionnement	0.04M acide citrique	5 mL	4 mL/min
Chargement	échantillon	10 mL	1 mL/min
Rinçage	0.04M acide citrique	2 mL	5 mL/min
Rinçage	0.1M NaOAc	2 mL	5 mL/min
Séchage	Temps = 30 minutes		
Elution	méthanol	10 mL	1 mL/min

Les analytes cibles sont retenus par la cartouche polymère puis élués avec 10 mL de méthanol qui sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote à T = 40°C. Le résidu est repris dans 200 µL d'une solution à 95/5 H₂O/MeOH.

2. Cas particulier des tétracyclines et des fluoroquinolones :

a. Extraction :

Une PLE a dû être optimisée pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones de la matrice solide. Le sol limono-argileux (sol A, **Tableau II.5**) a également été utilisé pour le développement de cette méthode.

Une cellule PLE de 11 mL est remplie avec 1 g de sol (broyé et tamisé à 0.63 mm) et de la terre de diatomée (Sartorius, Allemagne). Des filtres en cellulose sont placés aux deux extrémités de la cellule. Pour l'optimisation de la méthode, les cellules ont été dopées au centre à 500 ng/g avec une solution de méthanol contenant les 12 tétracyclines et fluoroquinolones. Par la suite, les cellules sont laissées 7 à 8 heures à température ambiante pour que les substances imprègnent bien la matrice. Deux solvants différents ont été employés pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones. Les conditions d'extraction sont résumées dans le **Tableau II.10**.

Tableau II.10 : Conditions de la PLE des tétracyclines et fluoroquinolones

Solvant	<u>tétracyclines :</u> 25/25/50 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 3
	<u>fluoroquinolones :</u> 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2 M acide citrique ajusté à pH = 4.5
Température (°C)	80
Pression (bars)	120
Temps statique (minutes)	10
Nombre de cycles	2

b. Purification :

Etant donné que les extraits PLE sont très chargés, une purification SPE a été nécessaire. Environ 20 mL d'extraits ont été obtenus après l'extraction par PLE. Ils ont été dilués dans 480 mL d'eau MilliQ. Les paramètres de la SPE sont exposés dans le **Tableau II.11**. Une cartouche StrataX (200 mg, 3 mL) a été employée.

Tableau II.11 : Paramètres SPE pour purifier et pré-concentrer les extraits PLE contenant les tétracyclines et les fluoroquinolones

ETAPES	Solvant	Volume	Débit
Conditionnement	méthanol	5 mL	10 mL/min
Conditionnement	H ₂ O MilliQ	5 mL	10 mL/min
Chargement	échantillon	500 mL	5 mL/min
Rinçage	H ₂ O MilliQ	5 mL	10 mL/min
Séchage	Temps = 15 minutes		
Elution	méthanol	6 mL	2 mL/min

Les 6 mL d'extraits sont ensuite évaporés à sec sous flux d'azote à T = 40°C et repris dans 1 mL de solution à 95/5 H₂O/méthanol. L'extrait obtenu est ensuite injecté en LC-MS/MS.

IV. Analyse par diffraction X :

A. Principe :

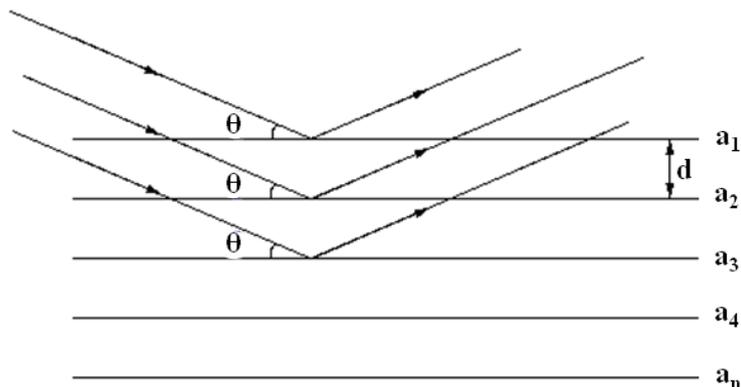
La diffraction X est une méthode utilisée pour identifier la nature et la structure de produits cristallisés (roches, cristaux, minéraux, argiles,...). Ces derniers présentent un arrangement périodique et ordonné, les atomes s'organisant en plans réticulaires séparés par des distances caractéristiques, d , appelées distances inter réticulaires.

Comme le montre la **Figure II.11**, un faisceau de rayons X incident de longueur d'onde λ n'est réfléchi par les plans réticulaires de l'échantillon (espacé d'une distance d) que dans la mesure où il rencontre ces plans sous un certain angle θ de Bragg, tel que:

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

avec : n un nombre entier correspondant à l'ordre de diffraction [7]

Figure II.11 : Principe de la loi de Bragg



a = plan réticulaire

d = distance inter réticulaire

L'enregistrement du signal par un détecteur adapté permet de visualiser les angles et intensité des pics de diffraction obtenus. La réfraction est d'autant plus intense que le plan est « dense », c'est-à-dire riche en atomes [8].

B. Manipulation :

Pour déterminer la nature de l'argile contenue dans le sol A (32.4% d'argile, **Tableau II.5**) utilisé pour les tests d'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones, nous avons fait une analyse par diffraction X (Diffractomètre Bruker, D8 Advance).

Avant d'effectuer cette analyse, nous avons extrait l'argile du sol. Pour cela, une masse de 150 mg de sol A a été introduite dans 800 mL d'eau. Ce mélange a été agité puis laissé à décanter pendant 10 minutes. L'argile a ensuite été récupérée dans la partie supérieure par aspiration du surnageant. Une partie de ce surnageant a été centrifugé et l'argile a été récupérée dans le fond du tube avant d'être diluée dans quelques millilitres d'eau. Cette solution d'argile a été déposée sur trois plaques de verre et laissée à l'air libre pour sécher. Cette dernière étape permet aux feuillets de s'orienter. Les trois échantillons obtenus ont ensuite été traités de trois manières différentes. L'un d'eux n'a subi aucun traitement, le deuxième a été glycolé sous cloche et le dernier a été chauffé à l'étuve à une température de 400°C.

Selon leur nature, les argiles sont affectées différemment par les traitements subis, ce qui peut être observé sur les diffractogrammes obtenus. Chaque type d'argile est caractérisé par un pic bien défini sur le diffractogramme. Selon le traitement appliqué à l'extrait d'argile, une disparition ou un décalage du pic peuvent être constatés. Au contraire certains pics ne seront pas affectés. Ces informations, en plus de la valeur de d , distance inter réticulaire, permettront l'identification du ou des types d'argile(s) présente(s) dans le sol.

V. Validation de la méthode QuEChERS :

L'extraction QuEChERS suivie de la purification SAX + StrataX a été validée suivant les recommandations de la norme ICH/2005 [9].

La linéarité a été évaluée en analysant des sols dopés dans une gamme de concentration de 0.01 ng/g à 1000 ng/g. La linéarité a été évaluée trois fois sur trois jours différents.

La répétabilité a été évaluée sur trois concentrations (basse : 1.5 ng/g ; moyenne : 50 ng/g et élevée : 500 ng/g) en effectuant 5 répétitions pour chaque concentration. La précision intermédiaire a été testée sur les trois mêmes concentrations, sur trois jours différents. La répétabilité et la précision intermédiaire ont été évaluées en calculant les coefficients de variation (CV, %) pour les différentes concentrations.

Les rendements d'extraction sont déterminés en comparant les résultats obtenus par l'analyse d'échantillons de sol dopés à différentes concentrations avec ceux obtenus en analysant des extraits de sol dopés après l'extraction aux mêmes concentrations :

$$\text{Rendement extraction (\%)} = \left(\frac{S_{\text{dopé}}}{S_{\text{ref}}} \right) \times 100$$

avec :

$S_{\text{dopé}}$ = signal correspondant à l'échantillon de sol dopé avant l'extraction

S_{ref} = signal correspondant à l'extrait de sol dopé après l'extraction

La limite de détection (LOD) a été déterminée telle que la concentration de l'analyte produit un pic d'une hauteur égale à trois fois l'écart-type du bruit. La limite de quantification (LOQ) correspond à la concentration pour laquelle la hauteur du pic de l'analyte est égale à dix fois l'écart-type du bruit, ceci sur la transition MRM la plus intense.

$$\text{LOD} : \frac{\text{Signal}}{\text{Bruit}} = 3$$

$$\text{LOQ} : \frac{\text{Signal}}{\text{Bruit}} = 10$$

La transition la plus intense a été utilisée pour quantifier alors que le rapport des deux transitions sert à la confirmation de l'identité de la substance.

L'existence d'un effet matrice est couramment reportée lors de l'analyse de sol. En effet les interférents de la matrice sont en compétition avec les composés analysés dans l'interface électrospray ce qui induit soit une diminution soit une augmentation de signal conduisant à des résultats inexacts. Pour évaluer cet effet matrice, les extraits de sol ont été dopés avec une solution de méthanol contenant les 31 composés et le signal S_{matrice} a été comparé à celui d'un standard S_{solvant} à la même concentration. L'effet matrice a ensuite été déterminé selon la relation suivante :

$$\text{effet matrice (\%)} = \left(\frac{S_{\text{matrice}} - S_{\text{blanc}}}{S_{\text{solvant}}} - 1 \right) \times 100$$

avec :

S_{blanc} = le signal de l'extrait du sol non dopé.

Un effet matrice positif correspond à une augmentation du signal alors qu'un effet matrice négatif indique un affaiblissement de signal.

VI. Etude en colonnes de sol:

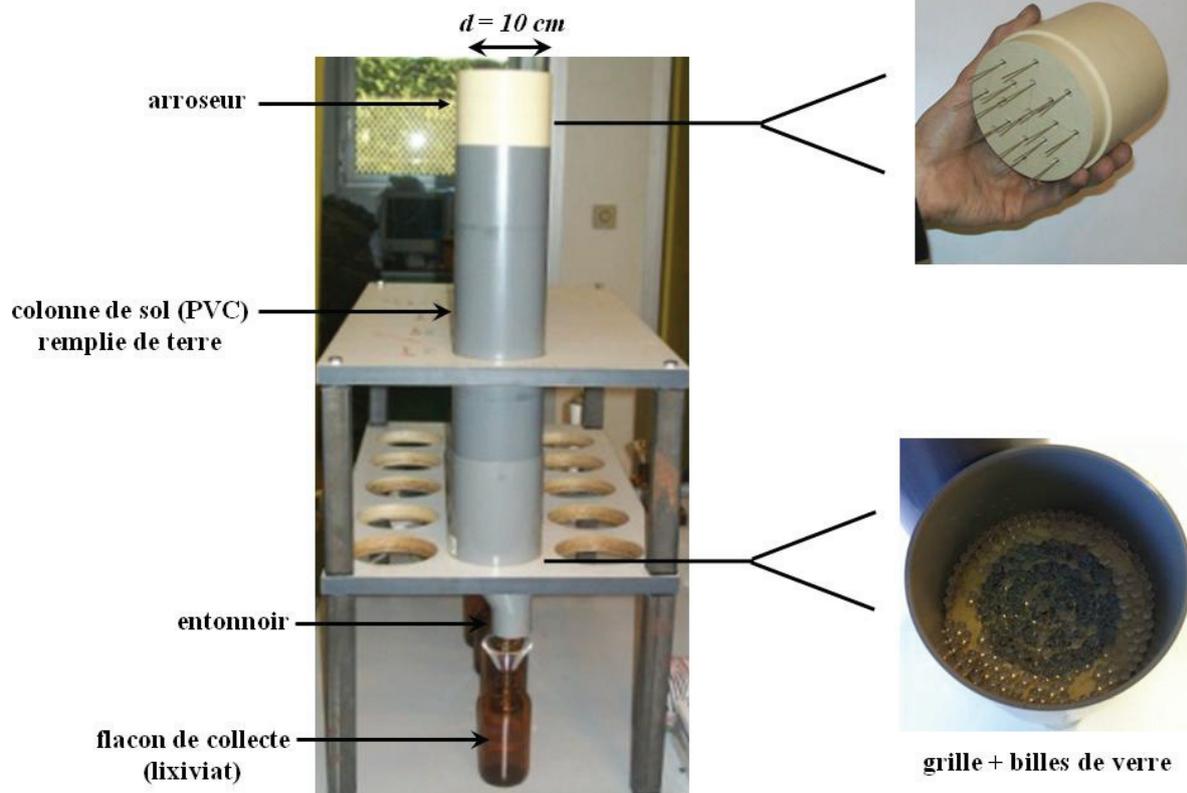
A. Protocole de l'étude en colonnes de sol :

La méthode développée a été appliquée aux analyses nécessaires à une étude en colonnes de sol dont l'objectif était d'évaluer le transfert, la dégradation et l'accumulation des composés dans la matrice solide. Cette étude a été réalisée sur les 23 substances qui s'ionisent positivement.

Des colonnes de diamètre 10 cm et de hauteur 30 cm en PVC ont été conçues au SCA (**Figure II.12**). L'extrémité inférieure de la colonne, en forme d'entonnoir, permet de récupérer le lixiviat dans des flacons. Le fond de la colonne est constitué d'une grille recouverte de billes de verre permettant de récupérer le lixiviat en sortie de colonne en limitant la perte de particules solides. Un arroseur a également été fabriqué à l'aide d'aiguilles permettant d'introduire l'eau en gouttes à gouttes, permettant un arrosage homogène et reproductible, sur toute la surface.

Les colonnes de sol ont été remplies avec 2.350 kg de sol. Deux séries de colonnes ont été préparées, l'une avec le sol A et l'autre avec le sol K dont les propriétés sont indiquées dans le **Tableau III.41**, chapitre IV.

Figure II.12 : Différentes parties des colonnes de sol



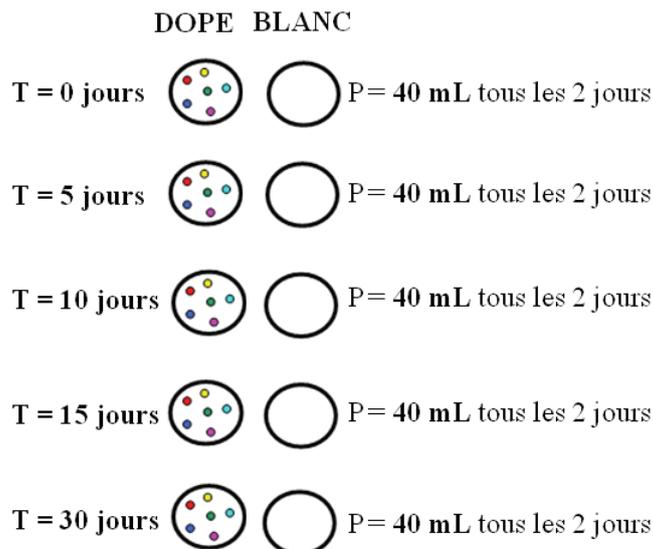
Partie II : Matériels et méthodes

Afin qu'une même quantité de chaque substance soit introduite de manière identique en tête de chaque colonne, le protocole suivant a été suivi. Tout d'abord, 22 mg de chacun des composés ont été pesés puis dissous dans 550 mL d'éthanol, 220 mL d'acétone ou 220 mL d'eau en fonction des solubilités respectives des composés. L'éthanol a permis de solubiliser le dicyclanile, la sulfadiméthoxine, la sulfaméthoxydiazine, l'érythromycine, la roxithromycine, la carbamazépine, la fluvoxamine, le paracétamol, l'androstènedione, la testostérone, le lévonorgestrel, la noréthindrone, la progestérone et le gestodène. L'acétone a été utilisée pour la sulfadimérazine, la sulfanilamide, la sulfadiazine, la sulfabenzamide, la sulfaméthoxazole et le triméthoprim. Enfin, le sulfathiazole, la tylosine et la pénicilline G ont été dissous dans l'eau. Pour chacun des sols A et K, 275 g de terre, 275 mL de solution d'éthanol et 110 mL d'acétone dopées ont été introduits dans un ballon de 2L et homogénéisés. Les solvants ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide et à une température de 37°C. Cette dernière a été choisie inférieure à 40°C pour éviter la dégradation de substances présentes dans le sol. Un sol dopé de manière parfaitement homogène a ainsi été obtenu. En tête de colonne, 25 g de sol dopé a été déposé et 10 mL d'eau dopée a été répartie, ce qui conduit à un dopage de 1 mg de chaque substance par colonne.

Pour chacun des sols, dix colonnes ont été réalisées dont cinq ont été dopées et cinq conservées pour le contrôle. L'étude en colonnes de sol a été menée sur une durée de 30 jours. Elle a été stoppée à intervalles pré-définis (0, 5, 10, 15 et 30 jours). A ces temps, les colonnes dopées et contrôle ont été placées au congélateur jusqu'à l'analyse.

Ces colonnes de sol avaient été au préalable saturées en eau puis ont été arrosées régulièrement avec de la pluie artificielle (0.01 M CaCl₂ dans de l'eau MilliQ), tous les deux jours pendant les trente jours. Les lixiviats ont été récupérés tous les deux jours dans des flacons ambrés. Ces derniers ont également été conservés au congélateur jusqu'à l'analyse. Le protocole est détaillé ci-dessous sur la **Figure II.13**.

Figure II.13 : Protocole de la manipulation de colonne de sol



B. Analyse des lixiviats et des colonnes de sol :

1. Lixiviats :

Les lixiviats ont été analysés en utilisant la méthode SPE détaillée à la partie III.A.2. La quantification des composés a été réalisée à l'aide d'une droite d'étalonnage réalisée dans la matrice (ou « matrix matched »), de 0.1 ng/L à 500 ng/L.

2. Colonnes de sol :

Les colonnes de sol congelées ont été découpées horizontalement en cinq tranches égales. Chacune d'entre elles a été décongelée pendant quelques heures pour pouvoir être homogénéisée. Environ 50 g de chacune des couches ont ensuite été placés au lyophilisateur pendant 24 heures. Après le passage dans le lyophilisateur, la terre est broyée puis tamisée à 0.63 mm. 5 g de sol sont introduits dans un tube QuEChERS et dopés à 100 ng/g avec les étalons deutérés. On utilise ensuite la procédure QuEChERS - SAX + StrataX (détaillée aux parties III.B.1.a.ii. et III.B.1.b.iii.) pour extraire les échantillons de sol. Ces derniers sont ensuite analysés en utilisant la méthode LC-MS/MS (cf. partie II.B.1.), l'extrait correspondant à la couche supérieure étant dilué dix fois.

En ce qui concerne le traitement des données, les aires trouvées ont été corrigées par les étalons internes.

Références bibliographiques :

- [1]: http://www.biomedicale.univ-paris5.fr/umr8601/IMG/pdf/PrincipesESI_IonTrap.pdf, 18/09/2012.
- [2]: **C. Buré**, 2005. Fragmentation dans une source à électronébulisation de biomolécules de synthèse : Peptides thioester, acétal, aldéhyde et oligonucléotides bromés. Université d'Orléans, Thèse.
- [3]: 17/08/2002. Commission of the European Communities, Commission decision of 12 August 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, 2002/657/EC, Official Journal of the European Communities.
- [4]: **AOAC**, 2007. AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. AOAC INTERNATIONAL.
- [5]: **Afnor**, 2009. Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par GC-MS et SL/SM/SM avec extraction / partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE disperses (Méthode QuEChERS). Afnor NF EN 15662.
- [6]: **J. H. Peterson, B. E. Richter, D. E. Knowles**. Improved Sample Preparation Productivity With Selective Extraction Using Accelerated Solvent Extraction. <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/19519-Improved-Sample-Preparation-Productivity-With-Selective-Extraction-Using-Accelerated-Solvent-Extraction/>, 18/09/2012.
- [7]: http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/methodes/diffra_x.htm#Principe, 24/09/2012.
- [8]: http://wpcm.fr/uploads/documents/Brochure_DRX_WPCM.pdf, 24/09/2012.
- [9]: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf, 18/09/2012.

PARTIE III

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I

**Développement de la méthodologie
pour l'analyse des composés
en phase liquide**

Objectif:

Le but de ce chapitre est de décrire le développement d'une méthode permettant l'analyse de composés vétérinaires et stéroïdes hormonaux contenus dans des matrices aqueuses : eaux de surface, lixiviats, ces derniers étant des liquides résiduels qui proviennent de la percolation de l'eau à travers le sol.

Résumé :

Nous avons tout d'abord mis au point l'étape d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les différents paramètres de la séparation (colonne, phases mobiles, gradient) et de la détection (transitions MRM, débit des gaz de nébulisation et de désolvatation, température du spectromètre) ont été optimisés. Sur les 31 substances, certaines s'ionisent positivement (23 substances) et d'autres négativement (8 substances), deux séparations ont été réalisées. Nous avons alors déterminé les limites de détection et de quantification instrumentales.

Puis une méthode d'extraction par SPE a été mise au point. Cette procédure permet d'extraire et de concentrer des échantillons d'eaux environnementales, incluant des lixiviats de sol. Elle a été optimisée pour les 23 composés qui s'ionisent positivement en évaluant à la fois les rendements d'extraction et les effets matrice. Les limites de détection et de quantification méthodologiques ont été obtenues. La linéarité a également été évaluée.

I. Analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem :

A. Séparation et détection des composés ionisés positivement :

Sur les 31 composés étudiés, 23 s'ionisent positivement. Ils appartiennent aux antiparasitaires, sulfonamides, macrolides, β -lactames, androgènes et progestagènes. Ce groupe de composés contient également quelques contaminants humains : la carbamazépine, la fluvoxamine et le paracétamol.

Optimisation des paramètres de la détection par spectrométrie de masse en tandem :

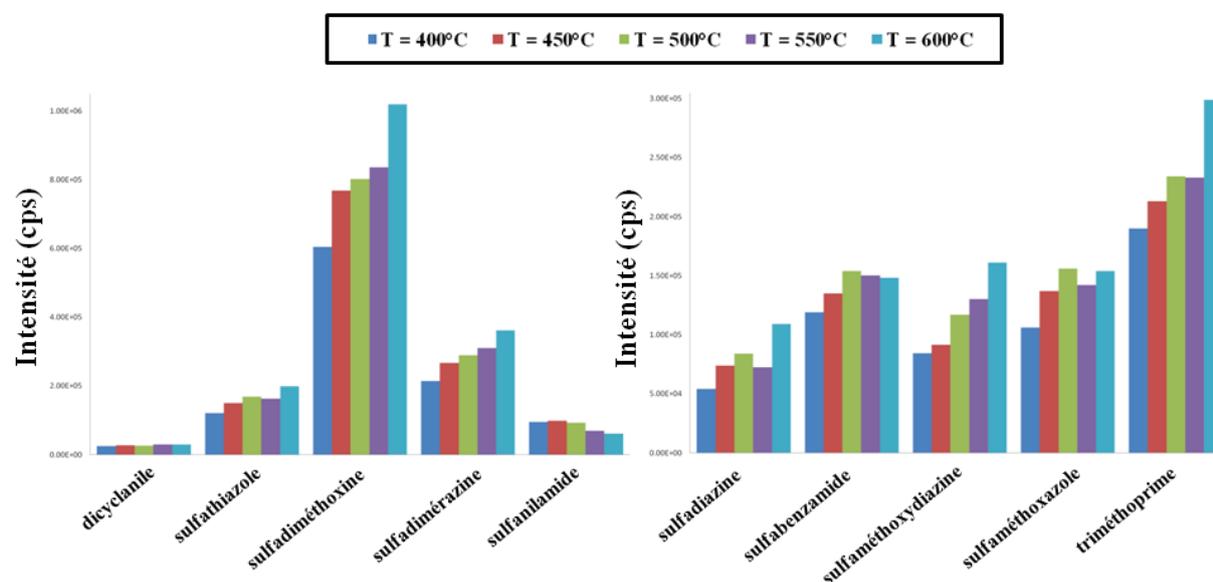
Tout d'abord, des infusions manuelles ont été effectuées avec des solutions de standards (50/50 H₂O/méthanol) à des concentrations comprises entre 1 et 2 mg/L. Cette étape a permis

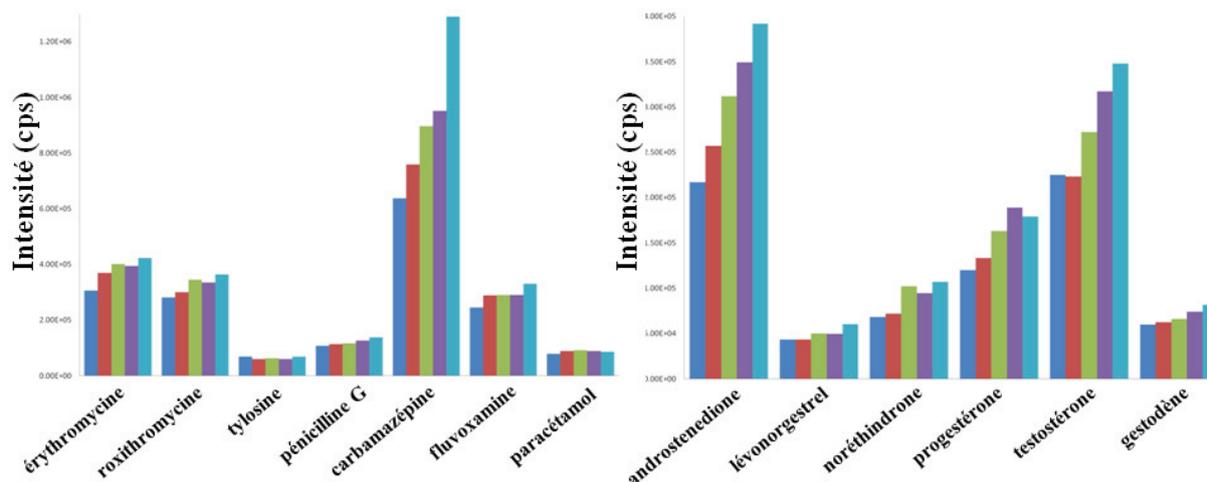
d'obtenir les transitions MRM (ion précurseur → 2 ions fils les plus intenses), spécifiques de chaque molécule. Pour toutes les substances, l'ion précurseur correspond à la molécule protonée $[M+H]^+$.

Les gaz de nébulisation (GS1) et de désolvatation (GS2) ont été optimisés (avec $GS2 > GS1$ et $GS2 + GS1 \leq 100\%$). Pour cela, des injections de standards en flux continu ont été effectuées en faisant varier les débits afin d'obtenir les pics les plus intenses possibles, en acceptant des compromis imposés par la diversité des propriétés physico-chimiques des substances.

Enfin, l'effet de la température de la source sur l'ionisation des composés a été évalué entre 400 et 600 °C. La température de 600°C a été choisie. Comme le montre le **Graphiques III.1** les intensités des pics sont nettement améliorées par rapport aux plus faibles températures pour les sulfonamides (notamment le sulfathiazole, la sulfadiméthoxine, la sulfadimérazine, la sulfadiazine, la sulfaméthoxydiazine), le triméthoprim, la carbamazépine et les stéroïdes hormonaux (notamment l'androstènedione et la testostérone).

Graphique III.1 : Intensités des pics (nombre de coups) des composés ionisés positivement à différentes températures de source





Optimisation de la séparation par chromatographie liquide : choix de la colonne chromatographique et des phases mobiles

Afin de séparer ces 23 substances, une colonne Zorbax Eclipse PLUS C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 µm) a été testée.

L'ajout de l'acide formique est souvent employé pour favoriser l'ionisation et donc augmenter la sensibilité lors de l'analyse d'antibiotiques et de stéroïdes hormonaux en mode ESI+ [1-4]. Nous avons donc utilisé comme phase aqueuse (A) une solution d'acide formique à 0.01% dans de l'eau MilliQ (pH = 3.3).

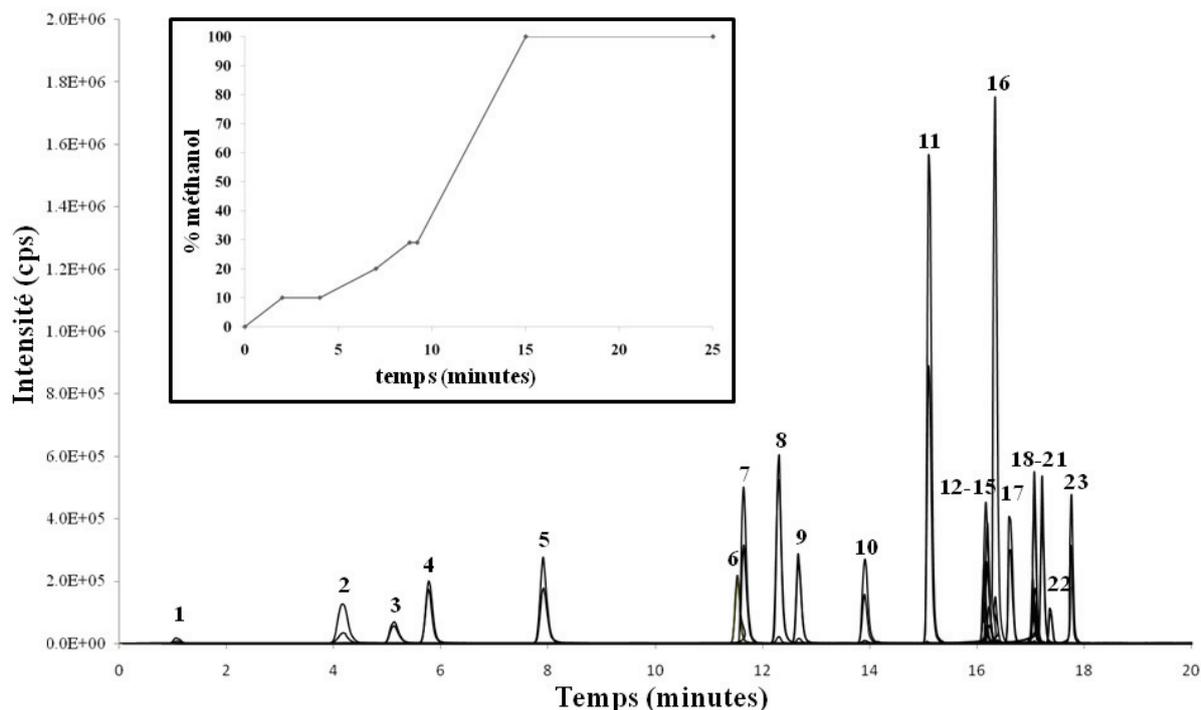
Pour la phase organique (B), l'acétonitrile et le méthanol ont été comparés. Comme le montre le **Tableau III.1**, le méthanol permet une meilleure ionisation de la plupart des composés. En effet, les sulfonamides et le triméthoprime présentent des pics 1.2 à 2.5 fois plus intenses avec le méthanol qu'avec l'acétonitrile (à l'exception de la sulfabenzamide qui ne montre pas de différence entre les deux phases). C'est également le cas pour la pénicilline G qui montre une hauteur de pic doublée avec le méthanol. L'érythromycine et la roxithromycine ont des intensités de pics comparables avec les deux solvants. Seuls la tylosine et le dicyclanile présentent des pics légèrement plus intenses avec l'acétonitrile. En ce qui concerne les contaminants humains, la fluvoxamine est 1.8 fois mieux ionisée avec le méthanol. Le signal de la carbamazépine, quant à lui, ne montre aucune différence entre les deux phases mobiles (B). En revanche, le paracétamol est légèrement mieux ionisé avec l'acétonitrile. Enfin, pour les stéroïdes hormonaux, les signaux sont 1.2 à 2.5 fois plus intenses lorsque l'analyse est réalisée avec le méthanol, à l'exception du lévonorgestrel et de la noréthindrone qui ont des hauteurs de pics comparables avec les deux solvants. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, le méthanol a été choisi comme phase organique.

Tableau III.1 : Intensités des pics (nombre de coups) des composés ionisés positivement pour l'acétonitrile et le méthanol comme phase B

Composés	acétonitrile	méthanol	rapport (méthanol/acétonitrile)
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES			
antiparasitaire			
dicyclanile	3.0×10^4	1.9×10^4	0.6
sulfonamides / triméthoprime			
sulfathiazole	4.0×10^4	1.0×10^5	2.5
sulfadiméthoxine	5.8×10^5	8.2×10^5	1.4
sulfadimérazine	1.3×10^5	2.0×10^5	1.5
sulfanilamide	2.0×10^4	3.0×10^4	1.5
sulfadiazine	5.8×10^4	6.9×10^4	1.2
sulfabenzamide	1.00×10^5	9.3×10^4	0.9
sulfaméthoxydiazine	5.9×10^4	8.0×10^4	1.4
sulfaméthoxazole	6.9×10^4	9.2×10^4	1.3
triméthoprime	1.0×10^5	1.5×10^5	1.5
macrolides			
érythromycine	2.6×10^5	3.0×10^5	1.2
roxithromycine	2.7×10^5	2.0×10^5	0.8
tylosine	1.0×10^5	4.0×10^4	0.4
β-lactame			
pénicilline G	3.8×10^4	7.3×10^4	1.9
CONTAMINANTS HUMAINS			
médicaments humains			
carbamazépine	7.1×10^5	6.0×10^5	0.9
fluvoxamine	1.0×10^5	1.8×10^5	1.8
paracétamol	7.8×10^4	4.6×10^4	0.6
STEROIDES HORMONAUX			
androgènes			
androstènedione	1.0×10^5	2.6×10^5	2.5
testostérone	1.2×10^5	1.5×10^5	1.3
progestagènes			
lévonorgestrel	4.0×10^4	3.7×10^4	0.9
noréthindrone	6.0×10^4	6.0×10^4	1
progestérone	7.8×10^4	1.3×10^5	1.7
gestodène	4.7×10^4	5.7×10^4	1.2

Dans ces conditions, les 23 composés sont séparés en environ 18 minutes. Le chromatogramme correspondant est présenté **Figure III.1**. Les numéros permettant d'associer les pics aux différents composés sont donnés dans le **Tableau III.2** entre parenthèses.

Figure III.1 : Chromatogramme représentant la séparation des 23 composés ionisés positivement ($C = 2 \text{ mg/L}$ et $V_{\text{inj}} = 2 \text{ }\mu\text{L}$)



Les limites de détection (ILODs) et de quantification (ILOQs) instrumentales ont alors été déterminées. Nous avons obtenu ces résultats en injectant $25 \text{ }\mu\text{L}$ d'une solution de standards dans 95/5 $\text{H}_2\text{O}/\text{méthanol}$. Elles sont exposées dans le **Tableau III.2**.

Tableau III.2 : Temps de rétention (t_r), ILODs et ILOQs des composés ionisés positivement

Composés	t_r (min)	ILOD (ng/L)	ILOQ (ng/L)
ANTIBIOTIQUES VÉTÉRINAIRES			
antiparasitaire			
dicyclanile	5.13 (3)	170	310
sulfonamides / triméthoprime			
sulfathiazole	7.91 (5)	5	17
sulfadiméthoxine	15.11 (11)	5	16
sulfadimérazine	12.30 (8)	5	17
sulfanilamide	1.04 (1)	180	580
sulfadiazine	5.80 (4)	7	22
sulfabenzamide	13.91 (10)	9	29
sulfaméthoxydiazine	11.53 (6)	11	36
sulfaméthoxazole	12.67 (9)	8	26
triméthoprime	11.65 (7)	6	21

macrolides			
érythromycine	16.17 (13)	33	180
roxithromycine	16.62 (17)	490	610
tylosine	16.24 (15)	790	1270
β-lactame			
pénicilline G	16.14 (12)	36	120
CONTAMINANTS HUMAINS			
médicaments humains			
carbamazépine	16.34 (16)	6	26
fluvoxamine	16.20 (14)	310	590
paracétamol	4.15 (2)	52	170
STEROIDES HORMONAUX			
androgènes			
androstènedione	17.07 (19)	37	68
testostérone	17.22 (21)	46	91
progestagènes			
lévonorgestrel	17.37 (22)	400	970
noréthindrone	17.05 (18)	17	58
progestérone	17.76 (23)	25	82
gestodène	17.09 (20)	31	140

Les résultats obtenus, que ce soit pour les antibiotiques vétérinaires, les médicaments humains ou les stéroïdes hormonaux, sont du même ordre de grandeur et **voire meilleurs que ceux mentionnés dans la littérature**. En effet, des travaux antérieurs présentent des ILODs entre 100 et 3000 ng/L et des ILOQs variant entre 300 et 4000 ng/L pour l'analyse de 17 médicaments humains et vétérinaires [5], de 12 sulfonamides [6] ou de 13 substances vétérinaires [7]. Concernant les contaminants humains, les valeurs de ILODs rapportées dans la littérature sont comprises entre 50 et 1700 ng/L [5, 8]. Il convient de mentionner que ces valeurs sont habituellement obtenues lors d'analyses d'un nombre limité de famille de composés. Dans notre cas, une étude multi-résidus et multi-familles a été réalisée ce qui est d'autant plus difficile car il faut accepter des compromis.

B. Séparation et détection des composés ionisés négativement :

Parmi les 31 substances étudiées, 8 s'ionisent négativement dont un antibiotique vétérinaire, le florfénicol, deux contaminants humains, l'ibuprofène et le bisphénol A et enfin cinq stéroïdes hormonaux qui appartiennent à la famille des estrogènes, la 17 α -estradiol, la 17 β -estradiol, l'estrone, l'estriol et la 17 α -éthinyloestradiol.

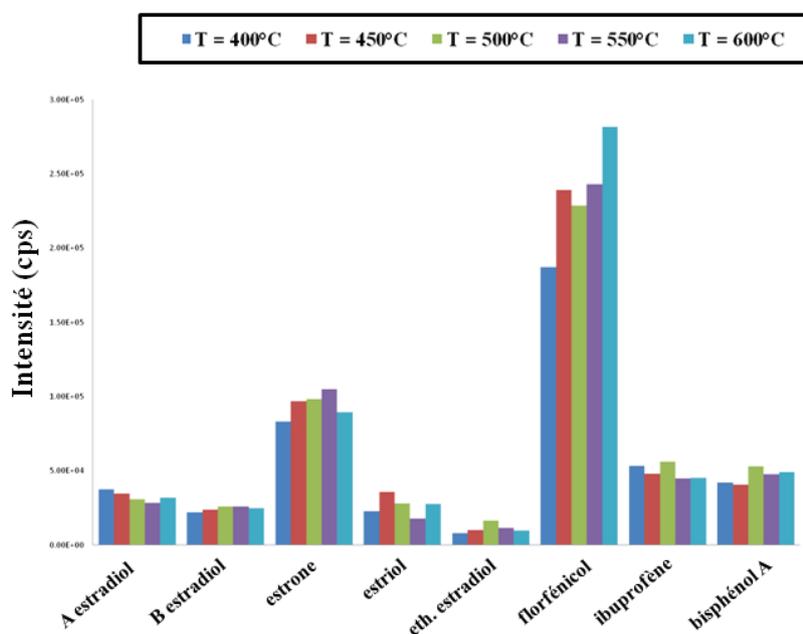
Optimisation des paramètres de la détection par spectrométrie de masse en tandem :

L'optimisation de la détection de ces substances par spectrométrie de masse en tandem a également été effectuée.

Les transitions MRM ont été obtenues en réalisant des infusions manuelles à l'instar des substances ionisées positivement. Pour ces composés, l'ion précurseur correspond à la molécule déprotonée $[M-H]^-$.

La température de la source a été optimisée pour détecter au mieux les 8 substances. Nous avons effectué des tests à différentes températures de source, ce qui est illustré sur le **Graphique III.2**.

Graphique III.2 : Intensités des pics (nombre de coups) des composés ionisés négativement à différentes températures de source



La température de la source n'a qu'un faible impact sur l'intensité des pics. Seul le florfénicol présente des pics significativement plus intenses lorsque la température augmente. La 17 α -éthinyloestradiol (eth. estradiol sur le **Graphique III.2**) affichant la plus faible intensité de pic, nous avons privilégié l'ionisation de ce composé, qui est légèrement mieux ionisée à 500°C. C'est donc cette température de source qui a été retenue.

Optimisation de la séparation par chromatographie liquide : choix de la colonne chromatographique et des phases mobiles

Nous sommes tout d'abord partis d'une méthode en utilisant la même colonne chromatographique que celle employée pour séparer les composés ionisés positivement (Zorbax Eclipse PLUS C18, 50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm). Nous avons choisi comme phase aqueuse (A) l'eau MilliQ seule. Une post-colonne (méthanol + 0.1% NH₄OH (v/v)) a été ajoutée, ce qui a permis une meilleure ionisation des composés, comme fréquemment observé [4].

Concernant la phase organique (B), l'acétonitrile ainsi que le méthanol ont été comparés. Comme le montre le **Tableau III.3**, le méthanol permet d'obtenir les pics les plus intenses. En effet, les estrogènes ont des hauteurs de pic de 1.7 à 3.3 fois plus élevée avec le méthanol qu'avec l'acétonitrile. La même tendance est observée pour le bisphénol A qui montre des intensités de pics deux fois supérieures avec le méthanol. Le signal du florfénicol n'est que peu influencé par le choix de ces deux solvants. Seul l'ibuprofène l'ibuprofène présente un pic plus intense avec l'acétonitrile.

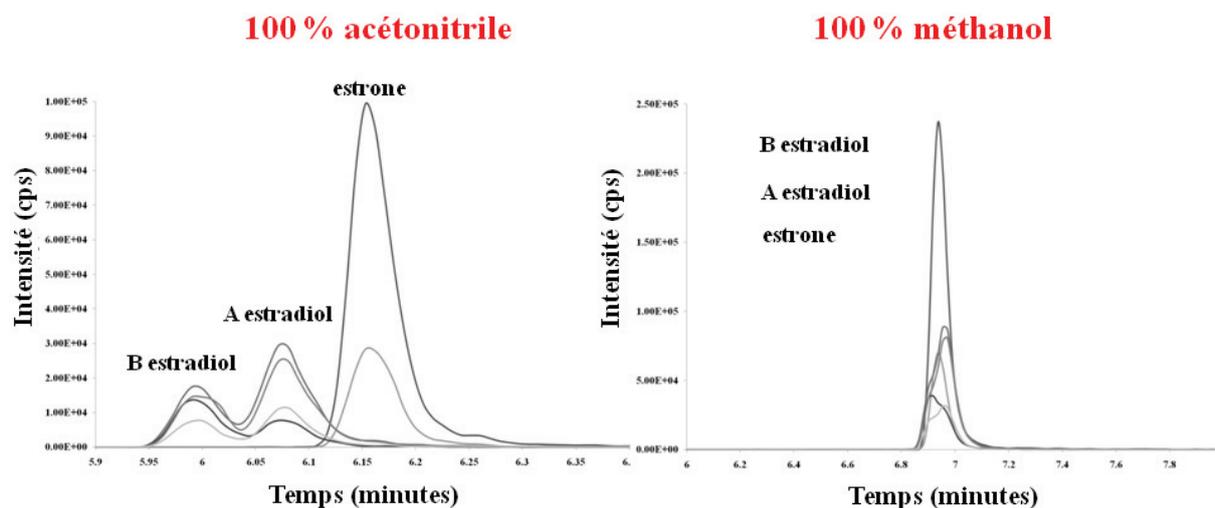
Tableau III.3 : Intensités des pics (nombre de coups) des composés ionisés négativement pour l'acétonitrile et le méthanol comme phase B

Composés	acétonitrile	méthanol	rapport (méthanol/acétonitrile)
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES			
phénicolé			
flofénicol	2.0×10^5	2.3×10^5	1.1
CONTAMINANTS HUMAINS			
médicament humain			
ibuprofène	1.8×10^5	8.0×10^4	0.5
plastifiant			
bisphénol A	2.0×10^4	4.7×10^4	2.35
STEROIDES HORMONAUX			
estrogènes			
17α-estradiol	3.0×10^4	9.10×10^4	3
17β-estradiol	3.0×10^4	9.80×10^4	3.3
estrone	1.20×10^5	2.70×10^5	2.3
estriol	2.3×10^4	3.8×10^4	1.7
17α-éthinyloestradiol	1.0×10^4	2.7×10^4	2.7

En revanche, comme le montre la **Figure III.2**, trois composés ayant des transitions MRM identiques, la 17α-estradiol, la 17β-estradiol et l'estrone ne sont pas du tout séparés avec une

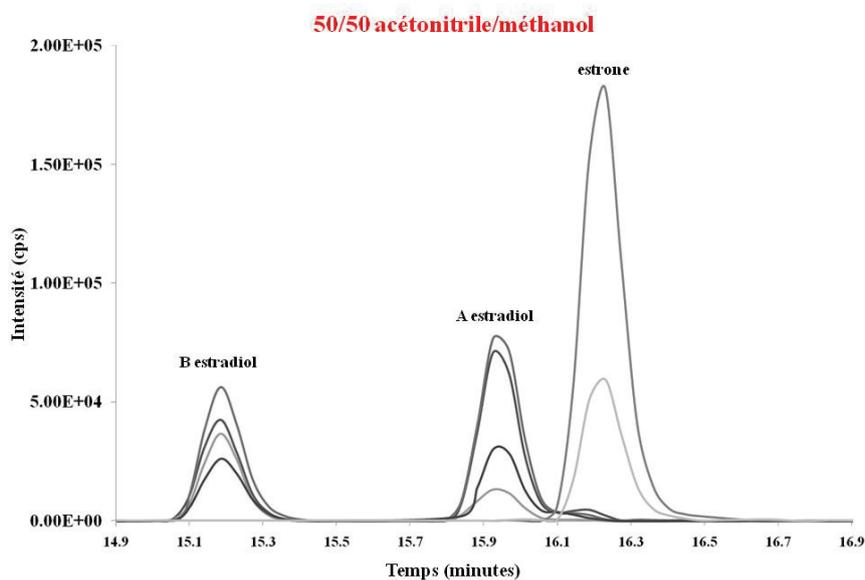
phase (B) 100% méthanol. Seule l'utilisation de l'acétonitrile conduit à une séparation, mais entraîne une diminution de la sensibilité pour les autres composés.

Figure III.2 : Séparation de la 17 α -estradiol, la 17 β -estradiol et l'estrone avec 100% acétonitrile ou 100 % méthanol avec la colonne Zorbax Eclipse PLUS C18 (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m)



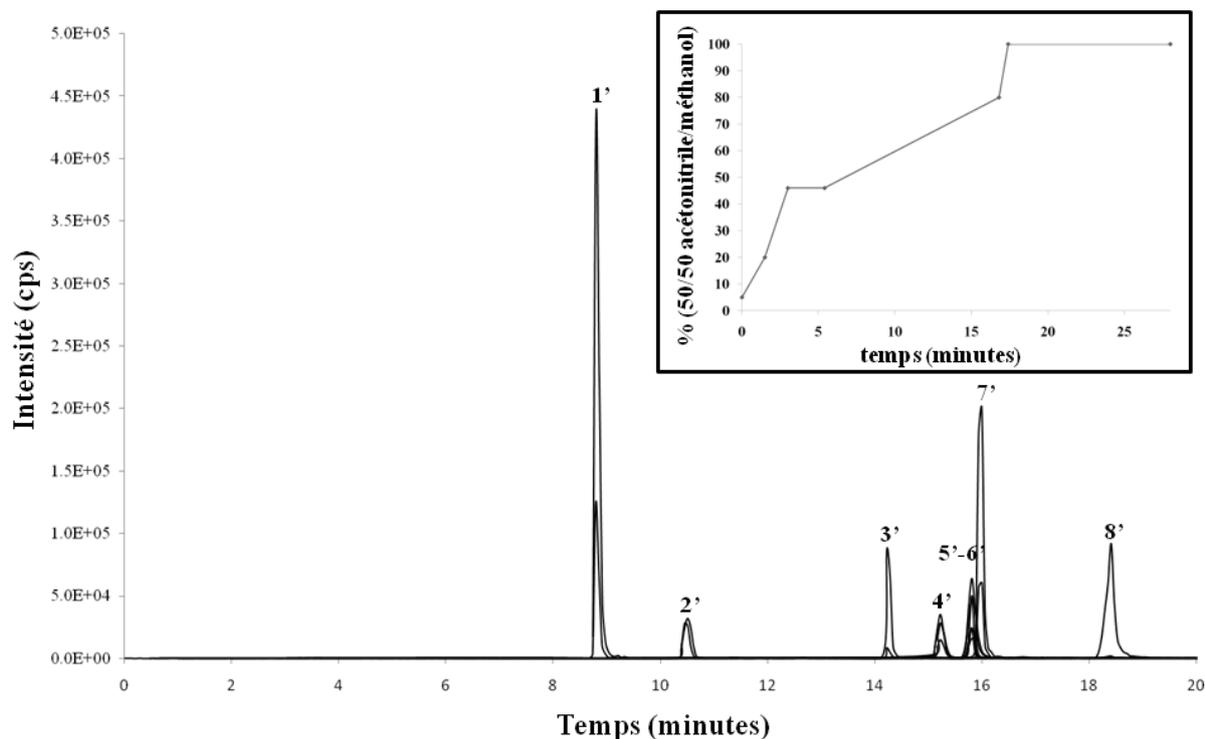
Pour améliorer la séparation de ces trois substances, une colonne Zorbax Eclipse XDB C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m) a été choisie [9]. La composition de la phase mobile (B) a également été ajustée. En effet, il a fallu faire un compromis pour séparer au mieux les trois composés estrogéniques tout en conservant un maximum de méthanol qui permet une meilleure ionisation. Le choix s'est finalement porté sur le mélange 50/50 acétonitrile/méthanol, comme montré sur la **Figure III.3**.

Figure III.3 : Séparation des trois composés 17 α -estradiol, 17 β -estradiol et estrone, avec la colonne Zorbax Eclipse XDB C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), la phase (B) 50/50 acétonitrile/méthanol et le gradient final



Les 8 composés sont séparés en moins de 20 minutes, comme l'illustre le chromatogramme **Figure III.4** Les numéros permettant d'associer les pics aux différents composés apparaissent dans le **Tableau III.4** entre parenthèses.

Figure III.4 : Chromatogramme représentant la séparation des 8 composés ionisés négativement (C = 2 mg/L et V_{inj} = 2 µL)



Les limites de détection et de quantification ont été déterminées comme dans le cas des composés ionisés positivement. Elles sont rassemblées dans le **Tableau III.4**.

Tableau III.4 : Temps de rétention (tr), ILODs et ILOQs des composés ionisés négativement

Composés	t _r (min)	ILOD (ng/L)	ILOQ (ng/L)
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES			
phénicolé			
flofénicol	8.81 (1')	49	160
CONTAMINANTS HUMAINS			
médicament humain			
ibuprofène	18.41 (8')	360	1210
plastifiant			
bisphénol A	14.24 (3')	15	50
STEROIDES HORMONAUX			
estrogènes			
17α-estradiol	15.82 (5')	140	480
17β-estradiol	15.23 (4')	370	1230
estrone	15.97 (7')	44	150
estriol	10.54 (2')	140	460
17α-éthinyloestradiol	15.83 (6')	1070	3570

La comparaison de ces résultats avec la littérature indique que les limites de quantification obtenues dans notre étude pour les estrogènes sont du même ordre de grandeur et **parfois même meilleures** que les valeurs mentionnées dans la littérature. Par exemple, B. Hauser *et al.* [10] ont trouvé des valeurs de ILOQs de 3000 ng/L, 300 ng/L et 500 ng/L pour l'estriol, la 17 β -estradiol et l'estrone respectivement.

II. Préparation d'échantillon :

Une procédure générique a été développée pour pouvoir analyser à la fois de faibles volumes de lixiviats (20 mL) et des échantillons environnementaux de volumes plus importants (200 mL).

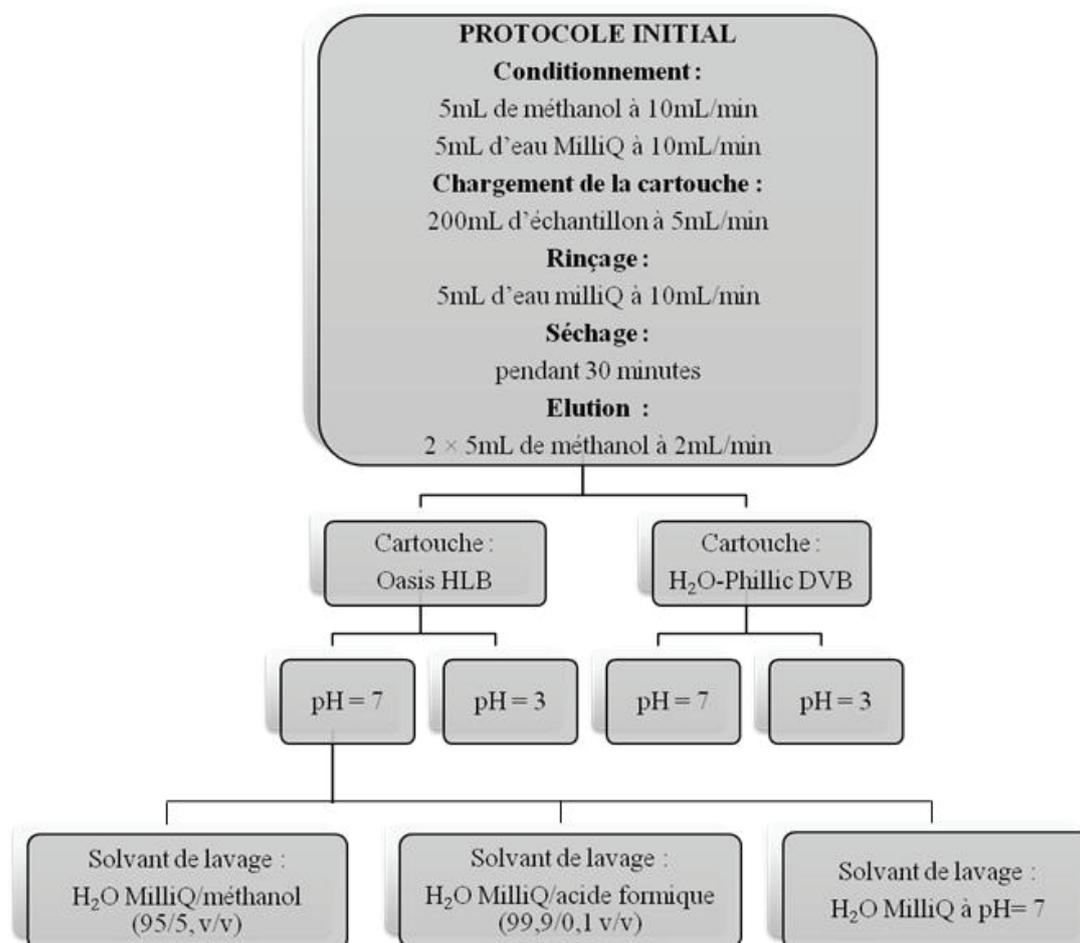
A. Développement de la méthode :

Une méthode de préparation d'échantillons en phase aqueuse, basée sur la SPE, a été développée pour les 23 composés ionisés positivement. La procédure a initialement été développée à partir de lixiviat récupéré en sortie des colonnes.

Nous avons mis au point la procédure en utilisant le lixiviat obtenu à partir d'un sol non dopé. Ainsi, 20 mL de lixiviat de sol ont été dilués dans 180 mL d'eau MilliQ afin d'obtenir un volume total de 200 mL. Le développement a été mené en dopant cette solution à une concentration $C = 0.2 \mu\text{g/L}$ en chacun des 23 composés.

Pour mettre au point cette méthode d'extraction, de purification et de concentration de lixiviats par SPE, nous avons évalué et optimisé plusieurs paramètres : le choix de la cartouche SPE, le pH auquel l'échantillon doit être fixé, la nature de la solution de lavage et enfin celle du solvant de reprise. La **Figure III.5** détaille le protocole de l'optimisation.

Figure III.5 : Schéma synthétisant le protocole d'optimisation de la SPE pour l'analyse de lixiviats de sol



Choix de la cartouche et du pH de l'échantillon :

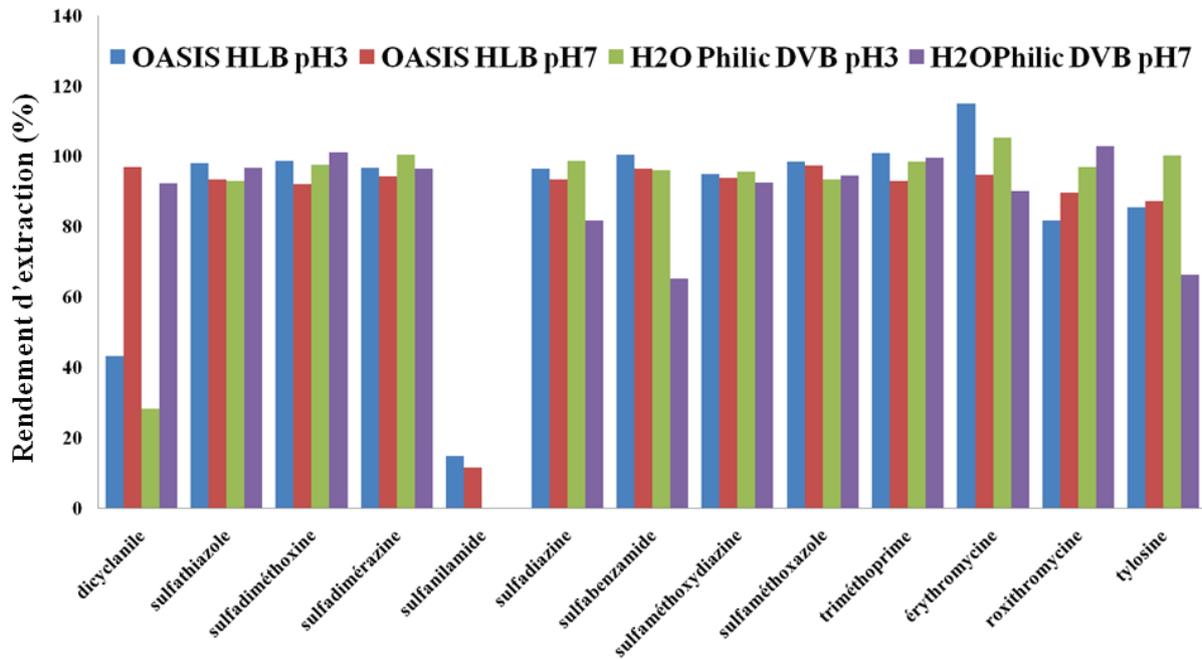
Dans un premier temps, le type de cartouche doit être choisi. Les principales cartouches mentionnées dans la littérature pour analyser des composés vétérinaires ainsi que des stéroïdes hormonaux sont des cartouches polymères OASIS HLB [1, 4, 7, 11-27], des cartouches greffées C18 [1, 4, 11, 12, 15, 17, 18, 20, 25, 28] ou plus rarement des cartouches de phases polymères H₂Ophilic DVB [12, 20]. Les deux cartouches polymères, OASIS HLB et H₂Ophilic DVB permettent d'extraire des espèces acides, neutres ou basiques appartenant à une large gamme de polarité. Les cartouches greffées C18 ne retiennent, quant à elle, que les composés peu ou pas polaires. Dans le cadre de notre étude multi-familles portant sur des molécules de propriétés physico-chimiques différentes, le choix s'est donc orienté vers l'utilisation de cartouches polymères. L'OASIS HLB est la plus souvent citée dans la littérature, mais les rares essais menés avec la cartouche H₂Ophilic DVB ont également mis

en évidence sa grande efficacité sur des substances pharmaceutiques. Par conséquent, les cartouches OASIS HLB et H₂OPhilic DVB ont été sélectionnées.

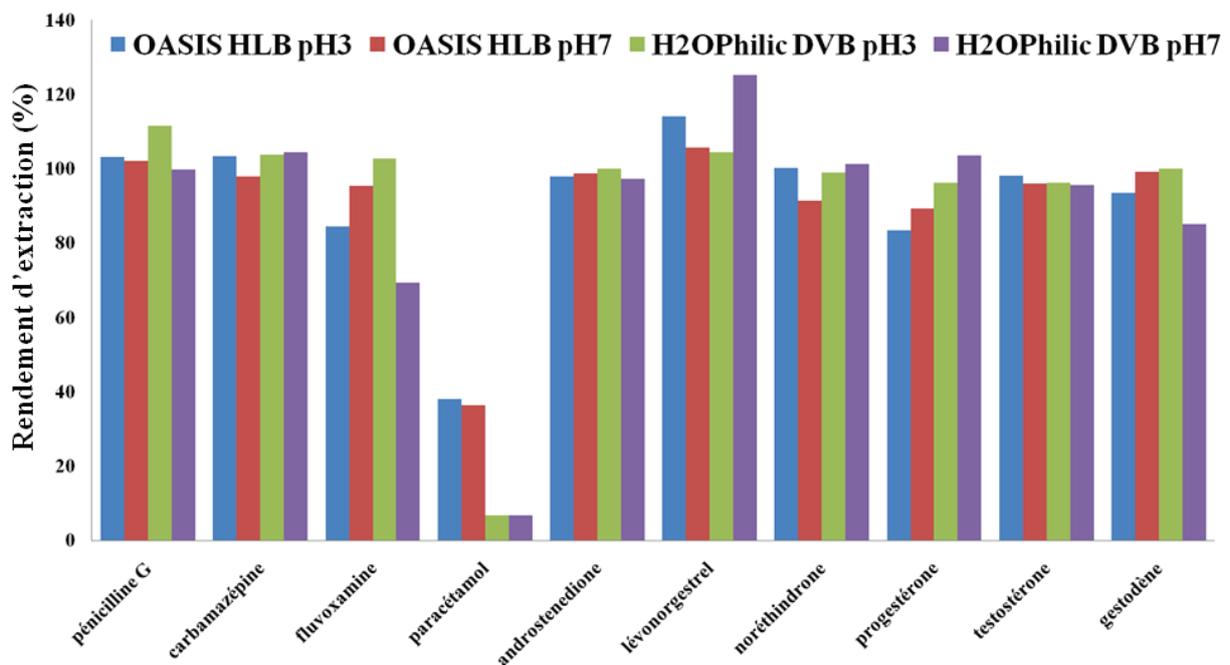
Le choix du pH des échantillons est également primordial puisqu'à la fois le rendement d'extraction des substances d'intérêt et la co-extraction des interférents de la matrice dépendent fortement de ce pH. Sur des cartouches polymères en phase inverse, le pH de l'échantillon doit être ajusté pour une rétention optimale de l'analyte, c'est-à-dire un pH pour lequel les composés à caractères acides ou basiques soient non chargés. La rétention des substances neutres n'est, quant à elle, généralement pas affectée par le pH. Nous avons donc choisi d'évaluer les deux pHs 3 et 7 pour lesquels la plupart des substances sont sous forme non chargées (excepté le dicyclanile à pH 3 et la pénicilline G et l'ibuprofène à pH 7). De plus, il semble que le pH 7 permette de limiter la co-extraction des interférents de la matrice sol [28]. Ces choix sont cohérents avec la littérature puisque des procédures mettent en œuvre l'extraction d'antibiotiques vétérinaires, contaminants humains et stéroïdes hormonaux de toutes sortes de matrices aqueuses à ces deux pHs. Ainsi, des antibiotiques [25] et notamment des sulfonamides [12, 13], des contaminants humains tels que la carbamazépine et le paracétamol [12] et des stéroïdes hormonaux [18] ont déjà été extraits de différents types d'eaux (eaux usées, souterraines, de surface) en utilisant le pH 3. Des extractions à pH 7 ont également été développées pour des sulfonamides [7, 11, 12, 14, 15, 19], des macrolides [11, 12] et des contaminants humains [11, 12].

Les rendements d'extraction et effets matrice (définis à la partie II, Matériels et Méthodes) ont été déterminés pour les deux cartouches testées, l'OASIS HLB et la H₂OPhilic DVB aux pHs 3 et 7.

Graphique III.3 : Rendements d'extraction de l'antiparasitaire, des sulfonamides, du triméthoprim, et des macrolides, obtenus lors de l'utilisation de deux cartouches, l'OASIS HLB et la H₂OPhilic DVB aux pHs 3 et 7



Graphique III.4 : Rendements d'extraction du β -lactame, des contaminants humains et des androgènes et progestagènes, obtenus lors de l'utilisation de deux cartouches, l'OASIS HLB et la H₂OPhilic DVB aux pHs 3 et 7



En ce qui concerne les rendements d'extraction, les résultats obtenus aux pHs 3 et 7 sont relativement similaires (**Graphiques III.3 et III.4**).

Dans les deux conditions de pH de notre étude, les sulfonamides amphotères ($pK_{a1} = 2$ et $pK_{a2} = 6-7.5$ pour la plupart des substances étudiées) ne sont pas ou peu chargés donc ils sont bien retenus par la cartouche polymère. Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures ciblées uniquement sur les antibiotiques et notamment les sulfonamides. L. Tong *et al.* [7] ont montré que les sulfonamides sont peu extraits à pH 2 alors qu'ils le sont plus à pH 4 ou encore à un pH non ajusté. Ceci est confirmé par W. Ben *et al.* [13] qui ont indiqué qu'il est préférable de se positionner à un pH légèrement supérieur à 2 pour éviter la forme cationique qui aurait tendance à pénétrer à l'intérieur de la cartouche polymère. D'un autre côté, à partir du pH environ 8, correspondant à $pK_{a2} + 2$, les sulfonamides sont ionisés négativement donc moins bien retenus par la phase polymère lors du passage de l'échantillon car susceptibles de se solubiliser plus facilement dans l'eau.

En ce qui concerne les macrolides, des rendements d'extraction similaires ont été obtenus à pHs 3 et 7 ce qui avait déjà été constaté auparavant par M. Seifrtová *et al.* [29].

Nous remarquons que le paracétamol donne un assez faible rendement d'extraction (entre 7 et 38%), probablement dû à sa forte polarité ($\log K_{ow} = 0.46$).

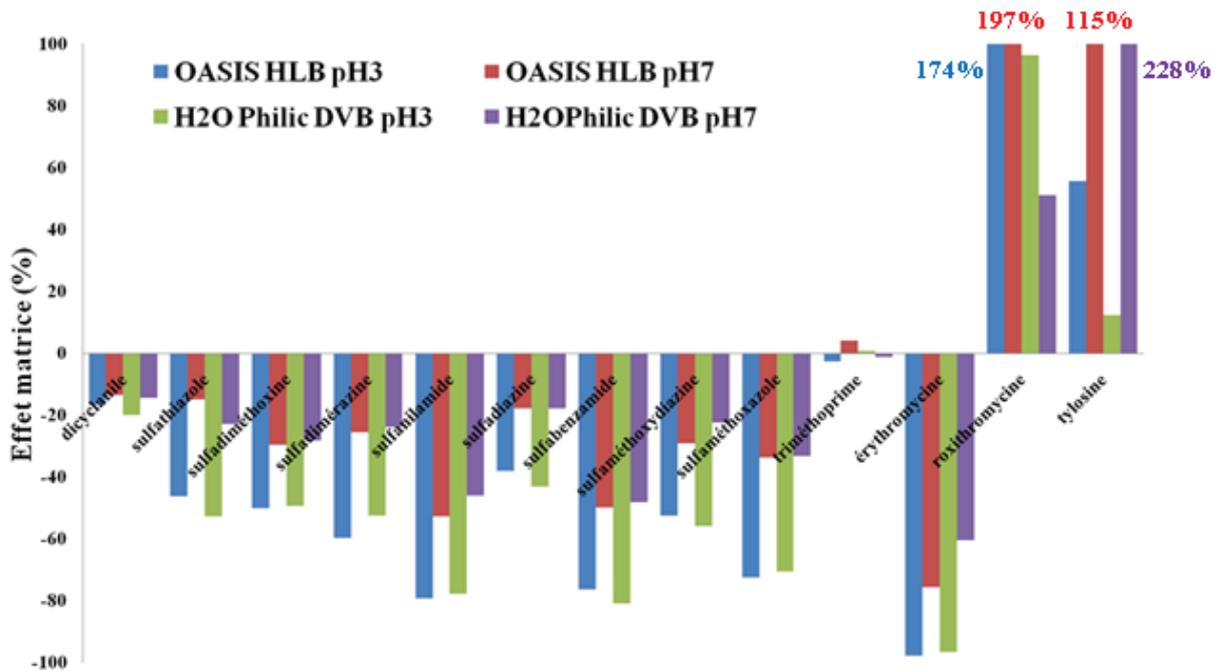
Seul le dicyclanile montre un rendement plus élevé à pH 7 qu'à pH 3. Ce composé à caractère basique ($pK_a = 4.58$) est protoné à pH 3 et n'est donc que peu retenu par la cartouche à ce pH.

La nature des deux cartouches ne modifie pas non plus de manière significative les rendements d'extraction. Seuls la sulfanilamide et le paracétamol sont moins bien extraits avec la H₂Ophilic DVB. Cette cartouche donne également de moins bons résultats à pH 7 pour certains composés comme la sulfadiazine, le sulfabenzamide et la tylosine.

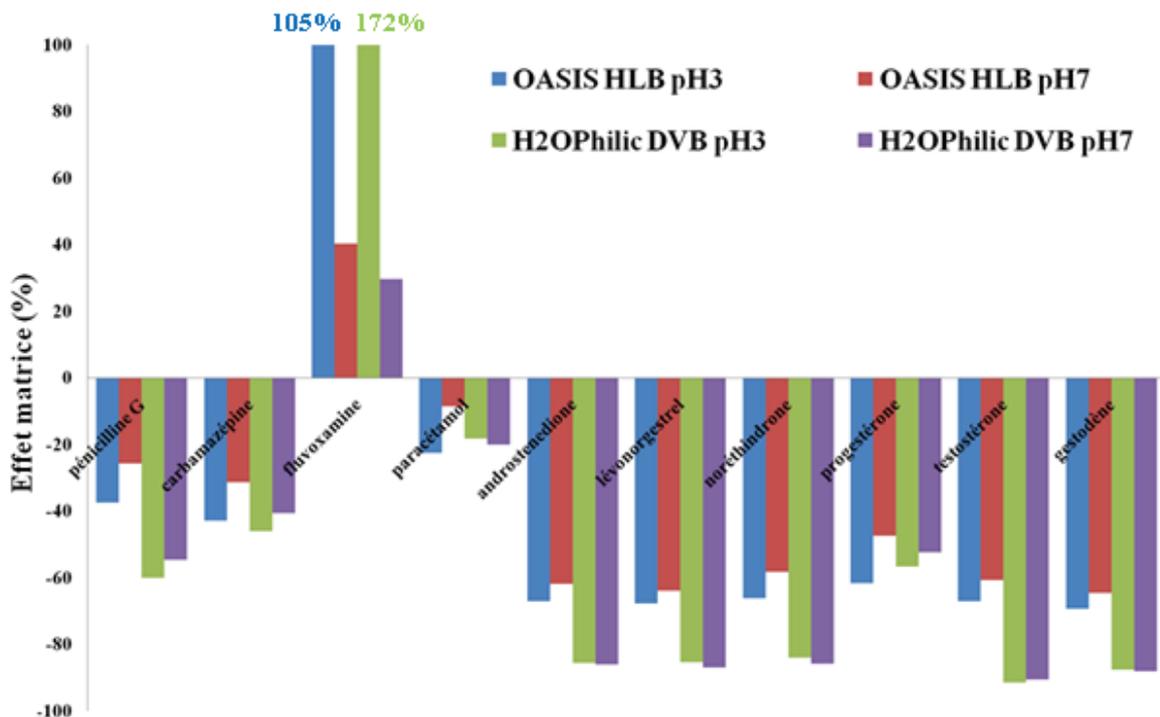
En considérant uniquement les rendements d'extraction, il est donc difficile de fixer la nature de la cartouche ainsi que le choix du pH.

Ce sont donc les résultats se rapportant aux effets matrice qui ont orienté nos choix (**Graphiques III.5 et III.6**).

Graphique III.5 : Effets matrice de l'antiparasitaire, des sulfonamides, du triméthoprime, et des macrolides, obtenus lors de l'utilisation de deux cartouches, l'OASIS HLB et la H₂OPhilic DVB aux pHs 3 et 7



Graphique III.6 : Effets matrice du β -lactame, des contaminants humains et des androgènes et progestagènes, obtenus lors de l'utilisation de deux cartouches, l'OASIS HLB et la H₂OPhilic DVB aux pHs 3 et 7



Commençons par comparer les résultats selon le pH utilisé. Pas ou peu de différences sont constatées sur les réponses du dicyclanile et du triméthoprimé qui montrent d'assez faibles effets matrice. Les signaux des stéroïdes hormonaux, qui subissent de forts effets matrice, ne montrent également pas de différences flagrantes selon le pH employé. En revanche, nous observons une nette chute des effets matrice à pH = 7 pour les sulfonamides, les macrolides (érythromycine et roxithromycine), la pénicilline G et les contaminants humains (carbamazépine, fluvoxamine et paracétamol). L'avantage de l'utilisation du pH 7 pour réduire la co-extraction des interférents de la matrice a d'ores et déjà été mis en évidence [19]. Ce comportement est expliqué par V. Pichon *et al.* [28] qui signalent qu'à pH 7, les acides humiques et fulviques ne sont pas co-extraits. En effet, ces substances contiennent un grand nombre de groupes phénoliques qui sont ionisés dans ces conditions et sont donc moins retenus par la cartouche. De plus, la macromolécule constituant l'acide humique possède différentes configurations selon le pH : les fonctions acides peuvent interagir avec le polymère contenu dans la cartouche facilement à pH acide et pas du tout à un pH neutre. Enfin, il a également été montré qu'à pH 7 les acides humiques et fulviques sont présents dans la fraction colloïdale et sont donc éliminés quand l'échantillon d'eau est percolé à travers la cartouche [28].

La nature de la cartouche n'influe pas de manière significative sur la valeur des effets matrice pour la majeure partie des composés. Seuls la pénicilline G et les stéroïdes hormonaux subissent une forte augmentation des effets matrice avec la cartouche H₂Ophilic DVB. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les deux cartouches ne contiennent pas le même polymère, les interférents pouvant être plus retenus sur la H₂Ophilic DVB. De plus, la H₂Ophilic DVB, de diamètre de particules de 15 µm, a une surface spécifique plus élevée que l'OASIS HLB qui a des particules de diamètres de 30 µm. Une surface spécifique plus élevée favorise un plus important chargement des molécules cibles mais également des interférents de la matrice.

Pour conclure, nous n'observons pas de grandes différences entre les deux pHs en termes de rendements. En revanche, le pH 7 engendre des effets matrice beaucoup plus faibles pour un grand nombre de composés. **Nous avons donc choisi d'ajuster le pH de l'échantillon à 7.**

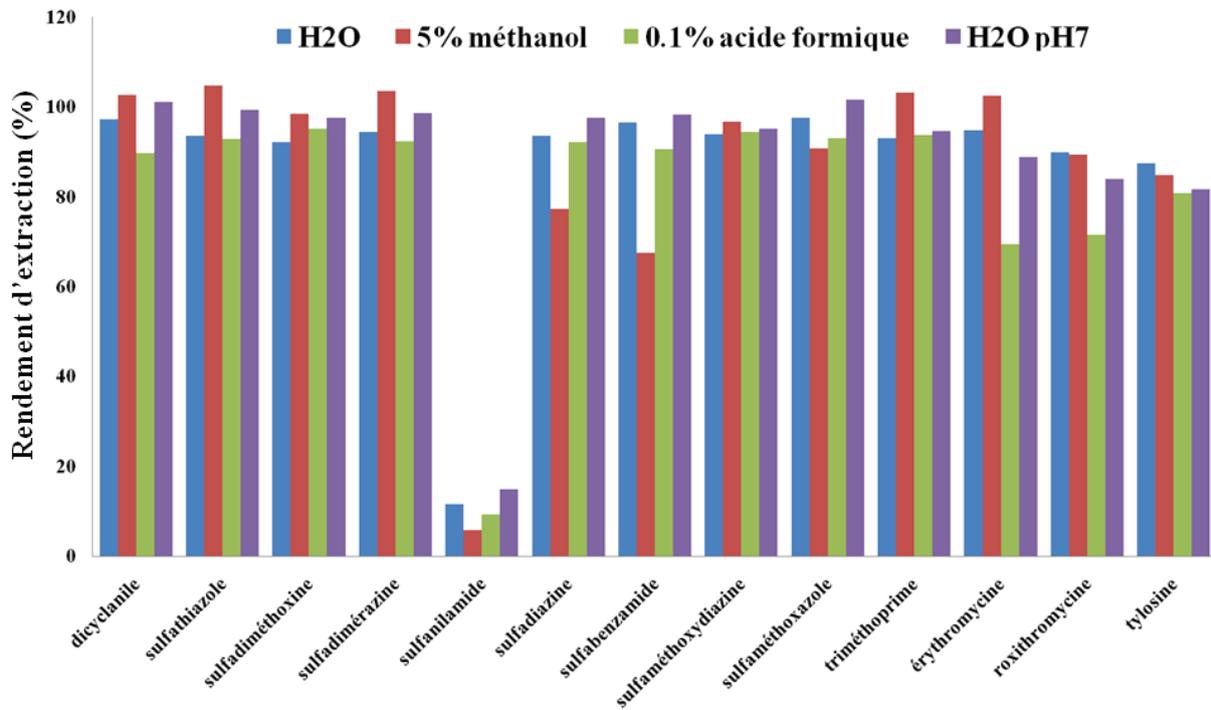
De plus, la cartouche H₂OPhilic DVB est à l'origine d'effets matrice plus forts pour la pénicilline G ainsi que pour les androgènes et les progestagènes que la cartouche OASIS HLB. **Nous avons donc retenu la cartouche OASIS HLB.**

Choix de la solution de lavage :

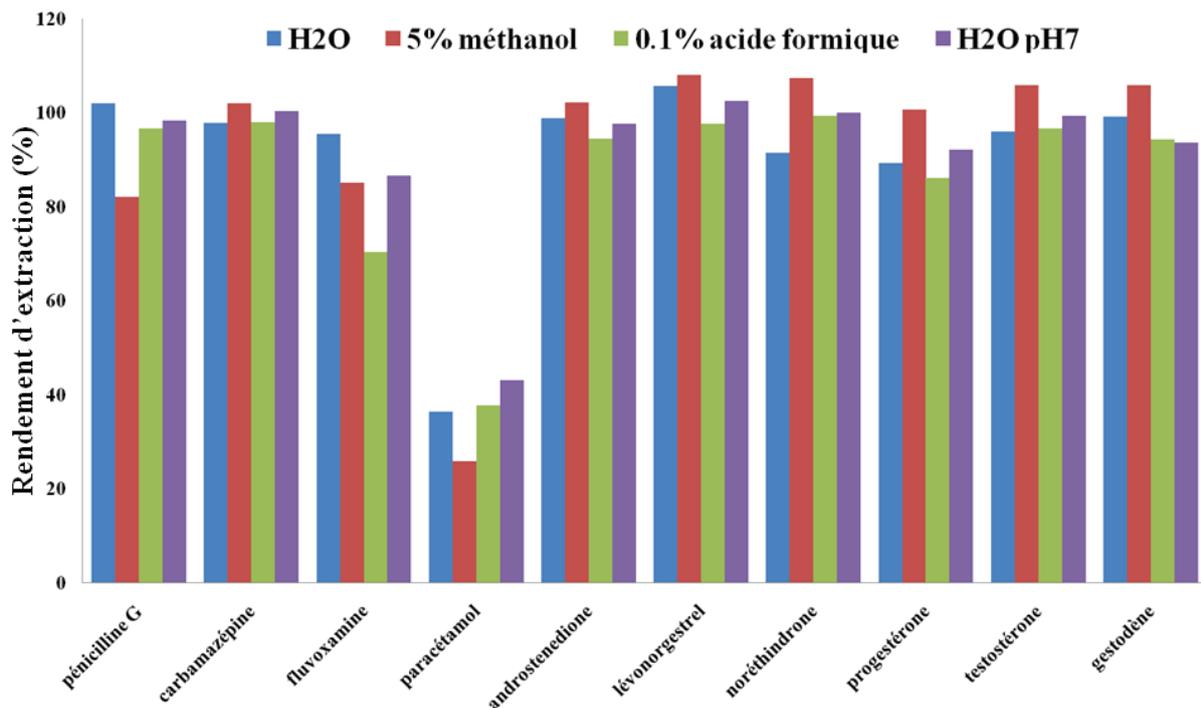
Après avoir choisi le pH auquel l'échantillon doit être fixé ainsi que la nature de la cartouche à utiliser, nous avons optimisé la nature de la solution de lavage. Parmi celles les plus couramment utilisées figure l'eau pure [11, 13, 14, 19, 22] ainsi qu'une solution aqueuse de méthanol à 5%. Cette dernière permet une forte dissolution des composés organiques contenus dans la matrice [7, 13, 18, 21]. D'autres procédures peuvent être envisagées. Ainsi une solution aqueuse acidifiée pourrait être utilisée dans le cas d'échantillons ajustés à pH basique. Elle permettrait d'éliminer les interférents de la matrice adsorbés lors du passage de l'échantillon car peu solubles en solution aqueuse à pH basique. Ou encore, nous pouvons supposer qu'un lavage à pH 7 désorbe les principaux interférents, les acides humiques et fulviques. En effet, dans ces conditions, ces derniers sont faiblement retenus par la cartouche [28]. Nous avons donc choisi d'évaluer, comme solution de lavage, l'eau pure, une solution à 5% de méthanol, une solution à 0.1% d'acide formique et enfin une solution d'eau MilliQ ajustée à pH = 7 avec NH₄OH.

Les résultats présentant les rendements d'extraction et les effets matrice pour ces différentes solutions de lavage sont rassemblés sur les **Graphique III.7 à III.10.**

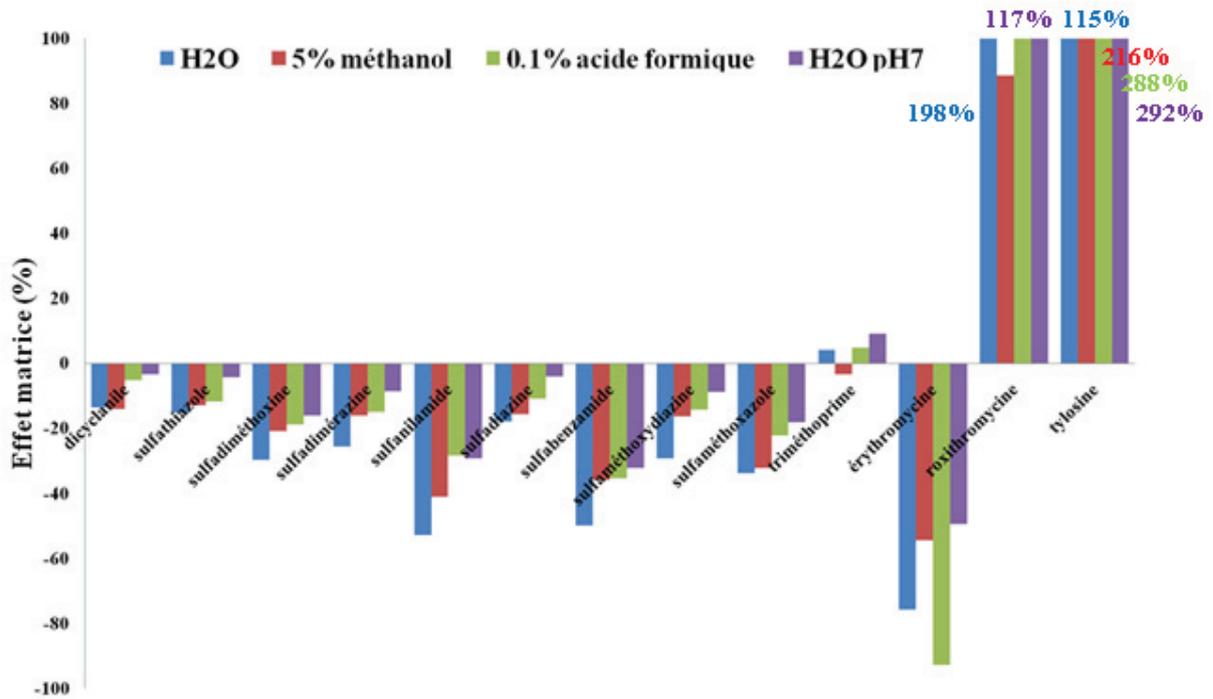
Graphique III.7 : Rendements d'extraction de l'antiparasitaire, des sulfonamides, du triméthoprimine et des macrolides lors de l'utilisation de quatre solutions de lavage différentes



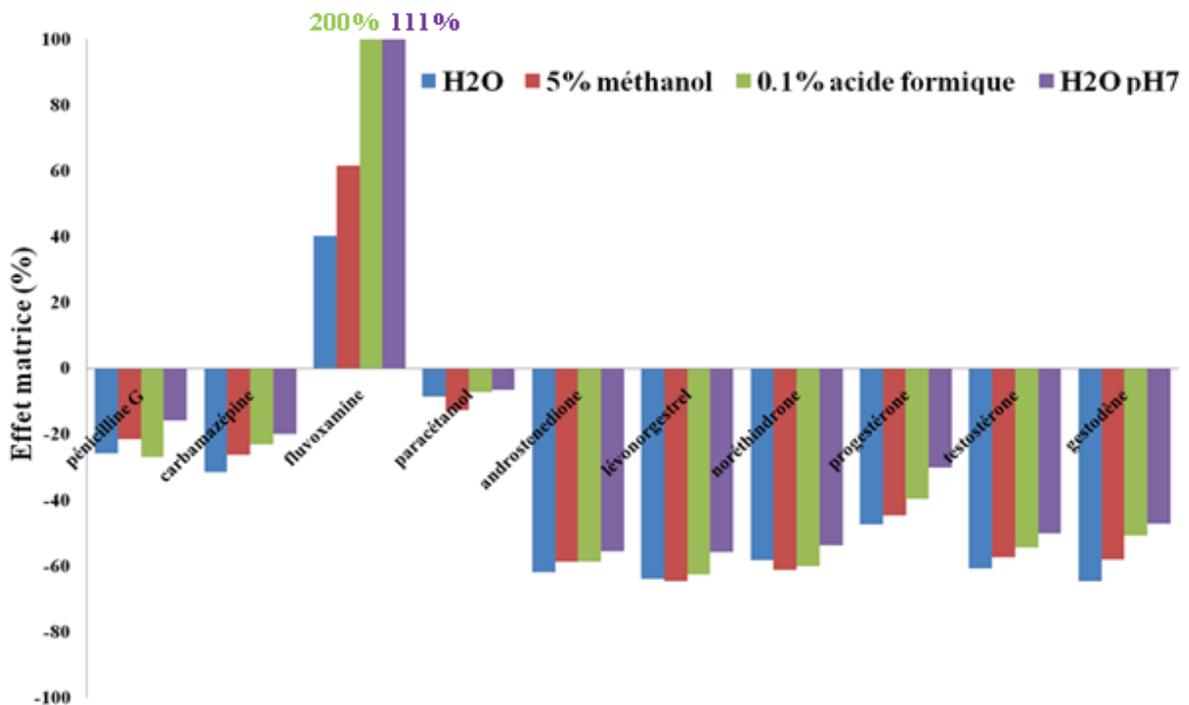
Graphique III.8 : Rendements d'extraction du β -lactame, des contaminants humains et des androgènes et progestagènes lors de l'utilisation de quatre solutions de lavage différentes



Graphique III.9 : Effets matrice de l'antiparasitaire, des sulfonamides, du triméthoprime et des macrolides lors de l'utilisation de quatre solutions de lavage différentes



Graphique III.10 : Effets matrice du β -lactame, des contaminants humains et des androgènes et progestagènes lors de l'utilisation de quatre solutions de lavage différentes



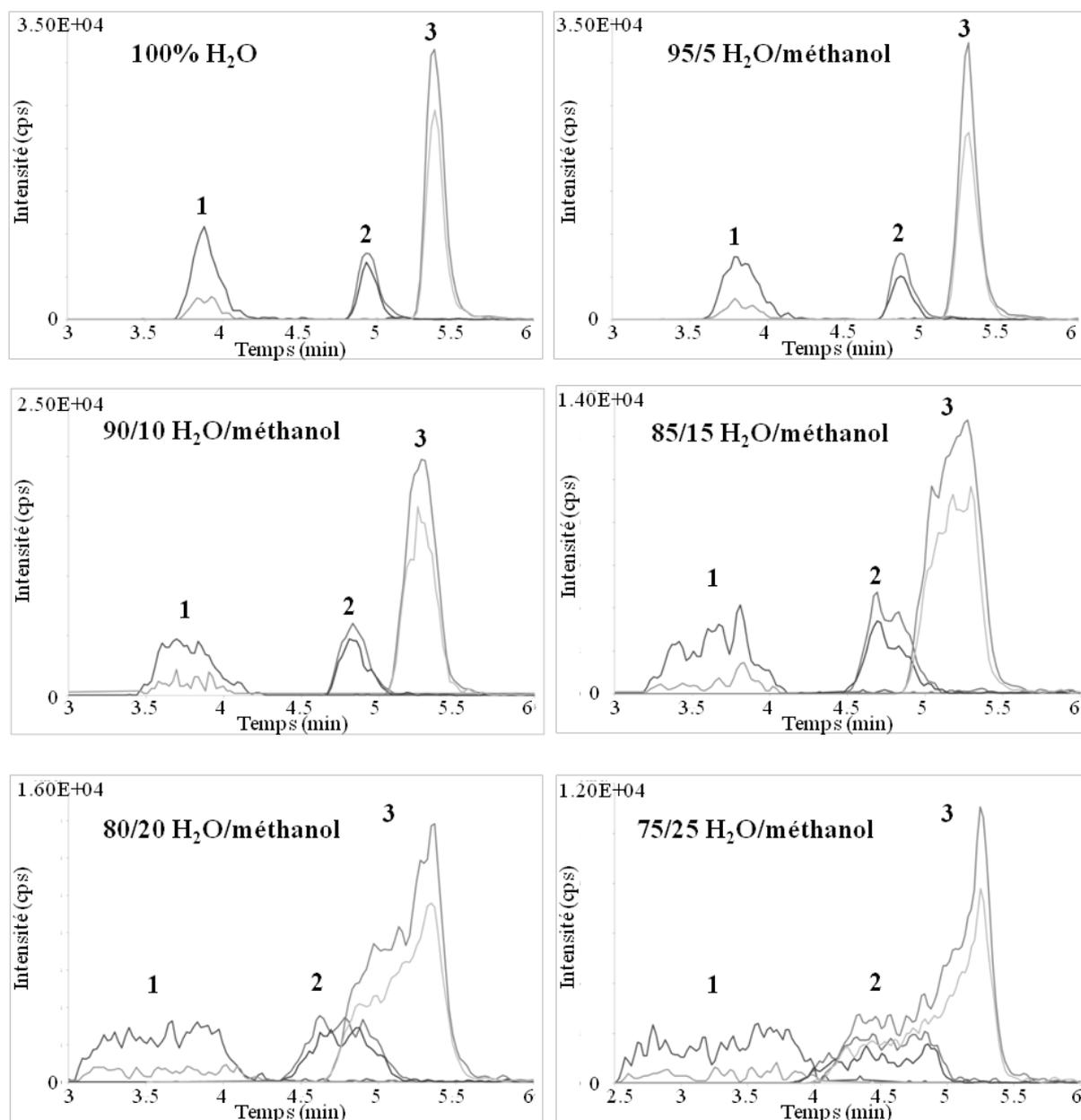
En comparant les rendements d'extraction obtenus selon les différentes solutions de lavage utilisées, globalement aucune différence notable n'apparaît. Nous avons seulement observé quelques pertes avec la solution à 5% de méthanol pour la sulfadiazine, la sulfabenzamide, la pénicilline G et le paracétamol ainsi qu'avec la solution acidifiée pour les macrolides (érythromycine, roxithromycine) et la fluvoxamine.

Nous pouvons remarquer que les effets matrice sont les plus faibles lors de l'utilisation de l'eau acidifiée et de l'eau à pH 7. Cependant, l'eau à 0.1% d'acide formique montre des effets matrice plus forts pour l'érythromycine et la pénicilline G que l'eau à pH 7. En conclusion, **l'eau à pH 7** permet d'obtenir à la fois de bons rendements d'extraction et généralement de plus faibles effets matrice. **Nous avons donc retenu cette solution de lavage.**

Choix du solvant de reprise :

Les 10 mL d'extrait dans le méthanol récupérés après la SPE ont été évaporés à sec à $T = 40^{\circ}\text{C}$ sous flux de N_2 . Plusieurs solutions de reprise correspondant à des compositions variant de 100% H_2O à 75/25 H_2O /méthanol ont été testées : 100% H_2O , 95/5 H_2O /méthanol, 90/10 H_2O /méthanol, 85/15, 80/20 H_2O /méthanol et 75/25 H_2O /méthanol. Les résultats ont montré que la présence de méthanol est nécessaire pour permettre une bonne solubilité des composés cibles. Cependant, la présence de solvant organique dans l'extrait final affecte la séparation chromatographique des composés ionisés positivement (**Figure III.6**). Ce phénomène s'explique par la modification de la force éluante de la phase mobile initiale par la présence d'une quantité croissante de méthanol dans le mélange de reprise. **Le meilleur compromis est d'utiliser le mélange 95/5 H_2O /méthanol.**

Figure III.6 : Exemple de séparations chromatographiques pour les composés paracétamol (1), dicyclanile (2) et sulfadiazine (3) obtenues pour différentes compositions du solvant de reprise



En conclusion, l'optimisation a conduit aux choix suivants : la cartouche OASIS HLB, un pH d'échantillon fixé à 7, une solution de lavage d'eau ajustée à pH 7 avec du NH₄OH et le mélange 95/5 H₂O/méthanol comme solvant de reprise.

B. Résultats : rendements d'extraction, effets matrice, linéarité, limites de détection et de quantification :

Les rendements d'extraction ainsi que les effets matrices ont été déterminés à partir de la solution à base de lixiviat dopée à 0.2 µg/L. Les analyses ont été effectuées en duplicat.

La linéarité (R^2) a été évaluée sur une gamme de concentration de 12 points allant de 0.1 ng/L à 500 ng/L.

Enfin, les limites de détection et de quantification méthodologiques (MLDs et MLQs) ont été déterminées pour un rapport signal sur bruit égal à 3 et 10 respectivement.

Les résultats des MLDs et MLQs ainsi que leur comparaison à la littérature sont exposés dans le **Tableau III.5**.

Tableau III.5 : Linéarité, limites de détection et de quantification méthodologiques (ng/L) et comparaison à la littérature

Composés	Gamme	R ²	MLD (ng/L)	MLQ (ng/L)	Littérature MLQs (ng/L)	Références
ANTIBIOTIQUES VÉTÉRINAIRES						
antiparasitaire						
dicyclanile	2-500	0.995	2	6.27		
sulfonamides / triméthoprime						
sulfathiazole	0.1-500	0.998	0.03	0.11	> ng/L	[7]
sulfadiméthoxine	0.5-500	0.999	0.27	1.23		
sulfadimérazine	0.1-500	0.999	0.03	0.11		
sulfanilamide	50-500	0.981	32	117		
sulfadiazine	0.1-500	0.993	0.03	0.09	> ng/L	[7]
sulfabenzamide	0.5-500	0.997	0.30	1.01		
sulfaméthoxydiazine	0.1-500	0.999	0.04	0.30		
sulfaméthoxazole	0.5-500	0.999	0.34	0.79	1 - 21	[1, 11-13, 21]
triméthoprime	0.1-500	0.992	0.05	0.50	1.14	[12]
macrolides						
érythromycine	1-500	0.999	0.71	1.54	2.5 ; 5.48	[12, 21]
roxithromycine	0.1-500	0.998	0.03	0.11		
tylosine	0.5-500	0.997	0.21	0.69	1.9	[21]
β-lactame						
pénicilline G	2-500	0.992	1.18	4.61		
CONTAMINANTS HUMAINS						
médicaments humains						
carbamazépine	0.25-500	0.997	0.15	0.93	0.97 - 10	[11, 12, 19]
fluvoxamine	5-500	0.990	2.39	9.33		
paracétamol	10-500	0.991	6.40	9.21		
STEROIDES HORMONAUX						
androgènes						
androstèdione	1-500	0.999	0.50	1.92	< ng/L	[9, 18]
testostérone	5-500	0.998	4.96	13.73	(MLDs < ng/L)	

progestagènes					
lévonorgestrel	10-500	0.995	10.18	18.04	
noréthindrone	5-500	0.996	2.39	9.91	
progestérone	2-500	0.994	1.02	3.71	[9, 18]
gestodène	10-500	0.993	10	34	

L'ensemble des composés présentent des **R² supérieurs à 0.99** sur leurs domaines de linéarité (exceptée la sulfanilamide qui a un $R^2 = 0.981$) ce qui est un très bon résultat.

Les MLQs sont compris entre 0.09 et 34 ng/L. Globalement pour les antibiotiques vétérinaires et les contaminants humains, les valeurs obtenues pour la MLQ sont comparables aux valeurs mentionnées dans la littérature et parfois même meilleures.

En revanche, pour les stéroïdes hormonaux, les MLDs ainsi que des MLQs mesurées sont plus élevées que celles rapportées par la littérature. En effet, S. Liu *et al.* [18] et E. Vulliet *et al.* [9] ont respectivement obtenu des valeurs de MLQs et de MLDs inférieures au ng/L pour les androgènes et les progestagènes. Toutefois, ces derniers se sont uniquement consacrés à l'analyse de stéroïdes hormonaux alors que notre étude avait pour but de développer une méthode d'analyse multi-residus et multi-familles. De plus, E. Vulliet *et al.* [9] ont mis au point leur méthode à partir d'une prise d'essai de 1L ce qui est cinq fois plus important que ce qui a été utilisé dans notre étude.

Les rendements d'extraction ainsi que les effets matrice ont également été évalués (**Tableau III.6**).

Tableau III.6 : Rendements d'extraction à C = 0.2 µg/L (%), comparaison à la littérature et effets matrice (%) à C = 0.2 µg/L

Composés	Rendement (%)	Littérature Rendement (%)	Références	Effet matrice (%)
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES				
antiparasitaire				
dicyclanile	101			-3
sulfonamides / triméthoprime				
sulfathiazole	99	80 – 91.1 (2 µg/L)	[7, 13]	-4
sulfadiméthoxine	97	137 (10 µg/L)	[13]	-16
sulfadimérazine	99			-8
sulfanilamide	15			-29
sulfadiazine	97	80 (2 µg/L)	[7]	-4
sulfabenzamide	98			-32
sulfaméthoxydiazine	95			-9
sulfaméthoxazole	101	90-108 (50 ng/L – 2 µg/L)	[1, 11-13, 21]	-18
triméthoprime	95	93 (50 ng/L)	[11]	9
macrolides				
érythromycine	89	90 ; 96 (500 ; 100 ng/L)	[19, 21]	-50
roxithromycine	84			117
tylosine	82	71.6 ; 87 (1 µg/L ; 50 ng/L)	[15, 21]	292
β-lactame				
pénicilline G	98			-16
CONTAMINANTS HUMAINS				
médicaments humains				
carbamazépine	100	67 – 114 (50 ng/L - 1 µg/L)	[11, 12, 19]	-20
fluvoxamine	87			111
paracétamol	43			-6
STEROIDES HORMONAUX				
androgènes				
androstènedione	98			-56
testostérone	99			-50
progestagènes				
lévonorgestrel	103	96 - 110	[18]	-56
noréthindrone	100			-54
progestérone	92			-30
gestodène	94			-47

En ce qui concerne les **rendements d'extraction à la concentration $C = 0.2 \mu\text{g/L}$, de très bons résultats (43-103%)** ont été obtenus pour l'ensemble des composés hormis pour la sulfanilamide qui a un faible rendement (15%). Elle est le seul sulfonamide à ne contenir qu'un seul cycle, il y a donc moins d'interactions π - π possibles avec la phase polymère ce qui pourrait expliquer le rendement plus faible obtenu pour cette substance. Les valeurs des rendements d'extraction sont comparables à ceux mentionnés dans la littérature pour toutes les substances.

Enfin, les **effets matrices** ont été évalués. **Ils sont assez faibles pour la plupart des antibiotiques vétérinaires.** En effet, le dicyclanile a un effet matrice de -3%. Pour les sulfonamides, ils sont compris entre -9% et -32%. Ils sont un peu plus élevés pour les macrolides, puisque cette famille de composés affiche des effets matrices compris entre -50% et 292%. Enfin, la pénicilline G a un effet matrice de -16%.

Les contaminants humains ont des effets matrice entre -20% et -6% (hormis la fluvoxamine qui a un effet matrice de 111%).

Enfin, ce sont les stéroïdes hormonaux qui montrent les effets matrice les plus importants. Ils sont compris entre -30% et -60% et la plupart étant proches de -50%. C'est peut-être la raison pour laquelle les MLDs et MLQs sont assez élevées pour ces derniers composés.

III. Conclusion :

Nous avons développé une méthode simple, rapide et robuste permettant d'extraire et concentrer efficacement à la fois des antibiotiques, des stéroïdes hormonaux et quelques contaminants humains contenus dans des matrices aqueuses, ce qui n'a jamais été réalisé auparavant. Pour cela, nous avons, après avoir ajusté le pH de l'échantillon à 7, effectué une extraction en utilisant une cartouche OASIS HLB. Une solution d'eau à pH 7 a été utilisée pour réaliser le lavage de cette cartouche. Enfin, avant l'analyse par chromatographie, l'extrait a été repris avec le mélange 95/5 H₂O/méthanol. Cette méthode peut être adaptée aussi bien à l'analyse d'échantillons réels (eaux de surface, ruissellement de terrain agricole par exemple) qu'à des échantillons de plus faibles volumes (lixiviats par exemple).

Références bibliographiques :

- [1]: **J.-Y. Pailler, A. Krein, L. Pfister, L. Hoffmann, C. Guignard**, 2009. Solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of sulfonamides, tetracyclines, analgesics and hormones in surface water and wastewater in Luxembourg. *Science of the Total Environment* 407, 4736.
- [2]: **M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo**, 2005. LC-MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 645.
- [3]: **N. Janzen, S. Sander, M. Terhardt, M. Peter, J. Sander**, 2008. Fast and direct quantification of adrenal steroids by tandem mass spectrometry in serum and dried blood spots. *Journal of Chromatography B* 861, 117.
- [4]: **M. J. L. d. Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo**, 2003. Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000, 503.
- [5]: **P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Pico**, 2010. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 2471.
- [6]: **A. Bialk-Bielinska, J. Kumirska, R. Palavinskas, P. Stepnowski**, 2009. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta* 80, 947.
- [7]: **L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu**, 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090.
- [8]: **W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger**, 2001. Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 910, 69.
- [9]: **E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, M. F. Grenier-Loustalot**, 2008. Multi-residue analysis of steroids at sub-ng/L levels in surface and ground-waters using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1210, 84.
- [10]: **B. Hauser, T. Deschner, C. Boesch**, 2008. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 23 endogenous steroids in small quantities of primate urine. *Journal of Chromatography B* 862, 100.
- [11]: **M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo**, 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678.
- [12]: **S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic**, 2009. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4989.
- [13]: **W. Ben, Z. Quiang, C. Adams, H. Zhang, L. Chen**, 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1202, 173.
- [14]: **R. Wei, F. Ge, S. Huang, M. Chen, R. Wang**, 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408.
- [15]: **P. A. Blackwell, H. C. H. Lutzhoft, H. P. Ma, B. Halling-Sorensen, A. B. A. Boxall, P. Kay**, 2004. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detector. *Journal of Chromatography A* 1045, 111.

- [16]: **K. J. Choi, S. G. Kim, C. W. Kim, S. H. Kim**, 2007. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD. *Chemosphere* 66, 977.
- [17]: **P. Labadie, H. Budzinski**, 2005. Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 1199.
- [18]: **S. Liu, G. G. Ying, J. L. Zhao, F. Chen, B. Yang, L. J. Zhou, H. J. Lai**, 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 1367.
- [19]: **M. J. Gomez, M. Petrovic, A. R. Fernandez-Alba, D. Barcelo**, 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography A* 1114, 224.
- [20]: **C. M. O. Gonçalves, M. A. D. Sousa, M. d. F. P. S. P. M. Alpendurada**, 2012. Analysis of acidic, basic and neutral pharmaceuticals in river waters : clean-up by 1°, 2° amino anion exchange and enrichment using an hydrophilic adsorbent. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* DOI:10.1080/03067319.2012.702272, 1.
- [21]: **Q. T. Dinh, F. Alliot, E. Moreau-Guigon, J. Eurin, M. Chevreuil, P. Labadie**, 2011. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta* 85, 1238.
- [22]: **S. Abuin, R. Codony, R. Compano, M. Granados, M. D. Prat**, 2006. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1114, 73.
- [23]: **Y. Filali-Meknassi, M. Auriol, C. D. Adams, R. Y. Surampalli**, 2007. Quantification of Steroids Sex Hormones Using Solid-Phase Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Water Environment Research* 79, 687.
- [24]: **S. C. Kim, J. G. Davis, C. C. Truman, J. C. A. II, K. Carlson**, 2010. Simulated rainfall study for transport of veterinary antibiotics - mass balance analysis. *Journal of Hazardous Materials* 175, 836.
- [25]: **M. Kostopoulou, A. Nikolaou**, 2008. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 1023.
- [26]: **S. Reverté, F. Borull, E. Pocurull, R. M. Marcé**, 2003. Determination of antibiotic compounds in water by solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-(electrospray) mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1010, 225.
- [27]: **L. K. Sorensen, T. H. Elbaek**, 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography B* 820, 183.
- [28]: **V. Pichon, C. C. D. Coumes, L. Chen, S. Guenu, M. C. Hennion**, 1996. Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides *Journal of chromatography A* 737 25.
- [29]: **M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena, P. Solich**, 2009. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* 649, 158.

CHAPITRE II

**Développement de la méthodologie
pour l'analyse des composés
en phase solide**

Objectif :

Le but de ce chapitre est de présenter le développement de méthodes d'analyse de traces d'antibiotiques vétérinaires et stéroïdes hormonaux contenus dans le sol.

Résumé :

Dans ce chapitre, nous avons mis au point et comparé deux méthodes d'extraction des 31 composés ciblés, dans le sol : l'extraction par liquide pressurisé PLE et l'extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe). Comme les effets matrice observés à l'issue de cette étape sont importants, une purification a été nécessaire. Pour cela, les purifications SPLE (pour la PLE) et dSPE (après QuEChERS) ont tout d'abord été évaluées. Les résultats ne s'étant pas avérés satisfaisants, nous nous sommes alors tournés vers une purification « offline » par SPE. Ainsi, nous avons développé une purification mettant en jeu deux cartouches en tandem : SAX + StrataX. Celle-ci a été testée après la PLE et l'extraction QuEChERS. Nous avons finalement retenu la méthode basée sur QuEChERS (extraction QuEChERS - purification SAX + StrataX) car elle est plus rapide et permet d'atteindre des rendements d'extraction légèrement plus élevés pour certaines substances que la PLE - purification SAX + StrataX.

Cette méthodologie a ensuite été validée suivant les recommandations de la norme ICH/2005. La linéarité, les limites de détection et de quantification méthodologiques (MLDs et MLQs), les rendements d'extraction, la répétabilité ainsi que la précision intermédiaire ont été évalués. Les effets matrice ont également été déterminés.

Enfin, une étude statistique a été effectuée pour évaluer l'influence des paramètres du sol (la CEC ainsi que les pourcentages en argile, en limon, en sable et en carbone organique) sur les rendements d'extraction et les effets matrice. Cette étude a été réalisée à partir de onze sols ayant des propriétés différentes.

I. Préparation d'échantillon :

Comme nous l'avons mentionné dans la partie bibliographique, plusieurs techniques d'extraction existent pour la matrice solide. Les techniques conventionnelles pour extraire des composés organiques sont basées soit sur le mélange du solide avec un solvant organique soit sur l'extraction Soxhlet qui est encore considérée comme la méthode de référence. Récemment, des techniques telles que la PLE (Pressurized Liquid Extraction) [1-18],

l'extraction par fluide supercritique [12, 19] ou encore assistées par les ultrasons [1, 3, 6-10, 12, 20-25] ou les micro-ondes [10, 12, 26, 27] ont été mises en place. Enfin en 2003, une nouvelle procédure d'extraction appelée QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) initialement mise au point pour extraire des pesticides de matrices alimentaires, a été développée [28]. La PLE est une méthode d'extraction efficace et très utilisée pour les sols. La procédure QuEChERS, quant à elle, est rapide et très innovante. Nous avons donc choisi de comparer ces deux techniques d'extraction.

A. PLE (Pressurized Liquid Extraction) :

1. Extraction par PLE :

Dans un premier temps, nous avons optimisé une méthode par PLE pour les 31 substances ciblées.

De nombreux paramètres doivent être fixés comme la température, la pression, le temps statique, le nombre de cycles et le solvant d'extraction. D'après les expériences du laboratoire et les données de la littérature, c'est la nature du solvant d'extraction qui a le plus d'effet sur l'efficacité de l'extraction, nous avons donc choisi de fixer préalablement la température, la pression, le temps et le nombre de cycles en fonction des données de la littérature et d'optimiser le solvant d'extraction.

Choix de la température, de la pression, du temps statique et du nombre de cycles :

Plusieurs études antérieures ont été consacrées à la PLE d'antibiotiques ou de stéroïdes hormonaux présents dans le sol.

En ce qui concerne les antibiotiques vétérinaires, des températures relativement basses (entre 70 et 80°C) sont généralement utilisées à cause de la dégradation thermique de ces substances [4, 29, 30]. Des pressions comprises entre 100 et 140 bars sont fréquemment rapportées [4, 29, 30] ainsi que des valeurs de temps statique entre 5 et 10 minutes [29, 30]. Enfin, les auteurs préconisent le plus souvent la réalisation de 2 ou 3 cycles [4, 29, 30].

Pour les stéroïdes hormonaux, des températures supérieures à 100°C (généralement 120°C) [3, 31], des pressions comprises entre 110 et 140 bars [3, 31], un temps statique de 10 minutes [31], ainsi qu'un nombre de cycles égal à 2 [3] ont souvent été mentionnés dans les travaux précédents.

D'après tous ces résultats, les valeurs des paramètres expérimentaux ont été fixées pour convenir au mieux à l'ensemble des composés (**Tableau III.7**).

Tableau III.7 : Paramètres expérimentaux fixés pour la PLE

Température (°C)	80
Pression (bars)	120
Temps statique (minutes)	10
Nombre de cycles	2

Choix du solvant d'extraction :

Pour la suite de notre développement, nous nous sommes attachés au choix du solvant d'extraction. Etant donné la diversité des propriétés physico-chimiques des composés, des compromis ont été nécessaires.

Les solvants les plus couramment mentionnés dans la littérature afin d'extraire les antibiotiques vétérinaires de matrices solides sont le méthanol, l'acétone, les mélanges acétone/méthanol (50/50) ou encore le méthanol et l'acétonitrile mélangés à des solutions aqueuses [4, 10, 29, 30, 32]. Des solvants à base d'acide citrique ont également été employés afin d'extraire les antibiotiques du sol par PLE. L'acide citrique est alors utilisé pour remplacer l'EDTA qui précipite dans le système d'extraction. Il permet d'éviter la complexation des composés avec des substances du sol, ce qui pourrait rendre leur extraction plus difficile [5]. Enfin, plusieurs études ont employé de l'acide phosphorique en complément de l'acide citrique afin d'extraire ces substances antibiotiques du sol [15].

Pour les stéroïdes hormonaux, les solvants méthanol, acétone et le mélange acétone/méthanol (50/50) sont les plus souvent cités [3, 31, 32].

D'après l'ensemble des informations recueillies dans la littérature, nous avons évalué les solvants suivants : l'acétone, le méthanol ainsi que le mélange acétone/méthanol (50/50). Nous avons également utilisé des solvants plus complexes tels que le mélange 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH environ 4 à l'aide de soude ou d'hydroxyde d'ammonium [5]. Le mélange 40/40/20 méthanol/acétonitrile/solution aqueuse d'acide phosphorique + 1 mM acide citrique a également été testé. Pour ce dernier solvant, nous avons réalisé des essais avec plusieurs pourcentages en acide phosphorique : 0.10% (pH = 3.1), 0.35% (pH = 2.8) et 0.875% (pH = 2.7).

Nous avons réalisé ces essais en dopant 5 g de sol à 50 ng/g en chacun des 31 composés. Après la PLE, les 18 mL d'extraits obtenus ont été évaporés à sec pour les solvants volatiles (acétone, méthanol, acétone/méthanol (50/50)) puis repris dans 1.5 mL d'eau avant d'être injecté en LC-MS/MS. Pour les mélanges contenant de l'eau, le solvant organique a été évaporé. L'évaporation a ensuite été stoppée pour éviter toute dégradation des analytes. Le volume final a été ajusté à 1.5 mL avec de l'eau MilliQ.

Le choix du solvant d'extraction est effectué en évaluant à la fois les rendements d'extraction ainsi que les effets matrice puisque le sol est une matrice très chargée.

En ce qui concerne les résultats, nous avons observé que l'acétone n'est pas adaptée à l'extraction des antibiotiques et des médicaments humains. En effet, les rendements d'extraction sont inférieurs à 50% pour la plupart des sulfonamides (pour certains inférieurs à 20%), inférieurs à 10% pour les macrolides et la pénicilline G n'a pas été détectée. Pour les médicaments humains, les rendements d'extraction sont inférieurs à 5% pour la fluvoxamine et l'ibuprofène et est de 40% pour le paracétamol. L'acétone convient uniquement à l'extraction des stéroïdes hormonaux puisqu'elle assure des rendements d'extraction compris entre 70% et 80% pour les progestagènes et les androgènes et entre 60% et 80% pour les estrogènes. Les résultats sont présentés en **Annexe 2**.

Le mélange 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 4 ne semble pas convenir davantage. En effet, ce solvant engendre des effets matrice importants. Ils sont compris entre -70% et -90% pour la plupart des antibiotiques et entre -60% et -85% pour les stéroïdes hormonaux. La présence d'acide citrique favorise probablement le passage d'interférents dans le solvant, ce qui explique que nous observions plus d'effets matrice dans l'extrait obtenu. Cependant, aucune augmentation flagrante sur les rendements d'extraction des composés n'a été observée par rapport aux autres solvants testés. Les résultats sont exposés en **Annexe 3**.

Concernant les mélanges à base d'acide phosphorique, nous observons une augmentation des effets matrice avec l'augmentation du pourcentage en acide. Ceci est illustré par le **Graphique III.11** qui montre les intensités des extraits de sol dopés après l'extraction pour les différentes quantités d'acide phosphorique du solvant. Comme l'acide citrique, l'acide phosphorique induit donc une plus forte extraction des interférents. Ceci est confirmé par la

Figure III.7 qui montre un extrait de plus en plus jaune lorsque le pourcentage en acide phosphorique augmente. Cet exemple illustre bien qu'il ne faut donc pas uniquement évaluer les rendements pour mettre au point une méthode d'extraction de composés d'une matrice complexe mais également prendre en compte les effets matrice.

Graphique III.11 : Intensités des extraits dopés après l'extraction pour différentes quantité d'acide phosphorique (AP) dans le solvant d'extraction pour les 23 composés ionisés positivement

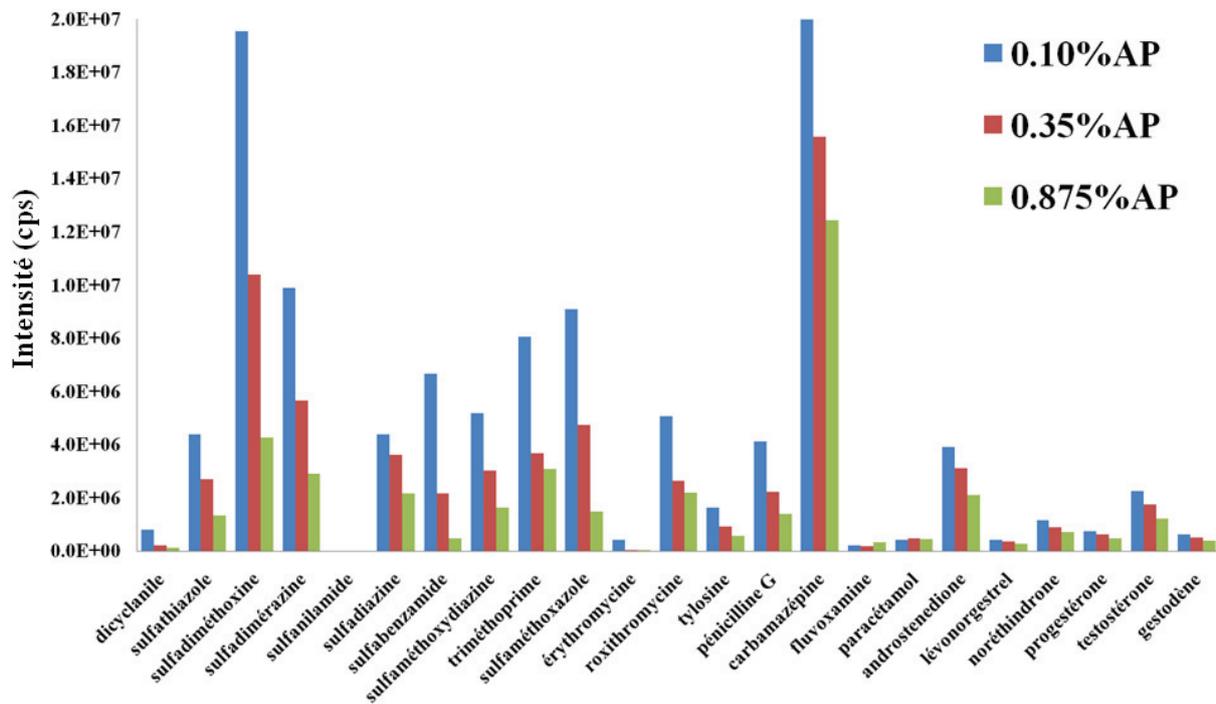
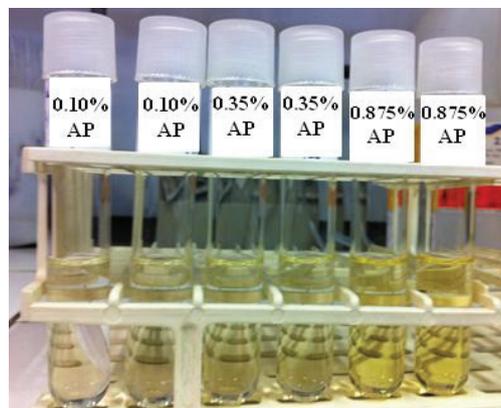
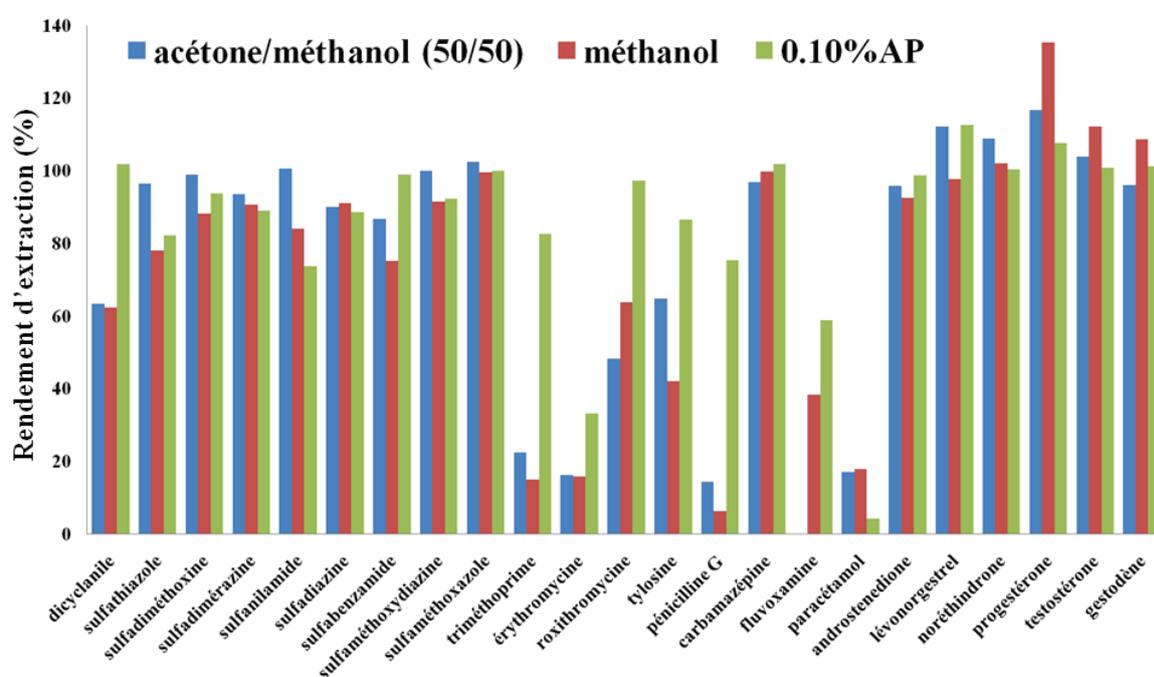


Figure III.7 : Extrait PLE pour différents pourcentages d'acide phosphorique dans le solvant d'extraction

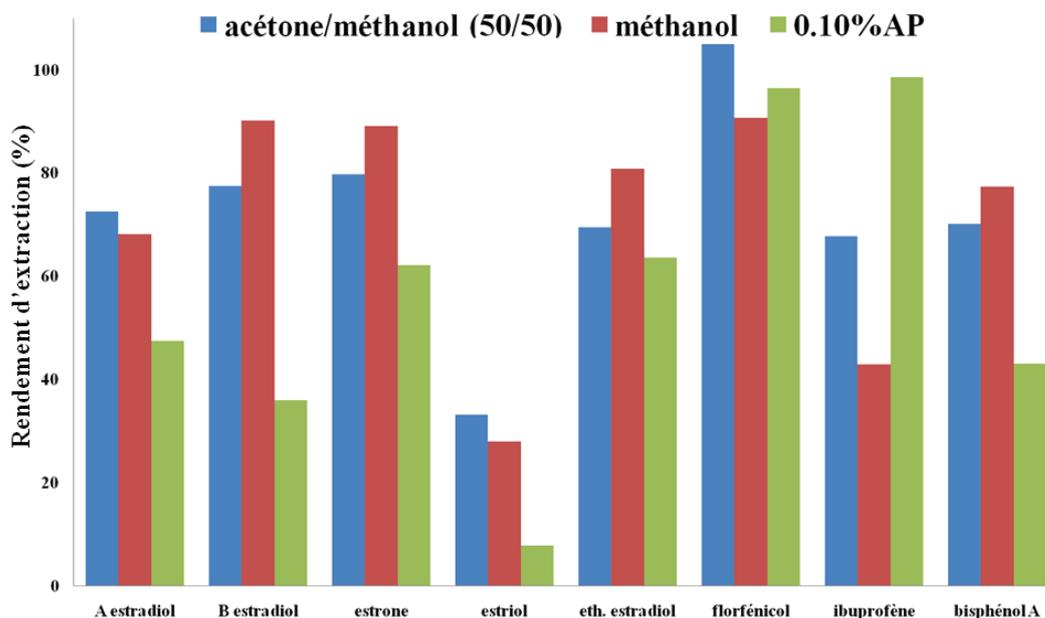


Comme le solvant contenant 0.10% d'acide phosphorique permet de bons rendements d'extraction tout en limitant les effets matrice, le mélange 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.10% acide phosphorique + 1 mM acide citrique (pH ~ 3.1) a été retenu pour des tests complémentaires. Ainsi, nous avons comparé ce solvant (noté 0.10%AP) avec les solvants acétone/méthanol (50/50) et méthanol. Les rendements d'extraction obtenus sont rassemblés sur les **Graphiques III.12 et III.13**.

Graphique III.12 : Rendements d'extraction pour les différents solvants testés (acétone/méthanol (50/50), méthanol et 0.10%AP) pour les 23 composés ionisés positivement



Graphique III.13 : Rendements d'extraction pour les différents solvants testés (acétone/méthanol (50/50), méthanol et 0.10%AP) pour les 8 composés ionisés négativement



Les histogrammes exposés ci-dessus montrent que le solvant à base d'acide phosphorique permet de bons rendements d'extraction pour les antibiotiques vétérinaires. En effet, pour le dicyclanile et le triméthoprime l'extraction est nettement améliorée avec le mélange à base d'acide phosphorique. Les rendements des sulfonamides varient peu entre les solvants, la plupart sont compris entre 80 et 100%. Pour les macrolides, des rendements d'extraction de 1.5 à 2 fois plus élevés ont été obtenus avec le mélange 0.10%AP par rapport aux deux autres solvants. C'est également le cas de la pénicilline G qui est très peu extraite avec le mélange acétone/méthanol (50/50) et le méthanol. Enfin, l'extraction du florfenicol ne montre pas de différences significatives entre les solvants (90 à 100% d'extraction).

En revanche, le solvant à base d'acide phosphorique engendre de fortes baisses sur les rendements du paracétamol et du bisphénol A mais il permet une bonne extraction de l'ibuprofène. La carbamazépine n'est pas affectée par la nature du solvant.

Pour finir, les rendements d'extractions des progestagènes et des androgènes sont très peu différents entre les trois solvants (compris entre 90 et 110%). Concernant les rendements d'extraction des estrogènes, ils sont nettement plus faibles avec le mélange à base d'acide phosphorique.

Notre travail étant une étude multi-résidus et multi-familles, nous devons effectuer un certain nombre de compromis. En effet, le solvant contenant de l'acide phosphorique permet les

meilleurs rendements d'extraction pour certains composés, cependant il n'est pas du tout adapté à l'extraction des estrogènes qui constituent une partie essentielle des stéroïdes hormonaux (composés cibles de notre projet, aux propriétés de perturbation endocrinienne avérées). Ce solvant ne permet pas non plus une très bonne extraction de quelques contaminants humains (paracétamol et bisphénol A). D'un autre côté, nous n'avons pas observé de différences significatives entre le mélange acétone/méthanol (50/50) et le méthanol. La fluvoxamine étant extraite, en faible quantité, uniquement avec le méthanol et les estrogènes montrant, dans l'ensemble, des rendements légèrement plus élevés avec ce dernier, **le méthanol paraît donc être le solvant d'extraction le plus adapté en terme de rendements.**

2. Purification par SPLE (Selective Pressurized Liquid Extraction) :

Une purification par SPLE correspondant à l'incorporation d'une phase purificatrice à l'intérieur de la cellule PLE a été envisagée. Certaines méthodes SPLE ont déjà été mises en place pour extraire des PCB (polychlorobiphényles) de boues, des pesticides organochlorés [33] et des estrogènes du sol [34]. Ces extractions ont été réalisées avec des solvants plutôt apolaires tels que l'hexane, les mélanges acétone/heptane (50/50) ou acétone/dichlorométhane (25/75). Des phases purificatrices florisil, silice et alumine ont été incorporées dans la cellule PLE. Ces phases sont parfaitement adaptées à ce genre d'extraction. En effet, ces sorbants polaires permettent de retenir les interférents polaires de la matrice alors que les solvants apolaires permettent d'extraire les analytes cibles de faibles polarités. Aucune méthode SPLE multi-résidus, à ma connaissance, n'a été mise en place pour extraire à la fois des antibiotiques vétérinaires et des stéroïdes hormonaux de la matrice sol. Comme nous l'avons montré dans la partie précédente, ces substances s'extraient plutôt avec des solvants polaires tels que le méthanol, l'acétonitrile ou des mélanges de ces solvants avec une solution aqueuse. Dans ce cas, les phases purificatrices de type C18 et SAX seraient peut-être adaptées.

Nous avons effectué les tests en incorporant 2 g de phase purificatrice à l'intérieur de la cellule PLE et nous les avons comparés à des tests sans ajouts de phases afin d'évaluer le rôle du sorbant de purification. Le dopage du sol est toujours de 50 ng/g et la reprise de l'extrait avant injection en LC-MS/MS de 1.5 mL d'eau. Pour chacun des solvants acétone/méthanol (50/50), méthanol et le mélange à base d'acide phosphorique, différentes phases ont été testées. Des combinaisons phases/solvants ont été établies pour lier un solvant avec la phase la

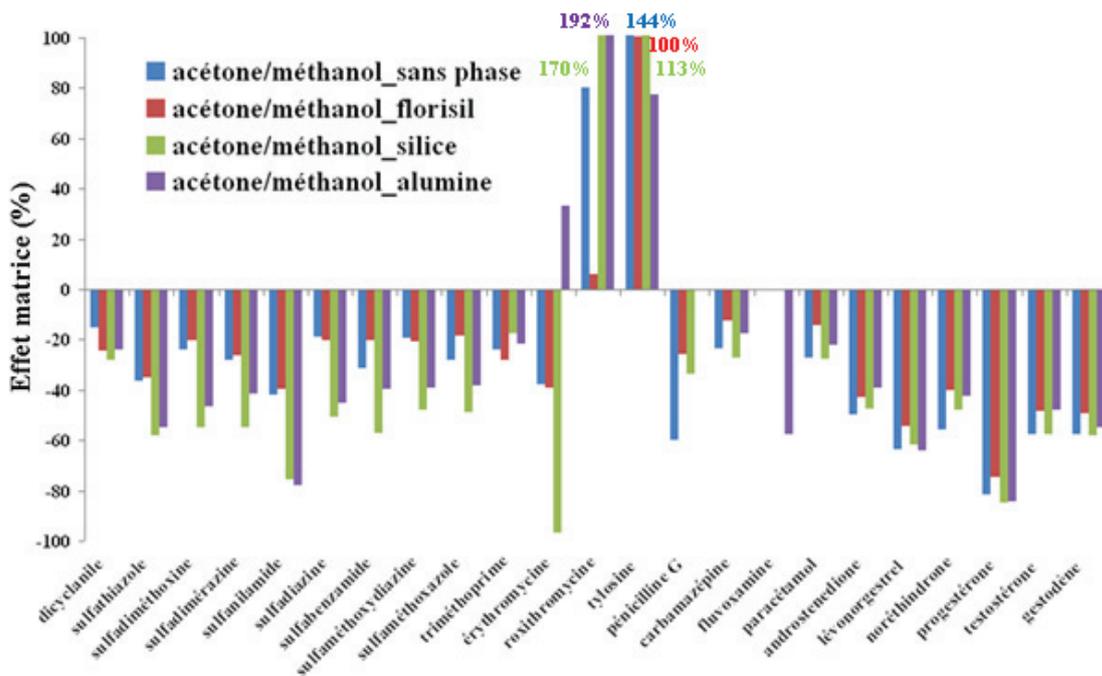
plus adaptée (selon la polarité, le pH) et ainsi avoir le plus de chance de diminuer les effets matrice. Le choix des combinaisons et les résultats sont discutés ci-dessous.

Pour le solvant acétone/méthanol (50/50), nous avons testé les trois phases florisil, silice et alumine puisque ces dernières ont déjà été utilisées lors de l'extraction d'estrogènes avec un solvant à base d'acétone [34]. L'effet de la phase C18 a été évalué avec le méthanol, et le mélange 0.10%AP. La phase C18 pourrait retenir des interférents apolaires non entraînés par les solvants polaires. Enfin le mélange à base d'acide phosphorique a été ajusté à pH environ 4 pour faire un test avec la phase SAX. En effet, à ce pH, les fonctions acides carboxyliques des acides humiques et fulviques sont en partie ionisées négativement et ces acides pourraient être retenus par la phase SAX.

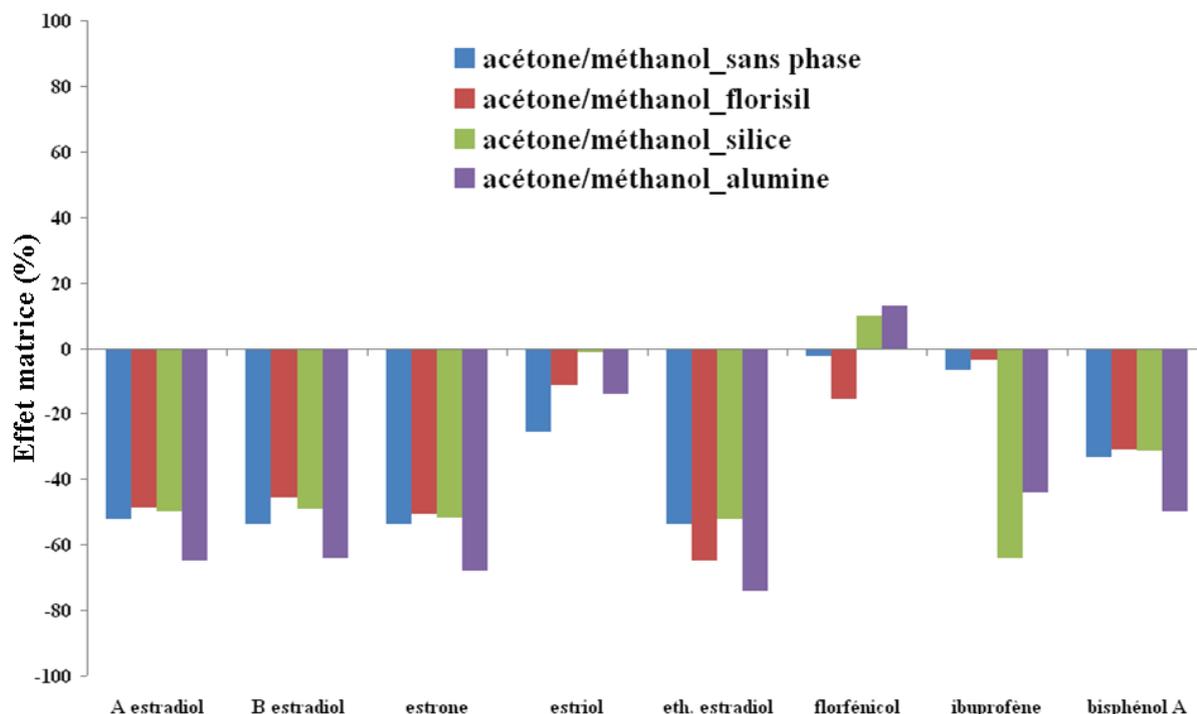
Globalement, les différents tests effectués ne donnent pas de résultats satisfaisants.

Les **Graphiques III.14 et III.15** montrent les effets matrice pour les essais réalisés pour le solvant acétone/méthanol (50/50).

Graphique III.14 : Effets matrice (%) des composés ionisés positivement pour les tests effectués avec le solvant acétone/méthanol (50/50)



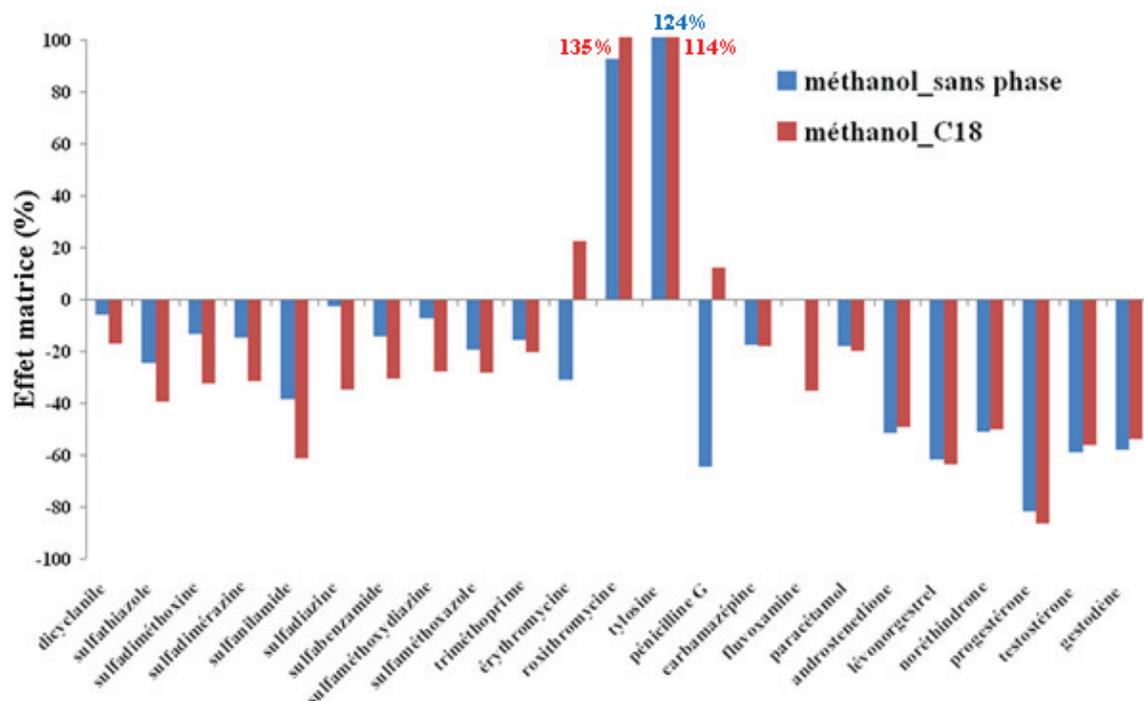
Graphique III.15 : Effets matrice (%) des composés ionisés négativement pour les tests effectués avec le solvant acétone/méthanol (50/50)



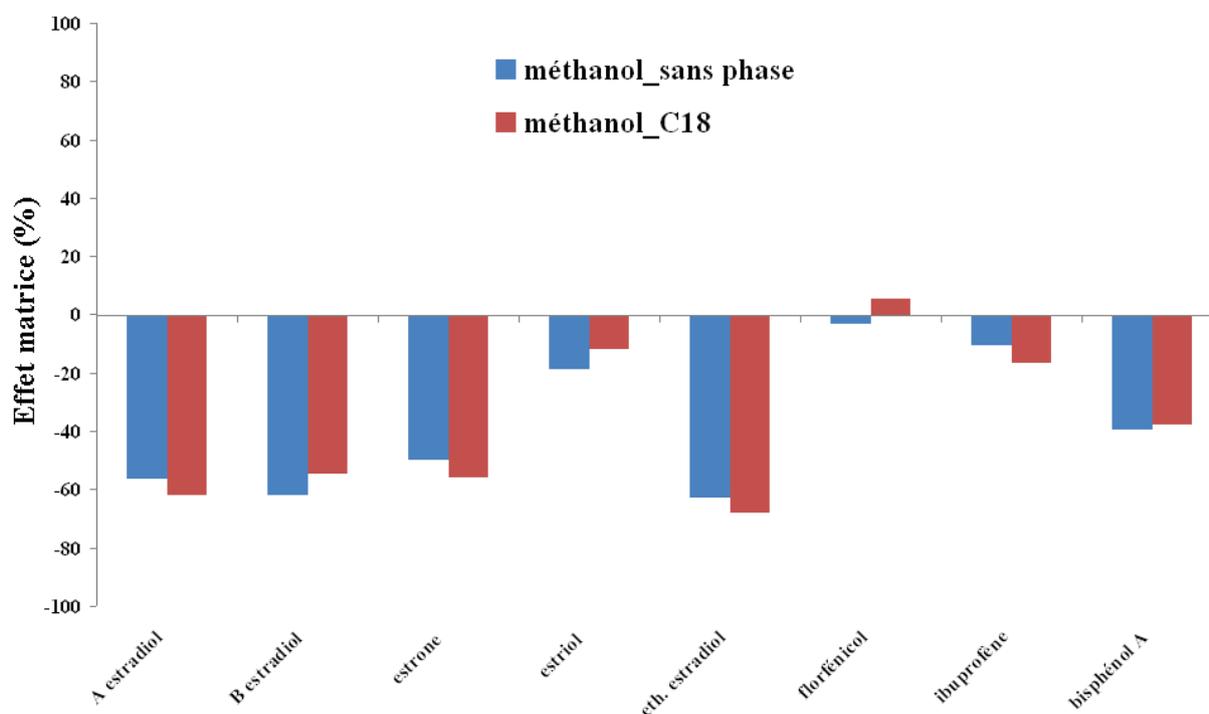
Nous remarquons que la phase florisil n'a pas permis de diminuer les effets matrice. En effet, ces derniers sont toujours aussi importants pour les progestagènes, androgènes et estrogènes. Ils sont faiblement atténués seulement pour le sulfaméthoxazole, la pénicilline G, la carbamazépine, le paracétamol et l'estriol. Avec la silice, le même phénomène a été observé. Les effets matrice sont même amplifiés pour les sulfonamides et l'ibuprofène. Enfin, l'alumine a provoqué une augmentation des effets matrice pour les sulfonamides, les estrogènes et le florfénicol. De plus, ils ne sont pas diminués pour les autres composés tels que les progestagènes et androgènes.

Les **Graphiques III.16 et III.17** présentent les résultats des effets matrice pour le méthanol.

Graphique III.16 : Effets matrice (%) des composés ionisés positivement pour les tests effectués avec le méthanol



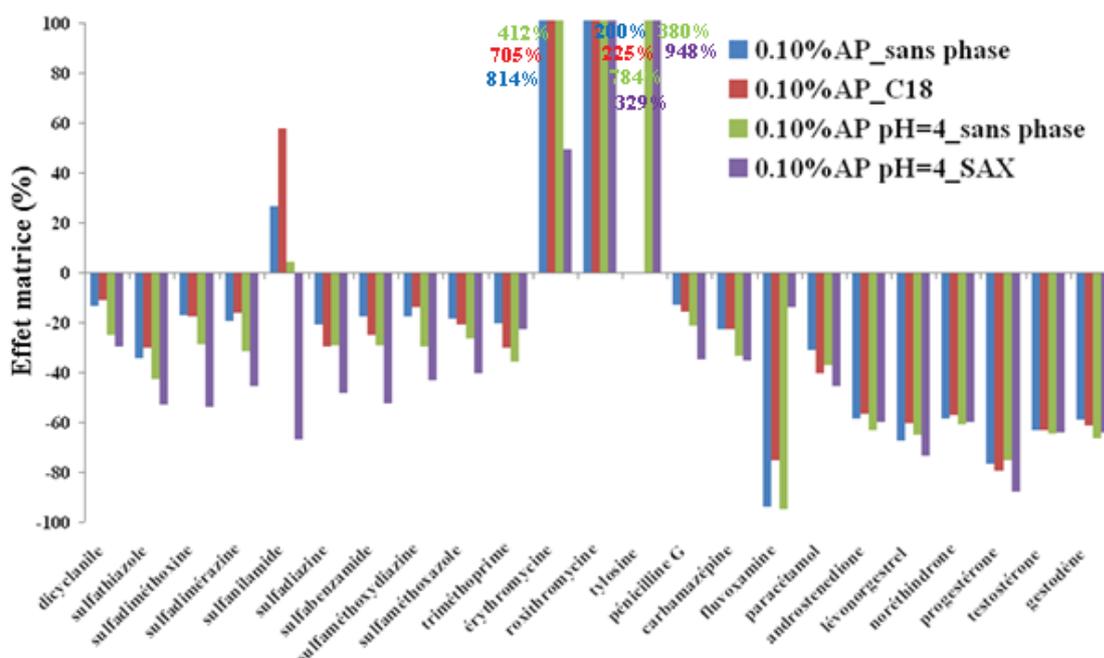
Graphique III.17 : Effets matrice (%) des composés ionisés négativement pour les tests effectués avec le méthanol



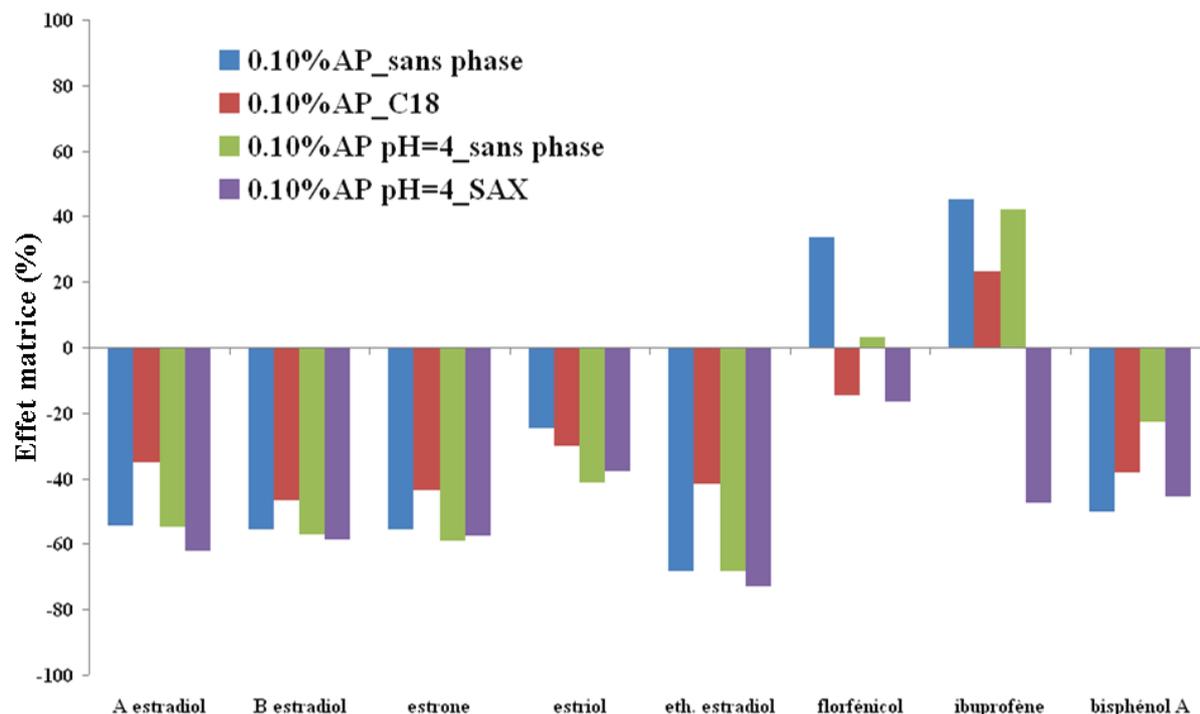
Nous observons que la présence de la phase C18 avec le méthanol comme solvant d'extraction n'a pas permis une diminution des effets matrice, ceux des sulfonamides ont même été augmentés.

Les **Graphiques III.18 et III.19** exposent les résultats pour les solvants à base d'acide phosphorique.

Graphique III.18 : Effets matrice (%) des composés ionisés positivement pour les tests effectués avec les solvants à base d'acide phosphorique



Graphique III.19 : Effets matrice (%) des composés ionisés négativement pour les tests effectués avec les solvants à base d'acide phosphorique



Pour le solvant à base d'acide phosphorique à pH non ajusté, les effets matrice ne sont pas nettement abaissés avec la phase C18. Seules la 17 α -estradiol et la 17 α -éthinyloestradiol voient leurs effets matrice légèrement diminués. La phase SAX (solvant ajusté à pH 4) a provoqué une augmentation des effets matrice des sulfonamides et aucune atténuation n'a été observée pour les autres composés. Les interférents de la matrice présentent probablement plus d'affinités avec les solvants plutôt qu'avec la phase purificatrice, aux pHs étudiés.

Enfin, les différences d'effets matrice entre les solvants ont également été prises en compte dans nos réflexions. Aucune différence flagrante n'a été observée. Les effets matrice sont seulement un peu plus faibles avec le méthanol et un peu plus élevés avec le solvant acide phosphorique 0.10% à pH = 4, en particulier dans le cas des sulfonamides.

Pour conclure, aucune des phases purificatrices introduites n'a permis de diminuer significativement les effets matrice, ces derniers sont même augmentés par certaines d'entre elles. De plus, les rendements d'extraction avec les phases purificatrices sont globalement diminués (résultats présentés en **Annexe 4**).

Etant donné que les phases purificatrices entraînent des pertes de composés et ne permettent pas de diminuer les effets matrice, **la méthode SPLE n'a pas été retenue.**

B. QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) :

1. Extraction QuEChERS :

Le développement d'une procédure QuEChERS a également été effectué pour la totalité des 31 composés.

La méthode QuEChERS est fréquemment utilisée pour extraire des substances de matrices alimentaires mais elle est très rarement employée pour l'extraction de composés de matrices environnementales. Néanmoins, cette technique a été récemment utilisée pour extraire différents composés tels que les pesticides ou encore les phénols à partir du sol [35-42]. Elle n'a jamais été développée, à ma connaissance, pour extraire à la fois des antibiotiques et des stéroïdes du sol. Le développement d'une telle procédure est donc novateur.

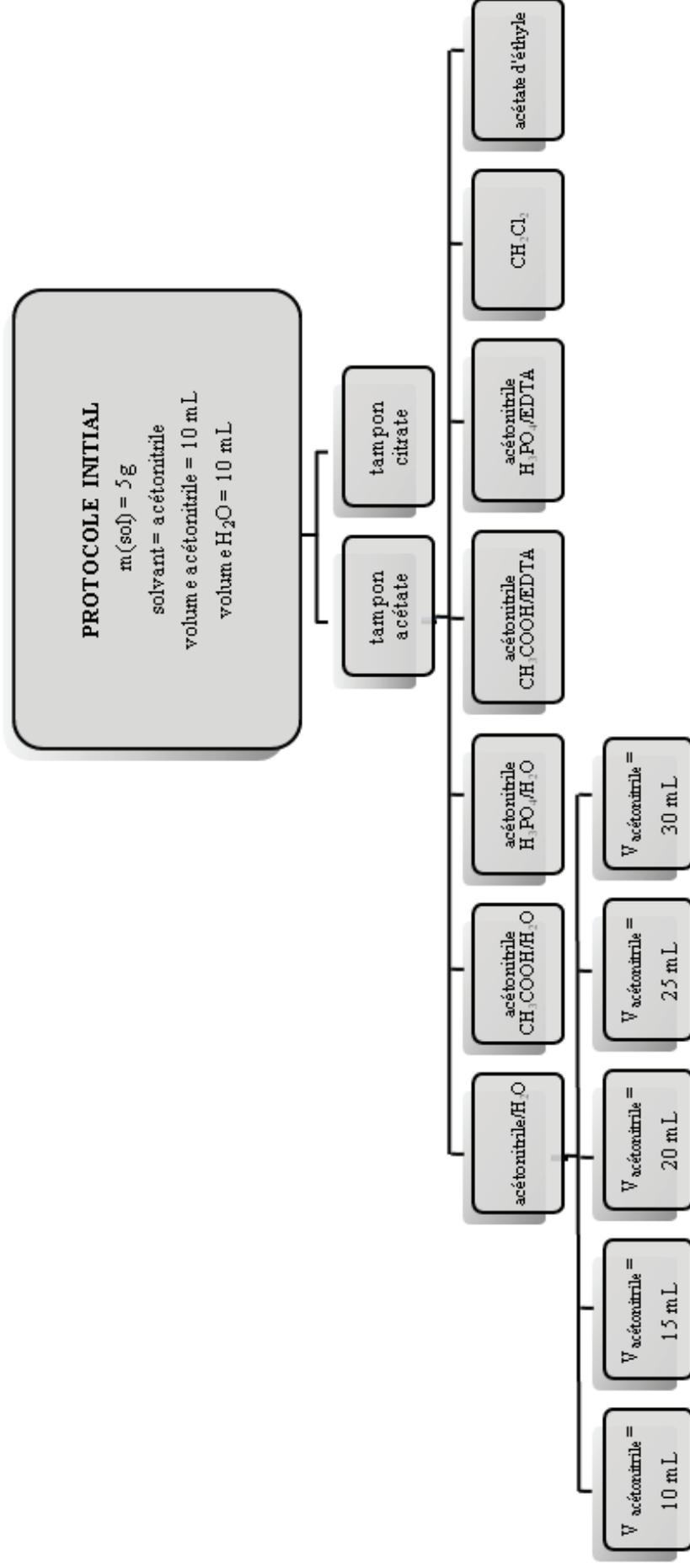
La procédure QuEChERS est une extraction liquide-liquide assistée par des sels suivie d'une purification dSPE.

Pour mettre en place une telle extraction, il a été nécessaire d'optimiser plusieurs paramètres : la quantité de matrice (sol) à introduire, la nature du tampon, la nature du solvant d'extraction et enfin les volumes d'eau et de solvant.

Pour le développement de la méthode, nous avons dopé 5 g de sol à 50 ng/g en chacun des 31 composés. Dans chaque cas, l'extrait récupéré a été évaporé à sec sous flux d'azote à T = 40°C et repris dans 1 mL d'eau avant l'injection en LC-MS/MS.

La **Figure III.8** détaille le protocole de l'optimisation de l'extraction QuEChERS.

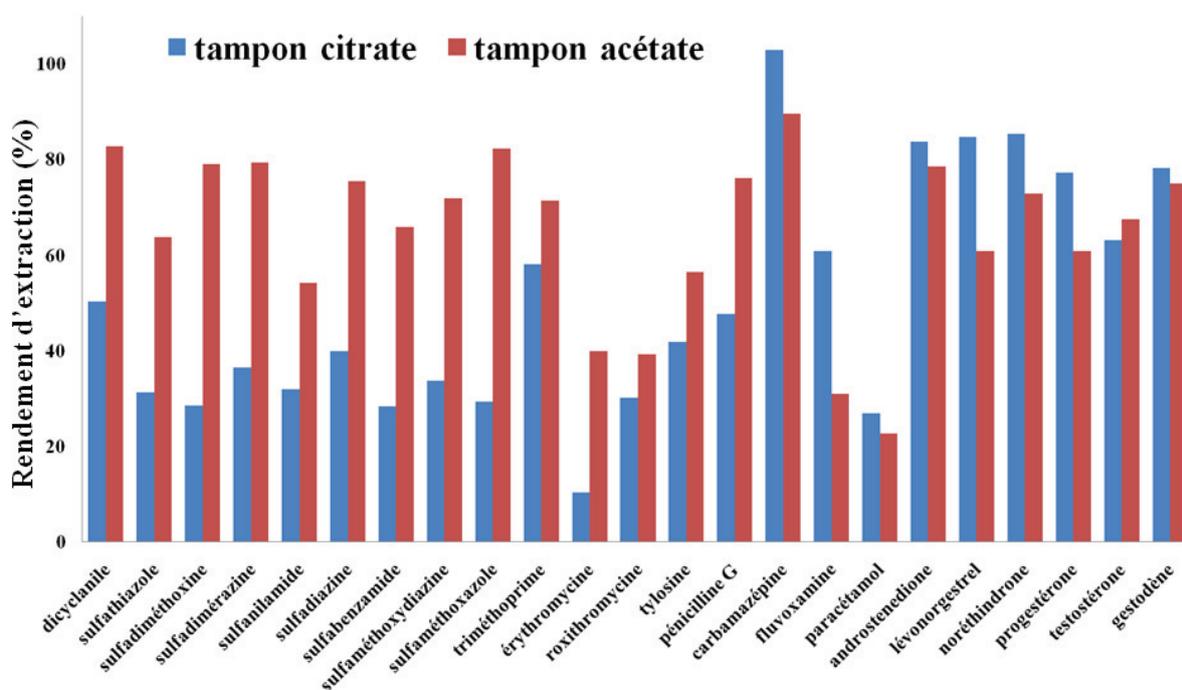
Figure III.8 : Schéma synthétisant le protocole d'optimisation de l'extraction QuEChERS



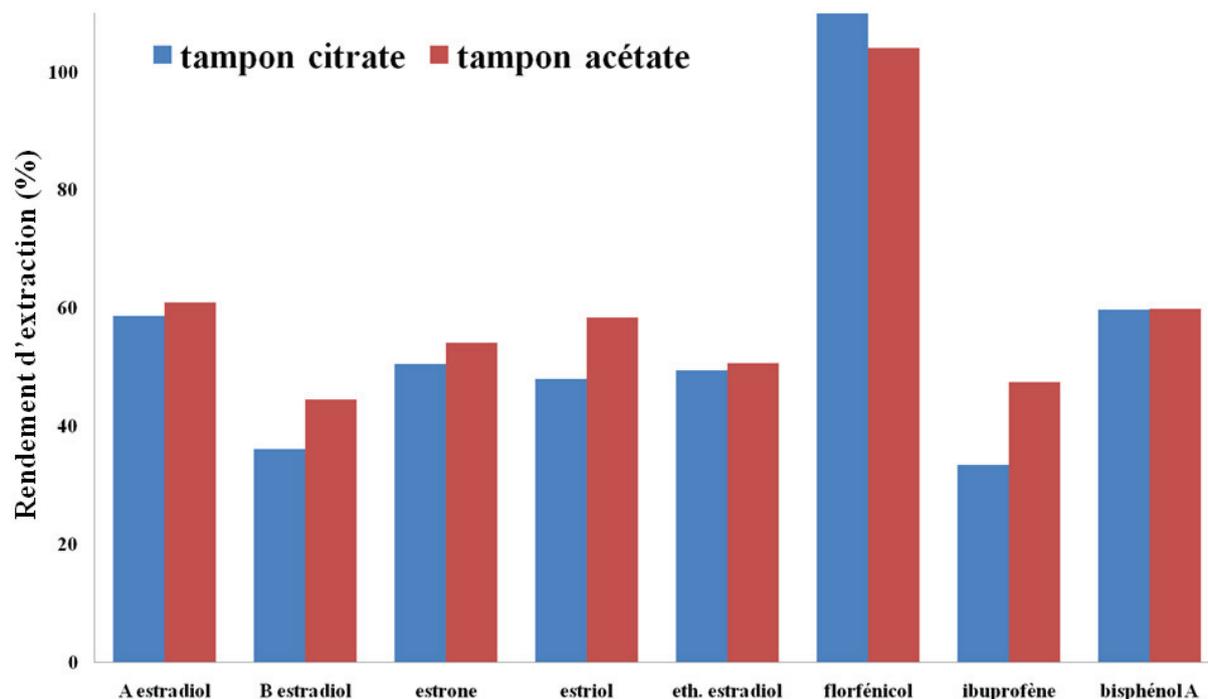
Choix de la nature du tampon :

Tout d'abord, nous avons comparé l'efficacité de l'extraction obtenue avec les deux tampons recommandés respectivement par la norme européenne (tampon citrate) ou par la norme américaine (tampon acétate). Ces deux tampons diffèrent par leurs pHs : le tampon citrate a un pH compris entre 5 et 5.5 et le tampon acétate fixe le pH à 4.8. Pour effectuer cette comparaison, l'extraction a été effectuée avec 5g de sol, 10 mL d'eau et 10 mL d'acétonitrile. Les résultats présentant les rendements d'extraction suite à l'utilisation des deux tampons sont exposés sur les **Graphiques III.20 et III.21**.

Graphique III.20 : Rendements d'extraction pour les composés ionisés positivement suite à l'utilisation des tampons citrate et acétate



Graphique III.21 : Rendements d'extraction pour les composés ionisés négativement suite à l'utilisation des tampons citrate et acétate



Les résultats exposés ci-dessus montrent que le tampon acétate permet globalement des rendements d'extraction plus élevés que le tampon citrate, bien que dans ces conditions, la fluvoxamine et le lévonorgestrel sont moins bien extraits. Ceci peut être expliqué par les pHs différents des deux tampons. En effet, il permet une extraction plus efficace du dicyclanile, des sulfonamides (de 1.5 à 3 fois plus efficace que le tampon citrate), du triméthoprime, des macrolides (1.5 à 4 fois plus efficace) et de la pénicilline G (1.5 fois mieux extraite). Pour la plupart des androgènes, progestagènes, estrogènes ainsi que pour le florfénicol ou encore certains contaminants humains (la carbamazépine, l'ibuprofène et le bisphénol A), nous n'avons pas observé de grandes différences entre les deux tampons. **Le tampon acétate préconisé par la norme américaine a donc été choisi.**

Choix du solvant d'extraction :

Par la suite, différents solvants ont été testés. L'acétonitrile a été le premier solvant utilisé par M. Anastassiades *et al.* en 2003 [28] pour l'extraction QuEChERS de résidus de pesticides de matrices alimentaires. L'acétonitrile avec 1% d'acide acétique a également été mentionné comme solvant de choix pour l'extraction de pesticides, chlorophénols, alkylphénols, nitrophénols de matrices alimentaires ou de sols par la méthode QuEChERS [35, 36, 43].

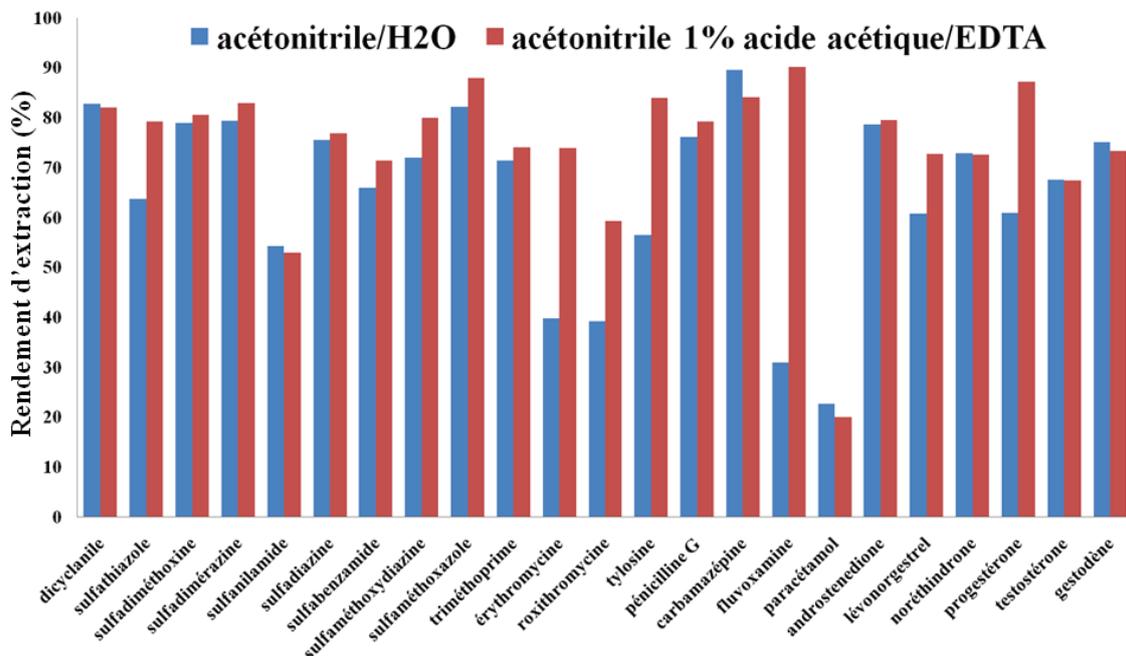
L'acétonitrile avec de l'acide phosphorique [4, 15] est également souvent utilisé pour extraire les antibiotiques du sol par PLE. Le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle [38] sont également employés pour extraire des composés chlorés du sol avec la méthode QuEChERS. Enfin, l'acétonitrile auquel est ajouté soit de l'acide acétique soit de l'acide phosphorique, peut également être utilisé en remplaçant l'eau par une solution à 0.1M Na₂EDTA. Dans ce cas, l'EDTA est ajouté pour faciliter l'extraction de composés liés à la matrice. Il évite la complexation de ces analytes avec les cations tels que Mg²⁺ et Ca²⁺ [44].

L'ensemble de ces solvants : acétonitrile/H₂O, acétonitrile + 1% d'acide acétique/H₂O, acétonitrile + acide phosphorique/H₂O, acétonitrile + 1% d'acide acétique/Na₂EDTA (0.1M), acétonitrile + acide phosphorique/Na₂EDTA (0.1M) ainsi que le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle ont donc été testés. Nous avons également réalisé des essais avec des solvants à base de méthanol. Pour effectuer ces tests, les paramètres suivants ont été fixés : 5 g de sol, utilisation du tampon acétate et des volumes d'eau et de solvant de 10 mL.

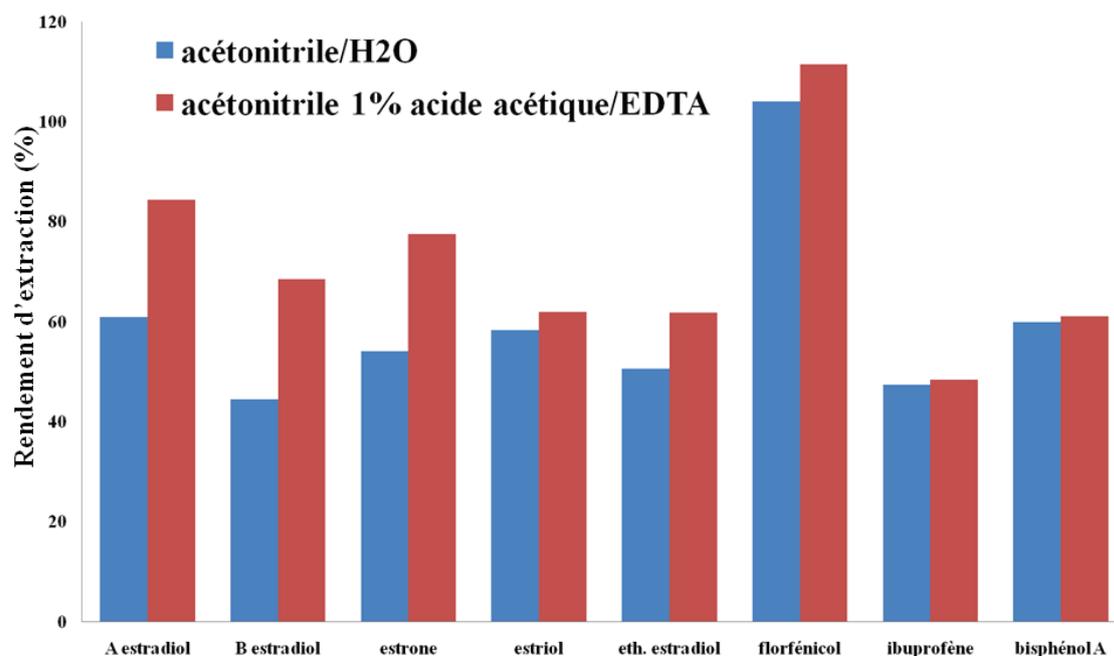
Avec les solvants à base de méthanol, des extraits visqueux ont été obtenus lors de l'évaporation à sec, sans doute du fait de la dissolution de sels par le méthanol [45]. Nous avons donc abandonné ces solvants.

Les solvants à base d'acétonitrile acidifié (acide acétique ou phosphorique) couplés à de l'eau donnent des rendements d'extraction plus faibles pour le triméthoprime, la pénicilline G, l'ibuprofène et quelques androgènes et progestagènes que le solvant acétonitrile/H₂O. C'est également le cas du solvant acétonitrile + acide phosphorique/Na₂EDTA (0.1M). De plus, ce dernier solvant extrait moins bien la plupart des sulfonamides que l'acétonitrile/H₂O. Le dichlorométhane ainsi que l'acétate d'éthyle conduisent à des rendements d'extraction relativement faibles pour la plupart des substances (les résultats sont présentés en **Annexe 5**). Deux solvants permettent d'extraire au mieux tous les composés : l'acétonitrile/H₂O et l'acétonitrile + 1% acide acétique/0.1 M Na₂EDTA (**Graphiques III.22 et III.23**).

Graphique III.22 : Rendements d'extraction pour les composés ionisés positivement lors de l'utilisation des solvants acétonitrile/H₂O et acétonitrile + 1% acide acétique/0.1M Na₂EDTA



Graphique III.23 : Rendements d'extraction pour les composés ionisés négativement lors de l'utilisation des solvants acétonitrile/H₂O et acétonitrile + 1% acide acétique/0.1M Na₂EDTA



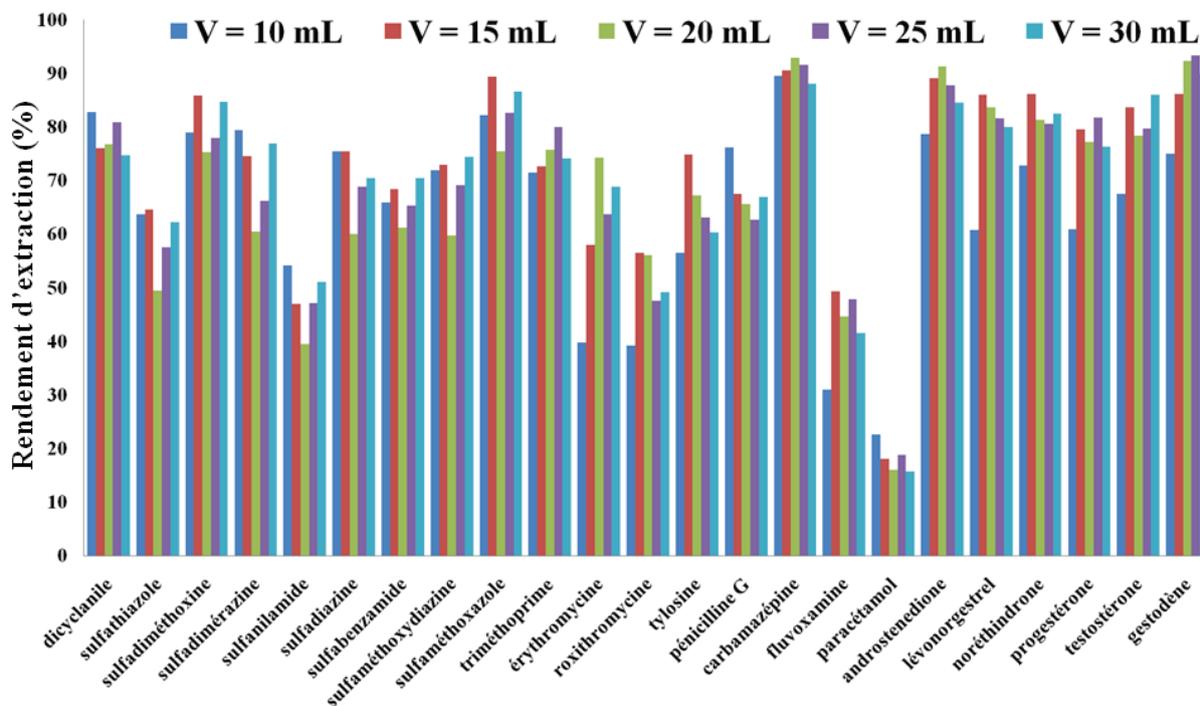
Pour la plupart des composés, les deux solvants affichent des rendements d'extraction comparables (antiparasitaire, sulfonamides, triméthoprime, β -lactame, phenicolé, contaminants humain, androgènes et progestagènes). En revanche, le solvant à base d'EDTA permet des rendements d'extraction plus élevés pour les macrolides (érythromycine, roxithromycine, tylosine), la fluvoxamine et quelques estrogènes. Mais les extraits obtenus avec le solvant à base d'EDTA étant plus chargés, plus visqueux, **notre choix s'est porté sur l'acétonitrile/H₂O**.

Choix du volume de solvant :

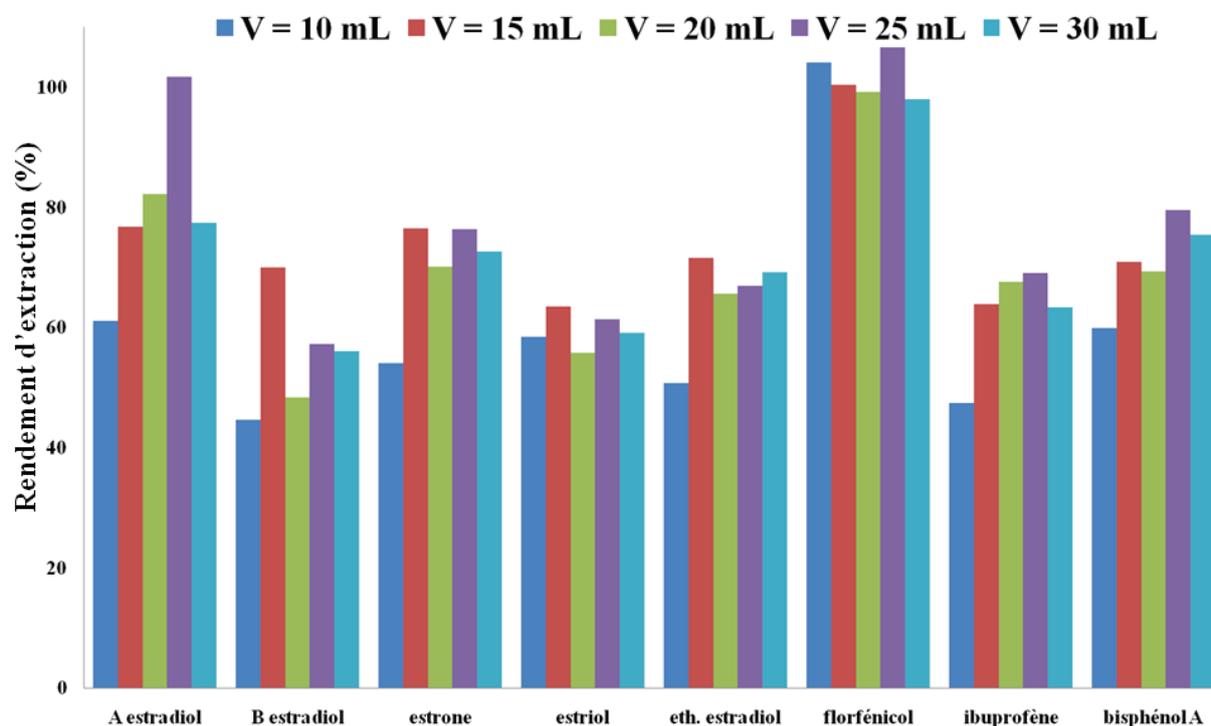
Enfin, nous avons testé plusieurs volumes d'acétonitrile : 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL et 30 mL. Ces essais ont été effectués avec 5 g de sol, le tampon acétate et 10 mL d'eau.

Les **Graphiques III.24 et III.25** présentent les rendements d'extraction pour les différents volumes de solvant testés.

Graphique III.24 : Rendements d'extraction pour les composés ionisés positivement pour les différents volumes d'acétonitrile testés



Graphique III.25 : Rendements d'extraction pour les composés ionisés négativement pour les différents volumes d'acétonitrile testés



Les graphiques ci-dessus montrent que pour certains composés, le volume de solvant d'extraction n'a pas beaucoup d'influence sur les rendements d'extraction. C'est ainsi le cas pour le dicyclanile, les sulfonamides, le triméthoprime, le florfénicol et quelques contaminants humains (carbamazépine et paracétamol). Pour d'autres substances tels que les macrolides, la fluvoxamine, l'ibuprofène, le bisphénol A et les stéroïdes hormonaux (androgènes, progestagènes et estrogènes), nous avons observé une augmentation du rendement d'extraction lorsque le volume d'acétonitrile est passé de 10 à 15 mL. En revanche, les volumes de 20 mL, 25 mL et 30 mL n'augmentent pas considérablement les rendements d'extraction par rapport au volume $V = 15$ mL. **Pour conclure, pour obtenir les rendements d'extraction les plus importants tout en minimisant la consommation de solvant, nous avons choisi le volume $V = 15$ mL.**

2. Purification dSPE (Dispersive Solid Phase Extraction) :

Afin de conserver une étape de préparation d'échantillon simple, rapide et économique dans l'esprit d'une extraction QuEChERS, des purifications dSPE ont été testées. Différentes phases pour purifier des extraits de sol ont déjà été employées dans des travaux antérieurs. En effet, les phases PSA (Primary and Secondary Amine) et PSA/C18 ont été utilisées après une

extraction QuEChERS, lors de l'analyse d'insecticides, de pesticides ou encore de composés chlorés [37-39, 41]. Les phases silice, et surtout alumine et florisol sont également employées après l'extraction de pesticides organochlorés du sol par PLE [44]. Enfin, la phase SAX (Strong Anion eXchange) permet de diminuer les effets matrice en éliminant les acides humiques et fulviques [2, 3, 5, 6, 46, 47].

Nous avons donc testé les sorbants PSA, PSA/C18, florisol, silice, alumine et SAX.

Pour les différents essais, nous avons dopé des extraits de sol à 17 µg/L, obtenus après l'extraction QuEChERS, ce qui a permis d'évaluer les taux de récupération obtenus uniquement après l'étape de purification. L'extraction QuEChERS a été effectuée avec les paramètres déjà optimisés précédemment. Les 10 mL d'extrait acétonitrile dopés ont été transférés dans un tube contenant la phase de purification. Après purification, nous avons récupéré un volume de 8 mL d'extrait purifié. Ce dernier a été évaporé à sec sous flux d'azote à $T = 40^{\circ}\text{C}$ et repris dans 200 µL d'une solution à 95/5 H₂O/méthanol avant d'être injecté en LC-MS/MS.

Les résultats indiquent que la phase PSA est à l'origine de la perte d'un grand nombre d'analytes. C'est notamment le cas pour les sulfonamides (pour la plupart, rendements de purification entre 20% et 50%), la pénicilline G (rendement de purification inférieur à 10%), le florfenicol (rendement de purification de 60%) et les hormones (ayant, pour la majeure partie d'entre elles, des rendements de purification entre 35% et 60%). En ce qui concerne les contaminants humains, l'ibuprofène a un rendement de purification de 20% et le bisphénol A de 40% (les résultats sont présentés en **Annexe 6**).

Comme le présente la **Figure III.9**, la phase PSA possède deux groupements amines ($\text{pK}_a = 10.1$ et 10.9). C'est un échangeur d'anion un peu plus fort que NH_2 .

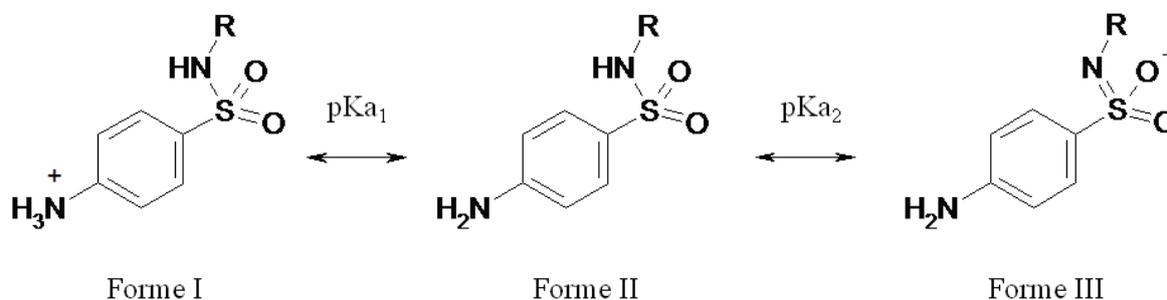
Figure III.9 : Formule chimique de la phase PSA



Il n'est pas surprenant de perdre en quantité importante la pénicilline G ($\text{pK}_a = 2.8$) et l'ibuprofène ($\text{pK}_a = 5.2$) qui possèdent tous deux une fonction acide carboxylique. Une interaction s'opère en effet entre la fonction acide (COO^-) de ces composés et l'amine primaire (NH_3^+) de la phase PSA.

Comme le montre la **Figure III.10**, les sulfonamides (pK_{a2} entre 6 et 7.5) peuvent également être partiellement sous forme anionique. Ils peuvent donc être retenus par le sorbant PSA.

Figure III.10 : Différentes formes des sulfonamides



La phase PSA n'est généralement pas employée pour l'extraction des sulfonamides, ces derniers ayant une forte affinité avec ce sorbant. Pour être certains que ces substances soient neutres ou chargées positivement, quelques équipes utilisent la PSA en ajoutant 0.1% d'acide acétique dans l'acétonitrile lors de l'extraction. Cependant, dans ces conditions acides, la phase est moins performante en terme de purification [48, 49]. Or, nous avons remarqué lors des différents tests de solvant pour l'extraction QuEChERS (partie I.B.1., choix du solvant d'extraction) que l'utilisation de l'acide acétique entraîne, pour certains composés, une diminution du rendement d'extraction. C'est notamment le cas pour le triméthoprime, la pénicilline G, l'ibuprofène ou encore quelques androgènes et progestagènes. C'est pourquoi nous n'avons pas évalué la phase PSA avec, comme solvant d'extraction, l'acétonitrile acidifié.

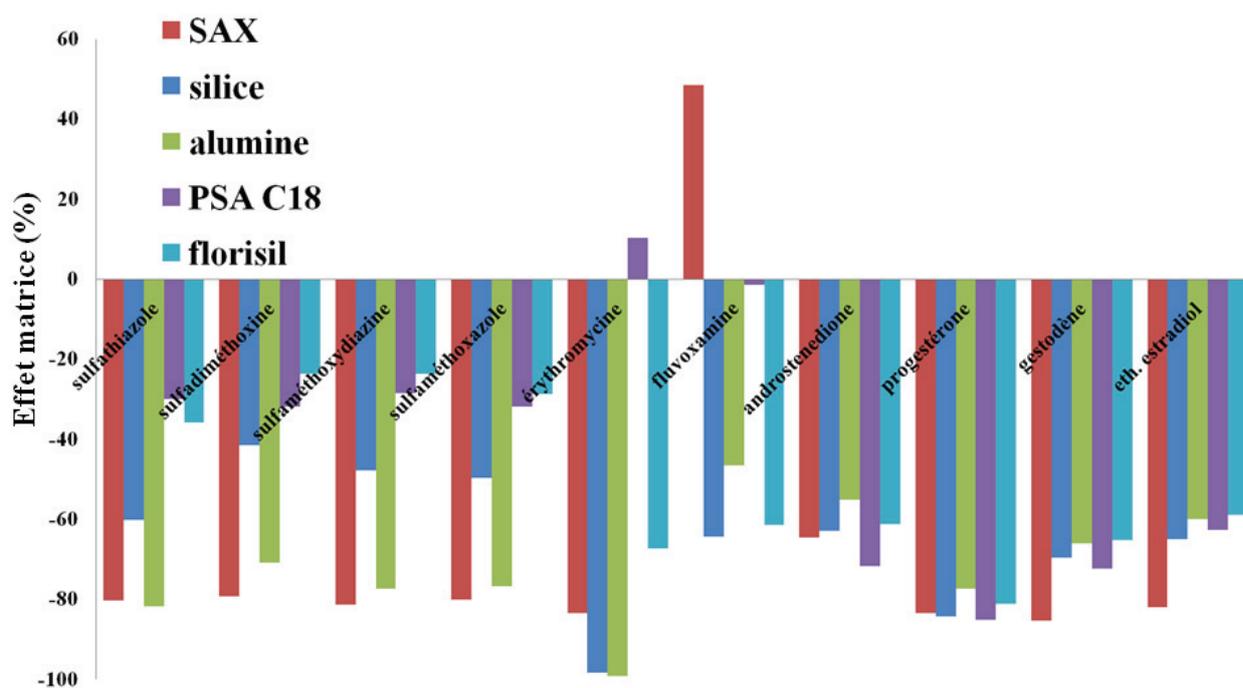
Enfin, lors de l'utilisation de la phase PSA, les résultats concernant les effets matrice ne sont pas très satisfaisants. C'est le cas en particulier des stéroïdes hormonaux dont les signaux subissent des effets matrice compris entre -60% et -90% (résultats exposés en **Annexe 6**).

Etant donné les résultats médiocres obtenus lors de l'utilisation de PSA, cette phase n'a pas été retenue.

Nous avons ensuite comparé les sorbants PSA/C18, SAX, silice, alumine et florisil. Ces phases donnent de relativement bons rendements de purification (supérieurs à 60% pour la plupart des substances, les résultats sont présentés en **Annexe 6**). En revanche, avec la SAX, la silice et l'alumine les effets matrice restent encore très élevés pour la plupart des composés.

Les phases PSA/C18 et florisil, quant à elles, diminuent les effets matrice de certains composés et notamment des antibiotiques. Mais, les stéroïdes hormonaux subissent encore de fortes suppression de signal : de -50% à -80% et de -55% à -85% pour les phases florisil et PSA/C18 respectivement. Le **Graphique III.26** illustre ces résultats en présentant une tendance des effets matrice obtenus lors de l'utilisation des différents sorbants pour dix composés qui incluent quatre antibiotiques vétérinaires (sulfathiazole, sulfadiméthoxine, sulfaméthoxydiazine et érythromycine), deux contaminants humains (sulfaméthoxazole, fluvoxamine) ainsi que quatre stéroïdes hormonaux (androstènedione, progestérone, gestodène et 17 α -éthynylestradiol). Les résultats complémentaires apparaissent en **Annexe 6**.

Graphique III.26 : Exemple d'effets matrice lors des tests de différentes phases (SAX, silice, alumine, PSA/C18 et florisil) pour dix substances



Les résultats les plus satisfaisants sont obtenus avec la phase florisil. Etant donné que les effets matrice sont encore malgré tout très importants pour les stéroïdes hormonaux, des essais supplémentaires ont été effectués avec cette phase.

Puisque la phase florisil est plus efficace avec des solvants peu polaires, l'extrait acétonitrile récupéré a été évaporé à sec à $T = 40^{\circ}\text{C}$ sous flux d'azote et dissous dans un solvant peu

polaire avant d'y ajouter le mélange de purification (florisil + MgSO₄). Différents solvants ont été testés : l'heptane, l'acétone, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane ainsi que les mélanges acétone/heptane (50/50), acétate d'éthyle/heptane (50/50), dichlorométhane/heptane (50/50), dichlorométhane/acétone (50/50), dichlorométhane/méthanol (50/50), acétone/méthanol (50/50) et acétate d'éthyle/acétonitrile (50/50). Pour la plupart d'entre eux, les rendements de purification sont relativement bas (inférieur à 50% notamment pour les antibiotiques). Cela est probablement dû à la faible solubilité des composés analysés dans ce genre de solvants. Néanmoins, certains solvants tels que les mélanges dichlorométhane/méthanol (50/50), et acétone/méthanol (50/50) affichent de relativement bons rendements de purification (supérieurs à 60%). Cependant, pour ces deux derniers solvants, les effets matrice sont encore très élevés, en particulier pour les stéroïdes hormonaux (entre -60 et -90%). Les résultats sont présentés en **Annexe 7**.

A l'instar des purifications SPLE, les dSPE n'ont pas donné de bons résultats, ni en termes de rendements de purification ni en termes d'effets matrice. Des purifications basées sur la SPE offline ont donc été mises en place.

C. Comparaison PLE / QuEChERS :

Les développements réalisés à la fois pour les méthodes PLE et QuEChERS ont permis d'en fixer les paramètres et notamment les solvants d'extraction. Ainsi, pour la PLE, nous avons retenu comme solvant le méthanol alors que l'acétonitrile a été considéré comme étant le solvant le plus adapté pour l'extraction QuEChERS.

Cependant, les différentes méthodes de purification testées telles que la SPLE pour la PLE et la dSPE pour QuEChERS, qui permettraient un « clean-up » rapide, n'ont pas montré de bons résultats en particulier pour diminuer les effets matrice. Il a donc été nécessaire de mettre au point une purification avec des cartouches de SPE.

Les différents tests ont été effectués après un dopage à C = 17 µg/L des extraits obtenus à l'issue de l'extraction par la méthode QuEChERS. Les extraits à l'issue de l'étape de purification ont été repris dans 200 µL d'une solution à 95/5 H₂O/méthanol.

1. Optimisation de la purification :

Cartouche SiOH :

Une méthode de purification, utilisant une cartouche SiOH, a déjà été utilisée avec succès au laboratoire lors de purification d'extraits de boues [50]. C'est pourquoi nous l'avons testée.

Après l'étape d'extraction, l'extrait a été évaporé à sec et repris dans 10 mL d'un mélange heptane/acétone (30/70).

Cette méthode permet d'obtenir de bons rendements de purification (supérieurs à 60% pour la plupart des substances). Cependant, les effets matrice restent très élevés (>70% pour l'ensemble des composés). **Nous n'avons donc pas poursuivi nos investigations avec cette cartouche de purification.** Les résultats de cette purification sont présentés en **Annexe 8**.

Cartouche SAX + StrataX en tandem :

A l'issue d'une étape d'extraction de sols ou de boues, afin de réduire la quantité de matière organique composée essentiellement d'acides humiques et fulviques, deux méthodes sont souvent utilisées.

La première consiste à ajuster le pH à 7 pour réduire le degré de rétention des acides humiques et fulviques sur la cartouche polymère. Nous avons d'ores et déjà mis au point une telle méthode pour extraire et purifier les échantillons d'eaux (procédure développée dans le chapitre I de la partie III). Etant donné que les extraits de sol sont plus chargés que les eaux, **il en résulte malheureusement encore de très forts effets matrice notamment pour les stéroïdes hormonaux.** Ces derniers subissent des suppressions de signal entre -55% et -70% (résultats exposés en **Annexe 9** pour les androgènes et les progestagènes).

La seconde méthode, qui donne en général des résultats convaincants, est basée sur l'utilisation de deux cartouches en tandem : une SAX, à échange anionique et une polymère [2, 3, 5, 6, 22, 46, 47]. La cartouche SAX permet d'éliminer les interférents tels que les acides humiques et fulviques alors que la StrataX permet de retenir tous les composés cibles.

Dans notre cas, après l'extraction, l'extrait a été évaporé à sec et repris dans 10 mL d'une solution aqueuse (97/3 H₂O/MeOH) pour être ensuite passé à travers les cartouches SAX et StrataX. La présence de méthanol permet une meilleure dissolution des composés. Cependant, un pourcentage plus élevé que 5% pourrait affecter les rendements de purification (lors du passage dans la cartouche polymère). C'est pourquoi nous avons fixé le pourcentage à 3% de MeOH.

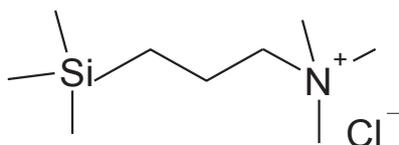
Plusieurs méthodologies sont retrouvées dans la littérature. Certaines n'utilisent que de l'eau [46], et d'autres utilisent une solution à base d'acide citrique pour la dissolution de l'extrait de sol ainsi que pour le conditionnement et le lavage de la cartouche [2, 3, 5, 22, 47]. Par

conséquent, nous avons effectué plusieurs tests, avec et sans acide citrique et à différents pHs (7, 4.3 et 2.5). La solution avec l'eau a été ajustée à pH = 2.5 et 4.3 avec une solution d'acide sulfurique et à pH = 7 avec de la soude. La solution d'acide citrique, quant à elle, est à une concentration de 0.04M en acide (pH = 2.5). Les pHs 4.3 et 7 ont été ajustés avec de la soude. Pour les essais réalisés sans acide citrique, le pH 7 permet de mieux extraire le dicyclanile (qui est sous forme non chargée dans ces conditions) ainsi que l'érythromycine. Cette dernière n'est pas extraite lors de l'utilisation de pHs plus faibles. En effet, dans ce cas, elle est probablement dégradée, la cétone présente dans le cycle lactone étant instable à pH acide [51]. En revanche, le pH 7 donne d'assez faibles rendements de purification pour les sulfonamides ainsi que les composés acides tels que la pénicilline G (**Tableau III.8**). Cela est probablement dû au fait que dans ces conditions, ces substances sont totalement ou partiellement ionisées négativement. Par conséquent, elles sont au moins partiellement retenues par la cartouche SAX. En effet, des interactions électrostatiques s'établissent avec la charge + de cette phase (**Figure III.11**). Nous n'avons donc pas retenu le pH 7.

Tableau III.8 : Rendements de purification des sulfonamides et de la pénicilline G lors de l'utilisation de la solution à base d'eau ajustée à pH 7

Composés	Rendements de purification (%)
sulfonamides	
sulfathiazole	37
sulfadiméthoxine	32
sulfadimérazine	48
sulfanilamide	48
sulfadiazine	45
sulfabenzamide	8
sulfaméthoxydiazine	43
sulfaméthoxazole	29
β-lactame	
pénicilline G	31

Figure III.11 : Formule chimique de la phase SAX

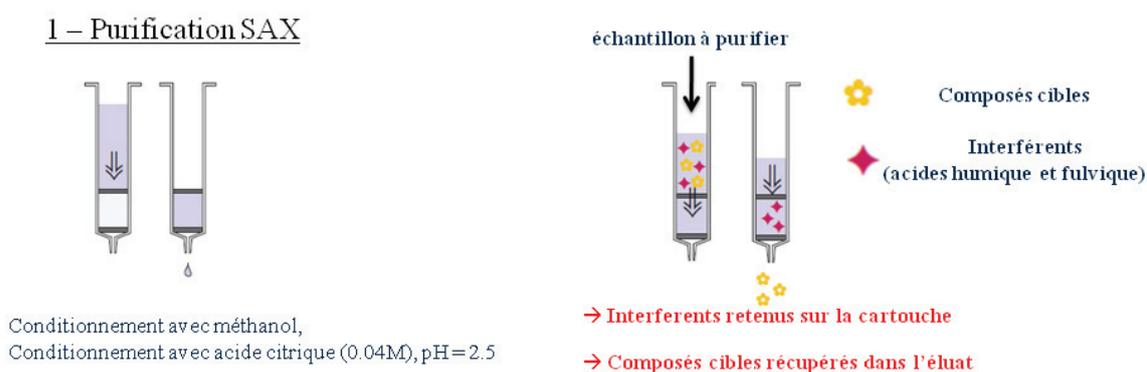


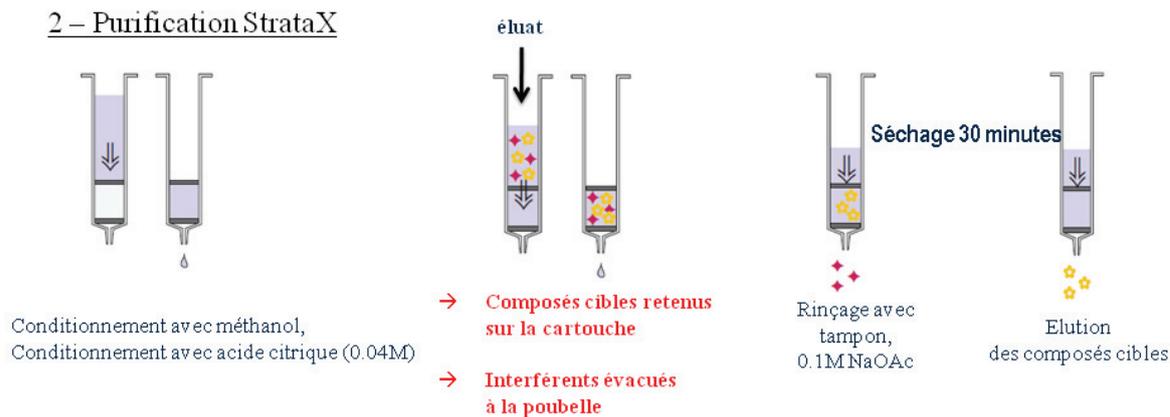
citrique) a été retenu. D'autres auteurs ayant utilisé la phase SAX pour purifier des extraits de sol ont également choisi de fixer le pH entre 2 et 3 [47, 52]. En effet, un pH de 2.5 permet que tous les composés à analyser soient neutres ou chargés positivement (voir tableaux des pK_a des composés – Partie I, synthèse bibliographique). Ainsi, ils ne sont pas retenus par la cartouche SAX. Toutefois, les acides humiques et fulviques qui possèdent des groupements acides carboxyliques sont chargés négativement et sont donc retenus par la phase SAX. En effet, les acides humiques ont des pK_a s entre -2 et 9, une partie des ces composés sont donc ionisés à pH 2.5 [53].

L'éluat récupéré après la purification SAX, contenant les composés d'intérêt, est ensuite passé à travers la cartouche StrataX. Cette dernière permet une purification supplémentaire ainsi qu'une préconcentration de l'échantillon. La plupart des méthodes SPE utilisant l'acide citrique [2, 3, 5, 47] effectuent les étapes suivantes sur la cartouche polymère : conditionnement avec du méthanol puis avec la solution à base d'acide citrique (0.04 M), chargement de l'échantillon, lavage de la cartouche avec la solution d'acide citrique puis une solution d'acétate de sodium (NaOAc) ou d'acétate de potassium (KOAc) et séchage de la cartouche. Enfin, cette dernière est lavée avec du méthanol.

La **Figure III.12** expose les étapes de la purification mise en place dans notre étude.

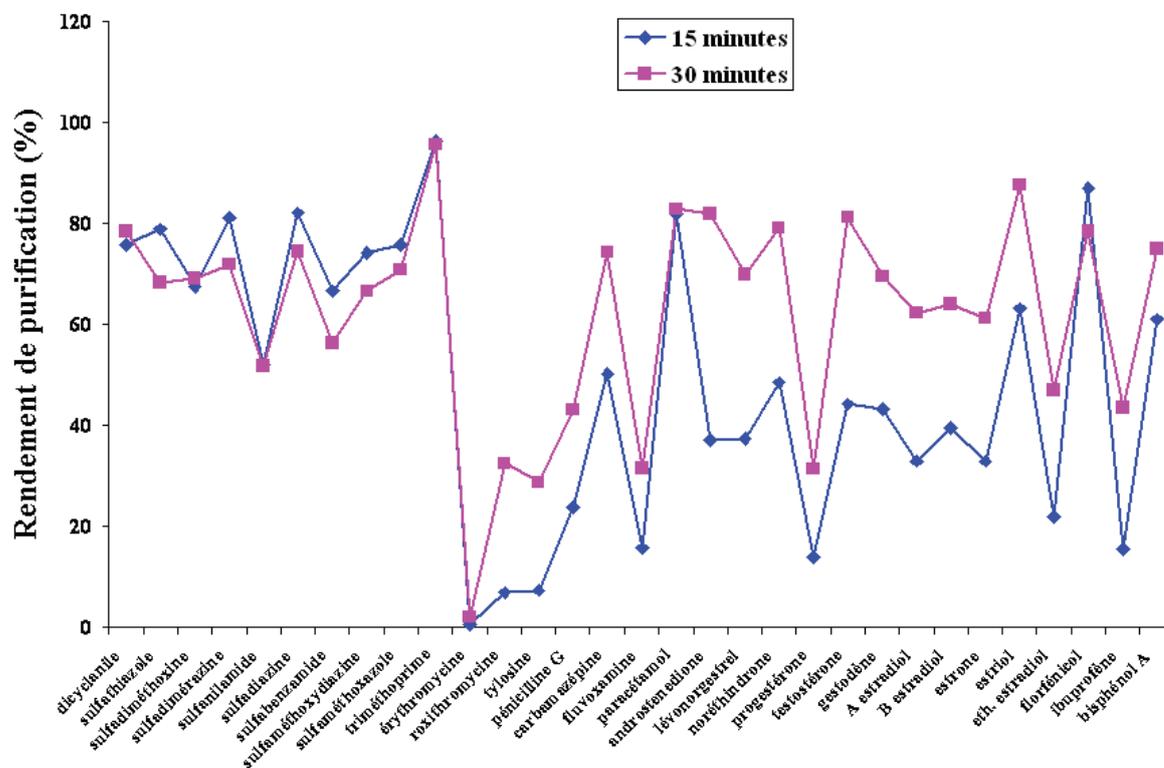
Figure III.12 : Principe de la purification SAX + StrataX





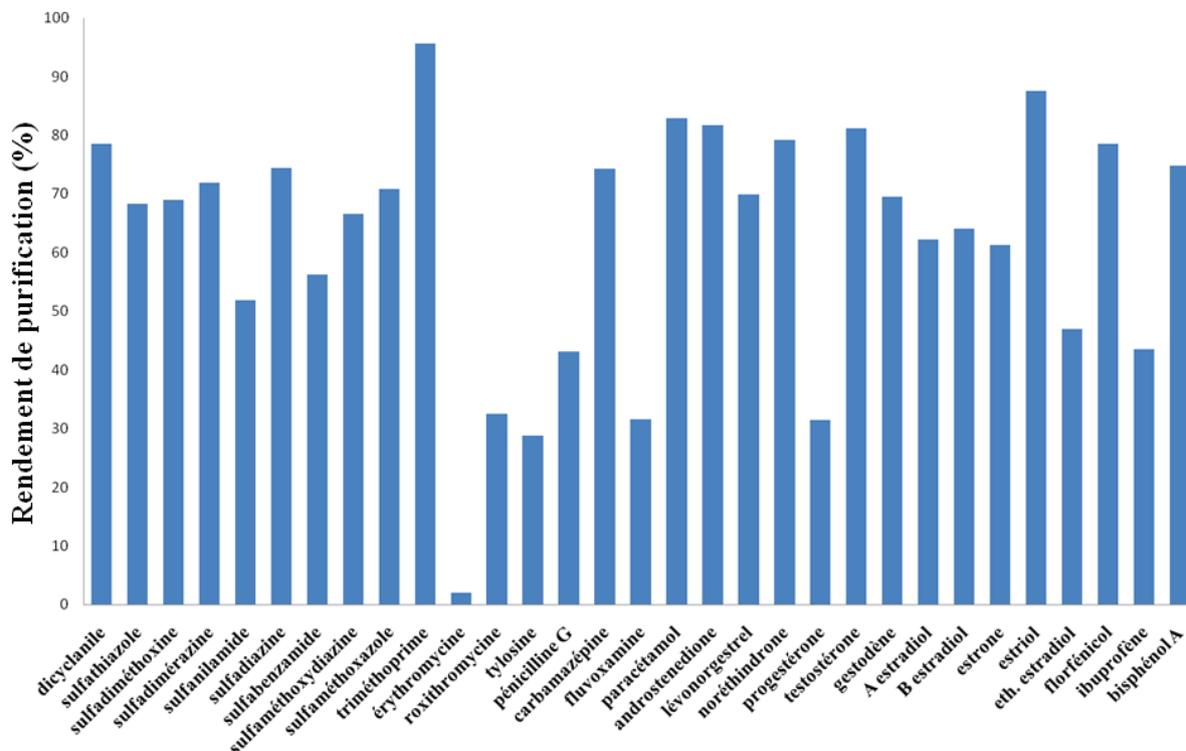
Deux temps de séchage de la cartouche StrataX ont été testés : 15 et 30 minutes. Peu de différence a été observée pour les composés antibiotiques. En revanche, un temps de séchage de 30 minutes permet d'augmenter significativement les rendements de purification des stéroïdes hormonaux. Nous avons donc retenu le temps de séchage de 30 minutes (Graphique III.28).

Graphique III.28 : Comparaison des temps de séchage de 15 minutes et 30 minutes pour la cartouche StrataX



Les rendements de purification obtenus à l'issue de la purification optimisée (SAX + StrataX) sont exposés sur le **Graphique III.29** (pour un dopage initial à 17 µg/L).

Graphique III.29 : Rendements de la purification SAX + StrataX pour les 31 analytes



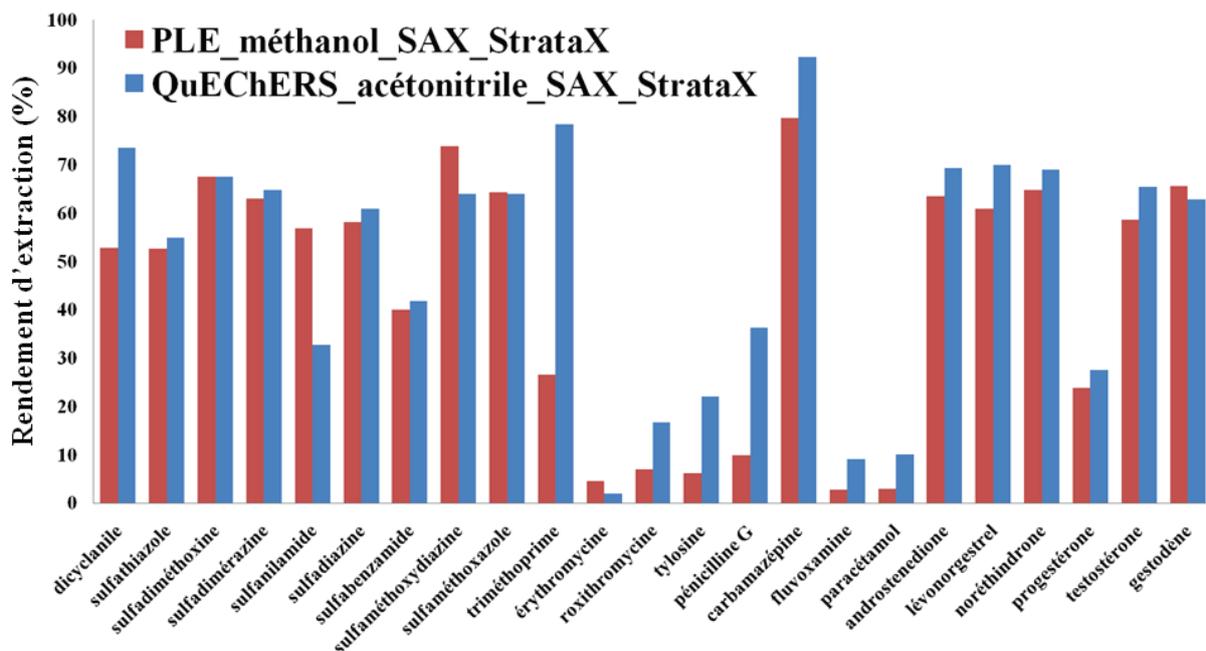
Les sulfonamides présentent des rendements de purification compris entre 65% et 75% ce qui est en accord avec la littérature [5]. Le triméthoprim a un rendement proche de 100%. Le dicyclanile et le florfenicol ont des rendements de purification d'environ 80%. Ceux des stéroïdes hormonaux sont compris entre 60% et 90%. Les contaminants humains, et notamment l'ibuprofène, le sulfaméthoxazole, la carbamazépine et le paracétamol présentent des rendements de purification de 44%, 71%, 75% et 83% respectivement. Ces résultats sont comparables à ceux retrouvés dans la littérature qui indique des valeurs de 50%, 60%, 80% et 70% respectivement [46]. En revanche, les macrolides et la pénicilline G ont des rendements de purification relativement faibles : entre 20 et 40% (sauf l'érythromycine qui a un rendement de purification de 2%). A faibles pHs, les macrolides sont peu présents dans l'extrait, peut-être à cause de leur immédiate et forte dégradation dans ces conditions [51]. Ceci est confirmé par M. Gros *et al.* qui ont déjà mentionné que l'érythromycine n'est pas du tout extraite par SPE à pH 2 [54]. Dans ces conditions, l'érythromycine ne pourra pas être quantifiée puisqu'elle expose un rendement de purification trop faible. Toutefois, dans notre

étude multi-résidus, il a fallu accepter quelques compromis. Effectivement, de nombreuses autres substances seraient chargées négativement à un pH plus élevé et ainsi retenues par la cartouche SAX.

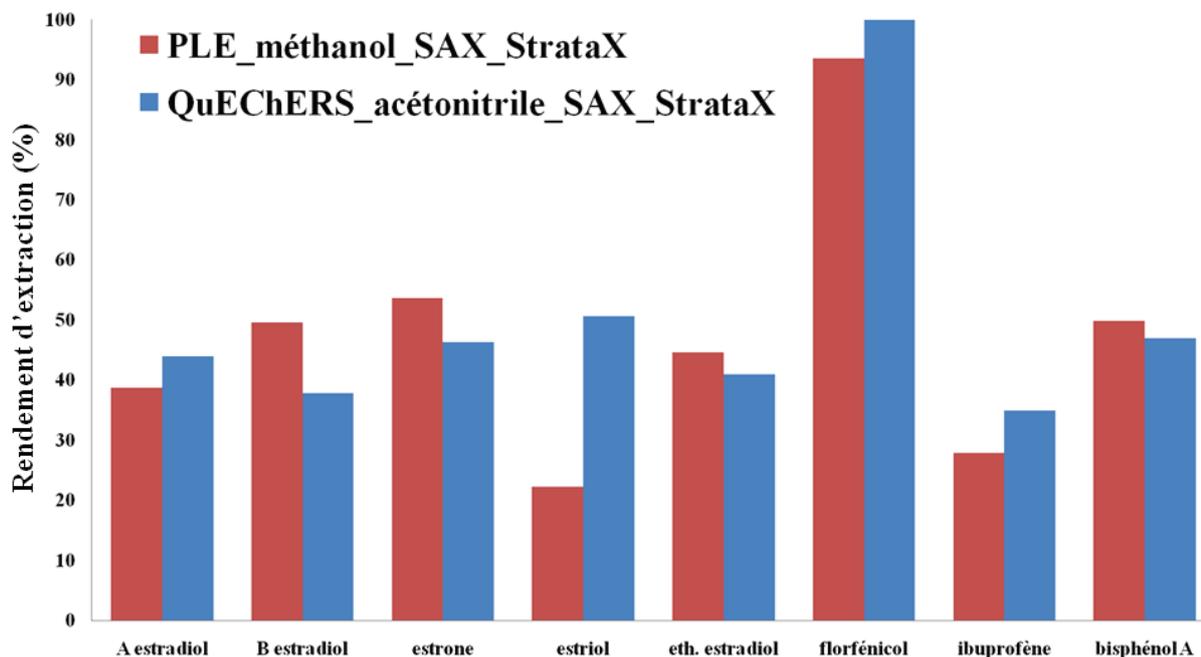
2. Application de la purification aux extraits PLE et QuEChERS :

La purification SAX + StrataX a été appliquée parallèlement aux extraits obtenus par PLE et QuEChERS. Nous avons donc comparé l'efficacité de ces deux protocoles. Les taux de récupération sont exposés ci-dessous (**Graphiques III.30 et III.31**). Ils ont été obtenus pour un dopage initial du sol à 50 ng/g. Les extraits ont été évaporés à sec puis repris dans 200 µL d'une solution à 95/5 H₂O/méthanol.

Graphique III.30 : Rendements d'extraction pour PLE et QuEChERS suivies de la purification SAX + StrataX pour les composés ionisés positivement



Graphique III.31 : Rendements d'extraction pour PLE et QuEChERS suivies de la purification SAX + StrataX pour les composés ionisés négativement



Pour certains des composés, les rendements d'extraction PLE et QuEChERS sont proches. C'est le cas pour le florfénicol, la majorité des sulfonamides, des androgènes, des progestagènes, des estrogènes et des contaminants humains tels que la carbamazépine, l'ibuprofène et le bisphénol A. En revanche, les rendements d'extraction sont meilleurs, pour certaines substances, lors de l'extraction QuEChERS. C'est le cas pour le dicyclanile, le triméthoprim, les macrolides (roxithromycine et tylosine), la pénicilline G, la fluvoxamine, le paracétamol et l'estriol qui en outre sont pour la plupart des composés critiques. Globalement la méthode basée sur QuEChERS présente donc de meilleurs rendements.

Nous avons également comparé les effets matrice (**Graphiques III.32 et III.33**) obtenus suite aux méthodes par PLE et QuEChERS suivies de la purification SAX + StrataX.

Pour les composés ionisés positivement, les effets matrice sont peu différents quelle que soit la méthode utilisée (PLE ou QuEChERS). Nous avons simplement remarqué que, lorsque la PLE est employée, les effets matrice sont un peu plus faibles pour quelques sulfonamides et plus élevés pour les stéroïdes hormonaux. En revanche, l'érythromycine affiche un effet matrice nettement plus important lors de l'utilisation de la PLE.

Pour les composés ionisés négativement, nous n'avons observé aucune différence significative entre les deux types d'extractions.

En conclusion, étant donné les résultats présentés ci-dessus concernant les deux types d'extractions, nous avons retenu l'extraction QuEChERS. Elle permet d'obtenir, pour certaines substances, des rendements plus élevés. De plus, cette procédure est facile à mettre en place, plus rapide et économique que la méthode par PLE. En effet, la PLE nécessite l'investissement d'un lourd matériel. De plus, la préparation de cellules PLE dépend de l'utilisateur et demande beaucoup de temps contrairement à la procédure QuEChERS. Par conséquent, en mettant en place l'extraction QuEChERS, un grand nombre d'échantillons pourront être analysés, ce qui permet d'envisager son utilisation pour de larges campagnes d'analyse et son transfert vers des laboratoires départementaux par exemple.

II. Validation de la méthode :

La procédure d'extraction basée sur QuEChERS et utilisant la purification SAX + StrataX, a été validée pour les 31 composés étudiés, suivant les recommandations de la norme ICH/2005 (Figure III.13).

La linéarité, la répétabilité, la précision intermédiaire, les rendements d'extraction ainsi les limites de détection et de quantification méthodologiques (MLDs et MLQs) ont été évaluées.

Figure III.13 : Procédure de la validation basée sur la norme ICH/2005

Validation de la méthode (ICH/2005) – QuEChERS – SAX/StrataX:

- Linéarité (gamme de concentration effectuée tous les jours C1 -> C9/10)
- Répétabilité (5 essais, 3 concentrations)
- Précision intermédiaire (3 jours, 3 concentrations)
- Rendement d'extraction (5 essais, 3 concentrations)
- limites de détection et de quantification de la méthode (MLD et MLQ)

C1-4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
0.01 ng/g	1 ^{er} jour		2 ^{ème} jour		3 ^{ème} jour	
0.05 ng/g	5 × C5	5 ng/g	5 × C7	300 ng/g	5 × C9	1000 ng/g
0.1 ng/g						
0.5 ng/g	1.5 ng/g		50 ng/g		500 ng/g	

Les résultats de la validation sont exposés dans le **Tableau III.9**.

Tableau III.9 : Paramètres de validation : linéarité, MLDs et MLQs (ng/g), rendements d'extraction (R, %), répétabilité et précision intermédiaire (coefficients de variation, CV, %) réalisés à trois concentrations (1.5 ng/g, 50 ng/g et 500 ng/g)

Composés	Gamme	R ²	MLD (ng/g)	MLQ (ng/g)	R (%)			Répétabilité (CV, %)			Précision intermédiaire (CV, %)			
					50 ng/g	500 ng/g	1.5 ng/g	50 ng/g	1.5 ng/g	500 ng/g	1.5 ng/g	50 ng/g	500 ng/g	
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES														
antiparasitaire														
dicyclanile	0.05-1000	0.998	0.024	0.080	71	74	80	4	4	4	5	5	8	14
sulfonamides / triméthoprime														
sulfathiazole	0.01-1000	0.993	0.011	0.036	45	55	76	5	5	5	5	6	2	21
sulfadiméthoxine	0.01-500	0.991	0.009	0.026	53	68	107	4	4	4	3	1	6	9
sulfadimérazine	0.01-1000	0.9937	0.005	0.015	55	65	98	8	6	6	6	11	6	9
sulfanilamide	50-1000	0.995	7	17	ND	33	34	ND	15	12	12	ND	20	28
sulfadiazine	0.05-1000	0.997	0.020	0.055	55	61	84	5	4	5	5	7	8	15
sulfabenzamide	0.01-1000	0.996	0.010	0.024	35	42	76	5	7	3	3	4	9	4
sulfaméthoxydiazine	0.01-1000	0.993	0.014	0.048	55	64	97	5	6	6	6	7	7	14
sulfaméthoxazole	0.05-1000	0.995	0.035	0.110	51	64	100	7	7	4	4	11	12	6
triméthoprime	0.01-1000	0.999	0.006	0.019	75	79	93	7	2	6	6	10	4	13
macrolides														
érythromycine	1.5-1000	0.998	0.700	2.140	2	2	2	20	13	11	11	37	12	9
roxithromycine	0.05-1000	0.999	0.046	0.155	14	17	13	20	11	28	16	16	25	15
tylosine	0.1-125 125-1000	0.998 0.990	0.100	0.330	17	23	26	14	17	36	33	33	17	10
β-lactame														
pénicilline G	0.5-500	0.998	0.220	0.730	29	37	51	19	8	9	31	31	9	22
phénicolé														
florfenicol	0.01-130 130-1000	0.997 0.994	0.004	0.013	94	102	114	12	6	3	31	31	26	8

CONTAMINANTS HUMAINS

médicaments humains													
carbamazépine	0.01-130 130-1000	0.998 0.994	0.006	0.018	69	93	119	6	3	2	6	8	5
fluvoxamine	1.5-1000	0.993	0.640	2.200	11	9	24	15	8	17	14	10	8
paracétamol	1.5-1000	0.995	0.900	3	18	10	23	7	8	7	25	26	11
ibuprofène	0.05-1000	0.998	0.030	0.100	71	35	47	16	4	18	25	23	33
plastifiant													
bisphénol A	0.5-1000	0.998	0.520	0.940	68	47	82	13	8	16	10	6	1
STEROIDES HORMONAUX													
androgènes													
androstènedione	0.05-500	0.991	0.017	0.072	76	70	98	14	4	5	8	5	13
testostérone	0.05-500	0.996	0.050	0.160	80	66	84	6	2	8	12	6	7
progestagènes													
lévonorgestrel	0.5-500	0.995	0.420	1.400	88	70	98	18	5	14	28	9	21
noréthindrone	0.5-500	0.996	0.140	0.460	80	70	89	8	3	6	4	7	12
progestérone	0.05-1000	0.994	0.052	0.180	74	28	61	11	8	21	7	23	17
gestodène	0.5-500	0.995	0.420	1.140	82	63	93	12	7	9	14	14	14
estrogènes													
17 α -estradiol	0.5-500	0.995	0.150	0.500	41	44	96	15	6	20	13	9	12
17 β -estradiol	0.5-500	0.996	0.140	0.500	47	38	80	17	11	20	18	14	18
estrone	0.1-500	0.995	0.060	0.180	46	47	104	11	5	18	11	4	13
estriol	0.5-500	0.997	0.170	0.550	48	51	91	16	5	4	4	8	16
17 α -éthinyloestradiol	0.5-500	0.996	0.245	0.900	47	41	96	20	11	20	10	15	27

La méthode QuEChERS – SAX/StrataX a été validée. Nous obtenons des **MLDs entre 0.04 et 0.9 ng/g et des MLQs entre 0.013 et 3 ng/g** (sauf la sulfanilamide qui a une MLD de 7 ng/g et une MLQ de 17 ng/g).

Tout d'abord, en ce qui concerne la linéarité de la méthode, la valeur du coefficient de corrélation (R^2) **est supérieure à 0.99** pour toutes les substances. Quelques composés tels que les stéroïdes hormonaux, et notamment les estrogènes, sont linéaires uniquement jusqu'à 500 ng/g. D'autres substances, la tylosine, le florfenicol et la carbamazépine montrent deux domaines de linéarité sur cette large gamme de concentration: une première linéarité jusqu'à environ 130 ng/g et une deuxième de 130 ng/g à 1000 ng/g.

Nous avons obtenu de bons résultats pour la répétabilité. La majorité des composés présentent des répétabilités **inférieures à 10%**. Les coefficients de variation (CV) des autres substances sont **inférieurs à 20%** à l'exception de la roxithromycine et la tylosine qui ont des CV, à la concentration de 500 ng/g, de 28% et 36% respectivement. **La précision intermédiaire est inférieure à 20% pour la plupart des substances.** La précision intermédiaire des autres composés est **inférieure à 30%** excepté pour l'érythromycine à 1.5 ng/g et l'ibuprofène à 500 ng/g. Effectivement, ces substances affichent des CV de 37% et 33% respectivement.

En ce qui concerne les rendements d'extraction, les **sulfonamides ont des rendements d'extraction entre 35% et 107%**. Ils sont compris, pour le **triméthoprime, le dicyclanile et le florfenicol, entre 70% et 114%**. Les **macrolides et la pénicilline G** ont des rendements d'extraction plus faibles (**entre 15% et 50%**), ce qui s'explique par la perte de ces composés lors de l'étape de purification. **Les contaminants humains ont des rendements d'extraction variant de 35% à 119%. Enfin, les stéroïdes hormonaux ont des valeurs comprises entre 45% et 104%.**

Les résultats obtenus dans notre étude ont été comparés à ceux issus de la littérature. Aucune comparaison avec des travaux utilisant une méthode d'extraction inspirée par QuEChERS ne peut être effectuée puisque cette procédure n'a jamais été employée pour extraire des antibiotiques vétérinaires, des contaminants humains et des stéroïdes hormonaux de la matrice solide, et encore moins simultanément. Nos travaux sont donc innovants. Notre méthode a permis d'obtenir des rendements d'extraction comparables à ceux mentionnés par A. Karci et

I. A. Balcioglu, ces derniers ayant utilisé une extraction par ultrasons [21]. En effet, ces auteurs ont rapporté des valeurs, pour une concentration de 200 ng/g, de 70% pour la sulfadiazine et le sulfaméthoxazole et de 100% pour le sulfathiazole. Notre procédure a permis, quant à elle, d'obtenir des rendements d'extraction de 61%, 64% et 55%, à 50 ng/g, et de 84%, 100% et 76%, à 500 ng/g, pour la sulfadiazine, le sulfaméthoxazole et le sulfathiazole respectivement.

En ce qui concerne les médicaments humains, nous avons trouvé des valeurs comparables à celles de P. Vasquez-Roig *et al.* Ces derniers ont effectué une PLE sur un sol limoneux faiblement fourni en matière organique [46]. Ils ont obtenus un rendement d'extraction de 86% à 50 ng/g pour la carbamazépine. Nous avons obtenu, pour la même concentration, une valeur de 93% pour ce composé.

Enfin, en ce qui concerne les estrogènes, Z. Zhang *et al.* [34] ayant utilisé la procédure PLE, ont rapporté des rendements d'extraction variant entre 70% et 90% à une concentration d'environ 100 ng/g. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus avec notre méthodologie, cette dernière donnant des rendements d'extraction entre 40 et 50% à 50 ng/g et entre 80 et 104% à 500 ng/g.

Quelques résultats mentionnés dans la littérature, obtenus en utilisant la PLE, sont légèrement plus élevés que ceux trouvés dans notre étude. Cependant des sols limoneux, sablo-limoneux, sableux sont souvent utilisés. Ces types de sols engendrent moins d'interaction entre les composés à extraire et la matrice que le sol utilisé dans notre travail (limono-argileux) qui contient une importante quantité d'argile (32.4 %) [5, 55]. De plus, une étude multi-résidus a été réalisée incluant à la fois des antibiotiques et des stéroïdes hormonaux alors que les travaux mentionnés précédemment se focalisent uniquement sur une catégorie de produits (soit les antibiotiques, soit les stéroïdes hormonaux). Enfin, les rendements d'extraction dépendent fortement de la concentration. Les comparaisons entre les travaux effectués, utilisant des concentrations diverses, doivent donc être parfois nuancées.

Les valeurs de MLQs sont, pour la plupart des composés, inférieures au ng/g. Elles sont comparables ou inférieures à celles rapportées par la littérature. En effet, M. P. Schüsener *et al.* [4] ont mentionné des MLQs d'environ 1 ng/g pour les macrolides. D'autres auteurs [5] ont rapporté des MLQs supérieures à 1 ng/g pour la sulfadiazine et l'érythromycine alors que nous avons obtenu respectivement des valeurs de 0.055 ng/g et 2.14 ng/g avec notre méthode.

Dans notre étude, nous avons trouvé, pour les sulfonamides, des MLQs inférieures à celles rapportées par certains travaux antérieurs.

Concernant les médicaments humains, nous avons obtenu des valeurs de MLDs comprises entre 0.006 ng/g et 0.9 ng/g pour la carbamazépine, le paracétamol et l'ibuprofène tandis que P. Vasquez-Roig *et al.* [46] rapportent des valeurs variant entre 0.1 et 1.8 ng/g.

Enfin, Z. Zhang *et al.* [34] rapportent des MLQs comprises entre 0.06 et 0.64 ng/g pour les estrogènes. Ces valeurs sont légèrement plus faibles que celles obtenues avec notre procédure. Cela peut s'expliquer par le fait que ces auteurs s'intéressent uniquement aux estrogènes alors que notre travail consistait à mettre au point une méthode multi-résidus et multi-familles.

Le facteur de préconcentration étant important (50 fois : 10 mL d'extrait évaporé et dissous dans 200 µL avant l'analyse), nous avons réussi à obtenir de faibles MLDs et MLQs. De plus, ces faibles valeurs ont été favorisées par une recherche approfondie pour diminuer les effets matrice.

Les effets matrice ont également été évalués à trois concentrations : 1.5 ng/g, 5 ng/g et 50 ng/g. Le **Tableau III.10** présente les effets matrice pour chacun des composés obtenus avec et sans purification SPE (SAX + StrataX).

Tableau III.10 : Effets matrice pour chacun des composés obtenus avec purification SPE à trois concentrations (1.5 ng/g, 5 ng/g et 50 ng/g) et sans purification (50 ng/g)

Composés	Avec purification SPE (SAX + StrataX)			Sans purification
	1.5 ng/g	5 ng/g	50 ng/g	50 ng/g
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES				
antiparasitaire				
dicyclanile	-11	-24	-30	-17
sulfonamides / triméthoprime				
sulfathiazole	-34	-27	-31	-65
sulfadiméthoxine	-27	-23	-31	-55
sulfadimérazine	-29	-22	-30	-55
sulfanilamide	ND	ND	-78	-92
sulfadiazine	-49	-40	-42	-47
sulfabenzamide	-47	-36	-41	-69
sulfaméthoxydiazine	-33	-20	-30	-46
sulfaméthoxazole	-19	-4	-20	-53
triméthoprime	-19	-5	-6	-12
macrolides				
érythromycine	18	13	0.6	-95

roxithromycine	162	203	242	40
tylosine	108	116	108	58
β-lactame				
pénicilline G	-19	-22	-34	-73
phénicolé				
florfénicol	-23	-17	-13	-25
CONTAMINANTS HUMAINS				
médicaments humains				
carbamazépine	-26	-18	-13	-23
fluvoxamine	122	132	143	-74
paracétamol	-40	-26	-33	-20
ibuprofène	-29	-26	-33	-76
plastifiant				
bisphénol A	-67	-64	-55	-77
STEROIDES HORMONAUX				
androgènes				
androstènedione	-44	-40	-47	-66
testostérone	-42	-42	-42	-66
progestagènes				
lévonorgestrel	-31	-20	-39	-83
noréthindrone	-48	-48	-53	-70
progestérone	-59	-36	-33	-92
gestodène	-56	-43	-49	-83
estrogènes				
17α-estradiol	-48	-44	-40	-85
17β-estradiol	-61	-58	-51	-89
estrone	-39	-38	-41	-82
estriol	-36	-31	-34	-48
17α-éthinyloestradiol	-42	-44	-45	-87

Suite à la **purification SAX + StrataX**, nous obtenons des **effets matrice compris entre -6% et -55% pour la plupart des substances à 50 ng/g** à l'exception de la sulfanilamide, des macrolides et de la fluvoxamine.

En ce qui concerne les sulfonamides, les effets matrice sont compris entre -20% et -40% (à l'exception de la sulfanilamide qui a une très forte suppression de signal : -78% à 50 ng/g). Ils sont compris entre -10% et -30% pour le dicyclanile et le florfénicol. Pour les macrolides, les effets matrices sont positifs, jusqu'à 242% pour la roxithromycine. La pénicilline G a un effet matrice de -34%.

Les contaminants humains affichent des effets matrice soit positifs (la fluvoxamine a un effet matrice de 143%) soit négatifs (jusqu'à -40% à l'exception du bisphénol A qui a des effets matrice entre -55% et -67%).

Enfin, les stéroïdes hormonaux ont des effets matrice entre -20% et -60%, ces derniers sont d'ailleurs pour la plupart des composés inférieurs à -50%.

Tous ces effets matrice ont été fortement diminués avec la purification SAX + StrataX notamment pour les stéroïdes hormonaux. En effet, lorsque l'étape de purification n'est pas réalisée, ces derniers subissent des effets matrice qui peuvent atteindre -90%.

III. Etude statistique : influence des paramètres du sol sur les rendements d'extraction et les effets matrice :

Dans ce chapitre, nous allons présenter l'influence des différents paramètres du sol (la CEC, capacité d'échange cationique, ainsi que les pourcentages en argile, en limon, en sable et en carbone organique) sur les rendements d'extraction et les effets matrices. Dans ce but, nous avons évalué ces deux variables (rendements d'extraction et effets matrices) pour onze sols ayant des propriétés différentes, sur les 23 composés ionisés positivement (antibiotiques vétérinaires, contaminants humains et stéroïdes hormonaux). Les sols utilisés pour cette étude ainsi que leurs paramètres sont présentés **Tableau III.11** (sols A et H à Q).

Tableau III.11 : Propriétés des différents sols

Sols	Texture sol	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	CO* (%)	N _{tot} * (%)	MO* (%)	pH	CEC (cmol+/kg)
A	limono-argileux	32.4	45.1	22.5	1.73	0.173	2.99	6.25	15.6
H	limoneux	14.6	37.8	47.6	2.38	0.116	4.11	8.36	5.83
I	limoneux fin	23.1	60.2	16.7	3.35	0.199	5.8	8.07	13.3
J	limoneux-sableux	10	20.9	69.1	0.731	0.04	1.26	8.69	4.19
K	limoneux-sableux	9.5	21.5	69	3.76	0.207	6.5	8.07	8.72
L	limoneux-argileux fin	31	50.8	18.2	9.37	0.922	16.2	7.62	35.8
M	limoneux	27.4	32.5	40.1	2.27	0.221	3.93	8.02	14.9
N	limoneux	26.9	33	40.1	6.47	0.606	11.2	7.67	22
O	limoneux	26.3	46.5	27.2	2.05	0.188	3.54	8.25	13.4
P	limoneux	26.1	35	38.9	3.75	0.297	6.48	7.51	17.1
Q	limoneux-argileux	28.7	46.8	24.5	3.48	0.322	6.03	7.75	19.8

CO : Carbone Organique, * N_{tot} : Azote total, * MO : Matière Organique

La détermination des propriétés a été effectuée par le laboratoire d'analyses des sols d'Arras (LAS-INRA).

A. Extraction des différents sols :

Avant l'analyse, les sols séchés ont été broyés et tamisés à 0.63 mm. Pour chaque sol, nous avons effectué la méthode basée sur l'extraction QuEChERS suivie de la purification SAX + StrataX, validée précédemment. Les rendements d'extraction et effets matrice ont été évalués à partir de 5 g de sol dopé à 50 ng/g en chacune des 23 substances.

Les **Tableaux III.12 et III.13** présentent les rendements d'extraction et les effets matrice des 23 substances pour les divers sols.

Les rendements d'extraction sont compris entre 4% (pour la fluvoxamine) et 89% (pour la carbamazépine) et les effets matrices entre 142% (pour la fluvoxamine) et -95% (pour la sulfanilamide). Nous observons que les rendements d'extraction et les effets matrice varient en fonction des sols analysés. Cependant, il est difficile à partir de l'ensemble de ces données, d'établir une relation entre les valeurs des rendements d'extraction et des effets matrice et les paramètres des sols, **c'est pourquoi une étude statistique a été réalisée.**

Tableau III.12 : Rendements d'extraction (%) des 23 substances pour les onze sols analysés

	Sol A	Sol H	Sol I	Sol J	Sol K	Sol L	Sol M	Sol N	Sol O	Sol P	Sol Q
dicyclanile	70	66	66	57	63	56	73	62	64	62	67
sulfathiazole	54	49	63	61	44	43	54	44	46	48	51
sulfadiméthoxine	61	62	77	73	55	56	69	53	56	57	59
sulfadimérazine	66	65	70	75	61	59	69	61	64	64	66
sulfanilamide	36	44	19	30	20	22	45	16	33	22	36
sulfadiazine	61	59	64	66	54	54	62	54	56	59	59
sulfabenzamide	43	40	49	52	34	34	44	33	37	35	37
sulfaméthoxydiazine	66	66	72	71	59	60	69	57	64	60	61
sulfaméthoxazole	65	56	70	75	60	53	66	51	54	53	52
triméthoprime	74	78	87	89	77	57	74	65	78	79	80
érythromycine	7	16	18	13	11	6	9	0.6	0.7	1	12
roxithromycine	17	19	23	21	18	8	9	14	11	10	12
tylosine	22	17	23	17	14	4	6	13	9	8	8
pénicilline G	58	52	51	42	54	37	47	48	48	28	49
carbamazépine	77	81	83	88	85	72	77	81	85	84	77
fluvoxamine	7	5	6	5	7	6	7	5	4	6	8
paracétamol	29	57	60	66	80	18	63	70	56	70	69
androstènedione	74	71	79	73	43	54	66	67	76	76	62
lévonorgestrel	66	60	66	56	38	26	54	57	52	53	58
noréthindrone	69	65	87	70	51	57	73	59	79	69	62
progestérone	29	21	17	31	8	10	15	14	23	16	13
testostérone	67	64	72	70	48	47	62	55	65	64	55
gestodène	71	73	83	68	46	44	68	47	78	76	52

Tableau III.13 : Effets matrice (%) subis par les 23 substances pour les onze sols analysés

	Sol A	Sol H	Sol I	Sol J	Sol K	Sol L	Sol M	Sol N	Sol O	Sol P	Sol Q
dicyclanile	-24	-28	-29	-25	-20	-20	-25	-28	-27	-23	-20
sulfathiazole	-36	-40	-51	-41	-39	-42	-43	-49	-46	-50	-47
sulfadiméthoxine	-27	-31	-45	-34	-33	-34	-33	-39	-36	-43	-37
sulfadimérazine	-30	-30	-37	-30	-29	-28	-31	-35	-35	-40	-34
sulfanilamide	-93	-95	-91	-88	-88	-85	-93	-89	-93	-90	-90
sulfadiazine	-35	-39	-41	-34	-33	-31	-36	-40	-38	-41	-33
sulfabenzamide	-41	-43	-46	-36	-40	-41	-40	-48	-41	-50	-38
sulfaméthoxydiazine	-23	-27	-33	-22	-24	-20	-23	-29	-31	-31	-24
sulfaméthoxazole	-32	-41	-40	-29	-28	-29	-32	-37	-32	-39	-28
triméthoprime	-10	-12	-24	-19	-14	-13	-12	-18	-19	-21	-19
érythromycine	0.5	-3	-21	6	70	72	6	1600	1581	1333	0.76
roxithromycine	35	23	-18	7	10	15	5	5	5	2	-9
tylosine	66	37	26	72	103	125	112	104	73	88	120
pénicilline G	-24	-27	-31	-23	-34	-34	-27	-33	-28	-32	-27
carbamazépine	-27	-26	-34	-29	-33	-32	-36	-35	-36	-39	-30
flvoxamine	142	133	82	82	131	117	116	103	95	75	37
paracétamol	-36	-37	-37	-35	-36	-38	-42	-40	-38	-37	-37
androstènedione	-47	-48	-55	-49	-55	-53	-50	-57	-54	-62	-58
lévonorgestrel	-43	-43	-70	-50	-66	-54	-54	-65	-55	-70	-69
noréthindrone	-53	-53	-62	-58	-64	-62	-60	-65	-63	-69	-65
progestérone	-10	-21	-41	-16	-38	-32	-28	-33	-21	-43	-44
testostérone	-42	-45	-51	-43	-52	-50	-45	-52	-50	-59	-52
gestodène	-54	-56	-67	-61	-64	-66	-61	-70	-67	-74	-69

B. Etude statistique des résultats :

La sensibilité d'une méthode dépend à la fois des rendements d'extraction et des effets matrice. Or, ces deux dernières variables peuvent fluctuer en fonction de la nature du sol, l'efficacité de la procédure sera donc affectée. C'est pourquoi, il est intéressant d'évaluer l'impact des paramètres du sol sur les rendements d'extraction et les effets matrice. Pour cela, nous avons effectué une étude statistique en utilisant soit la corrélation de Pearson soit une analyse de covariance (ANCOVA). Ce genre d'approche n'a jamais été abordé. Seuls quelques auteurs ont mentionné l'influence de certains paramètres du sol (pourcentage en argile, teneur en carbone organique) sur la forte adsorption de substances antibiotiques ou de stéroïdes hormonaux sur la matrice solide [5, 55, 56]. Cependant, aucune étude globale n'a été réalisée. De plus, l'impact des paramètres du sol sur les effets matrice n'a jamais été étudié.

En conclusion, aucune étude antérieure n'a effectué une telle analyse qui va permettre de connaître les paramètres qui ont le plus d'influence sur les rendements d'extraction et les effets matrice ainsi que les composés les plus impactés. Ces informations permettront de prédire l'efficacité d'une méthode en fonction de la nature du sol et des substances à analyser.

1. Méthodes statistiques utilisées :

Les données ont été traitées avec le logiciel statistique R (R i286 2.15.0) et notamment avec le package Rcmdr.

Une analyse de covariance (ANCOVA) a été réalisée lorsque plusieurs substances ont été analysées simultanément. Une corrélation de Pearson a été utilisée lorsqu'un composé a été étudié individuellement (une seule substance dans la famille), dans ce cas, la variable « catégorie de substance » n'intervient plus. Dans les deux cas, nous avons posé l'hypothèse nulle H_0 : « il n'y a pas de corrélation entre les variables ».

a. Corrélation de Pearson :

Le coefficient de corrélation de Pearson r permet de mesurer l'association entre deux variables. Ce dernier varie de -1 à +1, indiquant respectivement une corrélation négative et positive. Une valeur de 0 révèle que les deux variables ne sont pas linéairement corrélées.

En ce qui concerne l'interprétation de ce coefficient, un test t (test de Student) est utilisé. Nous posons l'hypothèse nulle H_0 . Le t_{calc} est calculé :

$$t_{calc} = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

avec n le nombre d'échantillon.

Nous comparons t_{calc} avec le t_{crit} trouvé dans la table de Student (t_{crit} est recherché à partir des valeurs : $p = 0.05$ (test significatif lorsque l'on a moins de 5% de chance que l'hypothèse nulle H_0 soit vérifiée) et nombre de degrés de liberté = $n-2$; table de Student, **Tableau III.13**). Si $t_{calc} < t_{crit}$, H_0 est acceptée alors que si $t_{calc} > t_{crit}$, H_0 est rejetée. Ce dernier cas signifie qu'il y a une corrélation importante entre les deux variables.

Etant donné que notre analyse statistique est réalisée à partir de onze sols, nous avons donc $n = 11$ et ainsi un degré de liberté égal à 9. Le t_{crit} trouvé dans la table de Student (à $p = 0.05$ et degré de liberté = 9) équivaut à 2.2622 (**Tableau III.13**). **Pour pouvoir affirmer une forte corrélation entre nos variables**, le t_{calc} doit être supérieur à 2.2622 d'où **r supérieur à 0.65 en valeur absolue**.

Le calcul a été réalisé pour $p = 0.05$. Dans le cas où $p = 0.1$ (moins de 10% de chance que l'hypothèse nulle H_0 soit vérifiée, $t_{crit} = 1.8331$, **r = 0.52**), **une corrélation entre les variables existe mais elle est plus faible**. Dans ce dernier cas, nous observons une tendance quant à l'association entre les deux variables.

Tableau III.14 : Table de Student

d.d.l. \ α	0,90	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001
1	0,1584	1,0000	1,9626	3,0777	6,3137	12,7062	31,8210	63,6559	636,5776
2	0,1421	0,8165	1,3862	1,8856	2,9200	4,3027	6,9645	9,9250	31,5998
3	0,1366	0,7649	1,2498	1,6377	2,3534	3,1824	4,5407	5,8408	12,9244
4	0,1338	0,7407	1,1896	1,5332	2,1318	2,7765	3,7469	4,6041	8,6101
5	0,1322	0,7267	1,1558	1,4759	2,0150	2,5706	3,3649	4,0321	6,8685
6	0,1311	0,7176	1,1342	1,4398	1,9432	2,4469	3,1427	3,7074	5,9587
7	0,1303	0,7111	1,1192	1,4149	1,8946	2,3646	2,9979	3,4995	5,4081
8	0,1297	0,7064	1,1081	1,3968	1,8595	2,3060	2,8965	3,3554	5,0414
9	0,1293	0,7027	1,0997	1,3830	1,8331	2,2622	2,8214	3,2498	4,7809
10	0,1289	0,6998	1,0931	1,3722	1,8125	2,2281	2,7638	3,1693	4,5868
11	0,1286	0,6974	1,0877	1,3634	1,7959	2,2010	2,7181	3,1058	4,4369
12	0,1283	0,6955	1,0832	1,3562	1,7823	2,1788	2,6810	3,0545	4,3178
13	0,1281	0,6938	1,0795	1,3502	1,7709	2,1604	2,6503	3,0123	4,2209
14	0,1280	0,6924	1,0763	1,3450	1,7613	2,1448	2,6245	2,9768	4,1403
15	0,1278	0,6912	1,0735	1,3406	1,7531	2,1315	2,6025	2,9467	4,0728
16	0,1277	0,6901	1,0711	1,3368	1,7459	2,1199	2,5835	2,9208	4,0149
17	0,1276	0,6892	1,0690	1,3334	1,7396	2,1098	2,5669	2,8982	3,9651
18	0,1274	0,6884	1,0672	1,3304	1,7341	2,1009	2,5524	2,8784	3,9217
19	0,1274	0,6876	1,0655	1,3277	1,7291	2,0930	2,5395	2,8609	3,8833
20	0,1273	0,6870	1,0640	1,3253	1,7247	2,0860	2,5280	2,8453	3,8496
21	0,1272	0,6864	1,0627	1,3232	1,7207	2,0796	2,5176	2,8314	3,8193
22	0,1271	0,6858	1,0614	1,3212	1,7171	2,0739	2,5083	2,8188	3,7922
23	0,1271	0,6853	1,0603	1,3195	1,7139	2,0687	2,4999	2,8073	3,7676
24	0,1270	0,6848	1,0593	1,3178	1,7109	2,0639	2,4922	2,7970	3,7454
25	0,1269	0,6844	1,0584	1,3163	1,7081	2,0595	2,4851	2,7874	3,7251

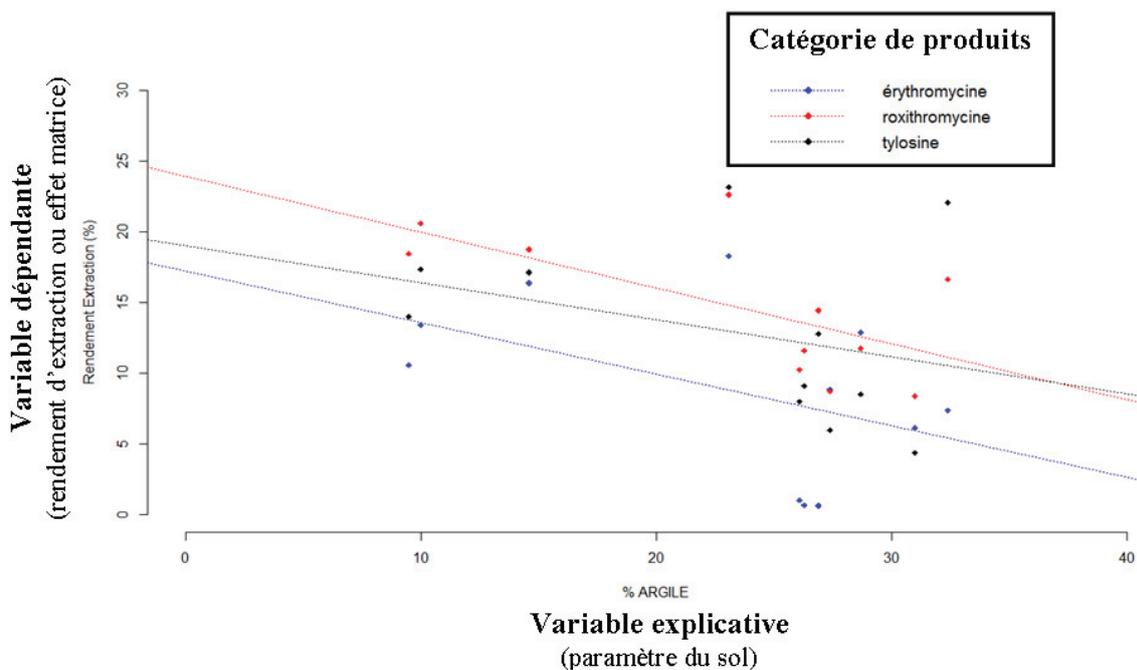
A partir du logiciel R (package Rcmdr), nous avons utilisé la fonction : test de corrélation (type de corrélation : « Pearson product-moment »).

b. Analyse de covariance : ANCOVA :

L'ANCOVA est une analyse de covariance qui réalise à la fois une analyse de variance et une régression linéaire simple. Elle permet de modéliser l'impact de variables explicatives sur une variable dépendante. Les grandeurs explicatives peuvent être soit numériques (paramètres du sol) soit catégorielles (type de substance). Les variables dépendantes sont, dans notre étude, les rendements d'extraction ainsi que les valeurs d'effets matrice.

Certains de nos résultats se présenteront sous forme de graphique à l'image de la **Figure III.14**.

Figure III.14 : Graphique type obtenu suite à une ANCOVA



Les questions se posent alors à trois niveaux :

- 1) La variable explicative numérique (comme par exemple le pourcentage en argile) a-t-elle un impact sur la variable dépendante (rendement d'extraction ou effet matrice) ? Ce premier point permet de déterminer l'influence des paramètres du sol sur les rendements d'extraction ou les effets matrice.
- 2) La variable explicative catégorielle (catégorie de substance) a-t-elle une influence sur la variable dépendante (rendement d'extraction ou effet matrice). Autrement dit, les valeurs des

rendements d'extraction ou des effets matrice dépendent-elles de la substance ? Le second point nous intéresse moins car il paraît évident que les rendements d'extraction et les effets matrice dépendent du composé.

3) Y a-t-il des interactions entre les variables explicatives ? Autrement dit, un facteur influence-t-il l'effet qu'à un autre facteur sur une variable dépendante ? (**effet d'interaction**) Pour cela, nous avons utilisé deux fonctions du logiciel R : « lm » (linear model) et « aov » (anova table). La première donne un tableau exposant les pentes et les ordonnées à l'origine des droites pour chacun des composés. La deuxième, quant à elle donne les valeurs de « p-value ».

Si la valeur de « p-value » est inférieure à 0.05, il y a moins de 5% de chance que l'hypothèse nulle H_0 soit vérifiée. Quand H_0 est vraie, la variable explicative (paramètre du sol ou catégorie de substance) n'a pas d'effet sur la variable dépendante (rendements d'extraction ou effets matrice). **Par conséquent, lorsque la « p-value » est inférieure à 0.05, il y a une corrélation importante entre les deux variables.** Cependant, comme mentionné précédemment, **lorsque cette dernière valeur est uniquement inférieure à 0.1** (moins de 10% de chance que l'hypothèse nulle H_0 soit vérifiée), **nous dirons que nous observons une tendance en ce qui concerne l'influence de la variable explicative sur la variable dépendante.**

2. Analyse des résultats :

a. Effet de la variable explicative sur la variable dépendante :

i Rendements d'extraction :

Pour évaluer l'influence des différents paramètres (la CEC ainsi que les pourcentages en argile, en limon, en sable et en carbone organique) sur les rendements d'extraction, nous avons procédé à une analyse ANCOVA. Nous avons observé que les pourcentages en limon et en sable n'ont pas d'influence sur les rendements d'extraction. En effet, nous avons obtenu respectivement des valeurs de « p-value » de 0.679 et 0.400, c'est-à-dire des valeurs très supérieures à 0.05.

Cependant, nous avons trouvé des valeurs de « p-value » de 0.0116, $3.03 \cdot 10^{-12}$ et de $8.29 \cdot 10^{-16}$ pour le pourcentage en argile, la CEC et le pourcentage en carbone organique respectivement. Ces résultats montrent que, pour l'ensemble des composés, ces trois derniers paramètres ont

une influence importante sur les rendements d'extraction. Les résultats sont résumés dans le **Tableau III.15**.

Tableau III.15 : Influence des différents paramètres du sol sur les rendements d'extraction en considérant l'ensemble des composés (« p-value »)

Paramètre du sol	p-value
% argile	0.0116
% limon	0.679
% sable	0.400
CEC	$3.03 \cdot 10^{-12}$
% carbone organique	$8.29 \cdot 10^{-16}$

Le pourcentage en matière organique correspond à la teneur en carbone organique à un facteur près ; nous retrouvons donc la même « p-value » pour la matière organique ($=853 \cdot 10^{-16}$) que pour le carbone organique.

i.1 Influence du pourcentage en argile sur les rendements d'extraction :

Nous avons noté précédemment que le pourcentage en argile a, pour l'ensemble des 23 composés étudiés, un impact sur les rendements d'extraction (« p-value » = 0.0116). Cependant, cette influence est également dépendante de chacun des composés. Effectivement, pour certains composés, leur rendement d'extraction n'évolue pas en fonction du pourcentage en argile. Nous avons donc étudié cet effet pour les différentes familles d'antibiotiques vétérinaires, les divers contaminants humains ainsi que pour les stéroïdes hormonaux.

Composés les plus impactés :

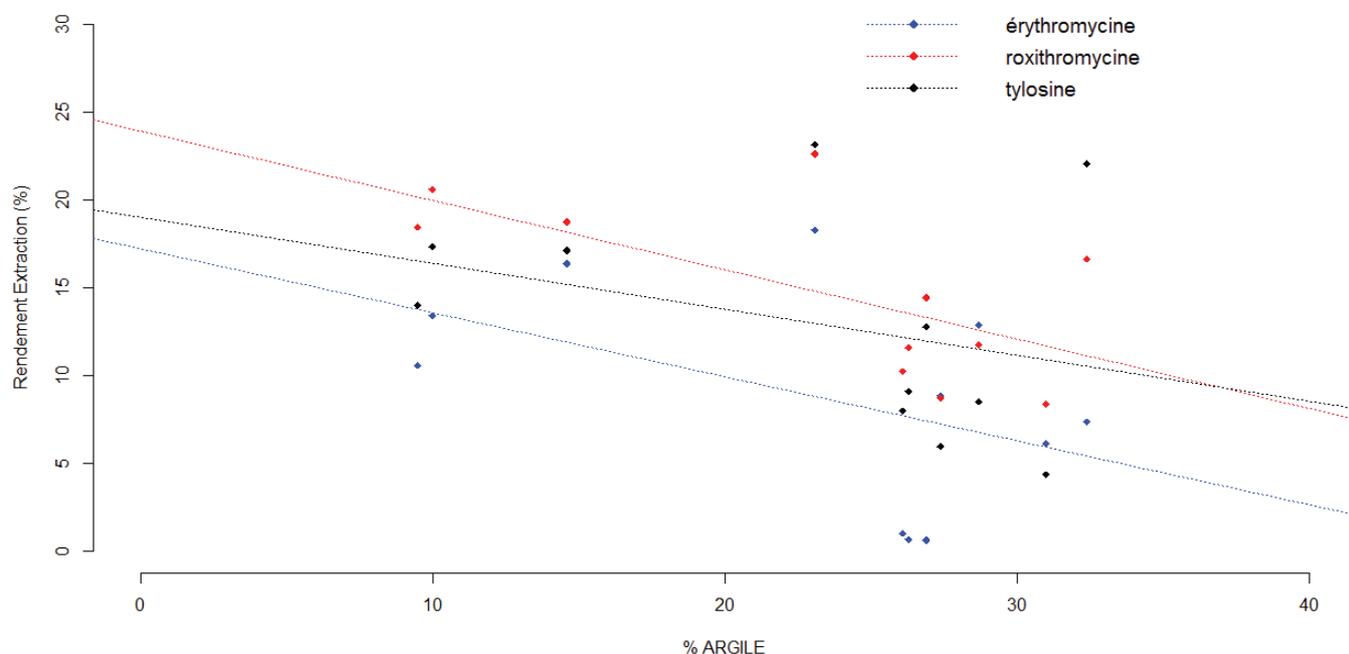
Les valeurs des rendements d'extraction des macrolides et de la carbamazépine dépendent fortement du pourcentage en argile. Les résultats montrant la corrélation entre les deux variables sont présentés dans le **Tableau III.16**.

Tableau III.16 : Valeurs des « p-value », des pentes des droites ou du r de Pearson pour les macrolides et la carbamazépine en ce qui concerne l'influence du pourcentage en argile sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value	Pentes ou r de Pearson
macrolides	ANCOVA	0.00997	pentés entre -0.26 et -0.40
carbamazépine	Pearson	0.0111	r de Pearson = -0.73

Pour les trois **macrolides** étudiés, l'érythromycine, la roxithromycine et la tylosine, nous avons obtenu une « p-value » de 0.00997 (ANCOVA) qui montre ainsi une forte influence du pourcentage en argile sur les rendements d'extraction des macrolides et donc de piégeage des molécules dans le sol puisque nous observons une diminution des rendements d'extraction lorsque le pourcentage en argile augmente. Les deux variables sont donc **anti-corrélées**. Ces résultats sont illustrés sur la **Figure III.15**.

Figure III.15 : Rendements d'extraction des macrolides en fonction du pourcentage d'argile



La carbamazépine a une « p-value » de 0.0111 qui indique que le pourcentage en argile a une forte influence seulement sur le rendement d'extraction. De plus, la **carbamazépine** a un r de

Pearson de -0.73 ce qui signifie les deux variables sont fortement **anti-corrélés** ($|-0.73| > 0.65$).

Tendance :

Les valeurs de « p-value » des sulfonamides (sulfathiazole, sulfadiméthoxine, sulfadimérazine, sulfanilamide, sulfadiazine, sulfabenzamide, sulfaméthoxydiazine, sulfaméthoxazole), du triméthoprim (famille des diaminopyrimidines) et du paracétamol sont supérieures à 0.05 mais inférieures à 0.1. Nous observons donc une tendance, le pourcentage en argile a donc une légère influence sur les rendements d'extraction de ces composés. De plus, les valeurs des pentes et des r de Pearson nous indiquent que les variables sont **anti-corrélées**. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III.17**.

Tableau III.17 : Valeurs des « p-value », des pentes des droites ou du r de Pearson pour les sulfonamides, le triméthoprim et le paracétamol en ce qui concerne l'influence du pourcentage en argile sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value	Pentes ou r de Pearson
sulfonamides	ANCOVA	0.0816	pentés entre -0.04 et -0.39
triméthoprim	Pearson	0.1000	r de Pearson = -0.52
paracétamol	Pearson	0.08499	r de Pearson = -0.54

Composés non impactés :

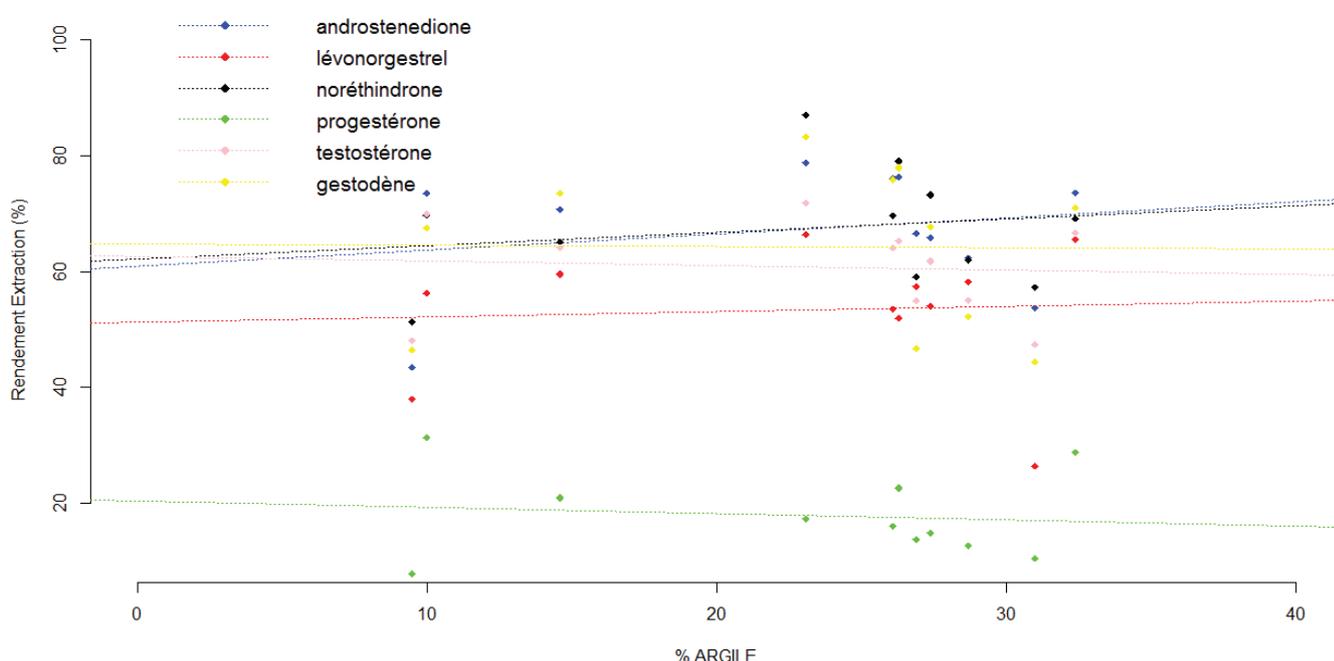
Les rendements d'extraction de quelques substances ne sont **pas influencés par le pourcentage en argile**. C'est le cas du **dicyclanile** (famille des antiparasitaires), de la **pénicilline G** (famille du β -lactame), de la **fluvoxamine** et des **stéroïdes hormonaux** (androstènedione, lévonorgestrel, noréthindrone, progestérone, testostérone, gestodène). Les valeurs des « p-value » sont exposées dans le **Tableau III.18**.

Tableau III.18 : Valeurs des « p-value » pour le dicyclanile, la pénicilline G, la fluvoxamine et les stéroïdes hormonaux en ce qui concerne l'influence du pourcentage en argile sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value
dicyclanile	Pearson	0.3557
pénicilline G	Pearson	0.736
fluvoxamine	Pearson	0.4249
Stéroïdes hormonaux	ANCOVA	0.714

La Figure III.16 représente l'évolution des rendements d'extraction des stéroïdes hormonaux en fonction du pourcentage en argile.

Figure III.16 : Rendements d'extraction des stéroïdes hormonaux en fonction du pourcentage en argile



Pour conclure, nous avons mis en évidence que le pourcentage en argile a une forte influence sur les rendements d'extraction de certains composés. En effet, pour les macrolides et la carbamazépine, une augmentation du pourcentage en argile provoque une diminution importante des rendements d'extraction. Les sulfonamides, le triméthoprime et le paracétamol

sont, quant à eux plus légèrement influencés. Ces résultats sont à rapprocher de travaux antérieurs qui ont montré que l'intercalation des composés entre les couches d'argile est un des mécanismes principaux de l'adsorption des antibiotiques dans le sol [55]. Ce phénomène a notamment été mentionné pour les macrolides et les sulfonamides [5, 55].

L'influence de l'argile sur l'extraction ne peut cependant pas être généralisée. En effet, le dicyclanile, la pénicilline G, la fluvoxamine et les stéroïdes hormonaux ne paraissent pas interagir avec les couches d'argile constituant le sol.

i.2 Influence de la CEC sur les rendements d'extraction :

Nous avons remarqué que, pour l'ensemble des composés étudiés, la CEC a une influence sur les rendements d'extraction. En effet, nous avons obtenu une « p-value » de $3.03 \cdot 10^{-12}$. Nous avons donc décidé d'étudier cette influence pour chacune des familles.

Composés les plus impactés :

Les rendements d'extraction des sulfonamides, des macrolides, du triméthoprime, de la carbamazépine et des stéroïdes hormonaux sont fortement influencés par la CEC. Nous observons que pour tous les composés, les deux variables sont **anti-corrélées** : les rendements d'extraction diminuent lorsque la CEC augmente. Le **Tableau III.19** présente les résultats.

Tableau III.19 : Valeurs des « p-value », des pentes des droites ou du r de Pearson pour les sulfonamides, les macrolides, le triméthoprime, la carbamazépine et les stéroïdes hormonaux en ce qui concerne l'influence de la CEC sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value	Pentes ou r de Pearson
sulfonamides	ANCOVA	$2.95 \cdot 10^{-5}$	pentés entre -0.25 et -0.51
macrolides	ANCOVA	0.00206	pentés entre -0.32 et -0.41
triméthoprime	r de Pearson	0.0030	r de Pearson = -0.80
carbamazépine	r de Pearson	0.005138	r de Pearson = -0.77
stéroïdes hormonaux	ANCOVA	0.000764	pentés entre -0.33 et -0.84

Les **Figure III.17 et III.18** représentent l'évolution des rendements d'extraction en fonction de la CEC pour les sulfonamides et la carbamazépine respectivement.

Figure III.17 : Rendements d'extraction des sulfonamides en fonction de la CEC

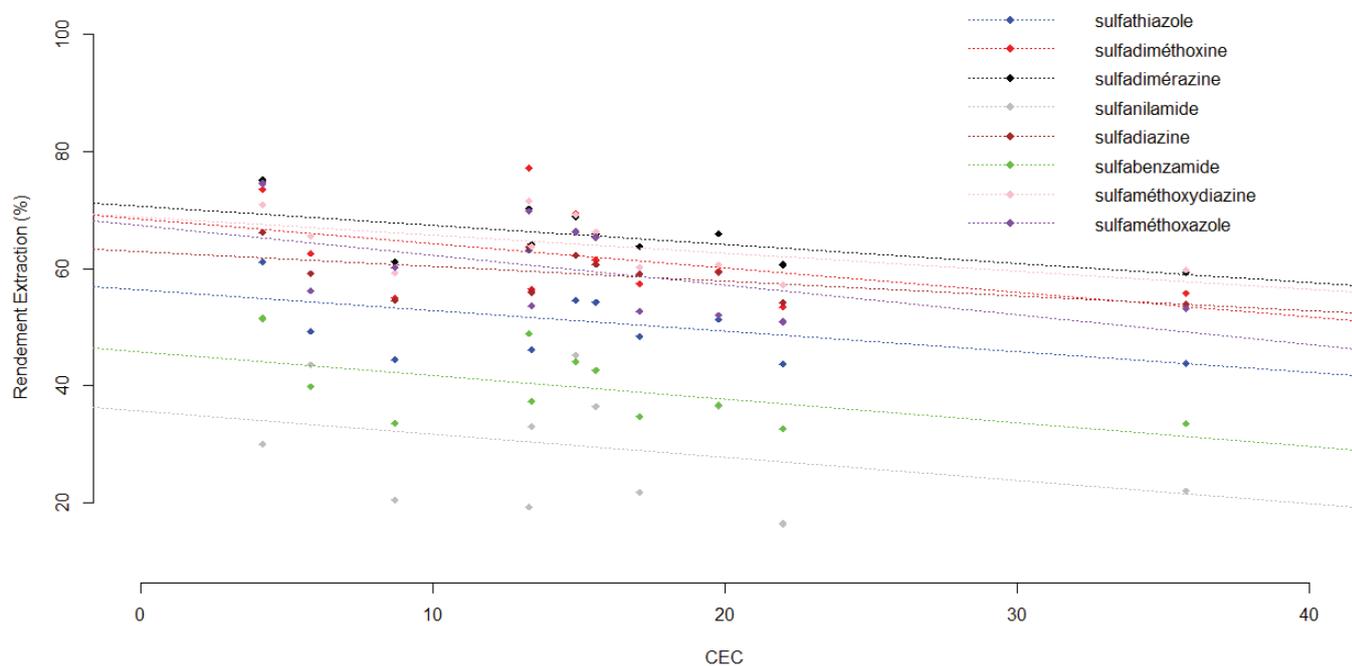
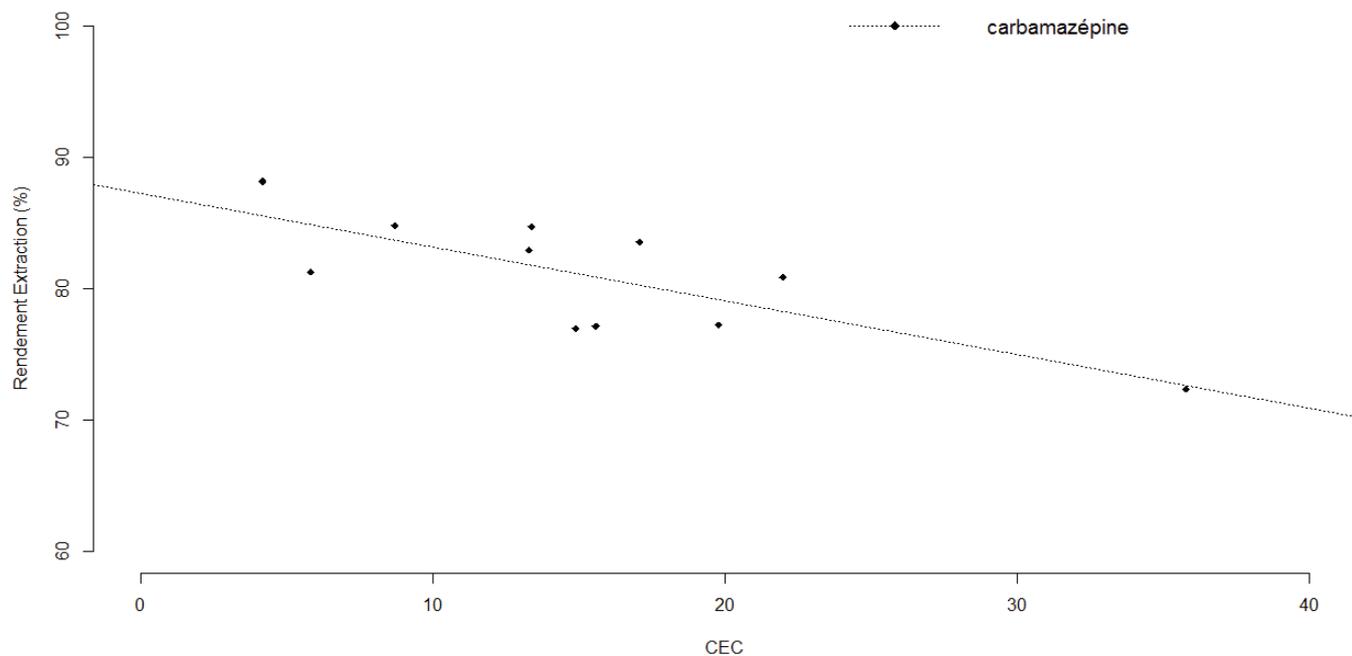


Figure III.18 : Rendement d'extraction de la carbamazépine en fonction de la CEC



Tendance :

Le rendement d'extraction du paracétamol est légèrement influencé par la CEC (anti-corrélation). Les résultats sont présentés dans le **Tableau III.20**.

Tableau III.20 : Valeurs de la « p-value » et du r de Pearson pour le paracétamol en ce qui concerne l'influence de la CEC sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value	Pentes ou r de Pearson
paracétamol	r de Pearson	0.07408	r de Pearson = -0.55

Composés non impactés :

Enfin, les rendements d'extraction de quelques substances ne sont **pas influencés** par la valeur de la CEC : **le dicyclanile, la pénicilline G et la fluvoxamine (Tableau III.21)**.

Tableau III.21 : Valeurs des « p-value » pour le dicyclanile, la pénicilline G et la fluvoxamine en ce qui concerne l'influence de la CEC sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value
dicyclanile	Pearson	0.4798
pénicilline G	Pearson	0.2707
fluvoxamine	Pearson	0.5096

La CEC a donc une influence sur les rendements d'extraction de la plupart des composés : les sulfonamides, les macrolides, le triméthoprime, la carbamazépine et les stéroïdes hormonaux, le paracétamol étant légèrement impacté.

i.3 Influence du carbone sur les rendements d'extraction :

Une ANCOVA a montré que la teneur en carbone organique a également un impact sur les rendements d'extraction des composés. En effet, une « p-value » de $8.29 \cdot 10^{-16}$ a été trouvée pour ce paramètre.

Composés les plus impactés :

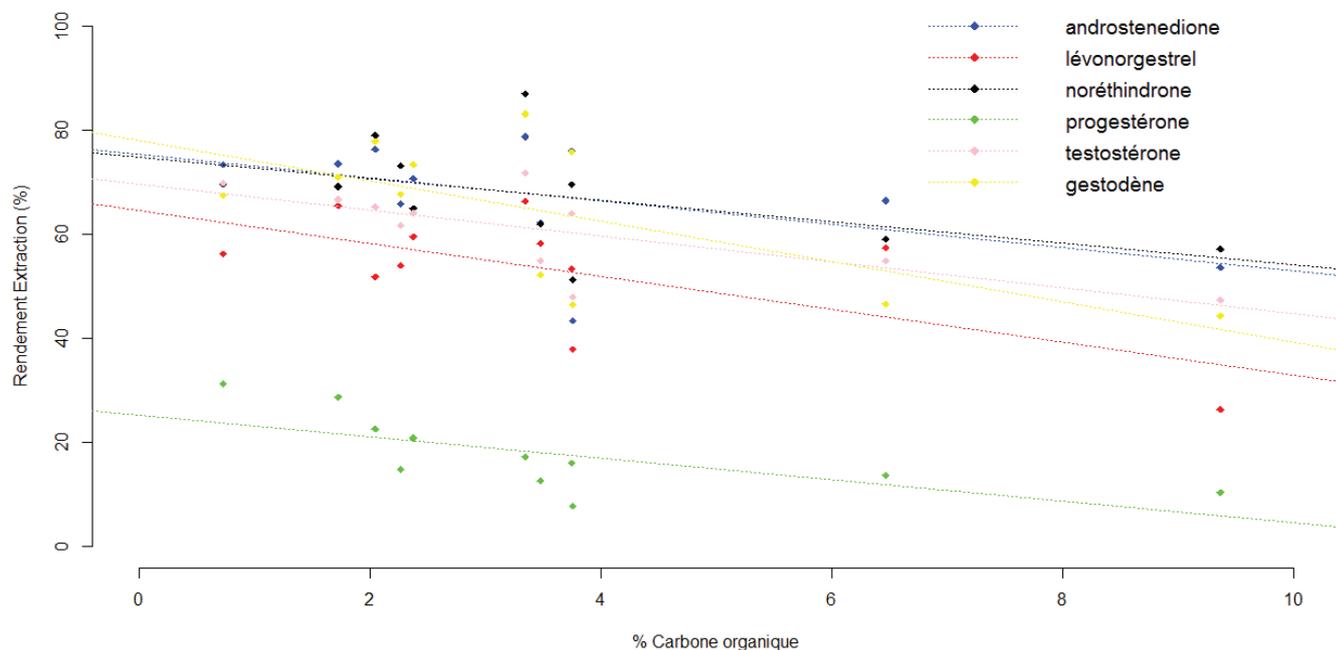
Les rendements d'extraction des sulfonamides, des macrolides, du triméthoprime et des stéroïdes hormonaux sont fortement influencés par la teneur en carbone organique, les deux variables étant anti-corrélées (Tableau III.22).

Tableau III.22 : Valeurs des « p-value », des pentes des droites ou du r de Pearson pour les sulfonamides, les macrolides, le triméthoprime et les stéroïdes hormonaux en ce qui concerne l'influence du pourcentage en carbone organique sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value	Pentes ou r de Pearson
sulfonamides	ANCOVA	$3.78 \cdot 10^{-10}$	pentés entre -1.16 et -3.02
macrolides	ANCOVA	0.02939	pentés entre -0.84 et -1.22
triméthoprime	r de Pearson	0.0023	r de Pearson = -0.81
stéroïdes hormonaux	ANCOVA	$5.52 \cdot 10^{-7}$	pentés entre -2.06 et -3.87

La **Figure III.19** représente l'évolution des rendements d'extraction des stéroïdes hormonaux en fonction de la teneur en carbone organique.

Figure III.19 : Rendements d'extraction des stéroïdes hormonaux en fonction de la teneur en carbone organique



Tendance :

Le rendement d'extraction de la **carbamazépine** est, quant à lui, plus faiblement influencé par la teneur en carbone organique (**anti-corrélation**). Les résultats sont présentés dans le **Tableau III.23**.

Tableau III.23 : Valeurs de la « p-value » et du r de Pearson pour la carbamazépine en ce qui concerne l'influence du pourcentage en carbone organique sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value	Pentes ou r de Pearson
carbamazépine	r de Pearson	0.06763	r de Pearson = -0.57

Composés non impactés :

Enfin, le dicyclanile, la pénicilline G, la fluvoxamine et le paracétamol ont leurs rendements d'extraction qui ne sont pas influencés par la teneur en carbone organique (Tableau III.24).

Tableau III.24 : Valeurs des « p-value » pour le dicyclanile, la pénicilline G, la fluvoxamine et le paracétamol en ce qui concerne l'influence du pourcentage en carbone organique sur les rendements d'extraction

Composés	analyse	p-value
dicyclanile	Pearson	0.144
pénicilline G	Pearson	0.2857
fluvoxamine	Pearson	0.9379
paracétamol	Pearson	0.2764

Pour conclure, il est désormais possible d'attester que la teneur en carbone organique a un fort impact sur les rendements d'extraction des sulfonamides, des macrolides, du triméthoprim et des stéroïdes hormonaux. La carbamazépine semble elle aussi légèrement impactée.

Il a été montré précédemment que le pourcentage en carbone organique a une influence sur l'adsorption des estrogènes par la matrice solide [57]. Il existe pour certains d'entre eux une corrélation positive entre la teneur en carbone organique et la valeur de K_d , coefficient de distribution entre le sol et l'eau [56]. Ici, nous démontrons statistiquement l'influence de la teneur en carbone organique sur l'ensemble des stéroïdes hormonaux.

Nous avons donc démontré que le pourcentage en argile, la CEC ainsi que la teneur en carbone organique ont un impact sur les rendements d'extraction d'un nombre important de composés. Plus la CEC est importante et plus il y a d'argile et/ou de carbone organique dans la matrice solide, plus les rendements d'extraction sont faibles.

ii Effets matrice :

Nous avons également étudié l'influence des différents paramètres du sol (pourcentages en argile, en limon, en sable, en carbone organique et la CEC) sur les effets matrice observés pour les sulfonamides, le triméthoprim, le dicyclanile, la pénicilline G, les contaminants humains et les stéroïdes hormonaux. Après avoir accompli une ANCOVA, nous avons obtenu les valeurs de « p-value » de 0.224, 0.0738, 0.0873, 0.143 et 0.100 pour les pourcentages en argile, en limon, en sable, la CEC et la teneur en carbone organique respectivement (**Tableau III.25**).

Tableau III.25 : Influence des différents paramètres du sol sur les effets matrice en considérant l'ensemble des composés (« p-value »)

Paramètre du sol	p-value
% argile	0.224
% limon	0.0738
% sable	0.0873
CEC	0.143
% carbone organique	0.100

La « p-value » pour la matière organique est également de 0.100.

Nous remarquons que les pourcentages en limon, sable et carbone organique ont un faible impact sur les effets matrice. Nous aborderons plus en détail (famille par famille) uniquement l'influence de la teneur en carbone organique sur les effets matrice des composés.

Influence du carbone organique sur les effets matrice :

Composés les plus impactés :

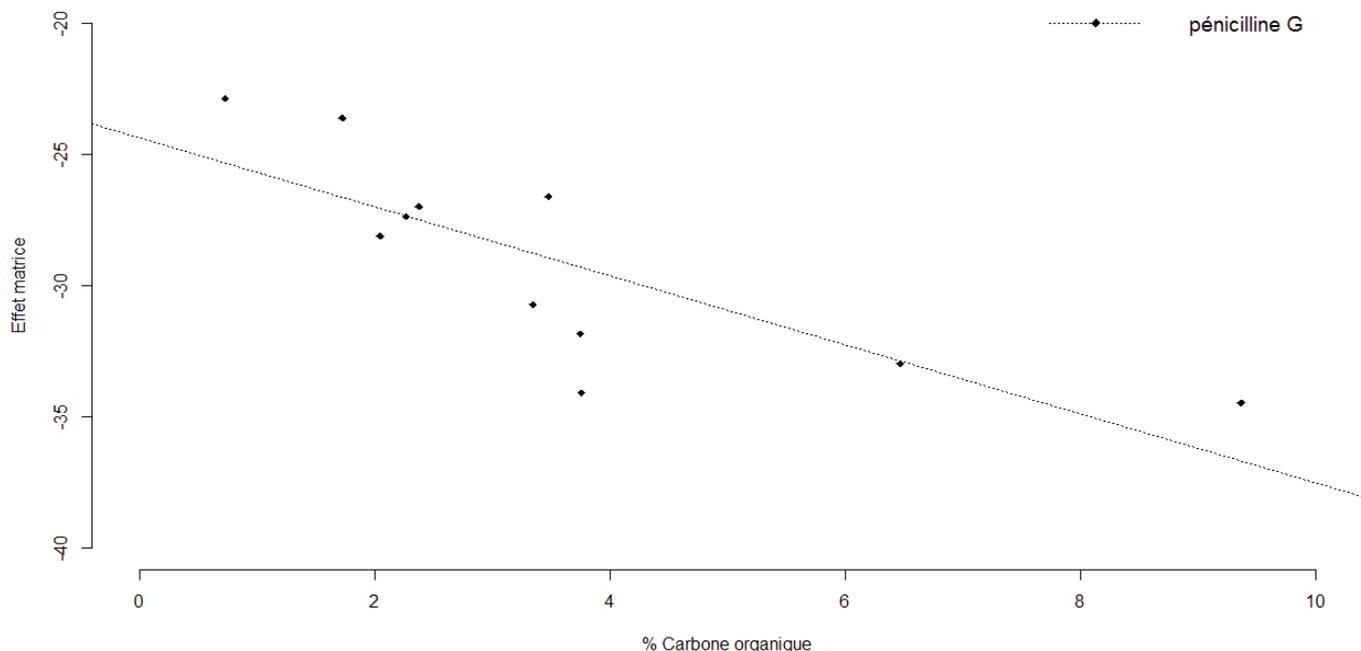
Le pourcentage en carbone organique a une forte influence sur les rendements d'extraction des **des stéroïdes hormonaux et de la pénicilline G**. Les deux variables sont **anti-corrélées** : plus le taux en carbone organique est élevé, plus les effets matrices sont élevés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III.26**.

Tableau III.26 : Valeurs des « p-value » et des pentes des droites pour les stéroïdes hormonaux et la pénicilline G en ce qui concerne l'influence du pourcentage en carbone organique sur les effets matrice

Composés	analyse	p-value	Pentes ou r de Pearson
pénicilline G	Pearson	0.00354	r de Pearson = -0.79
stéroïdes hormonaux	ANCOVA	0.004397	pentés entre -0.87 et -2.07

La **Figure III.20** représente l'évolution des effets matrice de la pénicilline G en fonction de la teneur en carbone organique.

Figure III.20 : Effets matrice de la pénicilline G en fonction du pourcentage en carbone organique



Composés non impactés :

Les effets matrice des sulfonamides, du triméthoprime, du dicyclanile, de la carbamazépine, de la fluvoxamine et du paracétamol ne sont, quant à eux pas influencés par la teneur en carbone organique (Tableau III.27).

Tableau III.27 : Valeurs des « p-value » pour les sulfonamides, le triméthoprime, le dicyclanile, la carbamazépine, la fluvoxamine et le paracétamol en ce qui concerne l'influence du pourcentage en carbone organique sur les effets matrice

Composés	analyse	p-value
sulfonamides	ANCOVA	0.8786
triméthoprime	Pearson	0.8821
dicyclanile	Pearson	0.3509
carbamazépine	Pearson	0.2918
fluvoxamine	Pearson	0.8910
paracétamol	Pearson	0.3304

Nous avons donc mis en évidence que seuls les effets matrice des des stéroïdes hormonaux et de la pénicilline G sont affectés par le pourcentage en carbone organique (qui correspond à un facteur près à la teneur en matière organique). Ceci est cohérent avec les résultats que nous avons présentés précédemment. En effet, les stéroïdes hormonaux et la pénicilline G sont les composés qui montrent le plus de diminution des effets matrice avec la purification SAX + StrataX (par rapport aux résultats obtenus sans purification). Nous renforçons l'idée que cette purification permet d'éliminer en grande partie la matière organique réduisant ainsi les effets matrice.

b. Effet d'interaction :

Nous nous intéresserons également aux interactions d'ordre 1 : interaction d'un facteur sur l'effet d'un autre facteur. Lorsque l'on observe une interaction d'ordre 1 entre deux variables explicatives cela signifie que l'impact d'une variable explicative sur la variable dépendante dépend de la valeur prise par l'autre variable explicative. Ce travail a été effectué globalement sur l'ensemble des composés.

i Rendements d'extraction :

Pour le rendement d'extraction comme variable dépendante, nous avons évalué les effets d'interaction entre les différents facteurs (variables explicatives) (**Tableau III.28**).

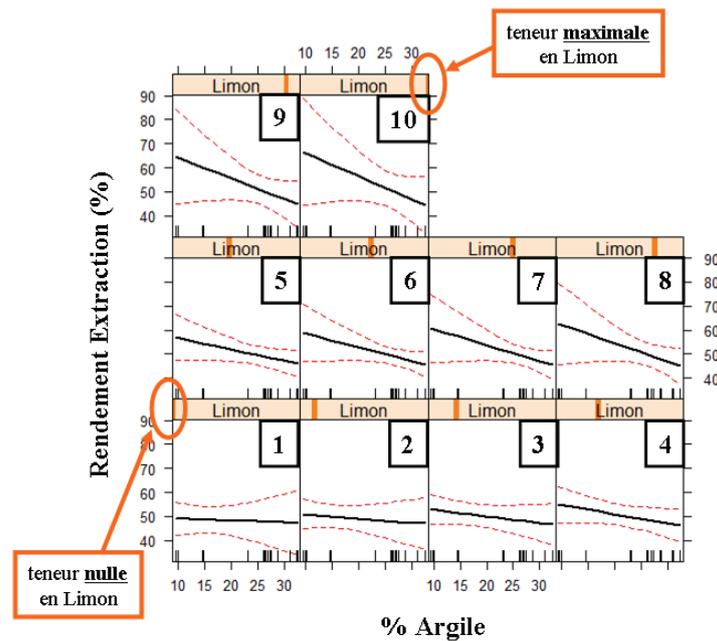
Tableau III.28 : Effets d'interaction entre les différents facteurs pour la variable dépendante = rendement d'extraction

Interactions	p-value	Interactions	p-value
argile : limon	0.0060	CEC : sable	0.4327
argile : sable	0.0094	CEC : CO	0.82343
argile : CEC	0.2206	limon : sable	0.4624
argile : CO	0.19220	limon : CO	0.32725
CEC : limon	0.61075	CO : sable	0.138225

Nous pouvons remarquer qu'il y a des **interactions entre l'argile et le limon ainsi que l'argile et le sable**.

Le pourcentage en limon a donc un impact sur l'effet qu'à l'argile sur les rendements d'extraction. Effectivement, plus la teneur en limon est importante, plus l'argile a une influence importante sur la diminution des rendements d'extraction (**Figure III.21**).

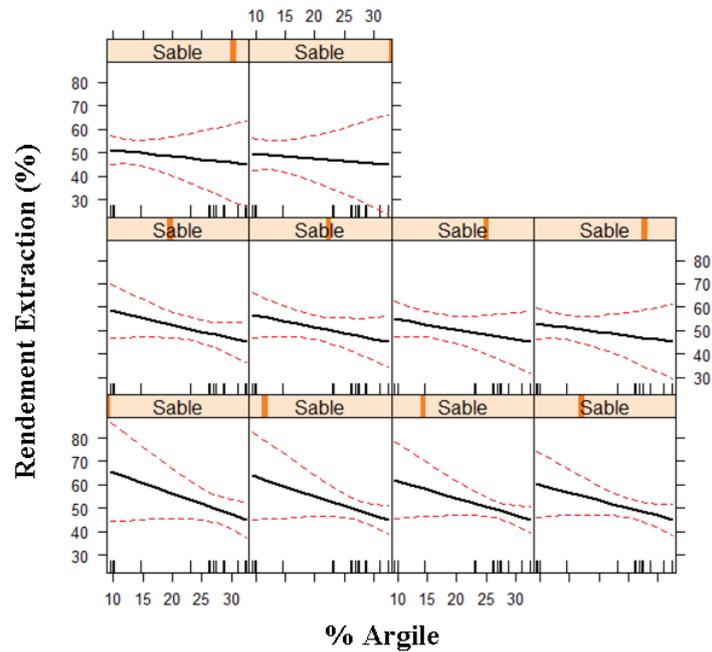
Figure III.21 : Influence de la quantité de limon sur l'effet qu'a l'argile sur les rendements d'extraction (interaction argile : limon)



La figure se lit d'en bas à gauche à en haut à droite (de 1 à 10). Les courbes en pointillées rouges correspondent à l'écart-type.

En revanche, c'est le cas inverse avec le sable: plus la quantité de sable augmente, moins l'argile a un effet sur la diminution des rendements d'extraction (**Figure III.22**).

Figure III.22 : Influence de la quantité de sable sur l'effet qu'a l'argile sur les rendements d'extraction (interaction argile : sable)



ii Effets matrice :

Nous avons également évalué les effets d'interaction entre les différents facteurs (variables explicatives) pour l'effet matrice comme variable dépendante (**Tableau III.29**).

Tableau III.29 : Effets d'interaction entre les différents facteurs pour la variable dépendante = effet matrice

Interactions	p-value	Interactions	p-value
argile : limon	0.0443	CEC : sable	0.0048
argile : sable	0.0042	CEC : CO	0.0001652
argile : CEC	1.45 10 ⁻⁶	limon : sable	0.9604
argile : CO	0.1873	limon : CO	0.02851
CEC : limon	0.0127	CO : sable	0.06894

Nous observons de nombreuses interactions. Notamment, plus la CEC et la quantité de limon sont petites, plus l'effet qu'a la teneur en carbone organique sur l'augmentation des effets matrice est important (**Figure III.23 et Figure III.24**).

Figure III.23 : Influence de la CEC sur l'effet qu'a la teneur en carbone organique sur les effets matrice (interaction CEC : CO)

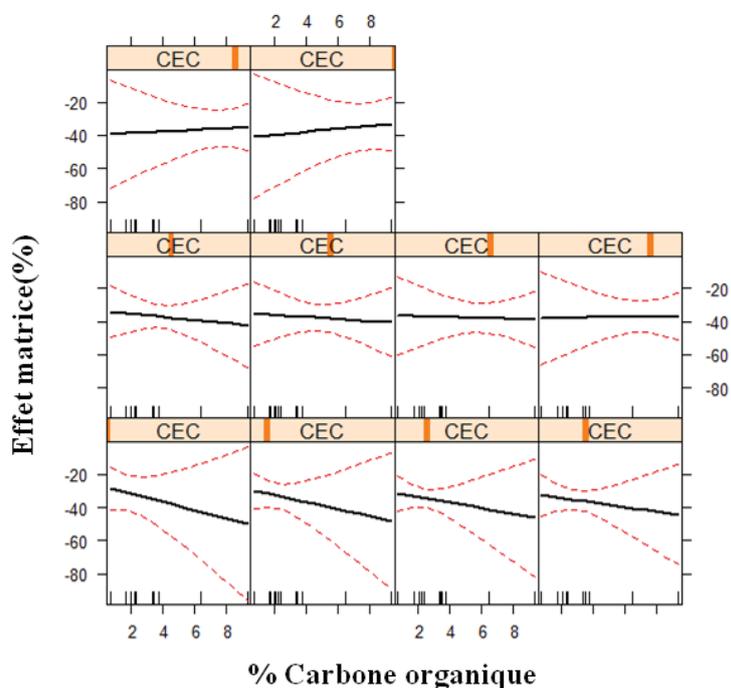
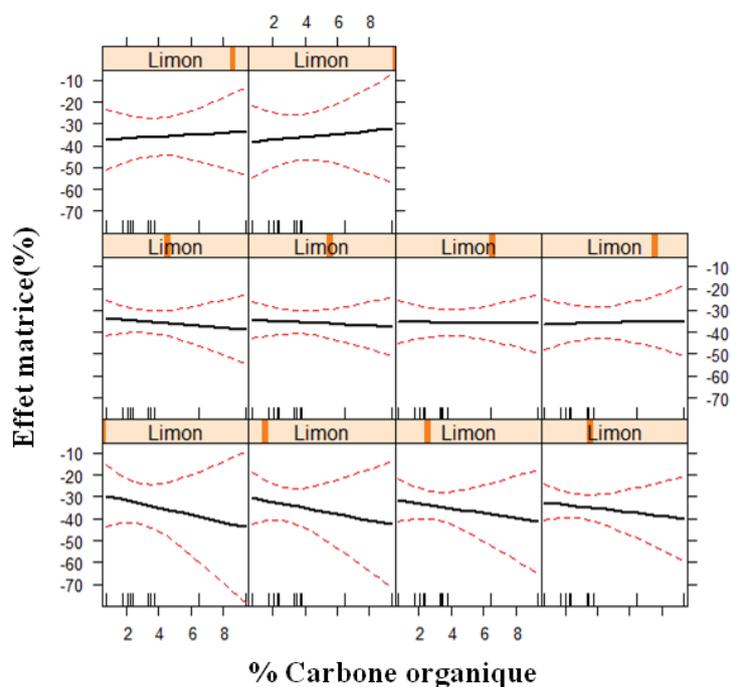


Figure III.24 : Influence de la quantité de limon sur l'effet qu'a la teneur en carbone organique sur les effets matrice (interaction limon : CO)



D'autres interactions ont également été observées : entre l'argile et le limon, l'argile et le sable, l'argile et la CEC, la CEC et le limon ainsi que la CEC et le sable.

L'étude de l'effet de la variable explicative sur la variable dépendante seule n'est donc pas suffisante pour conclure. Effectivement, l'étude des interactions a montré que les valeurs prises par les autres paramètres du sol ont également une influence sur cet effet. Ce travail nous a permis de comprendre pour l'essentiel les interactions mises en jeu dans cette matrice très complexe.

3. Conclusion de la partie statistique :

Nous avons mis en évidence que le pourcentage en argile, la CEC et la teneur en carbone organique ont une influence sur les rendements d'extraction de certains composés. Plus le pourcentage en argile, la CEC et/ou la quantité en carbone organique sont élevés, plus les rendements d'extraction sont faibles. Nous pouvons penser que de fortes interactions s'établissent entre les composés et l'argile ou les colloïdes organiques, rendant les substances plus difficiles à extraire de la matrice solide. Cette observation dépend cependant des composés. Effectivement, les rendements d'extraction du dicyclanile, de la pénicilline G et de la fluvoxamine ne sont ni influencés par le pourcentage en argile, ni par la CEC ni par la teneur en carbone organique. D'autre part, nous avons observé que le pourcentage en carbone organique a un impact sur les effets matrice des stéroïdes hormonaux et de la pénicilline G.

Le sol est une matrice complexe qui contient de nombreux constituants, nous avons donc étudié les effets d'interaction entre ces derniers. De nombreux effets croisés ont été observés. Effectivement certains facteurs (teneurs en limon, sable) ont un impact sur les effets qu'ont l'argile et la CEC sur les rendements d'extraction. D'autres (pourcentage de limon, et la CEC) ont une influence sur l'effet qu'a le carbone organique sur les effets matrice.

IV. Conclusion

Pour conclure, nous avons mis au point une méthode basée sur l'extraction QuEChERS pour extraire des antibiotiques vétérinaires, des stéroïdes hormonaux et des contaminants du sol. Cette procédure QuEChERS - purification SAX + StrataX a ensuite été validée suivant les recommandations de la norme ICH/2005. Nous avons obtenu une méthode sensible (MLQs entre 0.013 et 3 ng/g) qui a, par la suite, été appliquée à des échantillons réels et employée pour les analyses de sol liées à la manipulation en colonnes de sol (chapitre IV de la partie III). Une telle étude multi-résidus incluant à la fois des antibiotiques et des stéroïdes

hormonaux appliquée à des sols n'a jamais été réalisée, les travaux antérieurs se focalisant uniquement sur une catégorie de produits. De plus, cette méthodologie est basée sur la procédure QuEChERS qui est une extraction relativement rapide et efficace qui a été, précédemment, utilisée essentiellement pour extraire des pesticides de matrices solides. Cette méthode a, par la suite, été employée, dans le cadre d'une analyse statistique, pour évaluer l'impact des paramètres du sol sur les rendements d'extraction et les effets matrice des composés. Cette étude a montré que certains paramètres du sols (argile, CEC,...) ont un impact sur les rendements d'extraction de certaines substances. D'un autre côté, nous avons observé que le pourcentage en carbone organique a une influence sur les effets matrice des stéroïdes hormonaux et de la pénicilline G. Nous avons également remarqué que des effets d'interaction existent entre certains facteurs. Ce travail très novateur sera très utile pour prédire l'efficacité d'une méthode en fonction des paramètres du sol et des composés à analyser.

Références bibliographiques :

- [1]: **M. J. L. d. Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo**, 2003. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A* 1000, 503.
- [2]: **D. S. Aga, S. O'Connor, S. Ensley, J. O. Payero, D. Snow, D. Tarkalason**, 2005. Determination of the Persistence of Tetracycline Antibiotics and Their Degradates in Manure-Amended Soil Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7165.
- [3]: **H. O. Pharmaceuticals**, 2006. Ruggedness of analytical methods developed for hormones, antibiotics and pharmaceutical products in sludge, soil and biowaste. CAE / ANJOU RECHERCHE, Veolia Water.
- [4]: **M. P. Schlusener, M. Spittler, K. Bester**, 2003. Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1003, 21.
- [5]: **A. M. Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev, S. H. Hansen**, 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1038, 157.
- [6]: **S. O'Connor, D. S. Aga**, 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 456.
- [7]: **Y. Picó, V. Andreu**, 2007. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1287.
- [8]: **J. Beausse**, 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry* 23, 753.
- [9]: **M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo**, 2005. LC–MS2 trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 645.
- [10]: **M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo**, 2007. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 637.
- [11]: **M. P. Schlusener, K. Bester**, 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution* 143, 565.
- [12]: **D. M. Pavlovic, S. Babic, A. J. M. Horva, M. Kastelan-Macan**, 2007. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 1062.
- [13]: **E. M. Golet, A. Strehler, A. C. Alder, W. Giger**, 2002. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction. *Analytical Chemistry* 74, 5455.
- [14]: **H. Runqvist, S. A. Bak, M. Hansen, B. Styrisshave, B. Halling-Sorensen, E. Björklund**, 2010. Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction—Are we developing sound extraction methods? *Journal of Chromatography A* 1217, 2447.
- [15]: **M. Lillenberg, S. Yurchenko, K. Kipper, K. Herodes, V. Pihl, K. Sepp, R. Löhmus, L. Nei**, 2009. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 5949.
- [16]: **I. Ferrer, E. T. Furlong**, 2002. Accelerated solvent extraction followed by on-line solid-phase extraction coupled to ion trap LC/MS/MS for analysis of benzalkonium chlorides in sediment samples. *Analytical Chemistry* 74, 1275.

- [17]: **J. C. Durán-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. S. Castro, B. Jiménez, R. Gibson**, 2009. The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 78, 1159.
- [18]: **S. Armenta, S. Garrigues, M. d. I. Guardia**, 2008. Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 497.
- [19]: **Y. Yamini, M. Asghari-Khiavi, N. Bahramifar**, 2002. Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets. *Talanta* 58, 1003.
- [20]: **E. Martinez-Carballo, C. Gonzalez-Barreiro, S. Scharf, O. Gans**, 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570.
- [21]: **A. Karci, I. A. Balcioglu**, 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment* 407, 4652.
- [22]: **P. A. Blackwell, H. C. H. Lützhof, H. P. Ma, B. Halling-Sorensen, A. B. A. Boxall, P. Kay**, 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058.
- [23]: **J. Xu, L. Wu, W. Chen, A. C. Chang**, 2008. Simultaneous determination of pharmaceuticals, endocrine disrupting compounds and hormone in soils by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1202, 189.
- [24]: **S. C. Kim, K. Carlson**, 2005. LC–MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 635.
- [25]: **M. Rabolle, N. H. Spliid**, 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40, 715.
- [26]: **S. L. Rice, S. Mitra**, 2007. Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 589, 125.
- [27]: **R. Liu, J. L. Zhou, A. Wilding**, 2004. Microwave-assisted extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for the determination of endocrine disrupting chemicals in river sediments. *Journal of Chromatography A* 1038, 19.
- [28]: **M. Anastassiades, K. Mastovska, S. J. Lehotay**, 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* 1015, 163.
- [29]: **M. Hansen, E. Björklund, K. A. Krogh, B. Halling-Sorensen**, 2009. Analytical strategies for assessing ionophores in the environment. *Trends in Analytical Chemistry* 28, 521.
- [30]: **M. J. Capdeville, P. Pardon, H. Budzinski**, 2010. Methodology development (ASE, SPE, LC/MS/MS) and application for the analysis of antibiotics in liquid and solid pig manure. 20th SETAC. Seville, Spain.
- [31]: **R. Carabias-Martinez, E. Rodriguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz**, 2006. Determination of endocrine-disrupting compounds in cereals by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–mass spectrometry Study of background contamination. *Journal of Chromatography A* 1137, 207.
- [32]: http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_ksiazka/Chapters/chapter11.pdf, 23/10/2012.
- [33]: **A. Hussen, R. Westbom, N. Megersa, L. Mathiasson, E. Björklund**, 2007. Selective pressurized liquid extraction for multi-residue analysis of organochlorine pesticides in soil. *Journal of Chromatography A* 1152, 247

- [34]: **Z. Zhang, S. M. Rhind, C. Kerr, M. Osprey, C. E. Kyle**, 2011. Selective pressurized liquid extraction of estrogenic compounds in soil and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 685, 29.
- [35]: **A. Rashid, S. Nawaz, H. Barker, I. Ahmad, M. Ashraf**, 2010. Development of a simple extraction and clean-up procedure for determination of organochlorine pesticides in soil using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 2933.
- [36]: **J. A. Padilla-Sanchez, P. Plaza-Bolanos, R. Romero-Gonzalez, A. Garrido-Frenich, J. L. M. Vidal**, 2010. Application of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based method for the simultaneous extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresols in agricultural soils, analyzed by using gas chromatography–triple quadrupole-mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 5724.
- [37]: **C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker**, 2008. Comparison of four extraction methods for the analysis of 24 pesticides in soil samples with gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–ion trap–mass spectrometry. *Talanta* 75, 284.
- [38]: **C. G. Pinto, M. E. F. Laespada, S. H. Martín, A. M. C. Ferreira, J. L. P. Pavon, B. M. Cordero**, 2010. Simplified QuEChERS approach for the extraction of chlorinated compounds from soil samples. *Talanta* 81, 385.
- [39]: **D. Drozdzyński, J. Kowalska**, 2009. Rapid analysis of organic farming insecticides in soil and produce using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394, 2241.
- [40]: **X. B. Yang, G. G. Ying, R. S. Kookana**, 2010. Rapid multiresidue determination for currently used pesticides in agricultural drainage waters and soils using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 45, 152.
- [41]: **M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, L. M. Ravelo-Pérez, M. A. Rodríguez-Delgado**, 2010. Evaluation of a modified QuEChERS method for the extraction of pesticides from agricultural, ornamental and forestal soils. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396, 2307.
- [42]: **F. Rouviere, A. Bulete, C. Cren-Olive, C. Arnaudguilhem**, 2012. Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. *Talanta* 93, 336.
- [43]: **AOAC**, 2007. AOAC Official Method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. AOAC INTERNATIONAL.
- [44]: **M. M. Aguilera-Luiz, J. L. M. Vidal, R. Romero-Gonzalez, A. G. Frenich**, 2008. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1205, 10.
- [45]: **M. J. O’Neil**, The Merck Index : An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 14th Edition.
- [46]: **P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Pico**, 2010. Determination of pharmaceuticals in soils and sediments by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 2471.
- [47]: **P. A. Blackwell, H. C. H. Lutzhoft, H. P. Ma, B. Halling-Sorensen, A. B. A. Boxall, P. Kay**, 2004. Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detector. *Journal of Chromatography A* 1045, 111.
- [48]: **B. O. Pule**, 2011. Solid-phase extraction based sample preparation for the determination of drug and organic pollutant residues. Rhodes university, Master of Science in Chemistry.

- [49]: **J. Wang, J. D. MacNeil, J. F. Kay**, 2011. Chemical Analysis of Antibiotic Residues in Food. Wiley.
- [50]: **J. B. Baugros, C. Cren-Olivé, B. Giroud, J. Y. Gauvrit, P. Lantéri, M. F. Grenier-Loustalot**, 2009. Optimisation of pressurized liquid extraction by experimental design multiresidue ultra-trace quantification of substances concerned by european regulations in sludge, sediments and atmospheric fallout by tandem mass spectrometry-high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216, 4941.
- [51]: **M. Seifrtová, L. Nováková, C. Lino, A. Pena, P. Solich**, 2009. An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta* 649, 158.
- [52]: **D. Barcelo, M. Petrovic**, 2008. Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Wastes: Occurrence, Analysis and Effects. Springer.
- [53]: **R. Calvet**, 2003. Le Sol Propriétés et fonctions - Tome 1: Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. DUNOD.
- [54]: **M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo**, 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678.
- [55]: **K. Kumar, S. C. Gupta, Y. Chander, A. K. Singh**, 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87, 1.
- [56]: **Y. Y. Yang**, Degradation and transport pathways of steroid hormones from human and animal waste. Colorado State University, For the Degree of Doctor of Philosophy.
- [57]: **T. Borch, J. G. Davis, Y. Y. Yang, R. B. Young**, 2009. Occurrence of Steroid Sex Hormones in the Cache la Poudre River, and Pathways for their Removal in the Environment. Colorado Water Institute.

CHAPITRE III

Cas particulier des tétracyclines et des fluoroquinolones

Contexte et objectif :

Le but de ce chapitre est de présenter une méthode permettant l'analyse des tétracyclines et des fluoroquinolones contenues dans le sol.

Initialement intégrés à la liste des substances cibles, ces composés se sont finalement révélés impossible à analyser par la méthode multi-résidus et multi-familles développée dans le chapitre II. Effectivement, ces composés sont très difficiles à extraire de la matrice solide (échanges cationiques, formation de complexes avec les cations présents dans le sol). De plus, leur extraction dépend très fortement des propriétés du sol et notamment de la quantité d'argile ainsi que de sa nature. Comme les sols sont très différents d'une région à une autre, l'analyse de ces deux familles d'antibiotiques dans la matrice solide est un challenge pour les analystes.

Résumé :

Nous avons sélectionné 4 tétracyclines (tétracycline, oxytétracycline, chlortétracycline et doxycycline) et 8 fluoroquinolones (ciprofloxacine, enrofloxacine, ofloxacine, norfloxacine, danofloxacine, marbofloxacine, orbifloxacine et difloxacine).

Nous avons, tout d'abord, mis au point une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les limites de détection et de quantification instrumentales (ILODs et ILOQs) ont été déterminées. Par la suite, nous avons évalué l'efficacité de deux méthodes d'extraction : la procédure QuEChERS et l'extraction par PLE. Etant donné que la méthode QuEChERS ne permettait pas d'extraire ces deux familles d'antibiotiques, nous avons alors optimisé l'extraction par PLE en nous attachant particulièrement au choix des solvants. Les résultats préliminaires prometteurs sont en cours de validation.

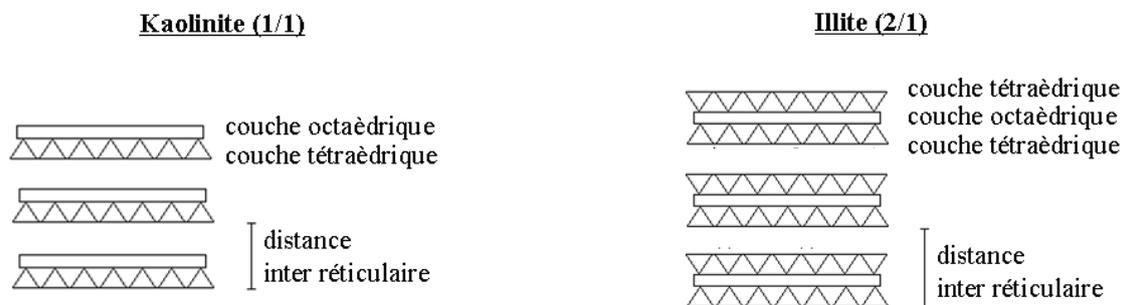
I. Enjeux de ces molécules : adsorption sur l'argile

L'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones représente un véritable défi analytique pour les chimistes. Nous avons cherché à expliquer, à l'aide de travaux antérieurs, les difficultés rencontrées pour extraire ces composés de la matrice solide. Beaucoup de paramètres pourraient être mis en cause tels que la CEC (capacité d'échange cationique), la présence d'argile, de carbone organique ou encore de colloïdes organiques (cf. chapitre II). Cependant, d'après la littérature, l'argile contenue dans les sols est en grande partie responsable de la forte adsorption de ces substances sur la matrice solide. Nous allons donc,

dans cette partie, nous focaliser sur le rôle de l'argile et essayer d'expliquer, à partir de travaux antérieurs, pourquoi elle a tant d'impact sur l'adsorption des tétracyclines et des fluoroquinolones et donc sur leur extraction du sol.

Pour une meilleure compréhension de cette partie, il convient de débiter par une brève description des argiles. Il s'agit d'un mélange de minéraux qui appartiennent au groupe des phyllosilicates, constitués d'un empilement de feuillets tétraédriques (SiO_4) et octaédrique (AlO_6) séparés par un espace appelé espace interfoliaire. La distance d entre les deux feuillets est appelée distance inter réticulaire. Selon la structure chimique des argiles, il est possible d'en distinguer plusieurs types: les kaolinites (kaolinites, dickites, hallosyites, nacrites), les illites, les smectites (montmorillonites, nontronite, saponite,...), les chlorites, les micas, la glauconie (proche de l'illite), la vermiculite... [1]. Elles diffèrent par les structures et le type d'empilement de leurs feuillets ; nous distinguons principalement les argiles 1/1 (1 couche tétraédrique et 1 couche octaédrique) qui comprennent les kaolinites et les argiles 2/1 (2 couches tétraédriques et 1 couche octaédrique) qui incluent les illites, les smectites et les chlorites (**Figure III.25**) [2].

Figure III.25 : Schéma représentant la structure des argiles : exemple de la kaolinite (2/1) et de l'illite (2/1) [2]



De plus, la kaolinite est constituée de feuillets neutres alors que des cations K^+ sont adsorbés dans l'espace interfoliaire des illites. Les smectites, ou montmorillonites sont, quant à elles, généralement calciques (Ca^{2+}) ou plus rarement sodiques (Na^+). Enfin, en ce qui concerne les chlorites, leurs espaces interfoliaires sont garnis par une couche composée de Mg et d' OH [2].

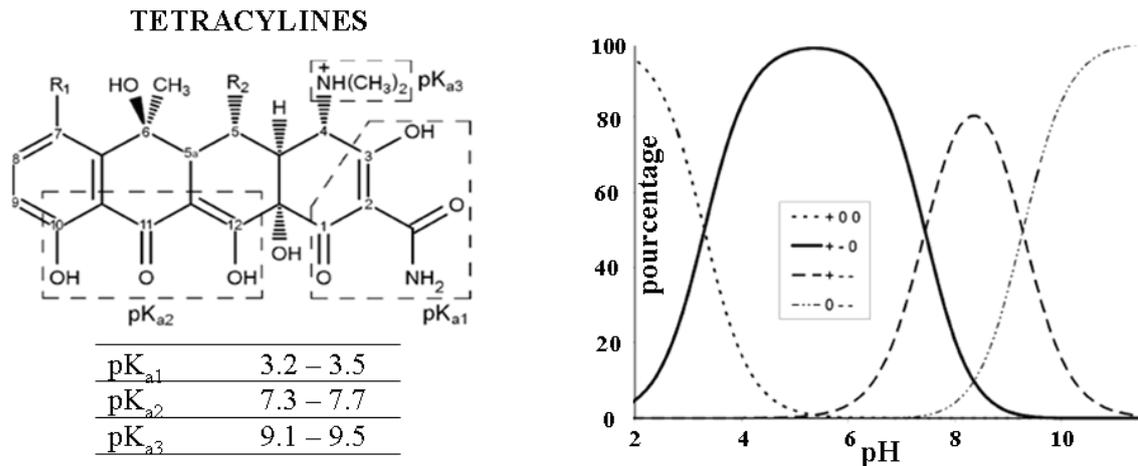
A. Analyse de travaux antérieurs :

L'influence de la teneur en argile sur l'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones a été notée. En effet, P. A. Blackwell *et al.* ont remarqué que les rendements d'extraction de l'oxytétracycline sont plus faibles lors de la présence d'argile dans le sol [3].

De plus, P. H. Chang *et al.* ainsi que K. Kumar *et al.* ont rapporté que l'intercalation des tétracyclines entre les couches d'argile est le principal mécanisme d'adsorption de ces substances sur la matrice solide [4, 5]. L'interaction entre les tétracyclines et l'argile est essentiellement due à un processus d'échange cationique. Des études récentes ont montré que ces composés ont une grande affinité avec la montmorillonite et la rectorite [4]. Ceci n'est pas étonnant puisque comme mentionné plus haut, des cations Ca^{2+} et Na^+ sont présents entre les feuillets de la montmorillonite. De même, la rectorite est un mélange d'illite et de smectite qui contiennent soit des cations, K^+ soit du Ca^{2+} et du Na^+ dans leurs espaces interfoliaires. Des phénomènes d'échanges cationiques peuvent donc avoir lieu entre les tétracyclines chargées positivement et les cations présents dans les espaces interfoliaires causant ainsi une augmentation de la distance entre les couches [5]. En plus des phénomènes d'échanges cationiques, les tétracyclines peuvent également former de très forts complexes avec les cations di- et tri-valents présents entre les couches d'argile [6]. Ainsi, S. A. Sassman et L. S. Li ont mentionné la formation de complexes Ca-tétracyclines entre les couches de montmorillonites à pHs entre 1.5 et 8.7 [7].

En plus du processus d'intercalation, des interactions peuvent s'établir entre les tétracyclines et la surface de l'argile. Par exemple, la forme zwitterionique (+ - 0) (cf. **Figure III.26**) peut former un complexe avec la surface de l'argile [8]. Des liaisons hydrogènes peuvent également s'établir avec les oxygènes des groupements hydroxyle présents à la surface de l'argile [5, 6]. Cependant, le processus d'échange cationique est plus favorable thermodynamiquement que les autres phénomènes ; il sera alors dominant même si seulement une petite partie du composé est sous forme cationique [7].

Figure III.26 : Différentes formes des tétracyclines en fonction du pH



Pour illustrer l'influence de l'argile sur l'adsorption des tétracyclines sur la matrice solide, des valeurs de K_d (coefficient de distribution entre le sol et l'eau) sont présentées dans la littérature pour différents types de sol. Plus le K_d est important, plus l'affinité entre le composé et le sol est importante. Le **Tableau III.30** rassemble des valeurs de K_d pour la tétracycline, la chlortétracycline et l'oxytétracycline dans différents types de sol.

Tableau III.30 : Valeurs de K_d (L/kg) pour la tétracycline et la chlortétracycline pour deux sols ayant des quantités d'argile différentes

Composés	sablo-limoneux (5.8%** d'argile)	limono-sableux (10%* ou 16.9%** d'argile)	limono-argileux (34%* d'argile)
tétracycline*		1147	2370
chlortétracycline*		1280	2386
oxytétracycline**	417	1026	

* [5]

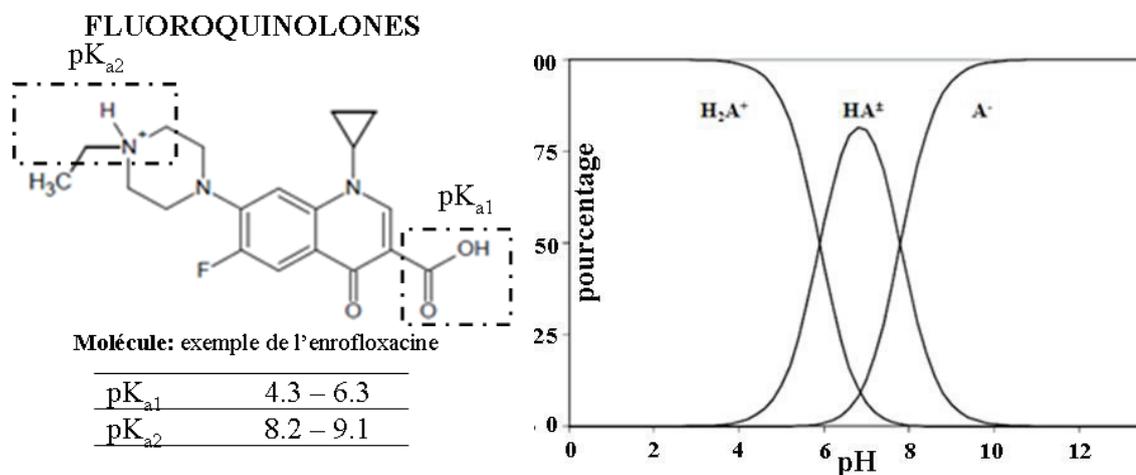
** [9]

Nous observons que les valeurs de K_d augmentent avec la quantité d'argile contenue dans le sol.

En ce qui concerne les fluoroquinolones, A. Nowara *et al* [10]. ont indiqué que les fluoroquinolones sont également adsorbées entre les couches d'argile. Ce phénomène d'intercalation a également été rapporté par K. Kumar *et al.* [5]. De plus, A. Nowara *et al.* ont montré que les interactions sont plus fortes lorsqu'il s'agit de montmorillonite plutôt que de kaolinite par exemple, pour un même pourcentage en argile. Cette observation n'est pas surprenante car comme mentionné plus haut la kaolinite est une argile constituée de feuillets

neutres alors que la montmorillonite contient du Ca^{2+} et parfois du Na^+ dans son espace interfoliaire. Des phénomènes d'échanges cationiques entre les substances chargées positivement (plutôt à faible pH, voir **Figure III.27**) et les cations de l'argile peuvent donc avoir lieu dans le dernier cas ce qui peut expliquer la plus forte adsorption des fluoroquinolones sur l'argile lorsqu'il s'agit de montmorillonite. Des réactions de complexation peuvent également avoir lieu entre les fluoroquinolones et les cations présents dans les espaces interfoliaires.

Figure III.27 : Différentes formes des fluoroquinolones (exemple de l'enrofloxacin) en fonction du pH



Le **Tableau III.31** présente les valeurs de K_d pour l'enrofloxacin pour deux sols ayant des argiles différentes.

Tableau III.31 : Valeurs de K_d pour des sols contenant soit de la kaolinite soit de la montmorillonite

	% argile	argile dominant	K_d (L/kg) enrofloxacin
sol 1	23.4	kaolinite	260
sol2	17.2	montmorillonite	5612

A. Nowara *et al.* ont également évalué les K_d correspondant à l'adsorption de l'enrofloxacin sur les deux types d'argile, la kaolinite et la montmorillonite. Ils ont obtenu des valeurs de 3548 L/kg et 6310 L/kg pour la kaolinite et la montmorillonite respectivement. Ces résultats confirment bien la forte adsorption des fluoroquinolones sur la montmorillonite [10, 11].

Comme pour les tétracyclines, des interactions peuvent s'établir à la surface de l'argile et aboutir à la formation de complexes ou de liaisons hydrogènes [11].

B. Caractérisation du sol utilisé pour le développement de la méthode

La nature de l'argile a un impact sur l'adsorption des tétracyclines et fluoroquinolones. Effectivement, nous avons vu précédemment que la montmorillonite est le type d'argile qui adsorbe le plus fortement les substances étudiées.

Une analyse par diffraction X a été effectuée pour déterminer la nature de l'argile contenue dans le sol utilisé pour réaliser les différents tests d'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones de la matrice solide dont les propriétés sont présentées dans le **Tableau III.32**.

Tableau III.32 : Propriétés du sol A utilisé pour le développement de la méthode d'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones du sol

Sol	Texture sol	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	CO*	N _{tot} *	MO*	pH	CEC (cmol/kg)
A	limono-argileux	32.4	45.1	22.5	1.73	0.173	2.99	6.25	15.6

CO : Carbone Organique, * N_{tot} : Azote total, * MO : Matière Organique

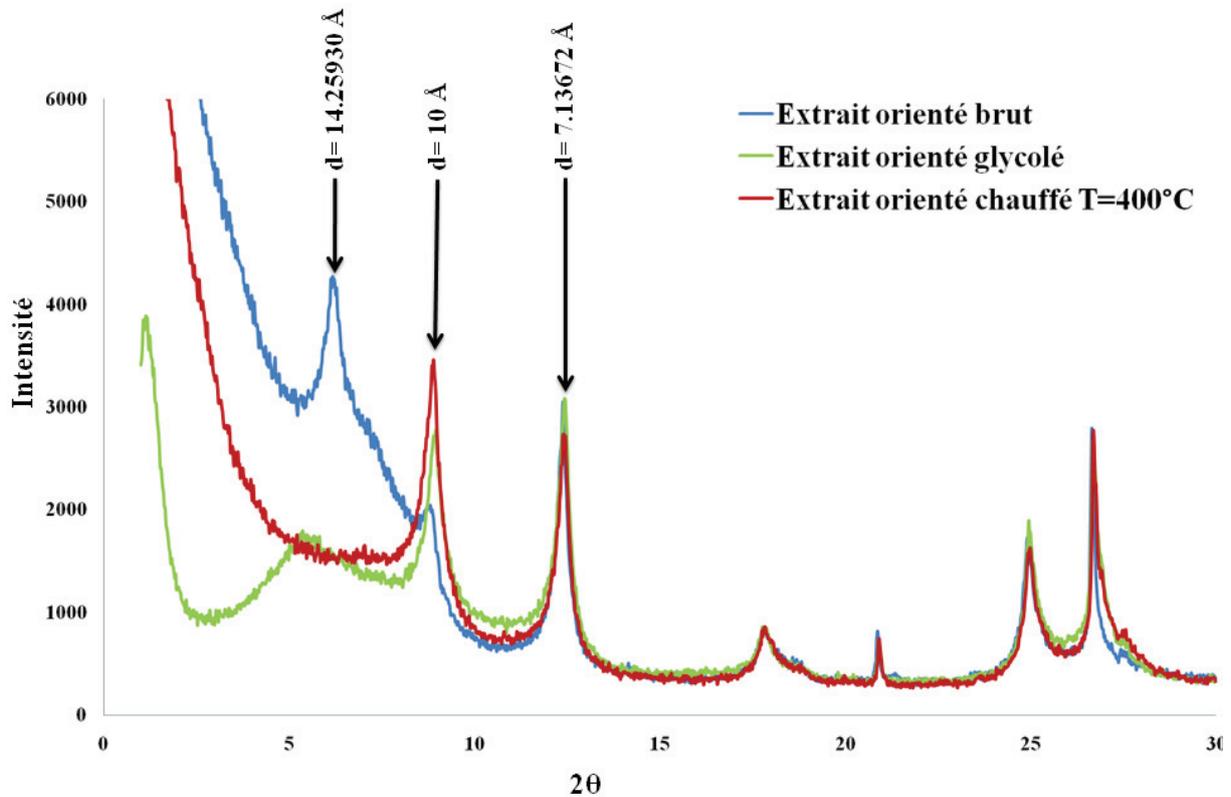
Les diffractogrammes obtenus pour les différents échantillons réalisés (non traité, glycolé et chauffé, voir partie II) sont exposés à la **Figure III.28**. A partir de l'observation de disparition ou décalage des pics selon les différents traitements, et des valeurs d, il a été possible d'attribuer un type d'argile à chaque pic.

Le pic à $d = 7.13672 \text{ \AA}$ correspond à de la kaolinite. Effectivement cette argile n'est pas affectée par la glycolation et survit au chauffage [12].

Le pic à $d = 10 \text{ \AA}$ correspond soit à de l'illite-montmorillonite interstratifiée soit à de l'illite vermicullite. Pour en savoir plus, il faudrait chauffer notre argile à une température plus élevée ($T = 550^\circ\text{C}$).

Enfin, le pic à $d = 14.25930 \text{ \AA}$ correspond à de la montmorillonite. La glycolation entraîne un décalage et un élargissement du pic. De plus, cette argile disparaît au chauffage [13].

Figure III.28 : Diffractogrammes de l'argile contenue dans le sol A ayant subi différents traitements (extrait orienté, glycolé et chauffé)



L'argile contenue dans le sol utilisé pour le développement de la méthode contient donc de la kaolinite, de la montmorillonite et de l'illite. De la vermiculite peut également être présente. En plus du fort pourcentage en argile contenu dans notre sol (32.4%), cette dernière est composée de montmorillonite qui est connue pour adsorber fortement les tétracyclines et les fluoroquinolones. De plus l'illite contient du K^+ dans son espace interfoliaire, des mécanismes d'échanges cationiques pourraient également avoir lieu entre ce cation et les substances chargées positivement. L'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones de ce sol est donc un réel challenge.

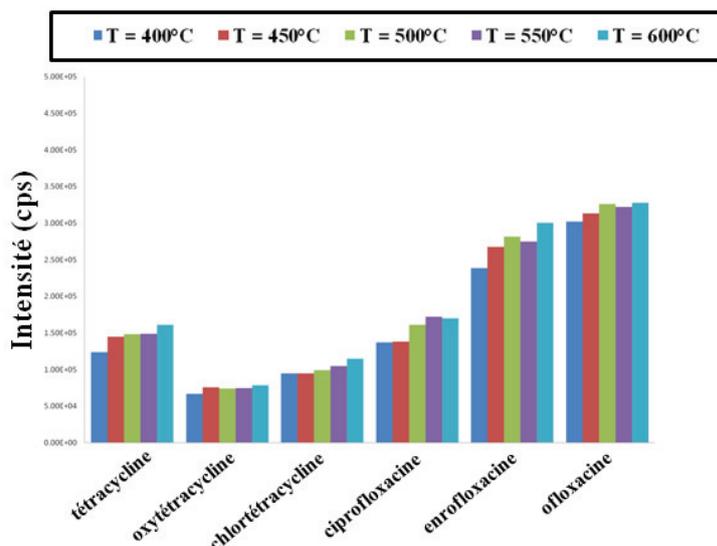
II. Séparation et détection des tétracyclines et des fluoroquinolones :

Optimisation des paramètres de la détection par spectrométrie de masse en tandem :

Les paramètres de détection par spectrométrie de masse en tandem ont été optimisés. Ces substances s'ionisent positivement, l'ion précurseur correspondant à la molécule protonée $[M+H]^+$.

L'effet de la température du spectromètre sur l'ionisation des composés a été évalué. Nous avons testé $T = 400^{\circ}\text{C}$, $T = 450^{\circ}\text{C}$, $T = 500^{\circ}\text{C}$, $T = 550^{\circ}\text{C}$ et $T = 600^{\circ}\text{C}$. Très peu de différences ont été notées entre les essais. **Cependant, quelques substances étant légèrement mieux ionisées à $T = 600^{\circ}\text{C}$, cette dernière température a été choisie (Graphique III.34).**

Graphique III.34 : Intensités des pics (nombre de coups) des tétracyclines et des fluoroquinolones à différentes températures de source



Optimisation de la séparation par chromatographie liquide :

Afin de séparer ces 12 composés, nous avons utilisé la même colonne chromatographique que celle employée pour séparer les 23 substances ionisées positivement de l'étude multi-résidus et multi-familles : la colonne Zorbax Eclipse PLUS C18 (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm).

En ce qui concerne les phases mobiles, nous avons sélectionné comme phase aqueuse (A) une solution d'acide formique à 0.01% dans de l'eau MilliQ (pH = 3.3) qui est identique à celle

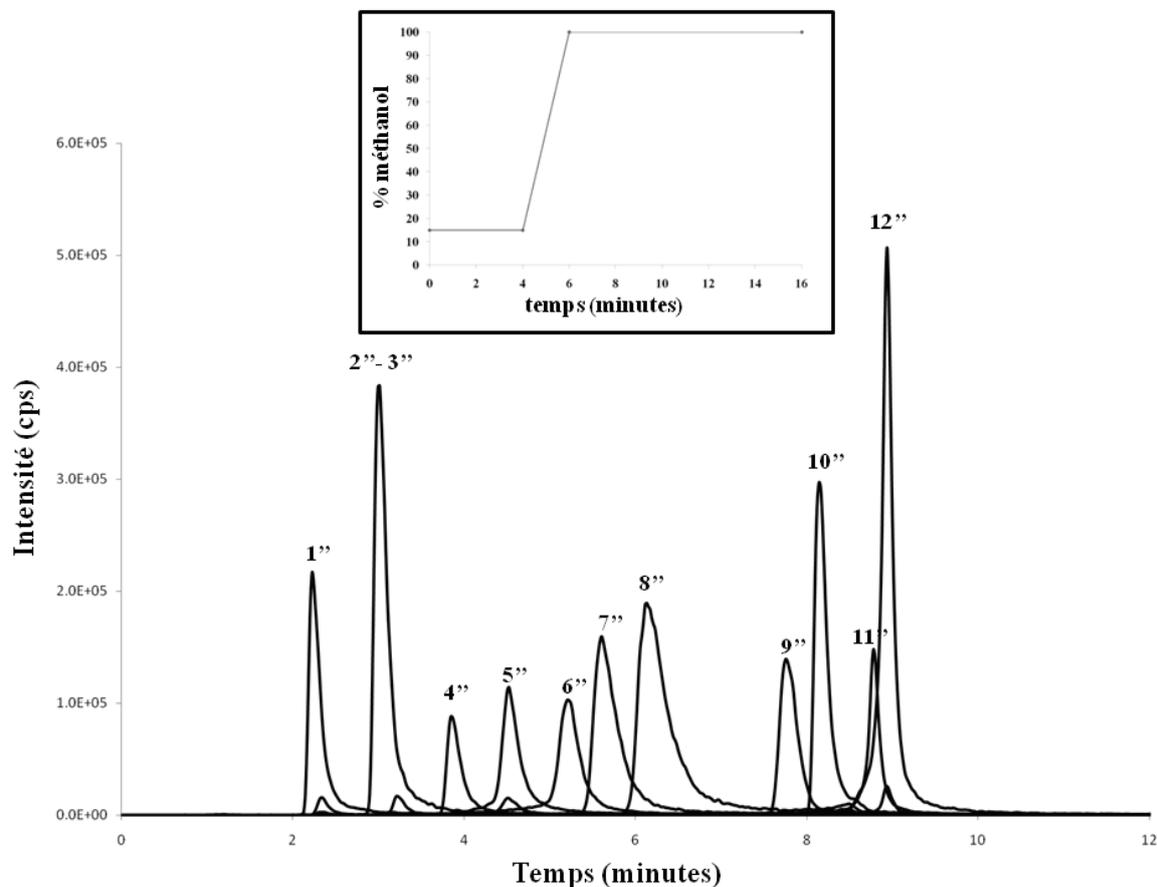
choisie pour les composés ionisés positivement de l'étude multi-résidus. L'acide formique est fréquemment utilisé pour l'analyse des tétracyclines et fluoroquinolones par chromatographie liquide [6, 14-17]. Nous avons, par la suite, testé l'acétonitrile et le méthanol pour la phase (B). Le méthanol permet une meilleure ionisation de ces deux familles de composés. En effet, les tétracyclines présentent des signaux de 1.3 à 1.6 fois plus intenses avec le méthanol qu'avec l'acétonitrile. De même, les fluoroquinolones sont de 1.3 à 1.5 fois mieux ionisées avec le méthanol (**Tableau III.33**). Compte tenu de ces derniers résultats, **le méthanol a donc été choisi comme phase (B)**.

Tableau III.33 : Intensités des pics (nombre de coups) des tétracyclines et des fluoroquinolones pour l'acétonitrile et le méthanol comme phase B

Composés	acétonitrile	méthanol	rapport (méthanol/acétonitrile)
tétracyclines			
tétracycline	6.0×10^4	9.6×10^4	1.6
oxytétracycline	4.0×10^4	5.7×10^4	1.5
chlortétracycline	6.0×10^4	7.8×10^4	1.3
fluoroquinolones			
ciprofloxacin	8.0×10^4	1.0×10^5	1.3
enrofloxacin	1.5×10^5	2.0×10^5	1.3
ofloxacin	1.8×10^5	2.6×10^4	1.5

Dans les conditions retenues, les 12 composés sont séparés en moins de 10 minutes. La **Figure III.29** représente le chromatogramme de la séparation des tétracyclines et fluoroquinolones. Les numéros permettant d'associer les pics aux différentes substances apparaissent dans le **Tableau III.34** entre parenthèses.

Figure III.29 : Chromatogramme représentant la séparation des tétracyclines et fluoroquinolones ($C = 200 \mu\text{g/L}$ et $V_{\text{inj}} = 25 \mu\text{L}$)



Les limites de détection et de quantification instrumentales (ILODs et ILOQs respectivement) ont été déterminées avec un rapport signal sur bruit égal à 3 et 10 respectivement. Nous avons obtenu ces résultats en injectant $25 \mu\text{L}$ d'une solution de standards dans 95/5 $\text{H}_2\text{O}/\text{méthanol}$ (Tableau III.34).

Tableau III.34 : Temps de rétention (t_r), ILODs et ILOQs des tétracyclines et fluoroquinolones

Composés	t_r (min)	ILOD ($\mu\text{g/L}$)	ILOQ ($\mu\text{g/L}$)
tétracyclines			
tétracycline	4.52 (5'')	0.5	1.5
oxytétracycline	5.20 (6'')	0.25	1
chlortétracycline	8.79 (11'')	1	2
doxycycline	8.94 (12'')	1	2
fluoroquinolones			
ciprofloxacin	3.86 (4'')	0.4	1
enrofloxacin	6.12 (8'')	0.5	1
ofloxacin	3.01 (2'')	0.4	1
norfloxacin	3.21 (3'')	5	10

danofloxacin	5.61 (7'')	2	5
marbofloxacin	2.23 (1'')	0.5	1
orbifloxacin	7.76 (9'')	0.1	0.4
difloxacin	8.16 (10'')	0.3	1

Nous remarquons que les tétracyclines ont des ILODs comprises entre 0.25 et 1 µg/L et leurs ILOQs varient entre 1 et 2 µg/L. Les fluoroquinolones, quant à elles, ont des ILODs entre 0.1 et 5 µg/L et des ILOQs entre 0.4 et 10 µg/L. Nos résultats sont, malgré certains écarts, comparables à ceux retrouvés dans la littérature. Effectivement, des ILODs entre 0.05 et 2.6 µg/L et des ILOQs entre 5.1 et 9.7 µg/L ont été mentionnés pour la tétracycline, la chlortétracycline, l'oxytétracycline et la doxycycline [18, 19]. En ce qui concerne les fluoroquinolones, des ILODs de 4.5 µg/L, 4.9 µg/L et des ILOQs de 16 µg/L, 18 µg/L ont été rapportées pour l'enrofloxacin et la ciprofloxacin respectivement. Ces valeurs sont nettement plus élevées que celles obtenues avec notre méthode. Cependant, une détection par spectrométrie de masse simple a été utilisée alors que la LC-MS/MS a été employée dans notre étude [18].

D'autres études ont porté sur l'analyse des tétracyclines et des fluoroquinolones mais la détection est réalisée à l'aide d'un détecteur UV ou par fluorescence [3, 16, 17]. Les résultats ne sont donc pas comparables aux nôtres.

III. Extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones du sol :

Deux méthodes d'extractions, QuEChERS et PLE ont été développées et comparées pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones du sol.

A. Extraction QuEChERS :

Plusieurs solvants d'extraction ont été évalués pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones avec la méthode QuEChERS. Pour cette optimisation, nous avons utilisé un sol dont les propriétés sont données dans le **Tableau III.32**. Nous avons effectué l'extraction à partir de 5 g de sol dopés à 500 ng/g, en utilisant le tampon acétate, 10 mL d'eau et 10 mL de solvant.

Les solvants comparés sont : acétonitrile/H₂O, acétonitrile + 1% d'acide acétique/H₂O, acétonitrile + acide phosphorique/H₂O, acétonitrile + 1% d'acide acétique/Na₂EDTA (0.1M),

acétonitrile + acide phosphorique/Na₂EDTA (0.1M), acétonitrile/acide citrique (0.2M) (50/50) ainsi que le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle. Ces solvants sont les mêmes que ceux testés pour l'étude multi-résidus. Seul le solvant à base d'acide citrique a été testé en plus car ce dernier est souvent utilisé pour extraire les tétracyclines du sol [6].

Les résultats montrent qu'aucun solvant ne permet d'extraire les composés appartenant à ces deux familles d'antibiotiques. Effectivement, les rendements sont inférieurs à 3 % pour l'ensemble des solvants testés, comme le montrent les données du Tableau III.35.

Tableau III.35 : Rendements d'extraction QuEChERS (%) des tétracyclines et des fluoroquinolones pour l'ensemble des solvants testés

<u>solvants testés</u>	<u>tétracyclines</u>	<u>fluoroquinolones</u>
acétonitrile/H ₂ O	0.2 – 0.5	0.1 – 0.4
acétonitrile + 1% d'acide acétique/H ₂ O	0.3 – 1.1	0.1 – 0.3
acétonitrile + acide phosphorique/H ₂ O	0.2 – 0.5	0.1 – 0.2
acétonitrile + 1% d'acide acétique/Na ₂ EDTA	0.3 – 0.9	0.2 – 0.5
acétonitrile + acide phosphorique/Na ₂ EDTA	0.3 – 1.1	0.2 – 0.4
acétonitrile/acide citrique (0.2M) (50/50)	ND	ND
dichlorométhane	0.3 – 2.7	0.2 – 0.3
acétate d'éthyle	0.4 – 1.8	0.1 – 0.2

ND : Non détecté

Compte tenu des résultats obtenus sur cette large gamme de solvants, le développement de la méthode QuEChERS n'a pas été poursuivi pour l'extraction des tétracyclines et fluoroquinolones. Cette extraction est trop douce, il n'y a donc pas assez d'énergie pour rompre les complexes. Nous nous sommes donc orientés vers l'extraction par PLE.

B. Extraction par PLE :

Choix de la température, de la pression, du temps statique et du nombre de cycles :

Quelques travaux antérieurs se sont consacrés à l'extraction des tétracyclines et des fluoroquinolones du sol par PLE. Des températures relativement basses ont été employées pour extraire les tétracyclines, substances sensibles à la dégradation thermique [6, 20, 21]: entre la température ambiante et 100°C. De plus, l'utilisation d'une température élevée entraîne une autre limitation : la co-extraction des composés de la matrice qui peuvent interférer avec les analytes cibles lors de l'analyse [21]. En ce qui concerne les

fluoroquinolones une température de 100°C est généralement employée [11, 22]. Nous avons donc fixé une température de 80°C.

Une pression comprise entre 100 et 150 bars est souvent employée pour ces deux familles d'antibiotiques [6, 11, 20, 22]. Nous l'avons donc fixée à 120 bars.

Un temps statique de 10 minutes étant généralement rapporté [6, 11, 20, 22], nous avons choisi $t = 10$ minutes.

Enfin, 2 ou 3 cycles sont souvent mentionnés dans la littérature pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones. Nous avons choisi d'exécuter 2 cycles [6, 20, 23].

Choix du solvant d'extraction :

Nous avons ensuite attaché beaucoup d'importance au choix du solvant pour optimiser l'extraction à la fois des tétracyclines et des fluoroquinolones. Tous les essais ont été réalisés à partir de 1g de sol dopé à 500 ng/g en chacune des substances.

1) Tests de solvants classiques:

Nous avons tout d'abord évalué l'efficacité de solvants classiques : l'acétone, le méthanol ou encore les mélanges acétone/méthanol (50/50), méthanol/H₂O (80/20) et acétonitrile/H₂O (70/30). Les extraits obtenus ont été repris dans 1 mL de solution à 95/5 H₂O/méthanol pour ensuite être injectés en LC-MS/MS. Les résultats montrent que seuls les mélanges méthanol/H₂O (80/20) et acétonitrile/H₂O (70/30) permettent d'extraire un minimum de fluoroquinolones (jusqu'à 6% et 11% respectivement, résultats présentés en **Annexe 10**).

2) Tests de mélanges plus complexes à base d'acide citrique:

Nous avons donc poursuivi les tests avec des mélanges de solvants plus complexes, incluant une partie aqueuse. Nous avons choisi d'évaluer des solvants à base d'acide citrique. Effectivement, il a été mis en évidence que les tétracyclines et les fluoroquinolones forment de forts complexes avec les cations di- et trivalents contenus entre les couches d'argile ou avec les groupes hydroxy à la surface des particules du sol [6, 11]. De plus, des échanges cationiques, des réactions hydrophobes ou encore la formation de liaisons hydrogènes peuvent également avoir lieu [6]. Pour réduire ces interactions, il est possible d'ajouter un agent complexant au solvant d'extraction. L'utilisation de l'EDTA ne peut pas être envisagée car il risquerait de précipiter dans le système PLE [6]. C'est pourquoi, nous avons employé l'acide citrique.

Les fluoroquinolones sont extraites avec de l'acétonitrile [22]. D'un autre côté, les tétracyclines semblent être plus fréquemment extraites de la matrice solide avec des solvants à base de méthanol [6, 15, 21], ce que nous avons-nous-même observé lors de notre première série d'expérimentations. Nous avons donc évalué des solvants contenant à la fois de l'acétonitrile, du méthanol et de l'acide citrique. Différentes compositions ainsi que différents pHs ont été comparés. Des pHs compris entre 2 et 5 sont le plus souvent utilisés pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones du sol [6, 17, 22, 24]. La plupart des extractions des tétracyclines s'effectuant à des pHs se situant autour de 4 [21].

Nous avons donc choisi de tester différentes compositions :

- 25/25/50 méthanol/acétonitrile/0.2 M acide citrique ajusté à pH 3 et 4.5
- 33/33/33 méthanol/acétonitrile/0.2 M acide citrique ajusté à pH 3 et 4.5
- 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2 M acide citrique ajusté à pH 3 et 4.5
- 50/50 méthanol/acétonitrile (acide citrique à 0.1 M)

A. M. Jacobsen *et al.* ont montré qu'une très forte concentration en acide citrique (supérieure à 0.2 M dans la partie aqueuse du mélange 50/50 méthanol/solution aqueuse d'acide citrique) ne permet pas d'améliorer les rendements d'extraction [6]. Nous avons donc choisi d'introduire 0.2 M d'acide citrique dans la fraction aqueuse de chacun des mélanges et l'équivalent de 0.1 M pour le mélange 50/50 méthanol/acétonitrile. De la soude a été ajoutée pour ajuster les pHs aux valeurs souhaitées.

Les extraits obtenus dans ces conditions étant très chargés et donc difficilement injectables en LC-MS/MS, une purification/préconcentration par SPE a été réalisée à l'aide de cartouches StrataX (200 mg).

Les 20 mL d'extraits PLE obtenus ont été dilués dans 480 mL d'eau MilliQ. Les conditions de la SPE sont exposées dans le **Tableau III.36**.

Tableau III.36 : Paramètres de la SPE pour purifier et préconcentrer les extraits de sol contenant les tétracyclines et les fluoroquinolones

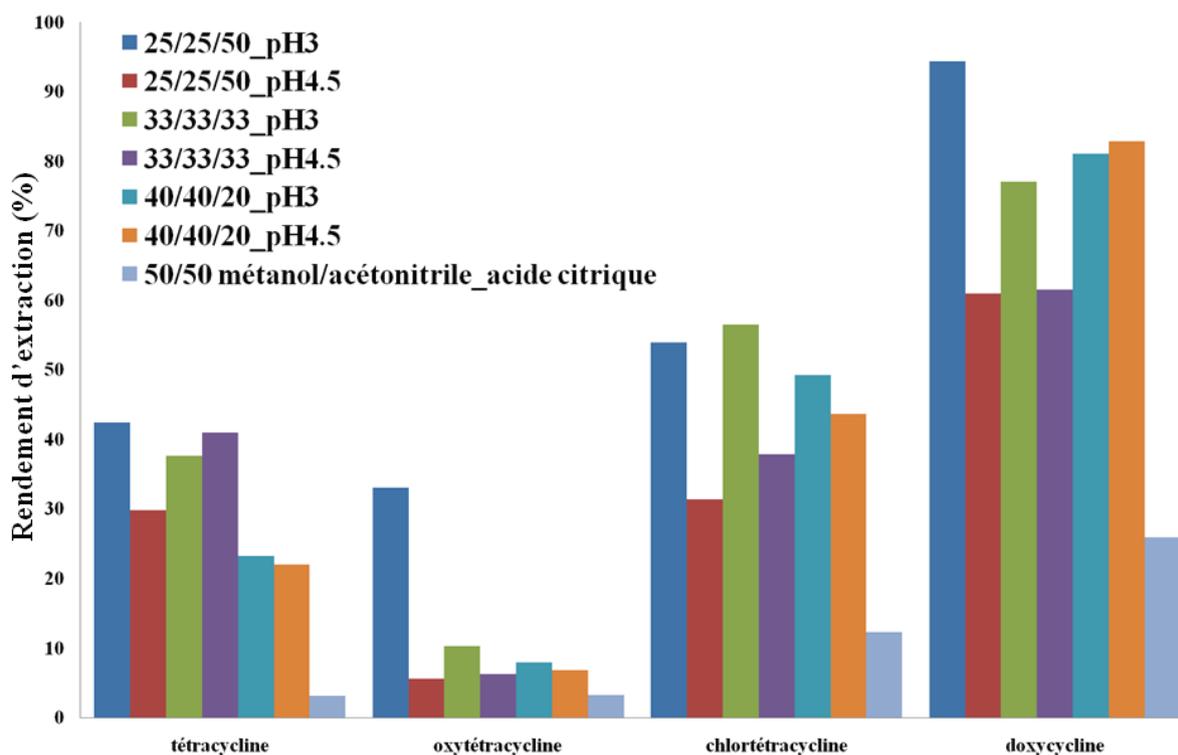
ETAPES	Solvant	Volume	Débit
Conditionnement	méthanol	5 mL	10 mL/min
Conditionnement	H ₂ O MilliQ	5 mL	10 mL/min
Chargement	échantillon	500 mL	5 mL/min

Rinçage	H ₂ O MilliQ	5 mL	10 mL/min
Séchage	Temps = 15 minutes		
Elution	méthanol	6 mL	2 mL/min

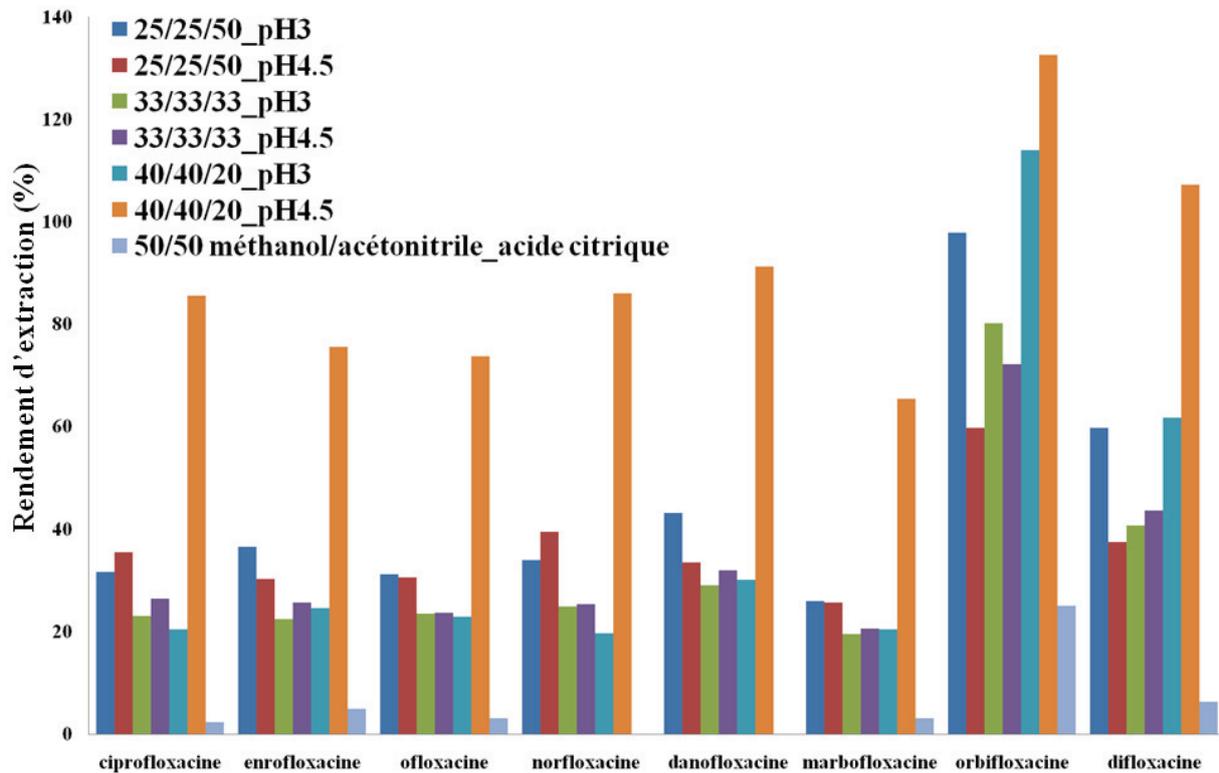
Pour évaluer uniquement les rendements d'extraction par PLE, nous avons comparé les réponses obtenues entre un dopage effectué avant extraction et un dopage des extraits de sol après l'extraction mais avant l'étape de purification/préconcentration. Après la SPE, l'extrait est évaporé à sec puis repris dans 1 mL de solution à 95/5 H₂O/méthanol.

Les rendements d'extraction PLE des tétracyclines et fluoroquinolones pour les différents solvants testés sont rassemblés sur les **Graphiques III.35 et III.36**.

Graphique III.35 : Rendements d'extraction PLE des tétracyclines pour les différents solvants testés



Graphique III.36 : Rendements d'extraction PLE des fluoroquinolones pour les différents solvants testés



Nous observons que le mélange 50/50 méthanol/acétonitrile contenant de l'acide citrique extrait très peu ces substances. Un minimum d'eau est nécessaire à l'extraction des tétracyclines et fluoroquinolones.

De plus, nous remarquons que les tétracyclines sont le mieux extraites avec le solvant 25/25/50 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 3 (rendements d'extraction entre 33 et 94%). Le solvant 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 4.5 permet, quant à lui, d'obtenir les rendements d'extraction les plus élevés pour les fluoroquinolones (rendements d'extraction entre 65 et 133%). Nous avons donc retenu deux solvants différents pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones.

IV. Conclusion :

Malgré la difficulté pour extraire les tétracyclines et les fluoroquinolones d'un sol argileux contenant à la fois de la montmorillonite et de l'illite (argiles adsorbant fortement les tétracyclines et les fluoroquinolones), deux méthodes d'extraction par PLE ont été

développées. Effectivement, les mélanges 25/25/50 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 3 et 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 4.5 permettent d'extraire respectivement les tétracyclines et les fluoroquinolones. Peu ou pas de méthodes ont été mises en place pour extraire des tétracyclines et des fluoroquinolones de sol très argileux. Les deux procédures d'extraction sont en cours de validation.

A l'aide de ces deux méthodologies, il serait intéressant d'évaluer les rendements d'extraction de ces composés pour des sols ayant des quantités d'argile différentes. Pour cette comparaison, la nature de l'argile devra être similaire pour chaque échantillon ce qui permettra une étude uniquement de l'influence de la quantité d'argile du sol. De même, nous pourrions comparer les rendements d'extraction pour des sols ayant environ le même pourcentage en argile, mais de natures distinctes. Dans ce cas, nous évaluerons l'impact du type d'argile présente dans le sol.

Références bibliographiques :

- [1]: <http://bu.umc.edu.dz/theses/chimie/BAT5998.pdf>, 18/09/2012.
- [2]: <http://www.u-picardie.fr/beauchamp/mst/argiles.htm>, 28/09/2012.
- [3]: **P. A. Blackwell, H. C. H. Lützhof, H. P. Ma, B. Halling-Sorensen, A. B. A. Boxall, P. Kay**, 2004. Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC–UV and fluorescence detection. *Talanta* 64, 1058.
- [4]: **P. H. Chang, Z. Li, W. T. Jiang, J. S. Jean**, 2009. Adsorption and intercalation of tetracycline by swelling clay minerals. *Applied Clay Science* 46, 27.
- [5]: **K. Kumar, S. C. Gupta, Y. Chander, A. K. Singh**, 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87, 1.
- [6]: **A. M. Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev, S. H. Hansen**, 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1038, 157.
- [7]: **S. A. Sassman, L. S. Li**, 2005. Sorption of Three Tetracyclines by Several Soils: Assessing the Role of pH and Cation Exchange. *Environmental Science and Technology* 39, 7452.
- [8]: **J. Wang, J. Hu, S. Zhang**, 2010. Studies on the sorption of tetracycline onto clays and marine sediment from seawater. *Journal of Colloid and Interface Science* 349, 578–582.
- [9]: **M. Rabolle, N. H. Spliid**, 2000. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil. *Chemosphere* 40, 715.
- [10]: **A. Nowara, J. Burhenne, M. Spiteller**, 1997. Binding of Fluoroquinolone Carboxylic Acid Derivatives to Clay Minerals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1459.
- [11]: **Y. Picó, V. Andreu**, 2007. Fluoroquinolones in soil—risks and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1287.
- [12]: http://www.axaa.org/index.php?option=com_content&view=article&id=13:clayanalysisxrdpart2&catid=10:resourcecentredocuments&Itemid=7, 18/09/2012.
- [13]: www.ajol.info/index.php/tjs/article/download/73624/63785, 18/09/2012.
- [14]: **M. Lillenberg, S. Yurchenko, K. Kipper, K. Herodes, V. Pihl, K. Sepp, R. Lõhmus, L. Nei**, 2009. Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 5949.
- [15]: **D. S. Aga, S. O'Connor, S. Ensley, J. O. Payero, D. Snow, D. Tarkalason**, 2005. Determination of the Persistence of Tetracycline Antibiotics and Their Degradates in Manure-Amended Soil Using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 7165.
- [16]: **T. Tylova, J. Olsovska, P. Novak, M. Flieger**, 2010. High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. *Chemosphere* 78, 353.
- [17]: **A. Karci, I. A. Balcioglu**, 2009. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. *Science of the Total Environment* 407, 4652.
- [18]: **E. Martinez-Carballo, C. Gonzalez-Barreiro, S. Scharf, O. Gans**, 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570.
- [19]: **A. Jia, Y. Xiao, J. Hu, M. Asami, S. Kunikane**, 2009. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4655.

- [20]: **M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo**, 2007. Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 637.
- [21]: **S. O'Connor, D. S. Aga**, 2007. Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification. *Trends in Analytical Chemistry* 26, 456.
- [22]: **E. M. Golet, A. Strehler, A. C. Alder, W. Giger**, 2002. Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Sewage Sludge and Sludge-Treated Soil Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Solid-Phase Extraction. *Analytical Chemistry* 74, 5455.
- [23]: **H. O. Pharmaceuticals**, 2006. Ruggedness of analytical methods developed for hormones, antibiotics and pharmaceutical products in sludge, soil and biowaste. CAE / ANJOU RECHERCHE, Veolia Water.
- [24]: **G. Hamscher, S. Sczesny, H. Hoper, H. Nau**, 2002. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 1509.

CHAPITRE IV

Application des méthodes développées

Objectif :

Le but de ce chapitre est de présenter l'application des différentes méthodologies optimisées aux chapitres précédents, d'une part en analysant des échantillons d'eaux et sols environnementaux et d'autre part en menant une étude en colonne de sols, dans les conditions du laboratoire.

Résumé :

Tout d'abord, la procédure permettant l'analyse de composés en phase liquide a été appliquée à cinq échantillons d'eaux. La quantification a été réalisée par étalonnage interne. La méthode basée sur l'extraction QuEChERS a permis, quant à elle, d'analyser six échantillons de sol provenant de divers endroits en France. Dans ce cas, la quantification a été réalisée en utilisant la méthode des ajouts dosés.

Par ailleurs, ces deux méthodologies ont été utilisées pour analyser des échantillons de sols et les lixiviats obtenus lors d'une étude en colonnes de sol. Ce travail a permis d'évaluer le transfert, l'accumulation et la dégradation de 23 des substances ciblées dans deux sols aux propriétés bien distinctes.

I. Analyse d'échantillons réels d'eaux :

La méthode développée au chapitre I a été appliquée à l'analyse d'échantillons d'eaux de surface.

A. Description des différentes eaux :

Les échantillons d'eaux ont été collectés dans des flacons ambrés et conservés à -23°C avant l'analyse. Le descriptif des collectes est présenté dans le **Tableau III.37**.

Tableau III.37 : Descriptif des collectes des eaux

Eaux	Nature	Dates collecte	Informations	Lieux*
I	eau de surface	16 mai 2012	bras du Rhône en aval de l'agglomération lyonnaise	Rhône
II	eau de surface en aval d'un terrain agricole	31 mars 2010	épandage lisier de porc le 20 janvier 2010	Loire

III	eau de surface en aval d'un terrain agricole	16 avril 2010	épandage lisier de vache le 15 avril 2010	Haute-Savoie
IV	eau de surface en aval d'un terrain agricole	19 mai 2010	épandage lisier de vache le 15 avril 2010	Haute-Savoie
V	eau de surface n aval d'un terrain agricole	mai 2012	épandage lisier de vache en avril 2012	Haute-Savoie

* La **Figure III.30** représente une carte de France où sont indiquées les régions où ont été effectués les prélèvements des eaux analysées.

Figure III.30 : Carte de France montrant les régions où ont été réalisés les prélèvements d'eaux de surface et de sols



B. Choix de l'étalonnage :

Le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout, en quantité parfaitement connue, dans toutes les solutions étalons et tous les échantillons, d'une molécule. Cette dernière sert de référence durant l'ensemble des phases de l'analyse. Cette substance doit avoir un temps de rétention et des propriétés physico-chimiques proches du composé à analyser, ce qui permet à la substance d'avoir un coefficient de réponse comparable à celui du composé à quantifier. De même, la molécule doit être initialement absente de l'échantillon. Cette substance est généralement un composé deutéré et / ou marqué au carbone 13. Au lieu de tracer une droite d'étalonnage correspondant à l'aire de l'analyte cible en fonction de sa concentration (étalonnage externe), nous utilisons le quotient de l'analyte et de l'étalon interne. Ainsi, nous obtenons un signal directement proportionnel à la concentration.

Cette méthode permet de s'affranchir des variations dues aux erreurs de l'expérimentateur mais également dues à l'appareillage (vieillesse de la colonne chromatographique, variabilités dans la détection). L'étalonnage interne permet également de corriger les effets

matrice en faisant l'hypothèse que la molécule à quantifier ainsi que l'étalon se comportent de la même manière vis-à-vis de la matrice.

Dans le cas d'une analyse multi-familles, à défaut de pouvoir utiliser un étalon interne par substance, il est nécessaire d'en utiliser au moins un par famille de molécules (**Tableau III.38**).

C. Analyse d'échantillons d'eaux :

La méthode permettant d'analyser des composés en phase liquide, dont l'optimisation est présentée au chapitre I, a été appliquée à cinq échantillons d'eaux de surface.

Pour chacune des eaux, un volume de 200 mL a été analysé. Les étalons internes ont été introduits à une concentration de 25 ng/L dans les échantillons à doser ainsi que dans les solutions étalon (gamme extraite : de 0.1 ng/L à 500 ng/L, 12 points).

Les résultats montrent que la méthode mise au point est suffisamment sélective et sensible pour permettre l'analyse d'ultra-traces des 23 composés ciblés dans des eaux de surface. Les résultats sont résumés dans le **Tableau III.38** ci-dessous. De même, quelques exemples de chromatogrammes obtenus lors de l'analyse de ces cinq eaux sont exposés sur la **Figure III.31**.

Tableau III.38 : Résultats de l'analyse des différentes eaux (I, II, III, IV et V), concentration exprimée en ng/L

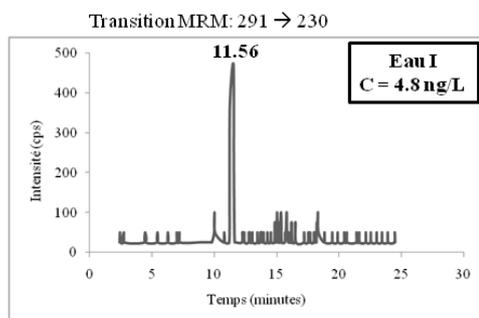
Composé	Etalons internes	Eau I Canal	Eau II Ruisseau lisier de porc -20 janvier 2010 31 mars 2010	Eau III Ruisseau lisier de vache -15 avril 2010 16 avril 2010	Eau IV Ruisseau lisier de vache -15 avril 2010 19 mai 2010	Eau V Ruisseau lisier de vache- avril 2012 mai 2012
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES						
antiparasitaire						
dicyclanile	triméthopri-me-d ₃	ND	ND	< MLQ	ND	ND
sulfonamides / triméthopri-me						
sulfadiméthoxine	sulfaméthoxazole-d ₄	ND	ND	2.4	< MLQ	ND
sulfadimérazine	sulfaméthoxazole-d ₄	ND	ND	3.9	ND	ND
sulfadiazine	sulfaméthoxazole-d ₄	ND	ND	0.9	0.5	ND
sulfabenzamide	sulfaméthoxazole-d ₄	ND	ND	1.0	ND	ND
sulfaméthoxydiazine	sulfaméthoxazole-d ₄	ND	ND	2.6	1.2	ND
sulfaméthoxazole	sulfaméthoxazole-d ₄	3.6	ND	1.0	ND	ND
triméthopri-me	triméthopri-me-d ₃	4.8	0.7	0.8	0.7	ND
macrolide						
roxithromycine	érythromycine ¹³ C-d ₃	2.0	ND	1.1	1.3	< MLQ
CONTAMINANTS HUMAINS						
médicaments humains						
carbamazépine	carbamazépine-d ₁₀	13.2	ND	< MLQ	< MLQ	ND
paracétamol	paracétamol-d ₃	ND	ND	140	79	ND
STEROIDES HORMONAUX						
androgènes						
androsténone	androsténone-d ₇	2.3	ND	2.6	16.1	< MLQ
testostérone	testostérone-d ₂	< MLQ	< MLQ	< MLQ	< MLQ	< MLQ
progestagène						
gestodène	gestodène-d ₆	ND	ND	< MLQ	< MLQ	< MLQ

ND : Non détecté

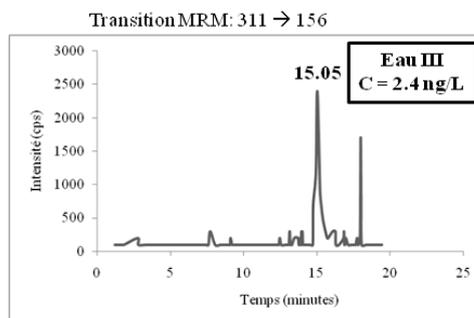
Figure III.31 : Exemple de quelques chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des eaux

ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES (sulfonamides / triméthoprime)

triméthoprime

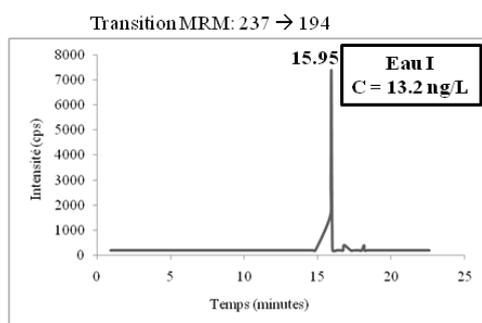


sulfadiméthoxine

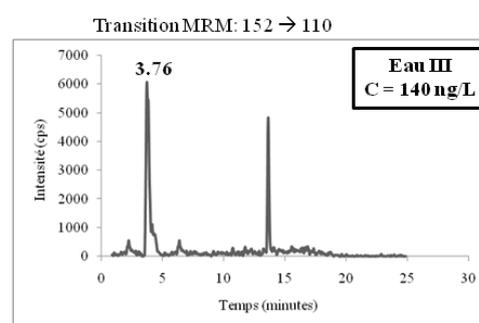


CONTAMINANTS HUMAINS (médicaments)

carbamazépine

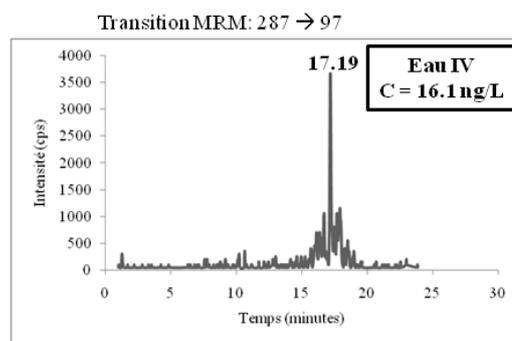


paracétamol



STEROIDE(androgène)

androstenedione



Nous remarquons qu'aucune eau analysée n'est exempte de contaminant. Les polluants retrouvés sont des antibiotiques appartenant à la famille des sulfonamides, le triméthoprime, la roxithromycine, la carbamazépine, le paracétamol, des androgènes (androstènedione, testostérone) et le gestodène. Ces composés sont détectés à des concentrations variant de la MLQ à 16.1 ng/L (sauf le paracétamol qui est présent à des concentrations comprises entre 79 et 140 ng/L).

Plus précisément, concernant les antibiotiques, le dicyclanile (<MLQ) a été détecté dans l'eau III. Cette eau provient du ruissellement d'un terrain agricole traité avec du lisier de vache, il n'est donc pas étonnant d'y retrouver le dicyclanile puisqu'il est utilisé comme antiparasitaire chez les ruminants [1]. Les sulfonamides et le triméthoprime sont présents dans les eaux I, II, III et IV. Le sulfaméthoxazole (3.6 ng/L) et le triméthoprime (4.8 ng/L) ont été détectés dans l'eau I provenant d'un canal en aval d'une agglomération. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés dans la littérature. En effet, M. Gros *et al.* ont détecté le sulfaméthoxazole (<MLQ) et le triméthoprime à des teneurs entre 1 ng/L et 20 ng/L dans l'Ebre en Espagne [2]. Le triméthoprime est également présent dans des rivières de Serbie à environ 20 ng/L [3]. Le sulfaméthoxazole et le triméthoprime ont aussi été retrouvés dans la Seine à des teneurs de quelques dizaines de ng/L [4]. Enfin, une autre équipe a également retrouvé le sulfaméthoxazole dans la Seine à des concentrations comprises entre 3.6 et 18 ng/L [5]. Les eaux II, III et IV provenant de ruissellement de terrains agricoles traités soit avec du lisier de vache soit avec du lisier de porc contiennent également de nombreux sulfonamides et du triméthoprime à des concentrations comprises entre 0.7 et 3.9 ng/L. Il a été difficile de comparer les résultats à la littérature. En effet, beaucoup de données sont disponibles sur la pollution des eaux de rivière, en revanche, nous ne retrouvons que très peu d'informations sur la contamination des eaux de ruissellement. Cependant, il est mentionné dans quelques travaux antérieurs que les sulfonamides sont présents dans des eaux usées provenant de fermes animales ou de terrains agricoles. Ainsi, W. Ben *et al.* [6] et L. Tong *et al.* [7] ont retrouvé de la sulfadiméthoxine (0.62-14 µg/L), du sulfaméthoxazole (1 µg/L) et de la sulfadiazine (jusqu'à 1 µg/L) dans des eaux de ruissellement de ferme élevant des porcs. R. Wei *et al.* ont également retrouvé de la sulfadiazine (valeur moyenne = 1.23 µg/L) et du sulfaméthoxazole (valeur moyenne = 0.35 µg/L) dans des eaux usées provenant de fermes de volailles, de vaches ou de porcs [8]. Enfin, K. Stoob *et al.* [9] ont analysé des eaux de ruissellement d'un terrain agricole traité avec du fumier contenant de la sulfadimérazine.

Cette dernière est présente dans le sol à des teneurs variant de quelques ng/L à 1000 ng/L, selon la période. La roxithromycine a également été retrouvée dans l'eau I (2 ng/L) et dans les eaux III, IV et V à des concentrations de l'ordre du ng/L. Cette substance a déjà été décelée dans des eaux de surface (rivières aux Etats-Unis) à une concentration moyenne de 50 ng/L [10]. Ce niveau est plus élevé que celui retrouvé dans les eaux analysées dans notre étude. En revanche aucun travail, n'a analysé cette substance dans des ruissellements de terrains agricoles.

En ce qui concerne les contaminants humains, la carbamazépine a été détectée dans l'eau de surface I à une concentration de 13.2 ng/L ainsi que dans les eaux III et IV. Ceci n'est pas étonnant puisqu'elle est très souvent utilisée en tant qu'antiépileptique et permet de réguler l'humeur. Elle a, dans des études antérieures, déjà été retrouvée dans l'Ebre à des concentrations variant de 2 ng/L à 110 ng/L [2], dans 80% des eaux de rivières de Serbie analysées par S. Grujic *et al.* à des teneurs comprises entre 8 ng/L et 130 ng/L [3] et dans des eaux de surface de France à des concentrations variant de quelques ng/L à 50 ng/L [11]. Le paracétamol, quant à lui, a été trouvé dans les eaux III et IV à des concentrations de 140 ng/L et 79 ng/L respectivement. Le retrouver dans l'eau n'est pas surprenant car ce composé est relativement polaire ($\log K_{ow} = 0.46$). Nos valeurs sont comparables à celles mentionnées dans la littérature puisque le paracétamol a déjà été retrouvé à des concentrations entre 0.4 et 610 ng/L dans des eaux de surface et souterraines [2, 3, 11]. Cependant, aucune étude n'a été mentionnée sur l'analyse de contaminant humain dans des eaux de ruissellement.

Enfin, deux stéroïdes hormonaux sont également présents dans l'eau I : l'androstènedione et la testostérone, à des concentrations de l'ordre du ng/L. Ces deux androgènes ont déjà été analysés dans 71 eaux de surface et 70 eaux souterraines et retrouvés dans presque tous les échantillons à des teneurs entre 0.3 et 26.3 ng/L dans les eaux de surface et entre 0.3 et 7.7 ng/L dans les eaux souterraines [11]. L'androstènedione et la testostérone ont également été détectées par S. Liu *et al.* dans la rivière Danshui en Chine à des concentrations d'environ 8 ng/L et 1 ng/L respectivement [12]. L'androstènedione, la testostérone et le gestodène sont également présents dans les eaux II, III, IV et V à des concentrations relativement faibles. Comme pour les contaminants humains, nous n'avons pas pu comparer nos valeurs avec l'occurrence de stéroïdes hormonaux dans des eaux de ruissellement.

II. Analyse des échantillons réels de sols :

La méthode développée et validée au chapitre II a été appliquée à des échantillons de sol provenant de deux régions en France et ayant subi des épandages agricoles.

A. Présentation des sites :

Pour l'application de la méthodologie développée à l'analyse d'échantillons réels, six échantillons de sol (B, C, D, E, F et G) ont été collectés entre mars et juillet 2010 à une profondeur de 10 cm et conservés dans des flacons ambrés à -23°C jusqu'à l'analyse. Les sols ont été passés à travers un tamis de 3 mm pour enlever les grosses particules et séchés pendant environ quatre heures dans une étuve (Etuve Kottermann 2771) à 35°C. Ils ont ensuite été broyés dans un mortier et tamisés à 0.63 mm pour obtenir des échantillons homogènes. Le descriptif des collectes est présenté dans le **Tableau III.39**.

Tableau III.39 : Descriptif des collectes des sols

Sols	Dates collecte	Informations	Lieux*
B	13 juillet 2010	épandage lisier de vache le 15 avril 2010	Haute-Savoie
C	13 juillet 2010	épandage lisier de vache le 20 avril 2010	Haute-Savoie
D	19 mai 2010	épandage lisier de vache le 20 avril 2010	Haute-Savoie
E	13 juillet 2010	épandage lisier de vache le 11 juin 2010	Haute-Savoie
F	31 mars 2010	épandage lisier de porc le 20 janvier 2010	Loire
G	31 mars 2010	épandage boues de station d'épuration fin février 2010	Loire

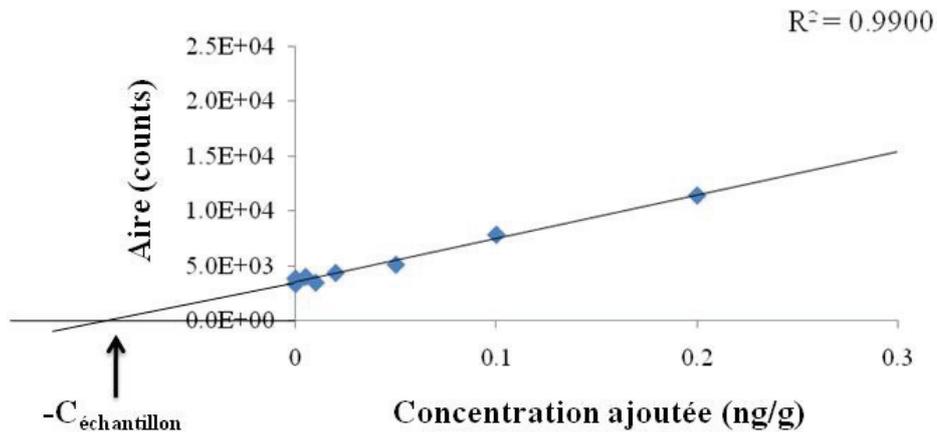
* La **Figure III.30** représente une carte de France où sont indiquées les régions de la Haute-Savoie et de la Loire.

B. Choix de l'étalonnage :

Pour la quantification de ces échantillons environnementaux, la méthode des ajouts dosés a été utilisée. Cette procédure utilise l'échantillon comme matrice pour l'étalonnage, ce qui permet de compenser les effets matrice. L'ajout de quantités parfaitement connues d'analytes

dans l'échantillon a permis de tracer une droite d'étalonnage. L'accroissement de l'aire de chaque composé entre deux analyses est lié à l'ajout, cela permet de déterminer la quantité initiale de chaque substance dans l'échantillon. Nous obtenons donc la droite d'étalonnage exposée à la **Figure III.32**.

Figure III.32 : Droite d'étalonnage obtenue lors d'ajouts dosés de la sulfadiazine dans le sol F



La concentration ajoutée correspond à :

$$C_{réelle} = C_{échantillon} + C_{ajoutée}$$

avec :

$C_{réelle}$: la concentration réelle de l'échantillon correspond à la concentration initiale contenue dans l'échantillon à doser additionnée à la concentration ajoutée

$C_{échantillon}$: la concentration initiale contenue dans l'échantillon à doser

Lorsque l'aire est nulle, la concentration réelle de l'échantillon est évidemment égale à zéro, nous obtenons donc : $C_{ajoutée} = -C_{échantillon}$

C. Occurrence des substances dans les sols analysés :

La méthode a été appliquée à six échantillons de sol (sols B à G) collectés dans la Loire et en Haute Savoie. Pour chacun des sols, 5 g ont été analysés. Pour les ajouts dosés, la gamme de concentration comprend dix points de 0.005 ng/g à 5 ng/g.

La procédure développée au chapitre II est suffisamment sensible et sélective pour analyser des traces de composés cibles contenus dans des sols comme l'illustrent des chromatogrammes obtenus pour l'analyse de différents sols (**Figure III.33**) et les résultats présentés dans le **Tableau III.40**.

Tableau III.40 : Résultats de l'analyse des différents sols (B, C, D, E, F et G), concentration en ng/g

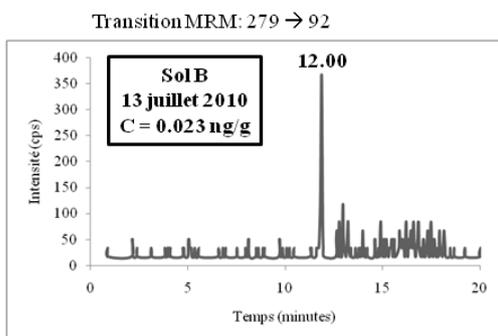
Composé	Sol B lisier de vache -15 avril 2010 13 juillet 2010	Sol C lisier de vache -20 avril 2010 13 juillet 2010	Sol D lisier de vache -20 avril 2010 19 mai 2010	Sol E lisier de vache -11 juin 2010 13 juillet 2010	Sol F lisier de porc -20 janvier 2010 31 mars 2010	Sol G Boues STEP -fin février 2010 31 mars 2010
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES						
sulfonamides / triméthoprime						
sulfadiméthoxine	ND	ND	ND	ND	< MLQ	ND
sulfadimérazine	0.023	ND	ND	ND	ND	ND
sulfadiazine	ND	ND	ND	ND	0.09	ND
sulfabenzamide	0.035	ND	ND	ND	0.038	ND
triméthoprime	ND	ND	ND	ND	ND	0.040
phénicolé						
florfenicol	ND	ND	ND	ND	ND	0.63
CONTAMINANTS HUMAINS						
médicaments humains						
carbamazépine	ND	ND	ND	ND	ND	0.027
ibuprofène	ND	ND	ND	ND	ND	< MLQ
STEROIDES HORMONAUX						
Androgène						
androstènedione	< MLQ	< MLQ	ND	ND	ND	< MLQ
ND : Non détecté						

Boues STEP : boues de station d'épuration

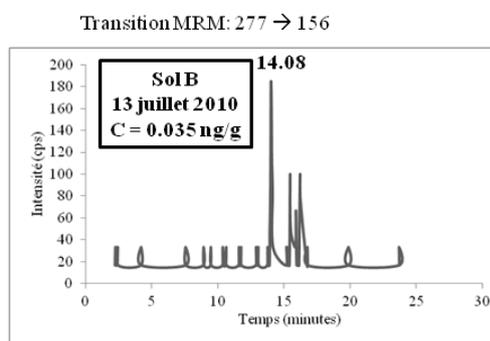
Figure III.33 : Exemple de quelques chromatogrammes obtenus lors de l'analyse des sols

SOL B – traité le 15 avril 2010 avec du lisier de vache

sulfadimérazine

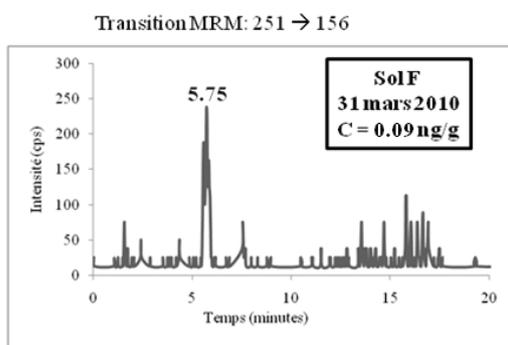


sulfabenzamide

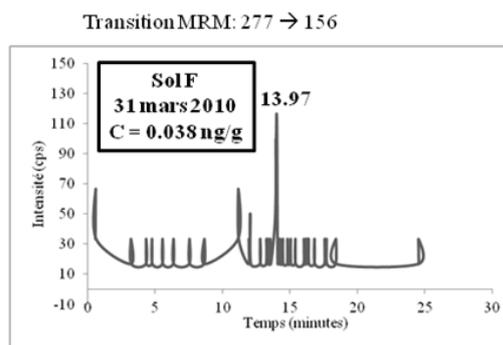


SOL F – traité le 20 janvier 2010 avec du lisier de porc

sulfadiazine

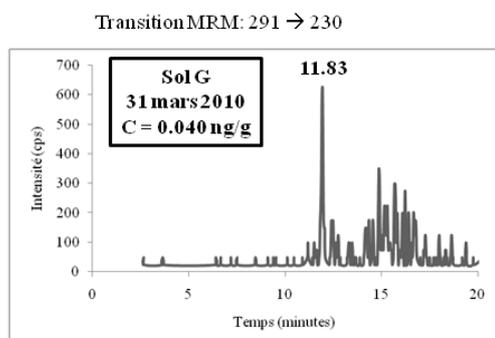


sulfabenzamide

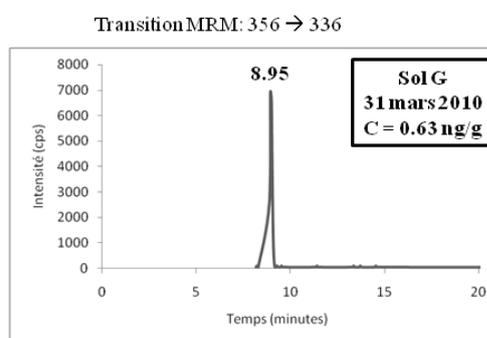


SOL G – traité en février 2010 avec des boues de station d'épuration

triméthoprim



florfenicol



Nous observons que trois sols sont particulièrement contaminés : les sols B, F et G traités respectivement avec du lisier de vache, de porc et des boues de station d'épuration. Pour les sols traités avec du lisier, ce sont les sulfonamides qui sont le plus souvent retrouvés. Cependant, uniquement des traces de polluants ont été détectés : de la MLQ à 0.63 ng/g.

Les sulfonamides ont été retrouvés à faibles concentrations dans les sols B et F traités avec du lisier de vache et de porc respectivement. En effet, le sol B contient seulement 0.023 ng/g de sulfadimérazine et 0.035 ng/g de sulfabenzamide. La sulfadiazine (0.09 ng/g), la sulfabenzamide (0.038 ng/g), et la sulfadiméthoxine (< MLQ) sont présents dans le sol F. Ces antibiotiques sont fréquemment administrés aux animaux pour soigner les infections ou la coccidiose (maladie qui détruit les cellules intestinales). Ces composés sont ensuite rejetés par les animaux à la fois sous formes inchangée et métabolisée [13]. Or, P. Sukul et M. Spittler [14] ont rapporté que les formes acétylées sont clivées pour redonner la molécule mère lors du stockage du lisier. Ainsi, E. Martinez-Carballo *et al.* ont détecté de la sulfadimérazine dans des lisiers de porc à des concentrations supérieures à 20 µg/g [15]. De même, M. Y. Haller *et al.* ont signalé de la sulfadimérazine et du sulfathiazole dans du lisier de porc. De plus, la forme acétylée de la sulfadimérazine est également présente dans ces lisiers mais à des concentrations de 2 à 50 fois plus faibles que le composé parent [16]. Les composés sous leurs formes natives sont ensuite transférés du lisier aux sols traités. Par exemple, H. Höper *et al.* ont retrouvé de la sulfadimérazine à une concentration de 11 ng/g dans un sol traité avec du lisier [17], valeur supérieure à la concentration retrouvée dans le sol B. Le triméthoprime (0.040 ng/g) et le florfenicol (0.63 ng/g) sont présents dans le sol G traité avec des boues de station d'épuration. Le florfenicol est utilisée dans la médecine vétérinaire et notamment pour les animaux domestiques et le triméthoprime peut être employé à la fois comme antibiotique humain et animal.

En ce qui concerne les contaminants humains, la carbamazépine (0.027 ng/g) et l'ibuprofène (< MLQ) ont également été détectés dans le sol G. Ces deux composés ont déjà été décelés dans des sols irrigués avec des eaux usées : l'ibuprofène a été détecté à des teneurs inférieures au ng/g et la carbamazépine à des concentrations entre 5 et 7 ng/g [18].

Enfin, l'androstènedione a été retrouvée dans les sols B, C et G traités avec du lisier de vache ou avec des boues de station d'épuration, à des teneurs ne dépassant toutefois pas la MLQ. Peu de données sont disponibles sur la contamination des sols par les stéroïdes hormonaux.

Cependant, L. Shore *et al.* ont trouvé une faible concentration de 0.1 ng/g en androstènedione dans un sol traité avec du lisier [19].

Pour finir, les sols D et E traités avec du lisier de vache ne contiennent aucun des contaminants étudiés.

Puisque les eaux III et IV sont les eaux de ruissellement du sol B, il est intéressant de comparer les composés retrouvés dans ces échantillons. Dans le sol B, nous retrouvons de la sulfadimérazine et de la sulfabenzamide qui sont également présents dans l'eau III. L'androstènedione est retrouvée dans les trois échantillons. D'autres sulfonamides et le paracétamol sont détectés dans les deux échantillons d'eau mais ne sont pas retrouvés dans le sol B. Ceci peut s'expliquer par la forte polarité de ces substances.

Nous pouvons effectuer le même raisonnement entre l'eau II et le sol F. Cependant, nous remarquons que les deux échantillons ne contiennent pas les mêmes composés.

III. Etude du transfert, accumulation et dégradation des composés dans le sol : expérience en colonnes de sol :

Cette étude en colonnes de sol a pour objectif d'évaluer le transfert, l'accumulation et la dégradation des substances dans le sol.

Cette partie sera divisée en plusieurs sous-parties. Tout d'abord, nous introduirons une description des sols utilisés pour cette étude, puis nous aborderons le choix des conditions expérimentales. Nous présenterons, par la suite l'analyse des lixiviats et des horizons de sol. Enfin, les résultats sur le transfert et la dégradation des composés dans les colonnes de sol seront exposés.

A. Description des sols utilisés pour cette étude :

Le transfert et la dégradation ont été étudiés pour deux sols A et K provenant de Roanne (Loire) et de Valence (Drôme) respectivement. Leurs propriétés sont présentées dans le **Tableau III.41**.

Tableau III.41 : Propriétés des sols A et K

Sols	Texture sol	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	CO* (%)	N _{tot} * (%)	MO* (%)	pH	CEC (cmol/kg)
A	limono-argileux	32.4	45.1	22.5	1.73	0.173	2.99	6.25	15.6
K	limoneux-sableux	9.5	21.5	69	3.76	0.207	6.5	8.07	8.72

* CO : Carbone Organique, * N_{tot} : Azote total, * MO : Matière Organique

Les sols ont été séchés et tamisés à travers un tamis de 3 mm avant d'être introduits dans les colonnes de sol.

B. Choix des conditions expérimentales :

Choix des dimensions de la colonne de sol :

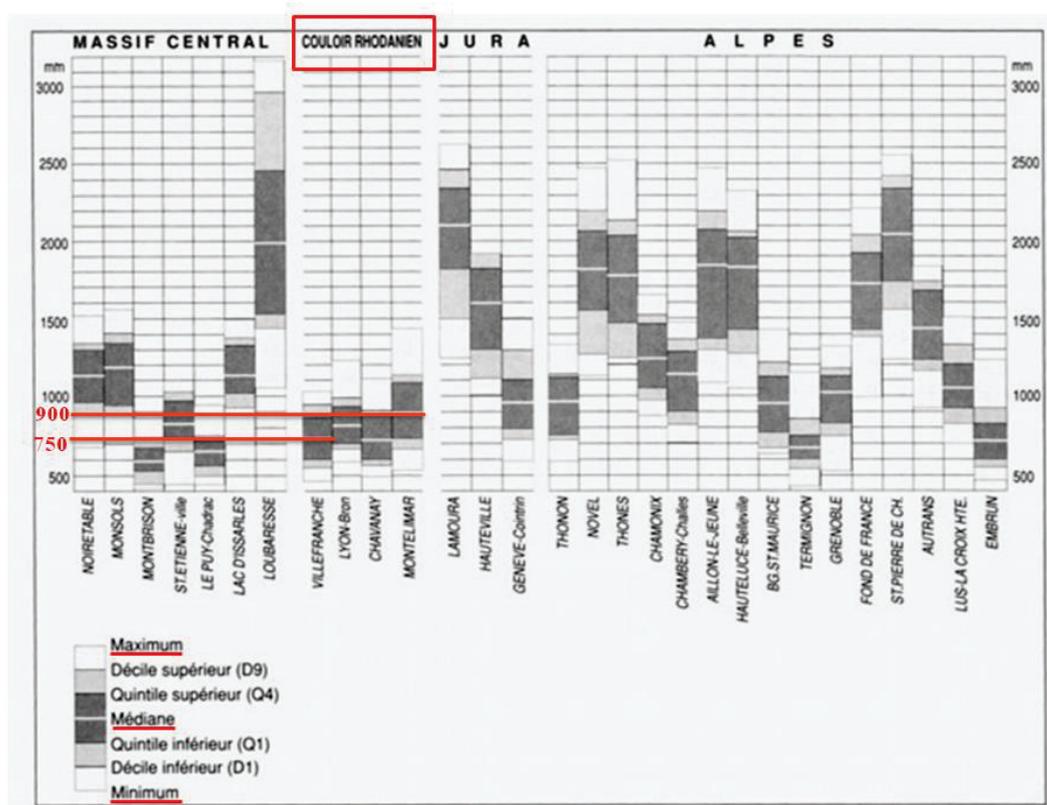
De nombreux travaux rapportent des dimensions de colonnes de sol de diamètre entre 5 et 10 cm et de hauteur entre 25 et 35 cm [20-22]. C'est la raison pour laquelle nous avons réalisé des colonnes de diamètre 10 cm et de hauteur 30 cm. Nous avons opté pour un diamètre de 10 cm et non pas 5 également afin d'éviter des effets de bord.

Choix de la pluviométrie :

Avant d'appliquer les substances au sommet des colonnes de sol, celles-ci ont été saturées en eau à l'aide d'une solution à 0.01 M CaCl₂ dans de l'eau MilliQ, souvent utilisée pour simuler l'eau de pluie [20, 21]. Pour cela, les colonnes ont été arrosées deux fois par jour avec 150 mL de cette solution.

Nous avons choisi d'arroser les colonnes de sol en fonction des précipitations enregistrées dans la région Rhône-Alpes afin d'être au plus proche de conditions réelles. La **Figure III.34** présente des valeurs minimum, médiane et maximum pour la pluviométrie annuelle dans la région Rhône-Alpes.

Figure III.34 : Pluviométrie (mm) annuelle dans la région Rhône-Alpes [23]



Nous pouvons observer sur la **Figure III.34** que la pluviométrie médiane est située entre 750 mm et 900 mm pour le couloir rhodanien (qui inclut la Loire et la Drôme où les sols A et K utilisés pour la manipulation en colonnes de sol ont été récupérés).

La pluviométrie correspond au volume d'eau reçu par le sol par unité de surface :

$$P(\text{mm} = L / \text{m}^2) = \frac{V(L)}{S(\text{m}^2)}$$

Nos colonnes de sol ont un diamètre de 10 cm soit :

$$S = \Pi \times R^2 = \Pi \times (0.05)^2 = 0.00785 \text{ m}^2$$

Notre objectif étant d'arroser les colonnes de sol tous les deux jours, et les pluviométries trouvées étant annuelles, le volume d'eau nécessaire à introduire dans les colonnes correspond donc à :

$$V = \frac{P \times S \times 2}{365}$$

Le volume de solution à 0.01 M CaCl₂ à incorporer dans chaque colonne de sol tous les deux jours, calculé à partir des pluviométries annuelles enregistrées dans le couloir rhodanien est présenté dans le **Tableau III.42**.

Tableau III.42 : Volumes de solution à 0.01 M CaCl₂ à introduire

Pluviométrie annuelle (mm)	Volume 0.01 M CaCl ₂ (mL) tous les 2 jours
825*	36

* moyenne entre 750 mm et 900 mm

Nous avons choisi d'arroser nos colonnes de sol avec 40 mL de solution à 0.01 M CaCl₂ tous les deux jours.

C. Analyse des lixiviats et des horizons de sol :

L'étude en colonnes de sol a été mise en place sur une période de 30 jours. L'évolution des colonnes a été stoppée à intervalles pré-définis (0, 5, 10, 15 et 30 jours).

1. Analyse des lixiviats :

Les lixiviats ont été récupérés tous les deux jours et analysés en utilisant la méthode SPE optimisée au chapitre I de la partie III, paragraphe II. Pour cela, le lixiviat récupéré (environ 20 mL) a été introduit dans une fiole jaugée de 200 mL qui a ensuite été complétée avec de l'eau MilliQ.

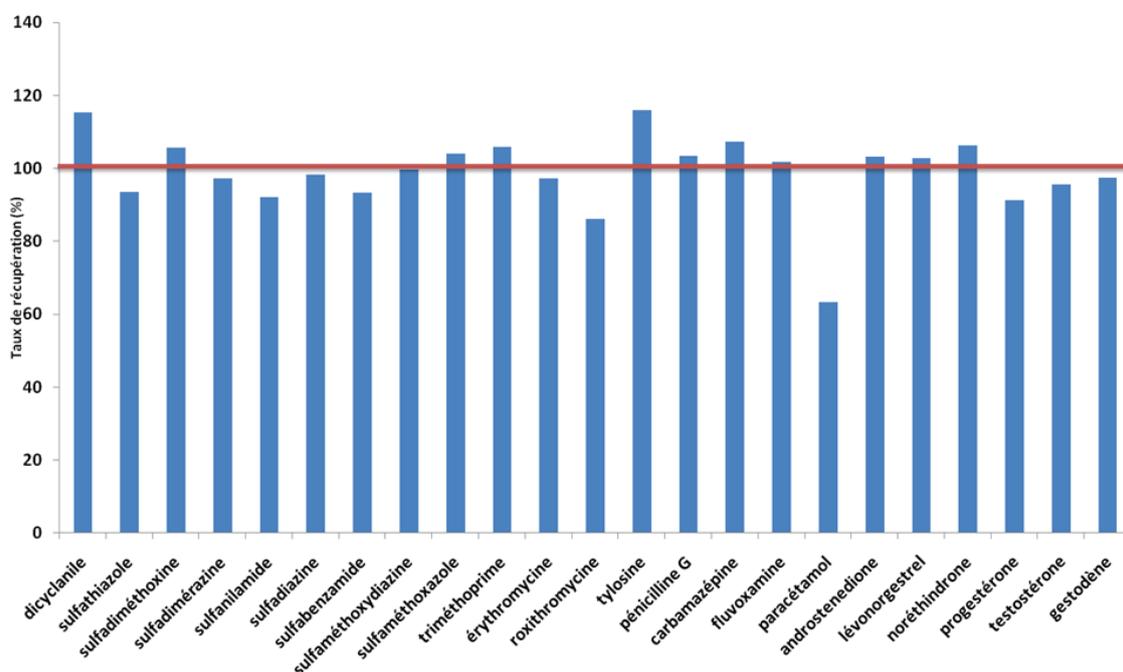
Pour effectuer la quantification des substances contenues dans ces échantillons, une droite d'étalonnage dans la matrice a été réalisée (« matrix-matched »). Pour chacun des douze points de la droite d'étalonnage, 180 mL d'eau MilliQ a été ajoutée à 20 mL de lixiviat blanc. Chaque solution a ensuite été dopée entre 0.1 ng/L et 500 ng/L.

Cette méthode de « matrix-matched » est, en plus de l'étalonnage interne et des ajouts dosés, fréquemment employée pour quantifier des substances contenues dans des matrices complexes. En effet, elle permet de compenser les effets matrice qui influent sur la réponse analytique. Cependant, pour utiliser cette procédure, une matrice non contaminée doit être disponible. Dans notre cas, les lixiviats des sols A et K non dopés ont été utilisés. Nous avons préalablement vérifié qu'il ne contenait aucune des substances ciblées. Les résultats de l'analyse des lixiviats sont présentés à la partie D, **Tableau III.43**.

2. Analyse des colonnes de sol :

Les colonnes de sol, congelées, ont été découpées en cinq tranches égales. Ces dernières ont ensuite été décongelées à température ambiante pour être homogénéisées. Elles ont ensuite été séchées au lyophilisateur (24 heures). Nous avons préalablement vérifié que l'étape de lyophilisation n'entraîne pas de pertes préjudiciables à l'interprétation des résultats. Seulement quelques pertes de roxithromycine et de paracétamol sont observées (**Graphique III.37**).

Graphique III.37 : Taux de récupération après 24 heures de lyophilisation



Par la suite, nous avons analysé chacune des tranches en utilisant la méthode basée sur l'extraction QuEChERS, optimisée au chapitre II. Dans ce cas, un étalonnage interne a été effectué.

Dans une étude multi-résidus et multi-familles, il est nécessaire d'avoir un étalon interne pour chaque famille de composés. Cependant, il est parfois difficile de se procurer ces étalons qui ne sont pas toujours disponibles commercialement. En ce qui concerne les antibiotiques vétérinaires, le sulfaméthoxazole-d₄ a été choisi pour les sulfonamides. Le triméthoprime-d₃, l'érythromycine ¹³C-d₃ et la pénicilline G-d₇ ont été respectivement utilisées pour le triméthoprime, les macrolides et la pénicilline G. En revanche aucun étalon interne n'a été trouvé pour l'antiparasitaire (dicyclanile). Le dicyclanile et le triméthoprime ayant des rendements d'extraction semblables, nous avons employé le triméthoprime-d₃ comme étalon

interne pour l'antiparasitaire. Les trois contaminants humains ont leur propre étalon interne : la carbamazépine-d₁₀, la fluvoxamine-d₄ et le paracétamol-d₃. Pour finir, les six stéroïdes hormonaux ont également chacun leur étalon interne : l'androstènedione-d₇, le lévonorgestrel-d₆, la noréthindrone-d₆, la progestérone-d₉, la testostérone-d₂ et le gestodène-d₆. Les résultats de l'analyse des colonnes de sol sont exposés en **Annexes 11 et 12** (transfert et dégradation des composés dans les sols A et K).

D. Etude du transfert :

Le transfert des composés correspond au déplacement de ces derniers à travers le sol. Il est dû à l'infiltration de l'eau à travers les couches du sol, l'eau pénétrant dans le sol sous l'action de la gravité. Il est évalué à la fois par la présence des composés dans le lixiviat et leur répartition dans les différents horizons des colonnes de sol. Comme mentionné précédemment, le transfert a été étudié pour deux sols (A et K) dont les propriétés sont exposées dans le **Tableau III.41**.

Pour les colonnes de sol correspondant à T = 30 jours, treize lixiviats ont été récupérés de L₁ à L₁₃. Très peu de composés ont été retrouvés dans ces derniers. Effectivement, pour le sol A, nous détectons : 3.6 ng de dicyclanile uniquement dans le lixiviat récupéré le quatrième jour (L₂), environ 0.1 ng de sulfadiméthoxine dans L₄, 0.04 ng de sulfadimérazine dans L₁₀ et L₁₃, entre 0.1 ng et 1 ng de tylosine dans L₁, L₂, L₃, L₅ et L₇ et moins de 2 ng de paracétamol dans L₄.

Pour le sol K, nous retrouvons dans la plupart des lixiviats : moins de 0.1 ng de sulfadiméthoxine et de carbamazépine, une quantité d'environ 0.02 ng de roxithromycine et enfin, approximativement 2 ng de paracétamol.

Les résultats sont rassemblés dans le **Tableau III.43**.

Tableau III.43 : Composés détectés dans les lixiviats des colonnes de sol (résultats exprimés en ng)

Composés	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇	L ₈	L ₉	L ₁₀	L ₁₁	L ₁₂	L ₁₃
SOL A													
dicyclanile	ND	3.6	ND	ND	ND	ND							
sulfadiméthoxine	ND	ND	ND	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
sulfadimérazine	ND	0.04	ND	ND	0.04								
tylosine	0.4	1	0.5	ND	0.2	ND	0.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
paracétamol	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SOLK													
sulfadiméthoxine	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
carbamazépine	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
roxithromycine	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	ND	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
paracétamol	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Les autres composés n'ont été détectés dans aucun des lixiviats.

En conclusion, très peu de composés ont été détectés dans les lixiviats des deux sols. De plus, les quantités de substances retrouvées sont très faibles, elles varient entre 0.02 ng et 3.6 ng. Ceci est négligeable par rapport au 1 mg de composé déposé au sommet de la colonne de sol au début de l'étude. **Les substances ciblées sont donc essentiellement présentes dans la matrice solide ou alors sous formes dégradées dans les lixiviats.**

Par conséquent, le transfert des composés a été discuté en prenant en compte uniquement les cinq tranches de chacune des colonnes de sol.

Tout d'abord, nous avons comparé le transfert entre les différentes substances pour un même sol. Pour chaque jour analysé (0, 5, 10, 15 et 30 jours), nous avons évalué la répartition des substances présentes (sans tenir compte de la dégradation) à travers les différentes couches de la colonne. La couche 1 représente la partie supérieure de la colonne et la tranche 5 le niveau inférieur.

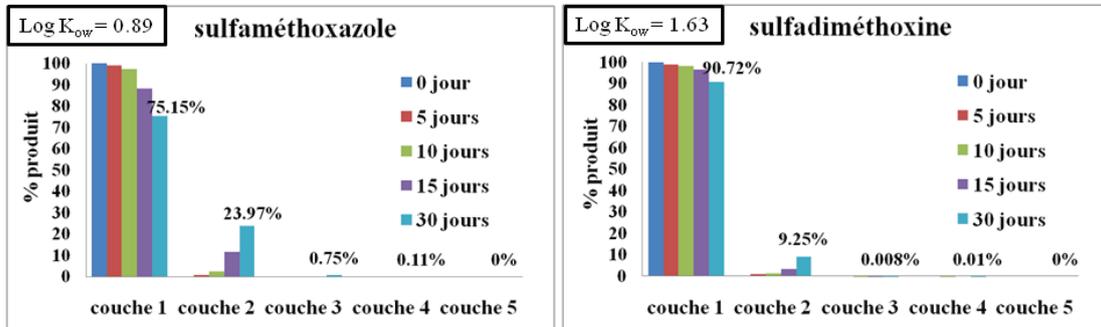
Nous remarquons globalement qu'il y a peu de transfert : les composés restent essentiellement dans la couche 1 de la colonne de sol, les sulfonamides étant les seules substances à se retrouver de manière significative dans la deuxième tranche.

Le **Graphique III.38** illustre le transfert de certains composés dans le sol K : le sulfaméthoxazole, la sulfadiméthoxine, le dicyclanile, la fluvoxamine et la testostérone. Les résultats pour l'ensemble des composés étudiés sont présentés en **Annexe 11**.

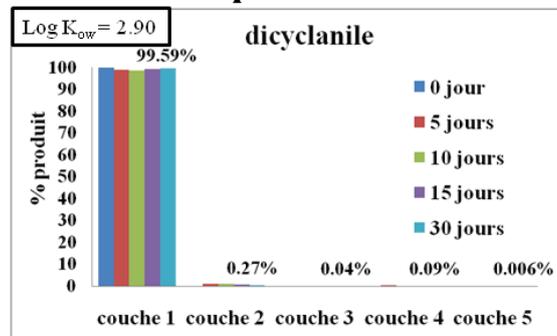
Graphique III.38 : Transfert de trois antibiotiques vétérinaires et d'un stéroïde à travers le sol K (l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de produit présent dans la colonne de sol)

ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES

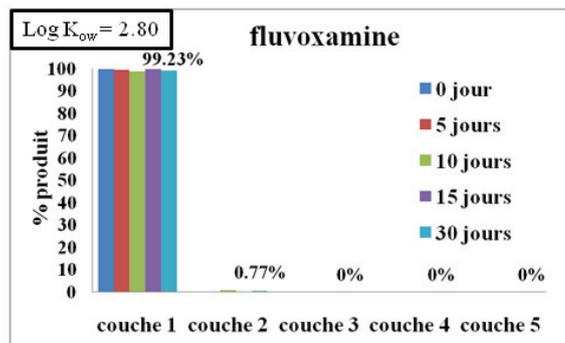
sulfonamides



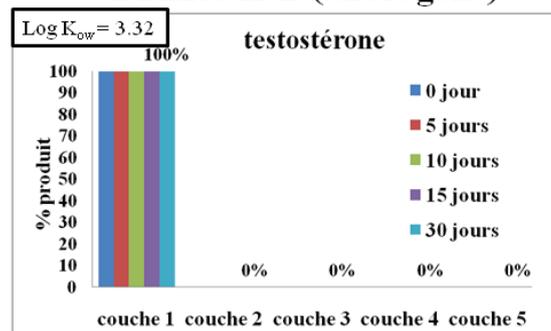
antiparasitaire



CONTAMINANT HUMAIN (médicament)



STEROÏDE (androgène)



Nous observons que seuls les sulfonamides migrent de manière significative à travers la colonne de sol. Effectivement, nous retrouvons ces derniers dans la deuxième couche de la colonne : par exemple, 24% du sulfaméthoxazole et 10% de la sulfadiméthoxine se trouvent dans la deuxième tranche à $T = 30$ jours d'expérimentation dans le sol K. 2%, 4%, 1% et 3% de carbamazépine, tylosine, d'androstènedione et de progestérone respectivement sont retrouvés dans la couche 2 du sol K après 30 jours d'expérience. Cependant les composés ne se retrouvent pas à plus de 1% dans les couches 3, 4 et 5. Les autres substances sont restées dans la première couche. La pénicilline G se dégradant très rapidement (voir partie E), son transfert à travers les colonnes de sol n'a pas pu être évalué.

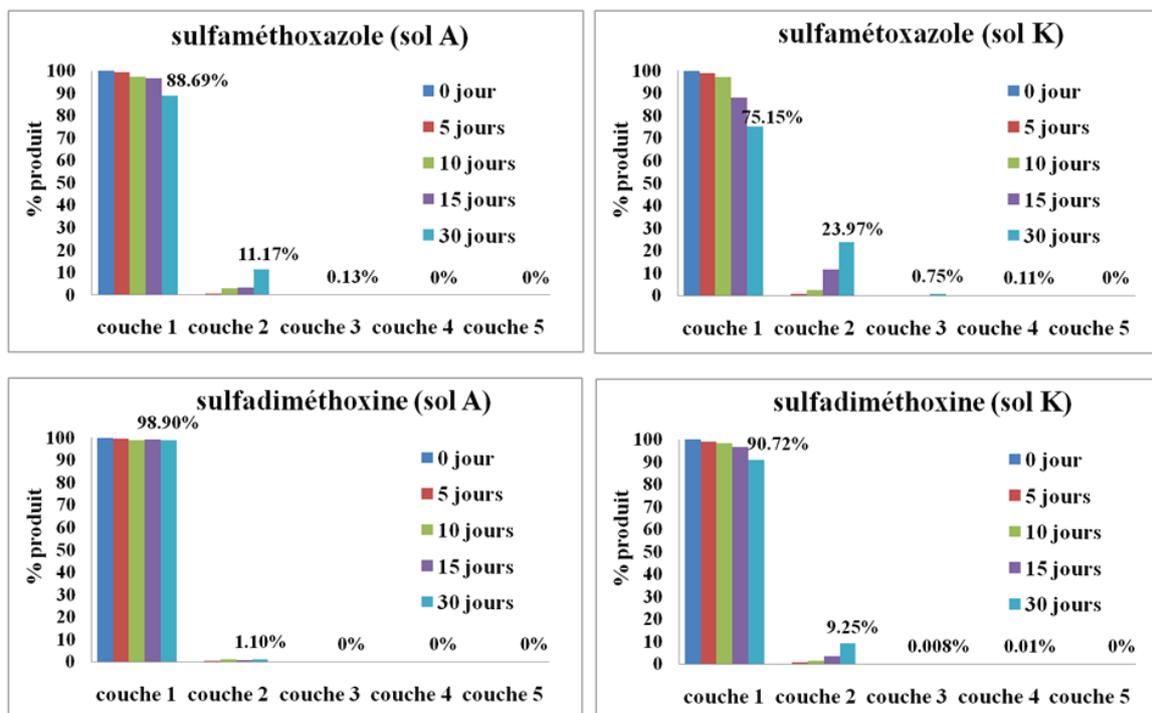
Ce résultat n'est pas surprenant car les sulfonamides sont polaires. En effet, ils affichent des valeurs de $\log K_{ow}$ très inférieures à 3 : entre -0.62 et 1.63 (voir tableau I.3). Ces substances sont donc facilement entraînées par l'eau lors de son passage dans la colonne. Les autres composés ont, pour la plupart, des $\log K_{ow}$ compris entre 2.45 et 3.87 (hormis le triméthoprime, la tylosine et le paracétamol qui ont des valeurs de $\log K_{ow}$ de 0.91, 1.63 et 0.46 respectivement). Ils restent donc globalement adsorbés dans la couche supérieure.

Ensuite, nous avons comparé la différence de transfert des composés entre les deux sols.

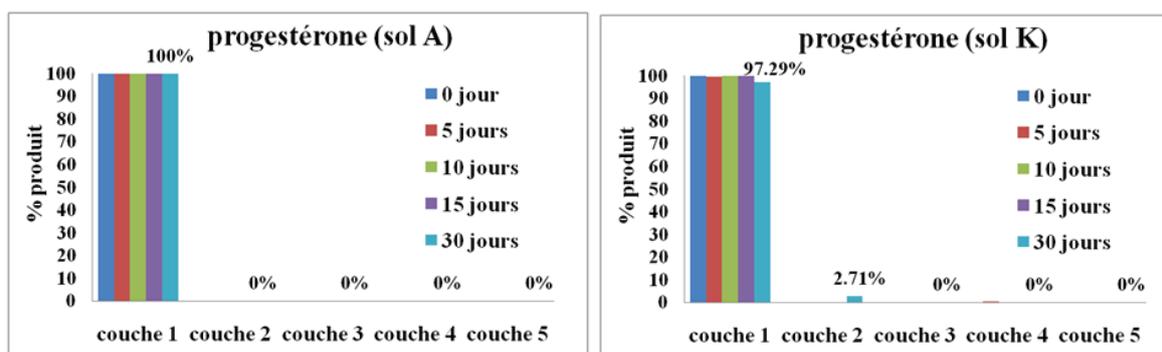
Nous observons que les composés sont globalement plus mobiles dans le sol K que dans le sol A. Par exemple, le **Graphique III.39** représente le transfert du sulfaméthoxazole, de la sulfadiméthoxine et de la progestérone à travers les sols A et K. Les résultats pour l'ensemble des composés étudiés sont présentés en **Annexe 11**.

Graphique III.39 : Transfert de deux sulfonamides et d'un stéroïde à travers les sols A et K
(l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de produit présent dans la colonne de sol)

ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES (sulfonamides)



STEROÏDE (androgène)



Nous observons globalement que les composés migrent plus dans le sol K que dans le sol A. Dans les exemples concernant les sulfonamides, nous retrouvons, au bout de 30 jours d'expérience, 24% de sulfaméthoxazole dans la couche 2 de la colonne contenant le sol K et seulement 11% dans le cas du sol A. Nous observons le même phénomène pour la sulfadiméthoxine. En effet, uniquement 1% de composé est identifié dans la tranche 2 du sol

A et environ 10% de sulfadiméthoxine migrent jusqu'à la couche 2 du sol K. C'est également le cas pour d'autres sulfonamides tels que la sulfadimérazine, la sulfadiazine ou encore la sulfabenzamide pour lesquels 7%, 9% et 5% respectivement de substance est présente dans la couche 2 du sol K et seulement 3%, 0.5% et 0.3% pour le sol A. En revanche, le sulfathiazole et la sulfaméthoxydiazine ne montrent pas de différence aussi nette entre les deux sols puisque 1.6% et 5% de sulfathiazole et de sulfaméthoxydiazine respectivement se retrouvent dans la couche 2 du sol K et 0.9% et 3% dans le cas du sol A.

Bien que le transfert des stéroïdes hormonaux soit très faible, probablement dû à leur faible polarité ($\log K_{ow} > 3$) et faible solubilité dans l'eau [19], une infime quantité de progestérone (3%) a été retrouvée, au bout de 30 jours d'expérience, dans la deuxième tranche de la colonne contenant le sol K. En revanche cette même substance reste totalement dans la couche 1 dans le cas du sol A. Nous observons le même phénomène avec l'androstènedione qui est présente à un niveau infime dans la couche 2 du sol K (1%) et pas du tout dans le cas du sol A. En ce qui concerne les autres stéroïdes hormonaux, ils restent tous adsorbés dans la couche 1 des deux sols étudiés.

La tylosine est, au bout de 30 jours, présente en faible quantité dans la couche 2 du sol K (4%) et reste globalement dans la couche 1 du sol A.

Les autres composés sont globalement adsorbés dans la couche 1 pour les deux sols étudiés. Ces observations peuvent être au moins en partie expliquées par la quantité d'argile contenue dans chacun des deux sols. Effectivement, il y a 32.4% et 9.5% d'argile dans les sols A et K respectivement. Des travaux antérieurs ont montré que plus la teneur en argile est importante, plus les sulfonamides [24, 25], les macrolides [24, 25] et les stéroïdes hormonaux [19] sont adsorbés sur la matrice solide. L'étude statistique présentée dans le chapitre II de la partie III avait également mis en évidence que le pourcentage en argile avait un impact sur les rendements d'extraction des sulfonamides et des macrolides confirmant une interaction entre l'argile et ces substances.

La différence de migration des sulfonamides à travers les deux sols peut également être interprétée par les valeurs de pH différentes des deux sols (6.25 et 8.07 pour les sols A et K respectivement). A pH supérieur ou égal à 7.5, les sulfonamides (pK_{a2} entre 6 et 7.5) existent principalement sous leur forme anionique (**Figure III.10**) et sont donc plus solubles en solution aqueuse et de ce fait plus facilement entraînées par l'eau. De plus, dans ces conditions, ils perdent leur caractère cationique qui leur permettait une forte adsorption sur le

sol [26]. Les sulfonamides ont donc tendance à migrer plus facilement à travers le sol K (pH = 8.07) qu'à travers le sol A (pH = 6.25).

Pour conclure, nous avons observé que les sulfonamides sont les substances qui migrent le plus à travers la matrice solide, probablement dû à leur faible polarité. De plus, ces composés ont de relativement faibles K_d (quelques L/kg) ce qui justifie également leur plus forte mobilité dans le sol. Les autres substances restent globalement adsorbées dans la couche supérieure. D'un autre côté, nous avons remarqué que le sol A retient plus les composés que le sol K.

E. Etude de la dégradation :

Comme nous l'avons mentionné dans la partie I (synthèse bibliographique), deux types de dégradation coexistent dans le sol : biotique (sous l'action des microorganismes) et abiotique (chimique et photochimique). Le sol est un milieu complexe composé de particules minérales, matière organiques, eau et êtres vivants et peut être considéré comme un réacteur chimique et biologique. La dégradation biotique, qui regroupe l'ensemble des processus métaboliques intervenant dans le devenir des contaminants organique, représente souvent la principale voie de dégradation des composés dans les sols. Les micro-organismes jouent un rôle important dans le métabolisme des substances chimiques. L'hydrolyse, quant à elle, représente une des principales réactions de dégradation abiotique des contaminants organiques présents dans les sols.

La dégradation des composés a été évaluée pour les sols A et K. Elle peut être estimée avec les valeurs des temps de demi-vie, $t_{1/2}$. Ce dernier correspond au temps nécessaire pour observer une disparition de 50% de la teneur initiale d'une substance chimique. Nous avons déterminé les $t_{1/2}$ graphiquement (**Figure III.35**) ; les valeurs sont résumées dans le **Tableau III.44**.

Tableau III.44 : Valeurs des $t_{1/2}$ pour les 23 substances étudiées dans les sols A et K

Composés	$t_{1/2}$ (jours) – sol A	$t_{1/2}$ (jours) – sol K
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES		
antiparasitaire		
dicyclanile	7.5	4
sulfonamides / triméthoprime		

sulfathiazole	3	4.5
sulfadiméthoxine	9	20
sulfadimérazine	5	12
sulfanilamide	6	6
sulfadiazine	4	6
sulfabenzamide	3	6
sulfaméthoxydiazine	7	11
sulfaméthoxazole	10	10
triméthoprime	> 30	10
macrolides		
érythromycine	30	5
roxithromycine	non déterminé	non déterminé
tylosine	25	11
β-lactame		
pénicilline G	dégradée	dégradée
CONTAMINANTS HUMAINS		
médicaments humains		
carbamazépine	non déterminé	non déterminé
fluvoxamine	9	4
paracétamol	3.5	3
STEROIDES HORMONAUX		
androgènes		
androstènedione	5	4
testostérone	4	4
progestagènes		
lévonorgestrel	15	9
noréthindrone	20	15
progestérone	7	6
gestodène	8	8

Nous observons que la plupart des substances se dégradent assez rapidement. En effet, des $t_{1/2}$ inférieurs à 20 jours ont été obtenus pour le plus grand nombre des composés étudiés. C'est le cas du dicyclanile, des sulfonamides, du triméthoprime (sauf pour le sol A pour lequel il affiche un $t_{1/2}$ supérieur à 30 jours), des macrolides (sauf dans le sol A, $t_{1/2}$ entre 25 et 30 jours), de la fluvoxamine, du paracétamol et enfin des stéroïdes hormonaux. La pénicilline G, quant à elle, se dégrade tellement rapidement que les $t_{1/2}$ n'ont pas pu être déterminés. En effet, elle n'est plus présente dans les colonnes de sol au bout de 5 jours d'expérience pour les deux sols analysés. Deux composés paraissent au contraire être très persistants dans la matrice solide : la roxithromycine et la carbamazépine. Effectivement ces composés se sont seulement dégradés d'environ 15-20% et 4-9% respectivement au bout de 30 jours.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par les travaux antérieurs. Effectivement, un $t_{1/2}$ compris entre 1 et 10 jours a été rapporté pour le dicyclanile [27]. C. Accinelli a mesuré, pour les sulfonamides, des $t_{1/2}$ moyens de 18.6 jours et 21.3 jours pour la sulfadimérazine et la

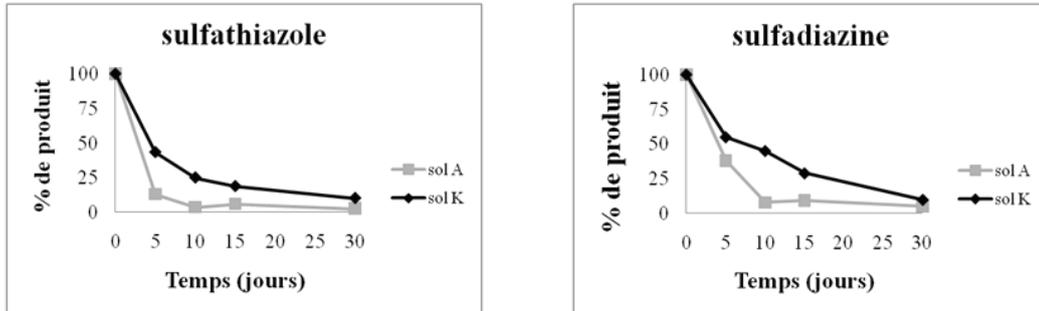
sulfachloropyridine, respectivement, dans des sols limoneux fin et sableux [28]. W. Lertpaitoonpan a rapporté des valeurs de $t_{1/2}$ compris entre 1.2 et 6.6 jours et entre 2.3 et 15.6 jours pour la sulfadimérazine en milieu aérobie et anaérobie respectivement [29]. L. Feng *et al.* ont trouvé des valeurs de $t_{1/2}$ pour le triméthoprimé de 4 jours et 11 jours dans des conditions aérobie et anoxique respectivement [30]. Des études effectuées précédemment pour différents types de sol ont révélé des valeurs de $t_{1/2}$ entre 11.5 et 20 jours pour l'érythromycine, supérieure à 120 jours pour la roxithromycine et entre 2 et 8.1 jours pour la tylosine [31, 32]. En ce qui concerne la pénicilline G, elle est connue pour être relativement instable et se dégrader très rapidement dans le sol ($t_{1/2} < 6.5$ jours) pour donner l'acide pénicilloïque [33, 34]. Il faudrait donc suivre l'acide pénicilloïque plutôt que la pénicilline G pour évaluer son transfert. Pour les contaminants humains, E. Walters *et al.* ont mentionné un $t_{1/2}$ compris entre 462 et 533 jours pour la carbamazépine [35]. S.C. Monteiro a confirmé, dans une de ses études, que la carbamazépine est très persistante dans le sol [36]. Le paracétamol, quant à lui, semble se dégrader très rapidement. En effet, un $t_{1/2}$ de 2.1 jours a été rapporté [37]. Pour finir, la dégradation des stéroïdes hormonaux a également été étudiée. Un $t_{1/2}$ compris entre 0.7 et 3.2 jours a été mentionné dans la littérature pour l'androstènedione [38]. La testostérone a un $t_{1/2}$ compris entre 0.3 et 14 jours [38, 39]. Un $t_{1/2}$ variant entre 4.32 et 11.55 jours a été rapporté pour le lévonorgestrel, à partir de tests effectués sur cinq sols différents [40]. Pour finir, M. Fang a signalé une valeur de $t_{1/2}$ de 1 jour pour la progestérone pour un sol limono-sableux [41].

Par ailleurs, nous observons que la dégradation est plus rapide dans le sol K que dans le sol A pour certaines substances. C'est le cas du dicyclanile, du triméthoprimé, des macrolides (érythromycine et tylosine), de la fluvoxamine, du paracétamol et de la plupart des stéroïdes hormonaux (androstènedione, lévonorgestrel, noréthindrone et progestérone). Au contraire, les sulfonamides semblent être dégradé plus rapidement dans le sol A que dans le sol K.

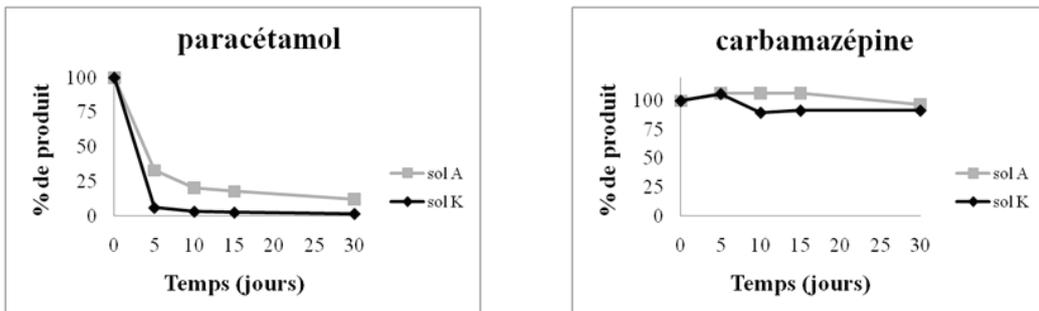
La **Figure III.35** présente des exemples de dégradation, dans les sols A et K, du sulfathiazole, de la sulfadiazine, du paracétamol de la carbamazépine, du lévonorgestrel et de la progestérone. Les courbes de dégradation sont exposées en **Annexe 12** pour tous les composés étudiés.

Figure III.35 : Exemples de dégradation de composés dans les sols A et K

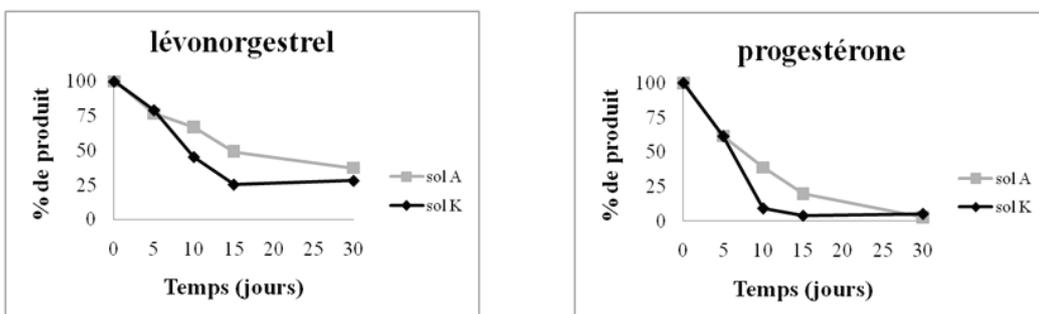
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES (sulfonamides)



CONTAMINANTS HUMAINS (médicaments)



STEROIDES (progestagènes)



Les deux catégories de dégradation (biotique et abiotique) sont influencées par les propriétés du sol, principalement le pH [42], la température, la quantité d'argile ou de matière organique. Par exemple, le pH du sol a un impact sur l'action des micro-organismes. Effectivement, l'activité microbienne semble plus élevée quand le pH augmente [42]. Ceci pourrait expliquer en partie la plus forte dégradation dans le sol K (pH = 8.07) par rapport au sol A (pH = 6.25)

d'un grand nombre de substances. De même, les réactions d'hydrolyse varient avec le pH, comme par exemple dans le cas des sulfonamides dont l'hydrolyse est plus rapide dans des conditions acides [13, 43, 44]. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour expliquer les résultats obtenus. Il faudra faire varier différents paramètres tel que le pH ou l'humidité pour évaluer leurs influences sur la dégradation. De même, des expériences dans différentes conditions (stérile / non stérile) seront également à réaliser pour étudier l'impact respectif des dégradations biotique et abiotique.

IV. Conclusion :

Deux méthodologies ont été mises au point pour analyser des composés respectivement en milieu aqueux et dans les sols. Elles permettent d'envisager des analyses environnementales d'eaux et de sols en un temps raisonnable, un screening est d'ailleurs prévu dans les mois prochains. Ces procédures permettront également d'approfondir les études sur colonnes de sol. Les résultats préliminaires ont d'ores et déjà montré que la dégradation des substances est relativement rapide dans la matrice solide et que le transfert ainsi que la dégradation diffèrent selon les substances et la nature du sol. Globalement, nous avons pu observer une forte dégradation de la molécule mère et une faible migration ce qui laisse supposer une faible présence de ces substances dans les couches inférieures. Cependant, cette conclusion ne peut pas s'étendre aux produits de dégradation. Une telle étude de colonne de sol sur un grand nombre de substances appartenant à la fois aux antibiotiques et stéroïdes hormonaux n'avait jamais, à l'heure actuelle, été effectuée.

En ce qui concerne les perspectives de ce travail, l'étude de la dégradation des composés est à poursuivre pour évaluer les paramètres qui influencent la dégradation ainsi que pour identifier les produits de dégradation.

Références bibliographiques :

- [1]: **M. A. Benoit, L. B. Serrurier, N. Z. L. Yeremian**, 2005. Création d'un stock de médicaments vétérinaires en clientèles canine, rurale et équine. Faculté de médecine de Créteil, Doctorat vétérinaire.
- [2]: **M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo**, 2006. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 70, 678.
- [3]: **S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic**, 2009. Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 4989.
- [4]: **F. Tamtam, F. Mercier, B. L. Bot, J. Eurin, Q. T. Dinh, M. Clément, M. Chevreuil**, 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the Total Environment* 393, 84.
- [5]: **Q. T. Dinh, F. Alliot, E. Moreau-Guigon, J. Eurin, M. Chevreuil, P. Labadie**, 2011. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta* 85, 1238.
- [6]: **W. Ben, Z. Quiang, C. Adams, H. Zhang, L. Chen**, 2008. Simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1202, 173.
- [7]: **L. Tong, P. Li, Y. Wang, K. Zhu**, 2009. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere* 74, 1090.
- [8]: **R. Wei, F. Ge, S. Huang, M. Chen, R. Wang**, 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* 82, 1408.
- [9]: **K. Stoob, H. P. Singer, C. W. Goetz, M. Ruff, S. R. Mueller**, 2005. Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry Quantification of sulfonamides antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters. *Journal of Chromatography A* 1097, 138.
- [10]: **D. Kolpin, E. Furlong, M. Meyer, E. M. Thurman, S. Zaugg**, 2002. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202.
- [11]: **E. Vulliet, C. Cren-Olivé**, 2011. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environmental Pollution* 159, 2929.
- [12]: **S. Liu, G. G. Ying, J. L. Zhao, F. Chen, B. Yang, L. J. Zhou, H. J. Lai**, 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218, 1367.
- [13]: **A. Bialk-Bielinska, J. Kumirska, R. Palavinskas, P. Stepnowski**, 2009. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC-MS/MS. *Talanta* 80, 947.
- [14]: **P. Sukul, M. Spiteller**, 2006. Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 187, 67.
- [15]: **E. Martinez-Carballo, C. Gonzalez-Barreiro, S. Scharf, O. Gans**, 2007. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. *Environmental Pollution* 148, 570.

- [16]: **M. Y. Haller, S. R. Muller, C. S. McArdel, A. C. Alder, M. J. F. Suter**, 2002. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography– mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 952, 111.
- [17]: **S. Thiele-Bruhn**, 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166, 145.
- [18]: **J. C. Durán-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. S. Castro, B. Jiménez, R. Gibson**, 2009. The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta* 78, 1159.
- [19]: **T. Deksissa**, 2008. Fate and Transport of Steroid Hormones in the Environment. UCOWR Conference.
- [20]: **P. Kay, P. A. Blackwell, A. B. A. Boxall**, 2005. Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. *Chemosphere* 60, 497.
- [21]: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/fulltext/9731202e.pdf?expires=1347988870&id=id&accname=freeContent&checksum=1CB1B7D7D3F087FBF52BB90A16670D3A>, 18/09/2012.
- [22]: **S. M. Novak, J. M. Portal, M. Schiavon**, 2000. Effet de la taille des agrégats sur le transport de deux herbicides et d'un traceur de l'eau. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris, Sciences de la terre et des planètes* 331, 111.
- [23]: **G. Blanchet**, 1993. Variabilité des précipitations annuelles dans la région Rhône-Alpes : présentation cartographique. *Revue de Géographie de Lyon*.
- [24]: **K. Kumar, S. C. Gupta, Y. Chander, A. K. Singh**, 2005. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment. *Advances in Agronomy* 87, 1.
- [25]: **A. M. Jacobsen, B. Halling-Sørensen, F. Ingerslev, S. H. Hansen**, 2004. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1038, 157.
- [26]: **S. T. Kurdwadkar, C. D. Adams, M. T. Meyer, D. W. Kolpin**, 2007. Effects of Sorbate Speciation on Sorption of Selected Sulfonamides in Three Loamy Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1370.
- [27]: <http://www.chembase.com>, 19/07/2012.
- [28]: **C. Accinelli**, 2007. Environmental fate of two sulfonamide antimicrobial agents in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2662.
- [29]: **W. Lertpaitoonpan**, 2008. Sorption, degradation, and transport of sulfamethazine in soils and manure-amended soils. Iowa State University, Doctor of Philosophy.
- [30]: **L. Feng, G.-G. Ying, J.-F. Yang, L.-J. Zhou, R. Tao, L. Wang, L.-J. Zhang, P.-A. Peng**, 2010. Dissipation of sulfamethoxazole, trimethoprim and tylosin in a soil under aerobic and anoxic conditions. *Environmental chemistry* 7, 370.
- [31]: [http://vro.dpi.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/pages/lwm_farmwater_agrochemical_pdf/\\$FILE/Comp_agrochemicals_reg_Victoria.pdf](http://vro.dpi.vic.gov.au/dpi/vro/vrosite.nsf/pages/lwm_farmwater_agrochemical_pdf/$FILE/Comp_agrochemicals_reg_Victoria.pdf), 18/09/2012.
- [32]: **M. P. Schlusener, K. Bester**, 2006. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. *Environmental Pollution* 143, 565.
- [33]: **J. Beausse, H. Pharmaceuticals**, 2004. Selected drugs in solid matrices : A review of environmental occurrence, determination and properties of principal substances. Anjou Recherche Veolia Water.
- [34]: **J. C. Chee-Sanford, R. I. Mackie, S. Koike, I. G. Krapac, Y. F. Lin, A. C. Yannarell, S. Maxwell, R. I. Aminov**, 2009. Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *Journal of Environmental Quality* 38, 1086.

- [35]: **E. Walters, K. McClellan, R. U. Halden**, 2010. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids/soil mixtures in outdoor mesocosms. *Water research* 44, 6011.
- [36]: **S. C. Monteiro, A. B. Boxall**, 2009. Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2546.
- [37]: **A. Y. Lin, C. A. Lin, H. H. Tung, N. S. Chary**, 2010. Potential for biodegradation and sorption of acetaminophen, caffeine, propranolol and acebutolol in lab-scale aqueous environments. *Journal of Hazardous Materials* 183, 242.
- [38]: **L. S. Lee, N. Carmosini, S. A. Sassman, H. M. Dion, M. S. S. Iveda**, 2007. Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality. *Advances in Agronomy* 93, 1.
- [39]: **Y. Y. Yang, T. Borch, R. B. Young, L. D. Goodridge, J. G. Davis**, 2010. Degradation Kinetics of Testosterone by Manure-Borne Bacteria: Influence of Temperature, pH, Glucose Amendments, and Dissolved Oxygen. *Journal of Environmental Quality* 39, 1153.
- [40]: **T. Tang, T. Shi, D. Li, J. Xia, Q. Hu, Y. Cao**, 2012. Adsorption Properties and Degradation Dynamics of Endocrine-Disrupting Chemical Levonorgestrel in Soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 3999.
- [41]: **M. Fang**, 2011. Removal of Natural and Synthetic Steroid Hormones through Constructed Wetland Microcosm
The University of Toledo, Master of Science.
- [42]: **M. Kah**, 2007. Behaviour of ionisable pesticides in soil. University of York, Doctor of Philosophy.
- [43]: **C. H. Huang, J. E. Renew, K. L. Smeby, K. Pinkston, D. L. Sedlak**, 2001. Assessment of Potential Antibiotic Contaminants in Water and Preliminary Occurrence Analysis. *Journal of Contemporary Water Research and Education* 120, 30.
- [44]: **J. F. Yang, G. G. Ying, L. H. Yang, J. L. Zhao, F. Liu, R. Tao, Z. Q. Yu, P. Peng**, 2009. Degradation behavior of sulfadiazine in soils under different conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part B* 44, 241.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Notre étude avait pour but de mettre en place des méthodes destinées à l'analyse de traces de composés vétérinaires et stéroïdes hormonaux susceptibles d'être présents dans l'environnement, en phases aqueuse et solide. Les contrôles de pollution nécessitent de disposer de méthodes fiables et suffisamment rapides. C'est pourquoi nous avons développé des méthodes multi-résidus et inter-familles pour la détection et la quantification de ces composés, sélectionnés parmi les plus pertinents à détecter et à doser grâce à une étude bibliographique.

Nous avons développé une procédure pour les **matrices aqueuses** en commençant par une optimisation de la méthode d'analyse par **chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem** (choix de la cartouche, des phases mobiles, des paramètres de la détection tel que la température du spectromètre). Puis nous avons mis en place l'étape de préparation d'échantillon par **SPE**. Plusieurs paramètres ont été testés : le choix de la cartouche, le pH auquel l'échantillon doit être fixé, la nature de la solution de lavage et le solvant de reprise. Après avoir évalué les rendements d'extraction et les effets matrice dans les différents cas, notre choix s'est porté sur la cartouche OASIS HLB, fréquemment utilisée, un pH d'échantillon fixé à 7, une solution de lavage d'eau ajustée à pH 7 et la solution 95/5 H₂O/méthanol comme solvant de reprise. **Les limites de quantification méthodologiques sont comprises entre 0.09 et 34 ng/L** (excepté pour la sulfanilamide, moins détectable avec une limite de quantification de 117 ng/L). Cette procédure a ensuite été validée en conditions environnementales lors de **l'analyse d'échantillons réels d'eaux de surface** (eau d'un canal, eaux de ruissellement de terrains agricoles) et a ainsi permis de mettre en évidence **la présence, à de faibles concentrations, de quelques antibiotiques (sulfonamides et macrolides), de stéroïdes hormonaux (androgènes et progestagènes) ainsi que de la carbamazépine et du paracétamol**, utilisés dans cette étude comme marqueurs de pollution.

Parallèlement, nous avons mis en place une méthode d'analyse pour la **matrice solide**. **Deux méthodes d'extraction ont été évaluées, la PLE et le procédé QuEChERS**. Dans le cas de la méthode PLE, nous avons principalement travaillé sur le choix du solvant d'extraction ; le méthanol a finalement été retenu. Pour la technique QuEChERS, plusieurs paramètres ont été testés : le tampon, la nature ainsi que le volume de solvant. Nous avons finalement sélectionné le tampon acétate et utilisé 15 mL d'acétonitrile et 10 mL d'eau. A

l'issue de cette extraction, comme les extraits obtenus sont relativement chargés, une étape de purification s'est avérée nécessaire. Les purifications SPLE (pour la PLE) et dSPE (en série avec le procédé QuEChERS) ont d'abord été tentées. Les résultats ne s'étant pas avérés satisfaisants, nous avons dû mettre au point une purification offline avec des cartouches SPE. Une purification employant deux cartouches en tandem, SAX + StrataX a été choisie. La SAX permet d'éliminer les interférents de la matrice notamment les acides humiques et fulviques contenus dans l'extrait et la StrataX retient les analytes cibles. Après avoir comparé les procédures PLE – purification SAX + StrataX et QuEChERS – purification SAX + StrataX, **nous avons retenue la méthode basée sur QuEChERS car elle permet globalement d'atteindre de meilleurs rendements d'extraction.** De plus, cette technique est rapide et permettra donc d'éventuelles vastes campagnes d'analyses. Cette méthode a ensuite été validée suivant les recommandations de la norme ICH/2005. **Nous avons obtenu des limites de quantification comprises entre 0.013 et 3 ng/g** (sauf pour la sulfanilamide ou la limite de quantification atteint 17 ng/g). **Cette procédure a été appliquée à différents échantillons de sols agricoles ayant subi des épandages, ce qui a révélé la présence de quelques composés à de très faibles concentrations (< 0.7 ng/g) tels que les sulfonamides, le florfenicol, l'androstènedione, la carbamazépine et l'ibuprofène.** Un tel travail n'avait jamais été réalisé. Effectivement les études précédentes concernant l'analyse de contaminants dans les sols se concentrent uniquement sur une catégorie de produit alors que notre travail permet d'étudier simultanément les antibiotiques et les stéroïdes hormonaux. De plus, la méthode QuEChERS qui est une procédure rapide et efficace a très peu été utilisée pour des analyses environnementales.

Compte tenu de la diversité des sols il était important d'étudier l'impact des paramètres du sol (capacité d'échange cationique (CEC), ainsi que les pourcentages en argile, en limon, en sable et en carbone organique) sur les rendements d'extraction et les effets matrice. Un travail statistique original et fondé sur une importante base expérimentale (11 sols et 23 composés) a montré que la CEC ainsi que les quantités d'argile et de carbone organique ont une influence sur les rendements d'extraction de certains composés (sulfonamides, macrolides,...). De même nous avons observé que la teneur en carbone organique a un impact sur les effets matrice de quelques substances (stéroïdes hormonaux,...). Les effets d'interactions entre les différents paramètres du sol ont également été étudiés. Nous avons observé que certains facteurs ont une influence sur l'effet qu'a l'argile sur les

rendements d'extraction. L'effet du carbone organique sur les effets matrice est également impacté par certains facteurs.

Comme les **tétracyclines et les fluoroquinolones** sont très difficiles à extraire de la matrice solide avec une méthode multi-familles, nous les avons étudiées séparément. Après avoir développé une méthode d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour ces substances, **nous avons comparé l'efficacité de la PLE et de QuEChERS pour les extraire**. La méthode QuEChERS ne permettant pas d'extraire les composés appartenant à ces deux familles d'antibiotiques, **nous avons retenu la méthode PLE**. Parmi les différents essais effectués, le solvant 25/25/50 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 3 permet d'extraire les tétracyclines et le mélange 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 4.5 semble le plus adapté pour extraire les fluoroquinolones. Malgré la difficulté d'extraire ces composés du sol, d'autant plus qu'il est argileux, nous sommes parvenu à obtenir d'assez bons rendements d'extraction : entre 33 et 94% pour les tétracyclines et entre 65 et 133% pour les fluoroquinolones. Ces deux méthodes d'extraction sont en cours de validation. A ce jour, très peu de procédures permettant d'extraire des substances appartenant à ces deux familles d'antibiotiques ont été mises en place et notamment pour des sols argileux. Par ailleurs, comme les tétracyclines et les fluoroquinolones interagissent fortement avec l'argile contenue dans le sol, et différemment selon le type d'argile, il serait intéressant, dans une étude future, d'évaluer l'efficacité des extractions en fonction du pourcentage en argile et de la structure cristallographique de ce constituant.

Enfin, nous avons réalisé une série d'expériences sur des colonnes de sol, approche destinée à évaluer le transfert, l'accumulation et la dégradation des antibiotiques vétérinaires et stéroïdes hormonaux dans un sol, dans les conditions contrôlées du laboratoire. Une telle étude n'a jamais été effectuée pour autant de substances appartenant aux antibiotiques et stéroïdes hormonaux. En ce qui concerne le transfert, nous avons mis en évidence que seuls les sulfonamides migrent à travers la colonne de sol. La quantité d'argile contenue dans le sol ainsi que son pH ont probablement une influence sur le transfert de ces substances à travers le sol, cependant des études complémentaires seraient nécessaires pour valider ces hypothèses. Il serait intéressant de poursuivre cette étude en multipliant les expériences en colonnes de sol sur des sols ayant des propriétés différentes. Il

Conclusion générale

serait ainsi possible d'évaluer l'impact des différents paramètres du sol sur le transfert des substances polluantes à l'aide d'une étude statistique. Par ailleurs, nous constatons que globalement les composés se dégradent relativement rapidement avec une durée de demi-vie comprise entre 3 et 30 jours. Comme pour le transfert, les résultats laissent supposer que le pH du sol a une influence sur la dégradation des composés. Toutefois, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse, et pour préciser l'influence de paramètres tels que le pH ou l'humidité sur les mécanismes et la vitesse de dégradation. Des expériences en conditions stérile/non stérile pourraient également être mises en place pour étudier l'influence respective des dégradations biotique et abiotique. Enfin, l'identification et le suivi des produits de dégradation constituent un important challenge. En effet ces substances, encore souvent inconnues, peuvent s'avérer plus persistantes et/ou plus toxiques que les polluants initiaux et il est important de mener des investigations. L'utilisation de la complémentarité de spectromètre de masse à haute résolution et de triple quadripôle très sensible représenterait une poursuite intéressante de nos premiers essais.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Concentrations limites en métaux lourds dans les sols et les boues pour pouvoir effectuer un épandage (directive sur les boues de station d'épuration (86/278/CEE))

ANNEXE I A

VALEURS LIMITES DE CONCENTRATION EN MÉTAUX LOURDS DANS LES SOLS

(mg/kg de matière sèche d'un échantillon représentatif des sols dont le pH est de 6 à 7, tel que défini à l'annexe II C)

Paramètres	Valeurs limites ⁽¹⁾
Cadmium	1 à 3
Cuivre ⁽²⁾	50 à 140
Nickel ⁽²⁾	30 à 75
Plomb	50 à 300
Zinc ⁽²⁾	150 à 300
Mercuré	1 à 1,5
Chrome ⁽³⁾	—

⁽¹⁾ Les États membres peuvent autoriser un dépassement des valeurs limites reprises ci-dessus dans le cas de l'utilisation des boues sur des terres qui, lors de la notification de la présente directive, sont consacrées à l'élimination des boues mais sur lesquelles s'effectuent des cultures à but commercial destinées exclusivement à la consommation animale. Les États membres communiquent à la Commission le nombre et la nature des sites concernés. Ils veillent en outre à ce qu'il n'en résulte aucun danger pour l'homme et l'environnement.

⁽²⁾ Les États membres peuvent autoriser un dépassement des valeurs limites pour ces paramètres sur des sols dont le pH est constamment supérieur à 7. En aucun cas, les concentrations maximales autorisées en ces métaux lourds ne doivent dépasser de plus de 50 % les valeurs reprises ci-dessus. Les États membres veillent en outre à ce qu'il n'en résulte aucun danger pour l'homme et l'environnement et notamment pour les nappes d'eau souterraines.

⁽³⁾ Il n'est pas possible à ce stade de fixer des valeurs limites pour le chrome. Le Conseil fixera ces valeurs limites à un stade ultérieur sur la base de propositions que la Commission présentera dans un délai d'un an suivant la notification de la présente directive.

ANNEXE I B

VALEURS LIMITES DE CONCENTRATION EN MÉTAUX LOURDS
DANS LES BOUES DESTINÉES À L'UTILISATION EN AGRICULTURE

(mg/kg de matière sèche)

Paramètres	Valeurs limites
Cadmium	20 à 40
Cuivre	1 000 à 1 750
Nickel	300 à 400
Plomb	750 à 1 200
Zinc	2 500 à 4 000
Mercurure	16 à 25
Chrome ⁽¹⁾	—

(1) Il n'est pas possible à ce stade de fixer des valeurs limites pour le chrome. Le Conseil fixera ces valeurs limites à un stade ultérieur sur la base de propositions que la Commission présentera dans un délai d'un an suivant la notification de la présente directive.

ANNEXE I C

VALEURS LIMITES POUR LES QUANTITÉS ANNUELLES DE
MÉTAUX LOURDS POUVANT ÊTRE INTRODUITES DANS LES SOLS
CULTIVÉS SUR LA BASE D'UNE MOYENNE DE 10 ANS

(kg/ha/an)

Paramètres	Valeurs limites ⁽¹⁾
Cadmium	0,15
Cuivre	12
Nickel	3
Plomb	15
Zinc	30
Mercurure	0,1
Chrome ⁽²⁾	—

(1) Les États membres peuvent autoriser un dépassement des valeurs limites reprises ci-dessus dans le cas de l'utilisation des boues sur des terres qui, lors de la notification de la présente directive, sont consacrées à l'élimination des boues mais sur lesquelles s'effectuent des cultures à but commercial destinées exclusivement à la consommation animale. Les États membres communiquent à la Commission le nombre et la nature des sites concernés. Ils veillent en outre à ce qu'il n'en résulte aucun danger pour l'homme et l'environnement.

(2) Il n'est pas possible à ce stade de fixer des valeurs limites pour le chrome. Le Conseil fixera ces valeurs limites sur la base de propositions que la Commission présentera dans un délai d'un an suivant la notification de la présente directive.

ANNEXE 2 : Rendements d'extraction PLE pour les 31 produits étudiés en utilisant l'acétone comme solvant d'extraction

Composés	Rendements d'extraction (%)
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES	
antiparasitaire	
dicyclanile	60
sulfonamides / triméthoprime	
sulfathiazole	19
sulfadiméthoxine	57
sulfadimérazine	64
sulfanilamide	46
sulfadiazine	18
sulfabenzamide	17
sulfaméthoxydiazine	37
sulfaméthoxazole	48
triméthoprime	9
macrolides	
érythromycine	4
roxithromycine	7
tylosine	7
β-lactame	
pénicilline G	ND
phénicolé	
florfénicol	83
CONTAMINANTS HUMAINS	
médicaments humains	
carbamazépine	90
fluvoxamine	3
paracétamol	40
ibuprofène	0.7
plastifiant	
bisphénol A	100
STEROIDES HORMONAUX	
androgènes	
androstènedione	75
testostérone	76
progestagènes	
lévonorgestrel	74
noréthindrone	81
progestérone	77
gestodène	69
estrogènes	
17α-estradiol	75
17β-estradiol	75

Annexes

estrone	78
estriol	59
17 α -éthynylestradiol	69

ND : non détecté

ANNEXE 3 : Rendements d'extraction et effets matrice après une PLE pour les 31 produits étudiés en utilisant le mélange 40/40/20 méthanol/acétonitrile/0.2M acide citrique ajusté à pH 4 comme solvant d'extraction

Composés	Rendements d'extraction (%)	Effets matrice (%)
ANTIBIOTIQUES		
antiparasitaire		
dicyclanile	82	-31
sulfonamides / triméthoprime		
sulfathiazole	110	-88
sulfadiméthoxine	110	-79
sulfadimérazine	109	-70
sulfanilamide	70	-73
sulfadiazine	106	-77
sulfabenzamide	110	-89
sulfaméthoxydiazine	109	-72
sulfaméthoxazole	110	-81
triméthoprime	79	-16
macrolides		
érythromycine	40	-76
roxithromycine	100	-60
tylosine	95	290
β-lactame		
pénicilline G	82	-47
phénicolé		
florfénicol	109	-51
CONTAMINANTS HUMAINS		
médicaments humains		
carbamazépine	96	-38
fluvoxamine	60	-47
paracétamol	8	-27
ibuprofène	97	-30
plastifiant		
bisphénol A	42	-54
STEROIDES HORMONAUX		
androgènes		
androstènedione	97	-71
testostérone	100	-72
progestagènes		
lévonorgestrel	99	-70
noréthindrone	96	-69
progestérone	91	-86

gestodène	100	-69
estrogènes		
17 α -estradiol	50	-59
17 β -estradiol	50	-60
estrone	60	-58
estriol	20	-67
17 α -éthynylestradiol	60	-71

ANNEXE 4 : Rendements d'extraction SPLE des 31 produits étudiés pour les différents solvants

1-Rendements d'extraction SPLE (%) pour le solvant acétone/méthanol (50/50)

Composés	sans phase	florisil	silice	alumine
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES				
antiparasitaire				
dicyclanile	63	87	87	72
sulfonamides / triméthoprime				
sulfathiazole	96	53	103	51
sulfadiméthoxine	99	79	125	75
sulfadimérazine	94	62	117	62
sulfanilamide	101	54	112	68
sulfadiazine	90	61	110	63
sulfabenzamide	87	59	105	47
sulfaméthoxydiazine	100	77	112	73
sulfaméthoxazole	102	77	120	74
triméthoprime	23	32	27	16
macrolides				
érythromycine	16	10	150	10
roxithromycine	48	42	50	58
tylosine	65	71	77	54
β-lactame				
pénicilline G	14	6	26	ND
phénicolé				
florfénicol	105	111	96	85
CONTAMINANTS HUMAINS				
médicaments humains				
carbamazépine	97	97	101	96
fluvoxamine	ND	ND	ND	ND
paracétamol	17	1	3	1
ibuprofène	68	55	201	2
plastifiant				
bisphénol A	70	16	54	22
STEROIDES HORMONAUX				
androgènes				
androstènedione	96	94	90	86
testostérone	104	97	95	87
progestagènes				
lévonorgestrel	112	88	85	93
noréthindrone	109	97	92	93
progestérone	117	86	117	94
gestodène	96	97	92	85

estrogènes				
17 α -estradiol	73	23	52	24
17 β -estradiol	78	25	36	47
estrone	80	32	58	42
estriol	33	8	32	15
17 α -éthynylestradiol	70	43	37	28

ND : non détecté

2-Rendements d'extraction SPLE (%) pour le méthanol

Composés	sans phase	C18
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES		
antiparasitaire		
dicyclanile	62	74
sulfonamides / triméthoprime		
sulfathiazole	78	78
sulfadiméthoxine	88	89
sulfadimérazine	90	84
sulfanilamide	84	79
sulfadiazine	91	85
sulfabenzamide	75	72
sulfaméthoxydiazine	91	89
sulfaméthoxazole	99	89
triméthoprime	15	44
macrolides		
érythromycine	16	24
roxithromycine	64	66
tylosine	42	50
β-lactame		
pénicilline G	6	20
phénicolé		
florfénicol	91	87
CONTAMINANTS HUMAINS		
médicaments humains		
carbamazépine	99	100
fluvoxamine	38	22
paracétamol	18	9
ibuprofène	43	66
plastifiant		
bisphénol A	77	49
STEROIDES HORMONAUX		
androgènes		
androstènedione	92	91
testostérone	112	95
progestagènes		
lévonorgestrel	98	85

noréthindrone	102	94
progestérone	135	79
gestodène	108	97
estrogènes		
17 α -estradiol	69	60
17 β -estradiol	90	60
estrone	89	58
estriol	28	14
17 α -éthinyloestradiol	81	48

3-Rendements d'extraction SPLE (%) pour le solvant à base d'acide phosphorique (0.10%AP)

Composés	sans phase	C18
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES		
antiparasitaire		
dicyclanile	102	108
sulfonamides / triméthoprime		
sulfathiazole	82	91
sulfadiméthoxine	94	99
sulfadimérazine	89	95
sulfanilamide	73	86
sulfadiazine	89	90
sulfabenzamide	99	92
sulfaméthoxydiazine	92	98
sulfaméthoxazole	100	98
triméthoprime	82	94
macrolides		
érythromycine	33	20
roxithromycine	97	100
tylosine	86	96
β-lactame		
pénicilline G	75	65
phénicolé		
florfénicol	96	112
CONTAMINANTS HUMAINS		
médicaments humains		
carbamazépine	101	108
fluvoxamine	60	70
paracétamol	4	2
ibuprofène	98	112
plastifiant		
bisphénol A	43	38
STEROIDES HORMONAUX		
androgènes		
androstènedione	99	100
testostérone	101	114

progestagènes		
lévonorgestrel	113	98
noréthindrone	100	107
progestérone	108	95
gestodène	101	107
estrogènes		
17 α -estradiol	47	35
17 β -estradiol	36	40
estrone	62	70
estriol	8	13
17 α -éthynylestradiol	64	50

ANNEXE 5: Rendements d'extraction (%) QuEChERS des 31 produits étudiés pour les différents solvants testés

Composés	acétonitrile/H ₂ O	acétonitrile CH ₃ COOH/H ₂ O	acétonitrile H ₃ PO ₄ /H ₂ O	acétonitrile CH ₃ COOH/EDTA	acétonitrile H ₃ PO ₄ /EDTA	CH ₂ Cl ₂	acétate d'éthyle
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES							
antiparasitaire							
dicyclanile	83	82	79	82	74	7	63
sulfonamides / triméthoprime							
sulfathiazole	64	73	75	79	65	1	26
sulfadiméthoxine	79	74	78	80	69	2	49
sulfadimérazine	79	77	81	83	69	2	48
sulfanilamide	54	47	60	53	45	1	18
sulfadiazine	75	73	76	77	69	2	39
sulfabenzamide	66	67	68	71	63	1	33
sulfaméthoxydiazine	72	71	78	80	68	1	38
sulfaméthoxazole	82	83	83	88	75	2	51
triméthoprime	71	65	60	74	58	1	19
macrolides							
érythromycine	40	47	41	74	47	1	4
roxithromycine	39	43	42	59	42	1	2
tylosine	57	64	64	84	65	1	1

Annexes

estriol	58	54	54	62	52	2	40
17 α -éthinyloestradiol	50	44	50	61	54	4	38

ANNEXE 6 : Rendements de purification et effets matrice pour les différentes dSPE testées avec l'acétonitrile pour les 31 composés étudiés

1- Rendements de purification (%) :

Composés	PSA	PSA/C18	SAX	florisil	silice	alumine
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES						
antiparasitaire						
dicyclanile	72	88	80	82	82	92
sulfonamides / triméthoprime						
sulfathiazole	33	64	77	89	62	65
sulfadiméthoxine	42	81	84	91	65	56
sulfadimérazine	50	78	87	83	71	60
sulfanilamide	60	73	83	85	86	68
sulfadiazine	45	68	83	87	68	59
sulfabenzamide	21	42	76	88	70	61
sulfaméthoxydiazine	40	77	81	82	56	57
sulfaméthoxazole	60	75	85	89	73	62
triméthoprime	50	83	83	62	57	90
macrolides						
érythromycine	50	79	48	11	36	99
roxithromycine	49	75	79	19	43	92

tylosine	18	45	86	59	46	96
β-lactame						
pénicilline G	9	12	65	62	53	25
phénicolé						
florfénicol	60	82	93	86	80	87
CONTAMINANTS HUMAINS						
médicaments humains						
carbamazépine	75	99	85	89	83	90
fluvoxamine	50	70	80	45	57	90
paracétamol	73	83	78	85	78	97
ibuprofène	20	64	75	72	59	65
plastifiant						
bisphénol A	40	80	85	91	74	90
STEROIDES HORMONAUX						
androgènes						
androstènedione	58	92	93	83	73	72
testostérone	55	93	82	80	72	79
progestagènes						
lévonorgestrel	46	77	75	82	76	70
noréthindrone	53	87	84	79	74	75
progestérone	62	50	81	80	78	62
gestodène	50	80	83	78	78	72
estrogènes						
17α-estradiol	39	65	80	86	69	75
17β-estradiol	36	74	73	84	71	62

estrone	40	83	82	93	72	77
estriol	60	94	83	88	76	86
17 α -éthinyloestradiol	51	62	90	93	72	76

2- Effets matrice (%):

Composés	PSA	PSA/C18	SAX	florisil	silice	alumine
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES						
antiparasitaire						
dicyclanile	-2	-12	-1	3	-1	-20
sulfonamides / triméthoprime						
sulfathiazole	-18	-30	-80	-35	-60	-81
sulfadiméthoxine	-17	-32	-79	-23	-41	-70
sulfadimérazine	-6	-20	-80	-20	-42	-74
sulfanilamide	-72	-77	-94	-84	-89	-97
sulfadiazine	-20	-20	-79	-30	-48	-76
sulfabenzamide	-30	-40	-78	-30	-43	-72
sulfaméthoxydiazine	-16	-29	-81	-23	-47	-77
sulfaméthoxazole	-42	-32	-80	-30	-49	-76
triméthoprime	16	-3	8	10	-19	-24
macrolides						
érythromycine	2	10	-83	-67	-98	-99
roxithromycine	140	54	177	50	-16	40

tylosine	132	154	171	343	167	148
β-lactame						
pénicilline G	-42	-9	-20	-7	-12	-40
phénicolé						
florfénicol	50	65	-1	52	42	25
CONTAMINANTS HUMAINS						
médicaments humains						
carbamazépine	-17	-26	-16	-7	-9	-14
fluvoxamine	274	-2	48	-61	-64	-46
paracétamol	-30	-30	1	-22	-16	-34
ibuprofène	-75	-60	-73	-5	-14	-21
plastifiant						
bisphénol A	-54	-53	-65	-44	-47	-46
STEROIDES HORMONAUX						
androgènes						
androstènedione	-65	-72	-64	-61	-63	-55
testostérone	-60	-66	-55	-52	-60	-50
progestagènes						
lévonorgestrel	-73	-72	-66	-65	-70	-61
noréthindrone	-64	-70	-50	-60	-65	-60
progestérone	-89	-85	-83	-81	-84	-77
gestodène	-73	-73	-85	-65	-70	-66
estrogènes						
17 α -estradiol	-60	-60	-77	-51	-54	-51
17 β -estradiol	-55	-55	-77	-52	-55	-43

estrone	-60	-60	-76	-50	-54	-52
estriol	-30	-40	-40	-30	-32	-30
17 α -éthinyloestradiol	-70	-63	-81	-59	-65	-60

ANNEXE 7 : Rendements de purification et effets matrice pour les différentes dSPE testées avec la phase florisil pour les 31 composés étudiés

1- Rendements de purification (%) :

Composés	heptane	acétone	acétate d'éthyle	CH ₂ Cl ₂	A/H	AE/H	D/H	D/A	D/MeOH	A/MeOH	AE/ACN
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES											
antiparasitaire											
dicyclanil	0.10	75	60	3	55	52	2.0	68	120	86	83
sulfonamides / triméthoprime											
sulfathiazole	0.01	39	23	3	11	7	0.3	28	63	51	33
sulfadiméthoxine	0.05	52	42	14	23	26	2.0	43	80	64	50
sulfadimérazine	0.03	47	33	7	19	22	1.1	38	73	57	43
sulfanilamide	ND	43	47	6	22	19	1.6	18	65	61	38
sulfadiazine	0.01	53	41	13	21	22	2.3	40	74	59	45
sulfabenzamide	0.01	32	28	15	11	12	2.2	28	86	57	47
sulfaméthoxydiazine	ND	50	35	12	17	21	1.8	35	73	59	45
sulfaméthoxazole	ND	47	42	16	21	26	1.8	39	86	60	50
triméthoprime	0.11	38	13	0.5	9	2	0.2	23	96	77	27
macrolides											
érythromycine	0.06	32	4	0.5	7	1	0.1	19	54	42	8
roxithromycine	0.08	46	9	0.3	12	2	0.2	26	79	58	12

tylosine	0.11	52	7	1	1	9	1	0.1	30	122	80	18
β-lactame												
pénicilline G	0.02	7	2	1	1	1	1	0.3	0.7	82	69	7
phénicolé												
florfénicol	ND	83	67	27	56	65	7	7	87	126	102	82
CONTAMINANTS HUMAINS												
médicaments humains												
carbamazépine	0.4	84	77	35	62	62	12	12	82	115	89	95
fluvoxamine	0.1	28	18	1	6	6	0.1	0.1	20	42	0.5	24
paracétamol	ND	97	102	16	66	72	5	5	92	127	90	102
ibuprofène	3.5	65	35	52	47	35	19	19	45	113	73	68
plastifiant												
bisphénol A	2	91	73	42	70	66	14	14	72	110	81	88
STEROIDES HORMONAUX												
androgènes												
androsténone	1.00	84	79	17	71	69	7	7	75	95	77	89
testostérone	0.54	81	79	15	68	64	7	7	72	108	86	90
progestagènes												
lévonorgestrel	1.84	95	76	29	68	57	18	18	71	107	86	85
noréthindrone	1.55	87	76	31	66	67	11	11	77	107	81	89
progesterone	0.83	88	76	10	74	58	6	6	68	102	71	67
gestodène	2.32	88	90	39	75	68	17	17	72	96	81	90
estrogènes												
17α-estradiol	2.03	100	67	41	65	62	22	22	68	117	75	92
17β-estradiol	0.41	86	55	45	66	64	19	19	71	120	88	98

estrone	1.00	90	74	48	66	74	22	69	122	86	93
estriol	0.08	84	51	12	50	39	3	59	116	86	76
17 α -éthinyloestradiol	1.16	94	71	47	71	67	28	89	108	79	112

2- Effets matrice (%):

Composés	heptane	acétone	acétate d'éthyle	CH ₂ Cl ₂	A/H	AE/H	D/H	D/A	D/MeOH	A/MeOH	AE/ACN
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES											
antiparasitaire											
dicyclanile	-7	-13	20	14	-29	-40	-31	-14	-51	-33	-18
sulfonamides / triméthoprime											
sulfathiazole	-30	-73	-50	-8	-46	-50	-35	-59	-52	-40	-53
sulfadiméthoxine	19	-50	-30	-10	-33	-42	-32	-40	-47	-40	-33
sulfadimérazine	16	-55	-32	2	-35	-43	-32	-42	-46	-42	-33
sulfanilamide	ND	-88	-83	-66	-72	-73	-50	-70	-71	-80	-82
sulfadiazine	3	-54	-40	11	-35	-40	-32	-40	-45	-40	-33
sulfabenzamide	-25	-55	-40	-7	-40	-41	-39	-45	-60	-45	-56
sulfaméthoxydiazine	ND	-55	-35	-1	-33	-42	-30	-42	-45	-40	-40
sulfaméthoxazole	ND	-52	-40	-12	-38	-45	-30	-45	-60	-40	-45
triméthoprime	12	-22	35	70	0.6	-21	-8	-25	-45	-40	-20
macrolides											
érythromycine	514	97	420	262	300	494	-5	80	-7	50	180
roxithromycine	160	50	100	154	-20	68	157	481	-44	-10	43

tylosine	900	140	350	319	-35	-17	79	115	-18	30	31
β-lactame											
pénicilline G	-12	-48	24	-12	-35	-5	-45	-47	-90	-81	-30
phénicolé											
florfénicol	ND	11	90	72	5	8	-18	12	-3	17	0
CONTAMINANTS HUMAINS											
médicaments humains											
carbamazépine	-3	-3	16	5	-32	-34	-30	-9	-45	-21	-23
fluvoxamine	800	3	150	959	-55	111	364	54	-68	-84	-88
paracétamol	ND	-31	-32	30	-11	-25	-10	-30	-54	-40	-41
ibuprofène	56	-21	-30	-35	-70	-54	-66	-23	-64	-40	-25
plastifiant											
bisphénol A	4	-50	-53	11	-52	-50	-30	-41	-70	-60	-55
STEROIDES HORMONAUX											
androgènes											
androstènedione	-4	-55	-50	-28	-55	-55	-50	-52	-72	-62	-60
testostérone	-1	-40	-42	-20	-62	-60	-50	-50	-73	-65	-52
progestagènes											
lévonorgestrel	-3	-65	-60	-20	-70	-65	-50	-66	-83	-76	-65
noréthindrone	-4	-55	-50	-17	-60	-60	-50	-55	-74	-68	-60
progestérone	-9	-80	-83	-50	-90	-81	-70	-85	-91	-85	-84
gestodène	-13	-70	-65	-30	-70	-63	-49	-70	-83	-85	-70
estrogènes											
17α-estradiol	3	-60	-50	-15	-67	-68	-55	-65	-78	-70	-70

17 β -estradiol	7	-50	-40	-10	-70	-65	-40	-60	-80	-70	-65
estrone	6	-60	-52	-16	-64	-70	-40	-65	-83	-75	-70
estriol	81	-30	25	33	-26	-30	-30	-16	-54	-45	-30
17 α -éthinylestrodiol	18	-66	-65	-5	-77	-72	-10	-75	-86	-80	-75

CH₂Cl₂ : dichlorométhane

A/H : mélange acétone/heptane (50/50)

AE/H : mélange acétate d'éthyle/heptane (50/50)

D/H : mélange dichlorométhane/heptane (50/50)

D/A : mélange dichlorométhane/acétone (50/50)

D/MeOH : mélange dichlorométhane/méthanol (50/50)

A/MeOH : mélange acétone/méthanol (50/50)

AE/ACN : mélange acétate d'éthyle/acétonitrile (50/50)

ND : non détecté

ANNEXE 8 : Rendements de purification et effets suite à la purification avec la cartouche SiOH pour les 31 composés étudiés

Composés	Rendements de purification (%)	Effets matrice (%)
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES		
antiparasitaire		
dicyclanile	110	-73
sulfonamides / triméthoprime		
sulfathiazole	42	-91
sulfadiméthoxine	70	-91
sulfadimérazine	72	-92
sulfanilamide	32	-91
sulfadiazine	61	-90
sulfabenzamide	40	-91
sulfaméthoxydiazine	60	-92
sulfaméthoxazole	60	-90
triméthoprime	1.5	-62
macrolides		
érythromycine	20	-81
roxithromycine	41	-79
tylosine	115	-82
β-lactame		
pénicilline G	5	-92
phénicolé		
florfénicol	99	-67
CONTAMINANTS HUMAINS		
médicaments humains		
carbamazépine	120	-63
fluvoxamine	56	-45
paracétamol	105	-67
ibuprofène	113	-76
plastifiant		
bisphénol A	109	-83
STEROIDES HORMONAUX		
androgènes		
androstènedione	120	-74
testostérone	115	-79
progestagènes		
lévonorgestrel	106	-85
noréthindrone	116	-79
progestérone	97	-93
gestodène	129	-83
estrogènes		
17α-estradiol	105	-85

Annexes

17 β -estradiol	107	-88
estrone	114	-87
estriol	78	-74
17 α -éthynylestradiol	105	-89

ANNEXE 9 : Effets matrice des androgènes et progestagènes après purification (OASIS HLB, pH7) d'un extrait de sol

Composés	Effets matrice (%)
androgènes	
androstènedione	-61
testostérone	-55
progestagènes	
lévonorgestrel	-55
noréthindrone	-60
progestérone	-70
gestodène	-60

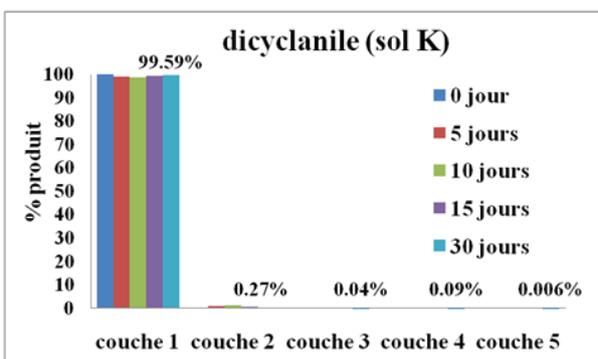
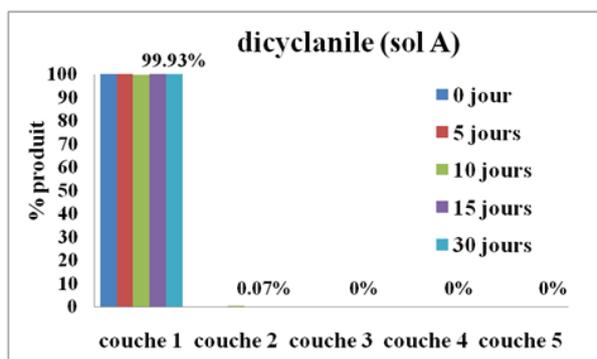
ANNEXE 10 : Rendements d'extraction PLE (%) de certaines tétracyclines et fluoroquinolones lors de l'utilisation de solvants classiques

Composés	acétone	méthanol	acétone/méthanol (50/50)	méthanol/H ₂ O (80/20)	acétonitrile/H ₂ O (70/30)
tétracyclines					
tétracycline	0.03	ND	ND	0.164	ND
oxytétracycline	ND	ND	ND	ND	ND
chlortétracycline	ND	ND	ND	ND	ND
fluoroquinolones					
ciprofloxacine	0.04	0.2	0.2	3	3
enrofloxacin	0.04	0.1	0.08	6	11
ofloxacin	0.04	0.06	0.1	5	4

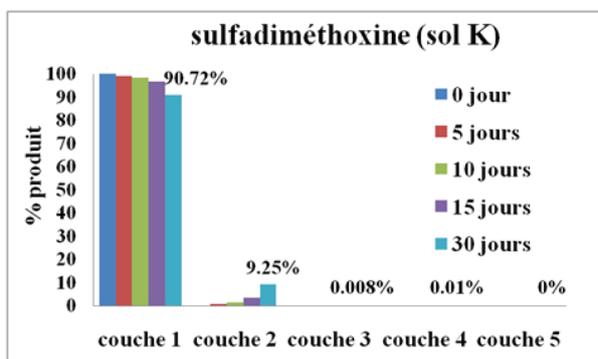
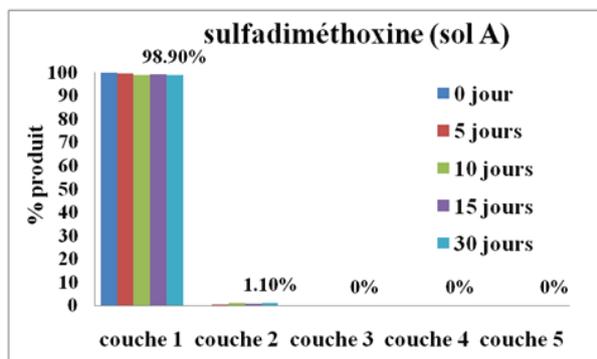
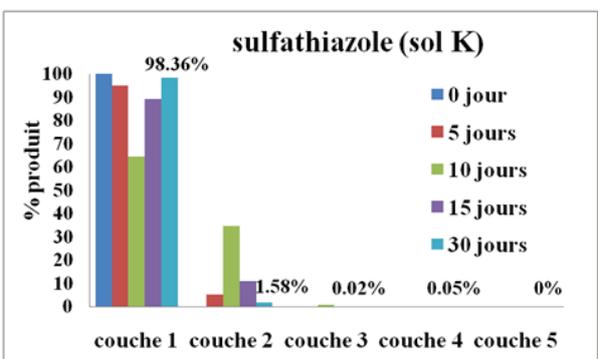
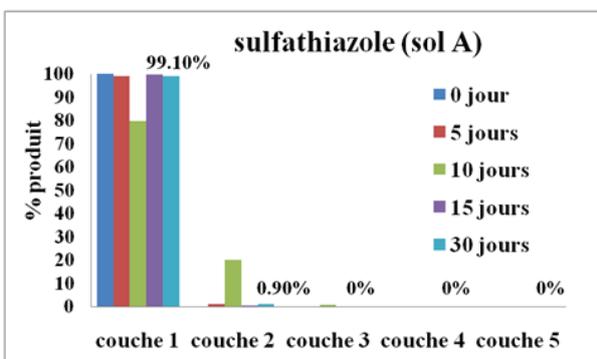
ND : Non détecté

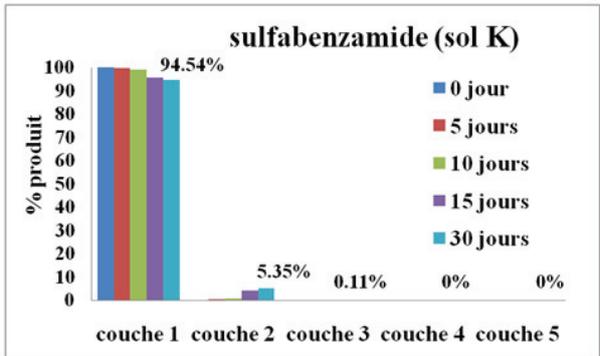
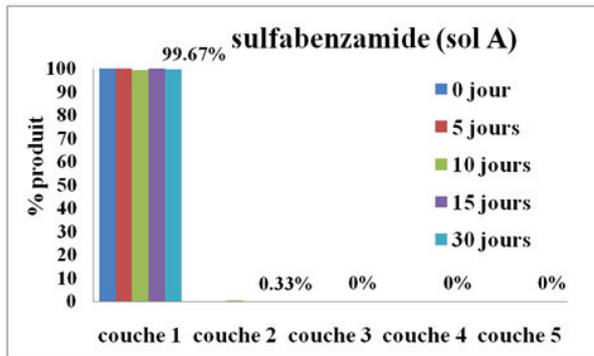
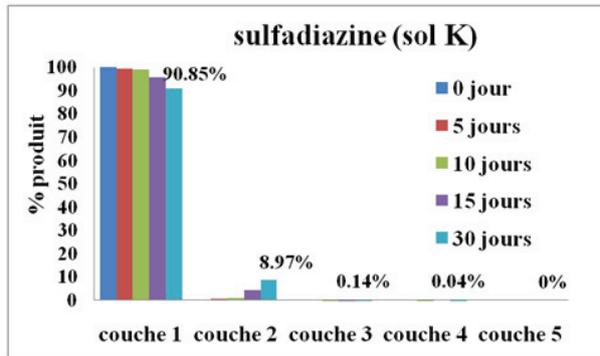
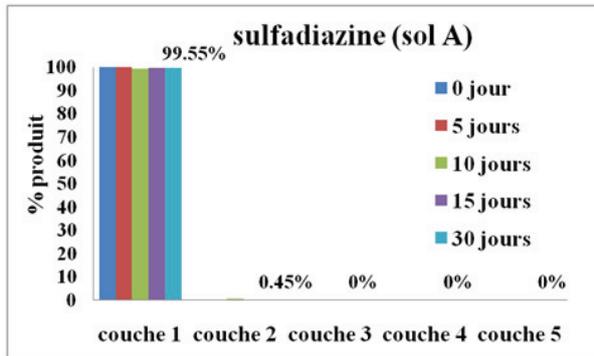
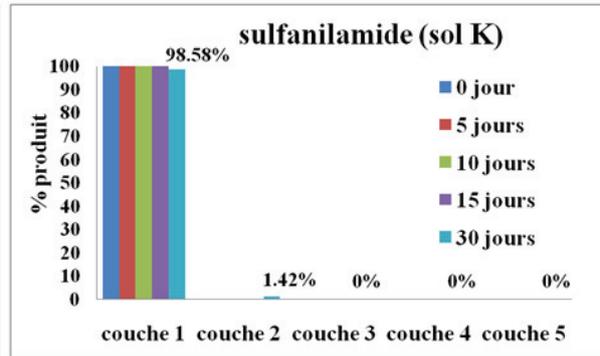
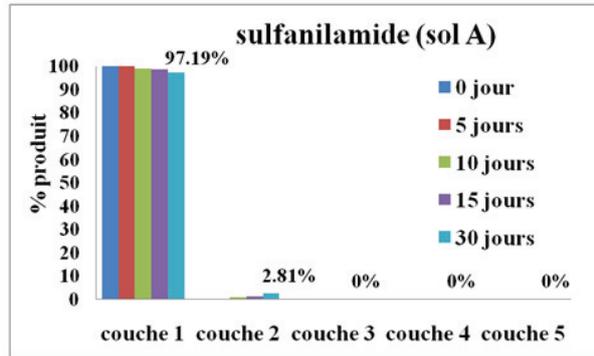
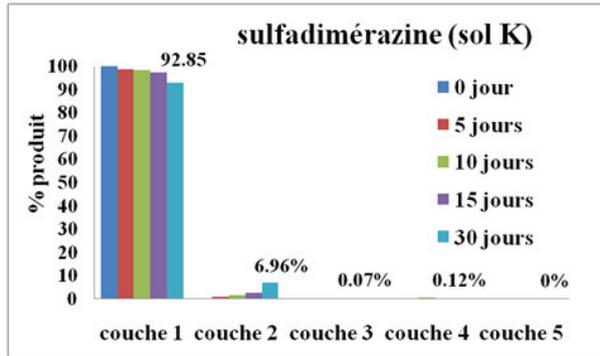
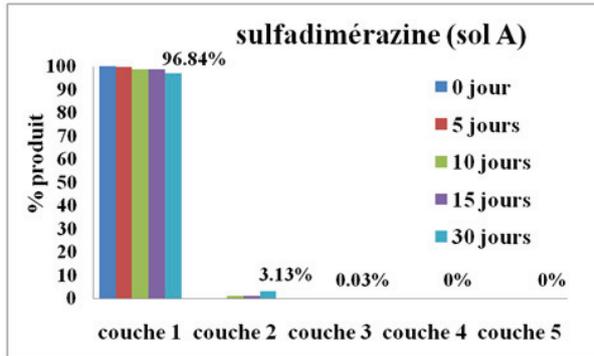
ANNEXE 11 : Transfert des composés étudiés à travers les sols A et K (l'axe des ordonnées correspond au pourcentage de produit présent dans la colonne de sol)

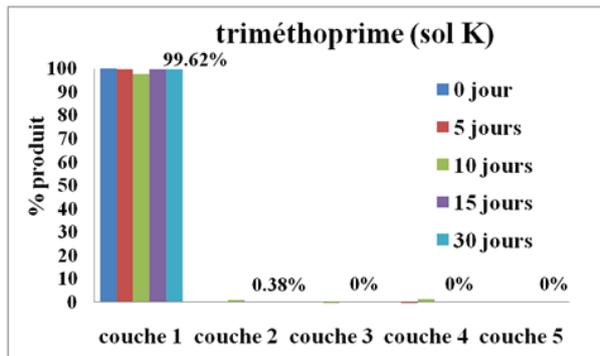
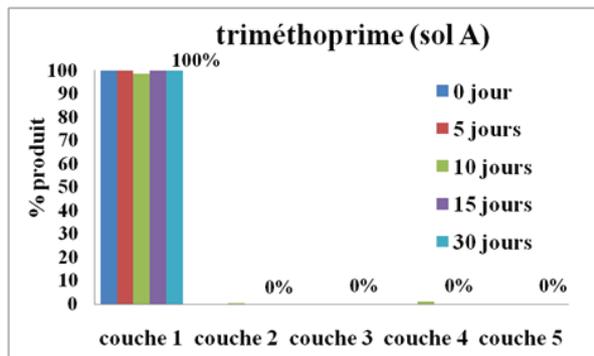
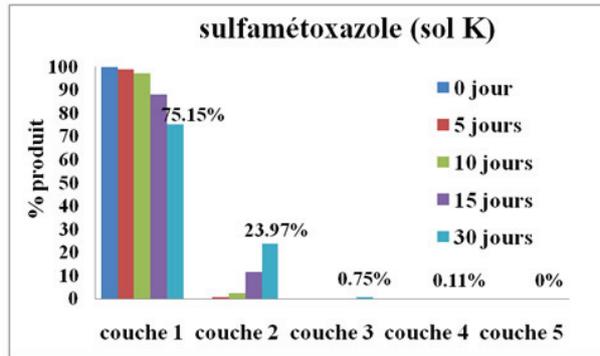
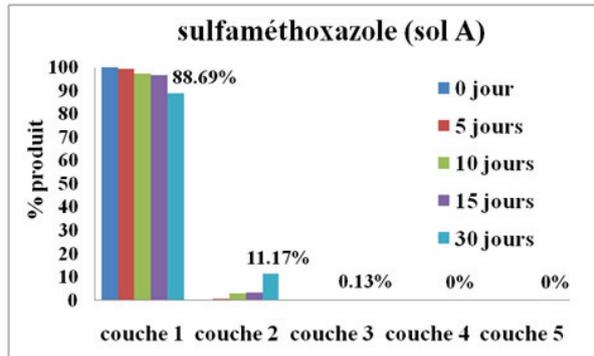
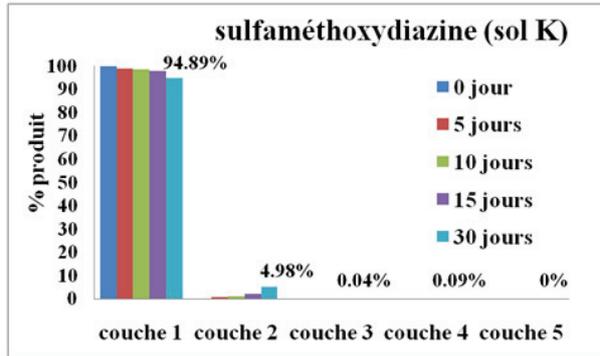
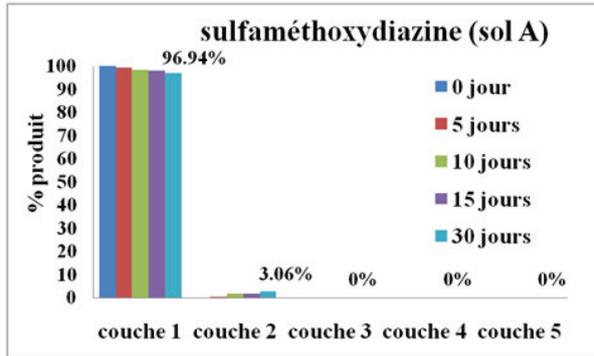
**ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES
(antiparasitaire)**



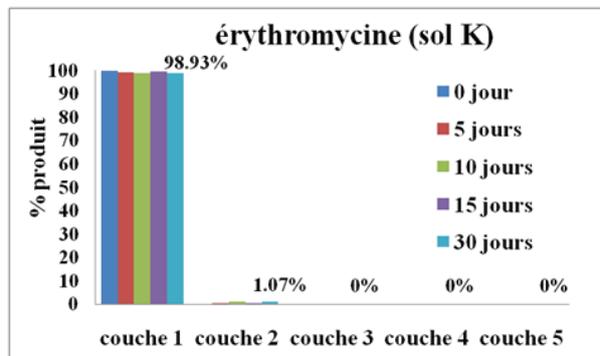
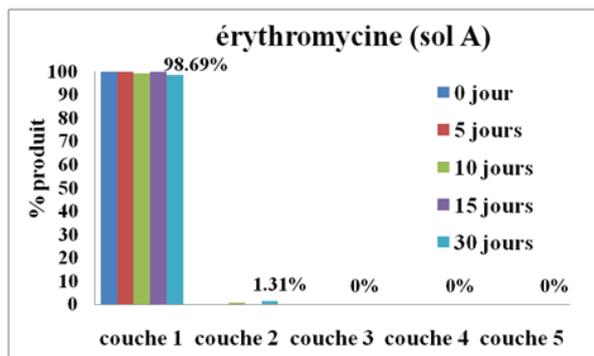
**ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES
(sulfonamides / triméthoprime)**

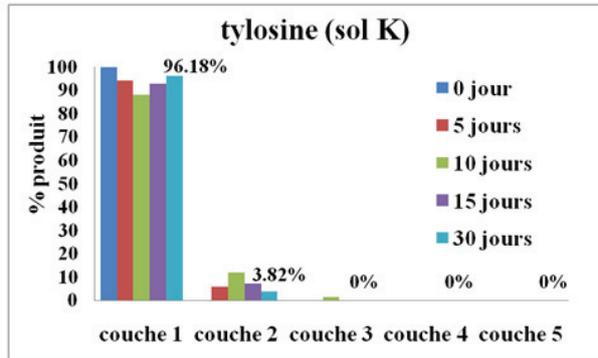
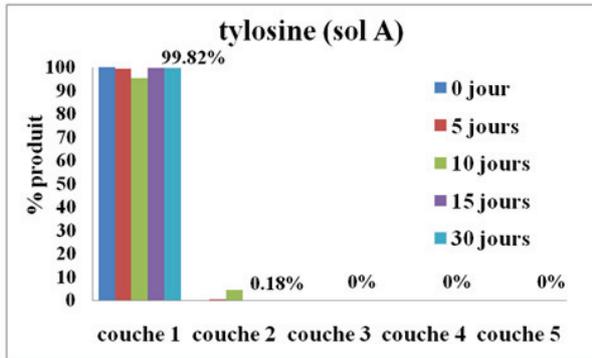
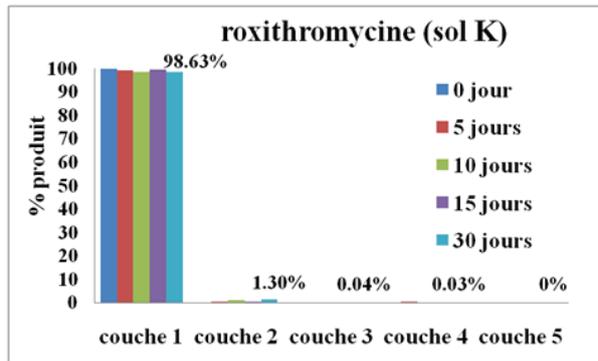
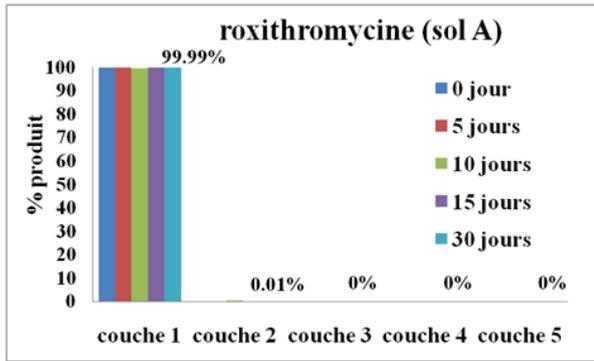




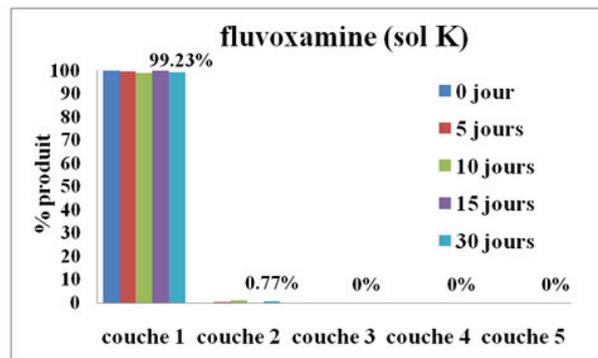
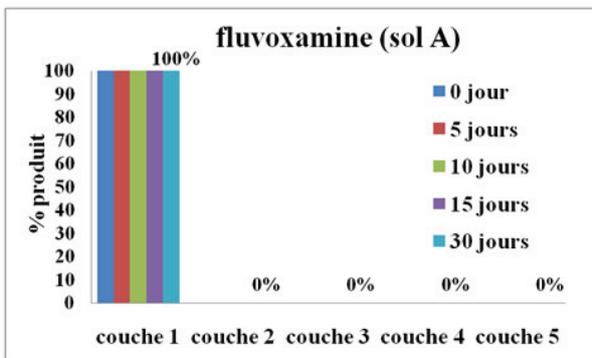
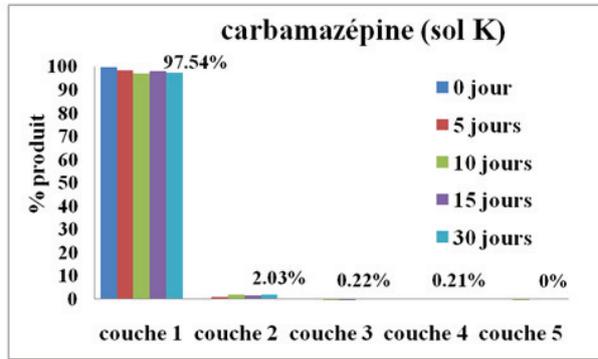
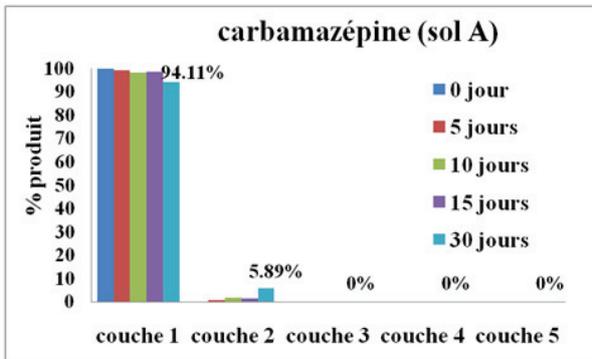


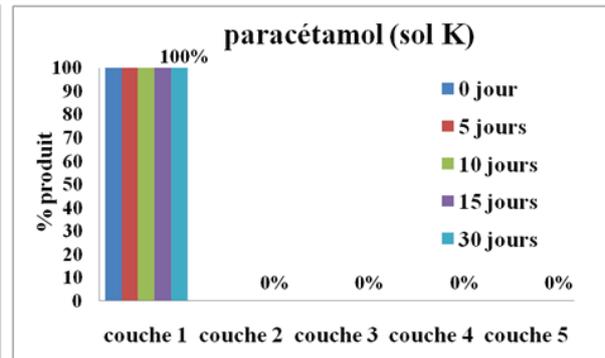
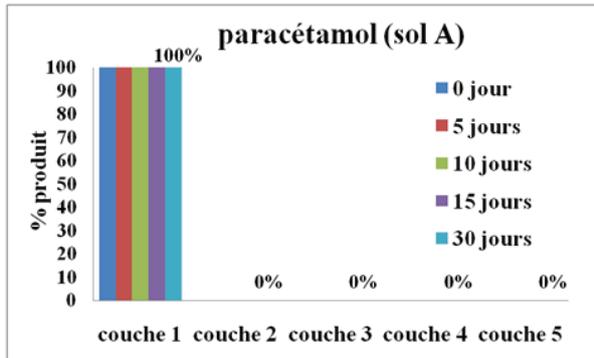
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES (macrolides)



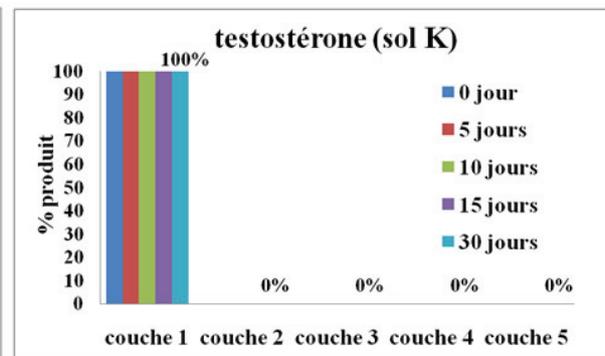
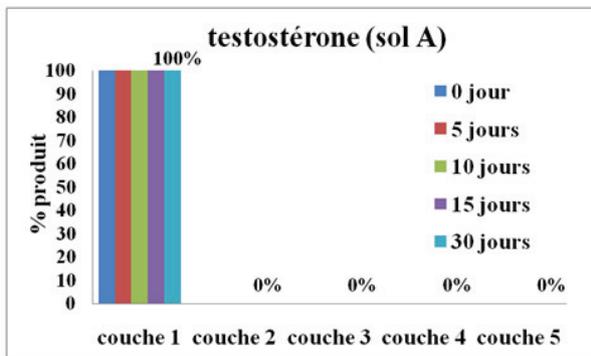
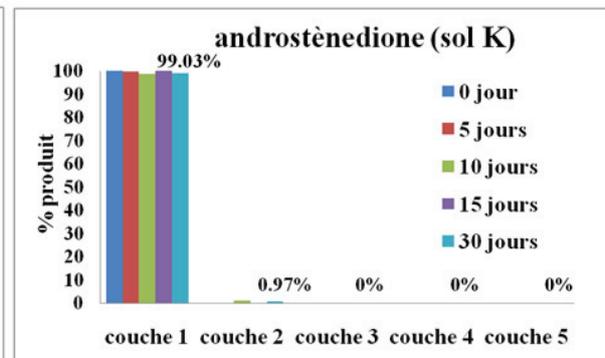
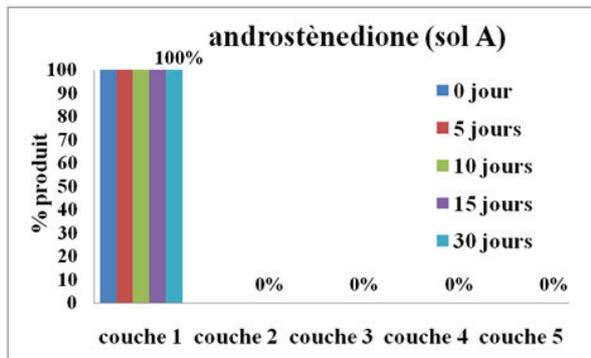


CONTAMINANTS HUMAINS (médicaments)

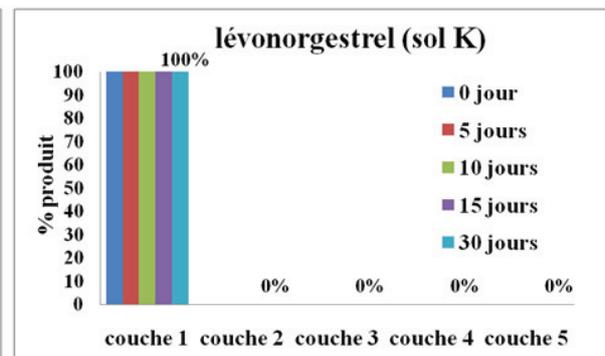
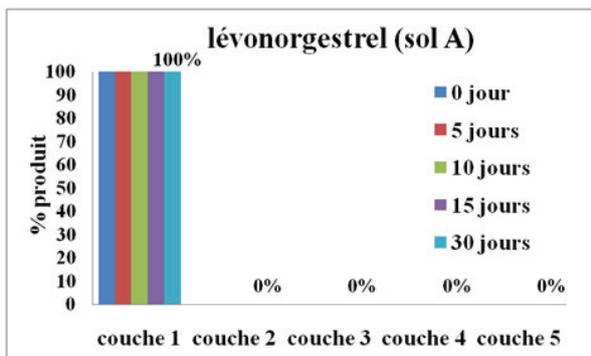


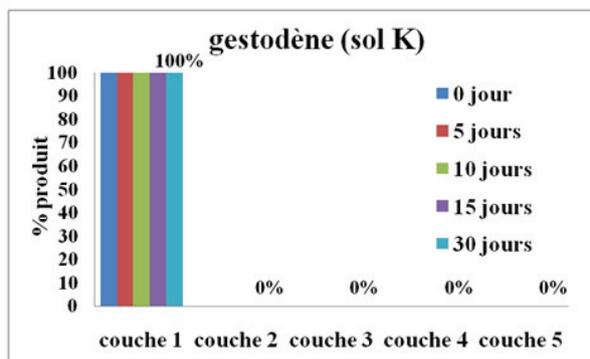
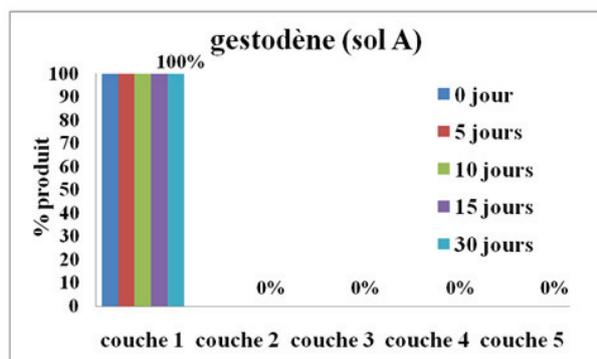
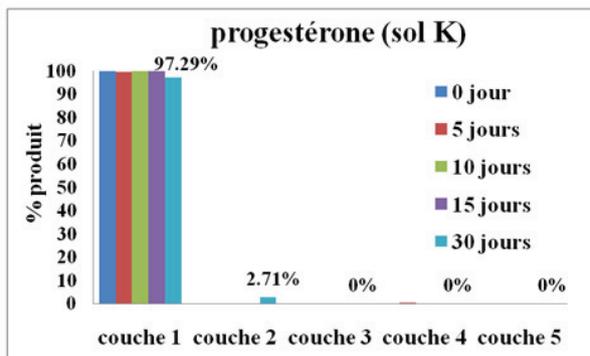
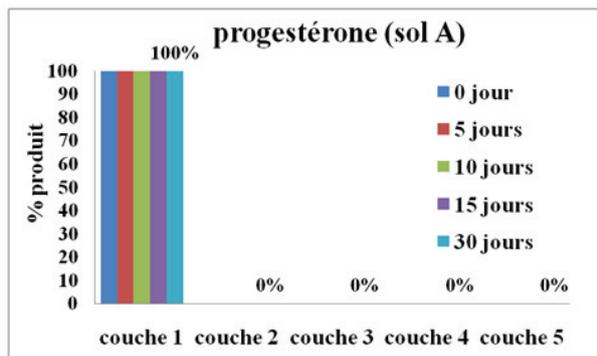
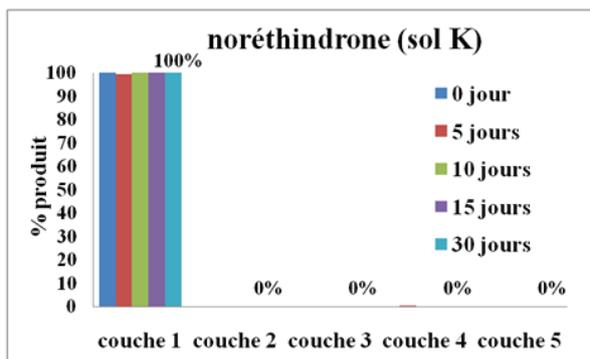
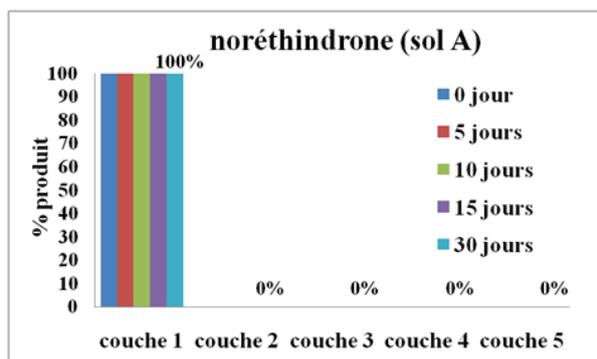


STEROIDES HORMONAUX (androgènes)



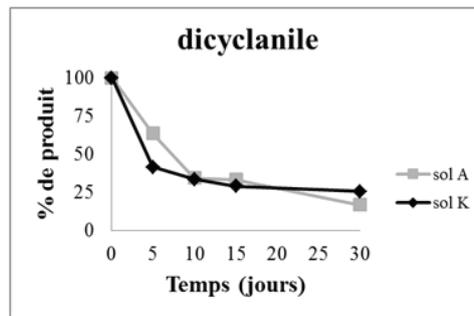
STEROIDES HORMONAUX (progestagènes)



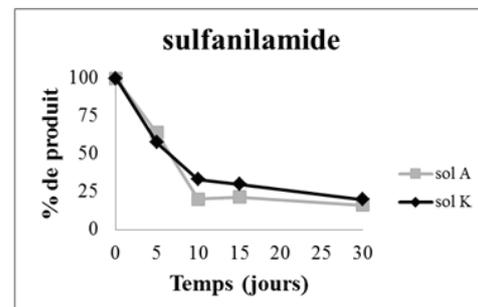
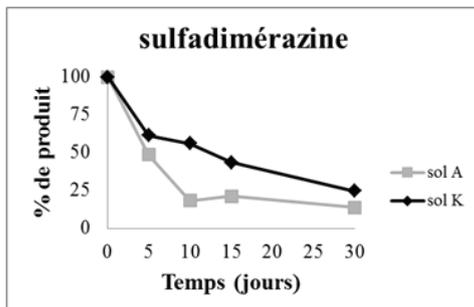
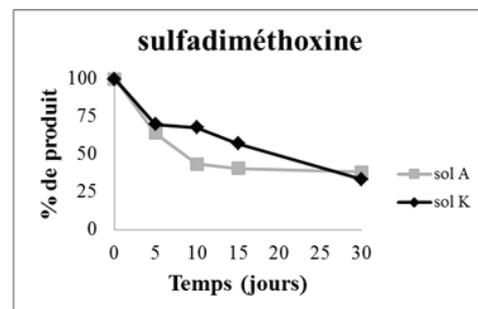
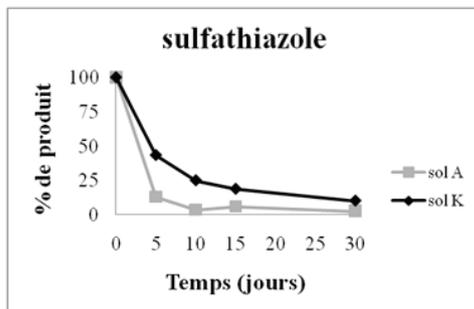


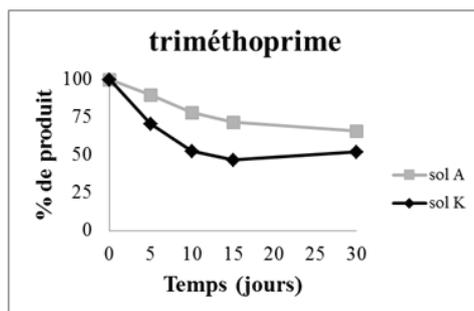
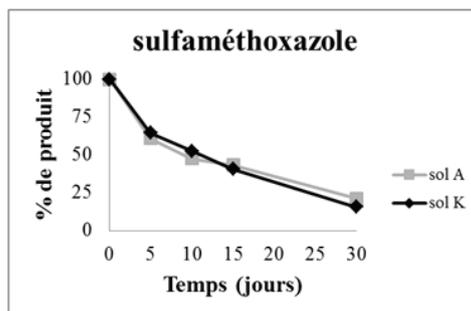
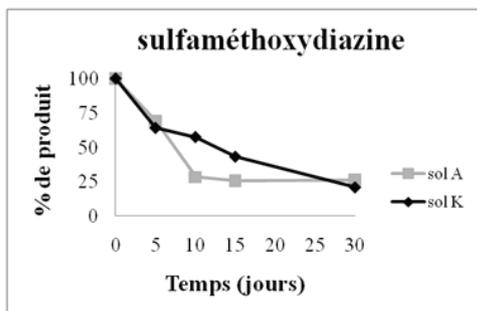
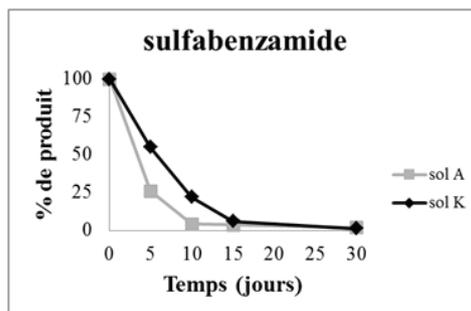
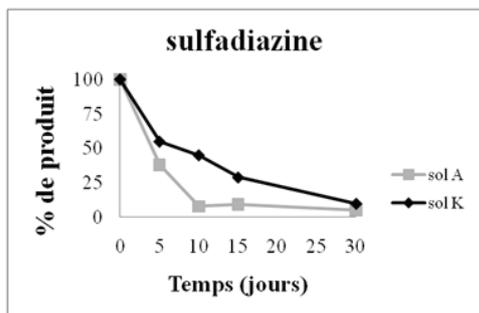
ANNEXE 12 : Dégradation des composés étudiés dans les sols A et K

ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES (antiparasitaire)

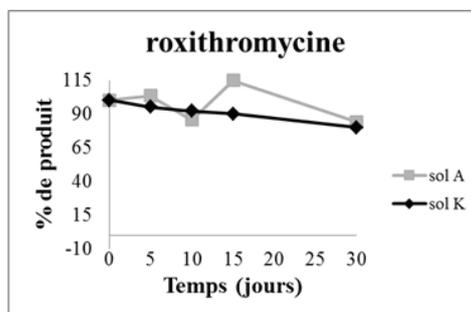
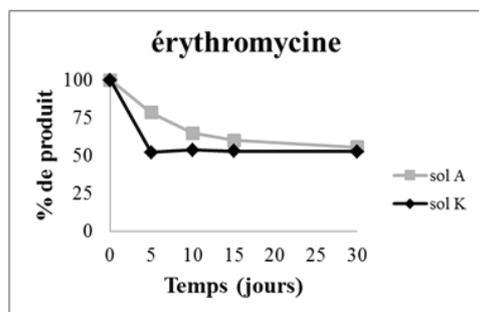


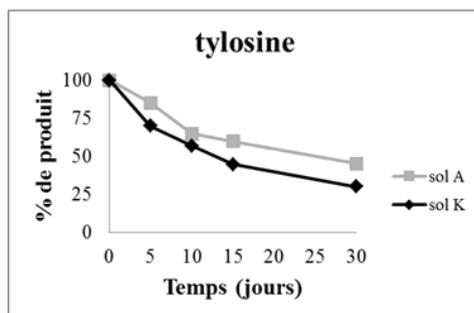
ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES (sulfonamides / triméthoprime)



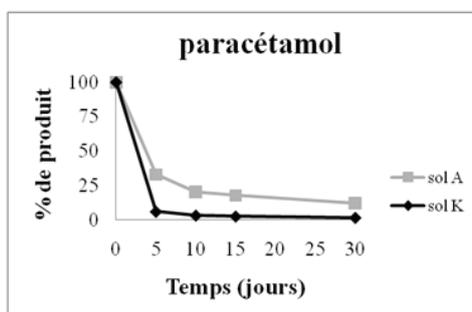
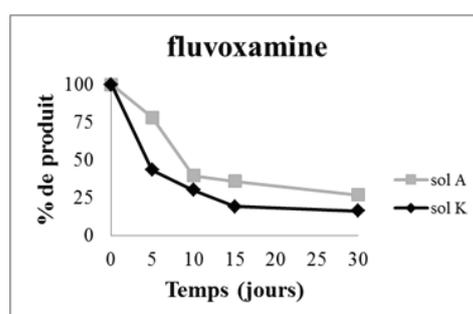
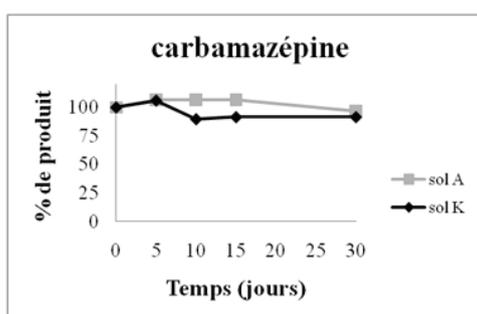


ANTIBIOTIQUES VETERINAIRES (macrolides)

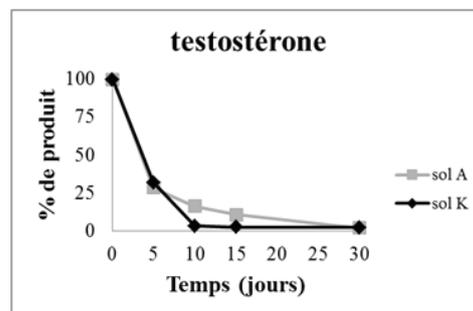
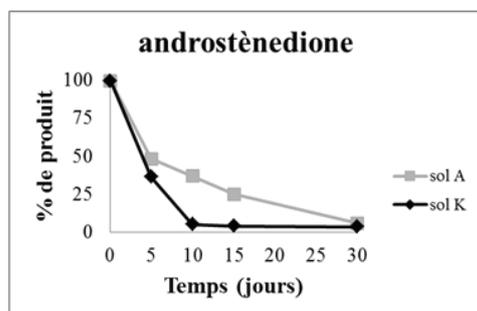




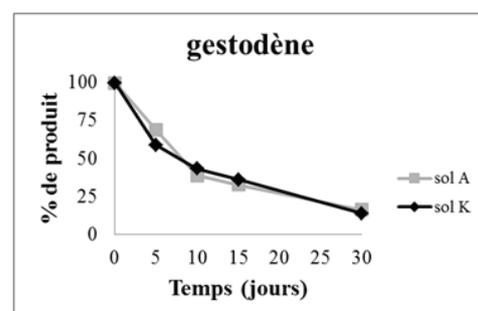
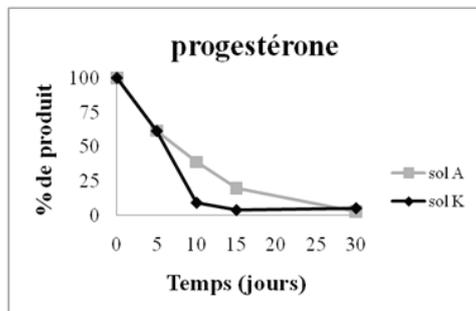
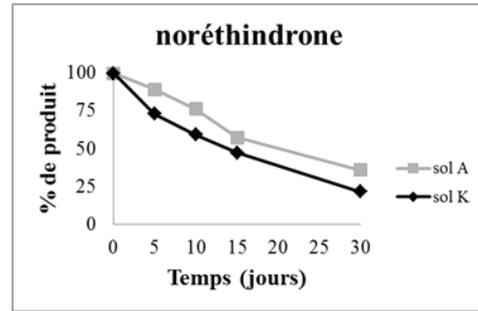
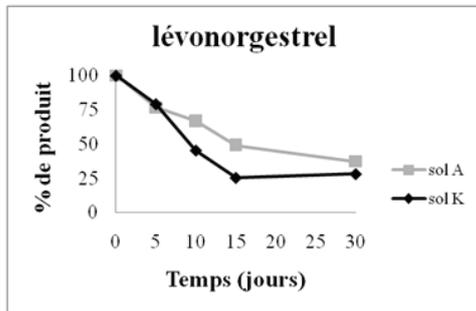
CONTAMINANTS HUMAINS (médicaments)



STEROIDES HORMONAUX (androgènes)



STEROIDES HORMONAUX (progestagènes)





Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil

Marie-Virginie Salvia, Emmanuelle Vulliet*, Laure Wiest, Robert Baudot, Cécile Cren-Olivé

Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, Département Service Central d'Analyse, UMR5280 CNRS, Equipe TRACES, Université Lyon 1, ENS-Lyon, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 February 2012
Received in revised form 7 May 2012
Accepted 8 May 2012
Available online 12 May 2012

Keywords:

Soil
Emerging pollutants
Traces
Sample preparation
SPE
LC–MS/MS

ABSTRACT

The aim of this study was to develop an analytical method for the analysis of traces of hormonal steroids and veterinary and human drugs in soil. Thus, 31 substances were selected, including 14 veterinary products, 11 hormonal steroids and 6 other well-known human contaminant compounds. The procedure inspired by the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction method was developed. First the acetonitrile-based extraction was optimized. This step was followed by a solid-phase extraction (SPE) clean-up using both a strong anion-exchange cartridge and a polymeric cartridge. The analysis was then performed using liquid chromatography coupled to a triple quadrupole analyser operated with tandem mass spectrometry. This analytical procedure was validated using the ICH/2005 standard by evaluating the linearity (from 0.01 ng/g to 1000 ng/g – $R^2 > 0.99$), the intra-day precision (relative standard deviation (RSD) < 20%), the inter-day precision (RSD < 30%), recoveries (40–110% for most of the compounds) and limits of detection and quantification. This method allowed for the determination of the target analytes in the lower ng/g concentration range. The methodology was then applied to real soil samples collected in several areas of France that received different manure or sludge treatments. Some target compounds were detected at very low level (inferior to the ng/g). Veterinary antibiotics, mainly from the sulfonamide family, were found in soils treated by manure (0.02–0.12 ng/g). On the other hand, pharmaceuticals usually used by humans (carbamazepine, ibuprofen) were detected in soils treated by domestic sludge.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Currently, antibiotics are used for the treatment of infections in humans and animals, but are also increasingly used as growth promoters in farm animals. Large proportions of these antibiotics are not used by animals and are excreted unchanged, and consequently, these compounds can enter the environment through the land application of manure [1]. The presence of veterinary or human drugs in the environment can induce pathogen resistance to antibiotics [2]. Steroids are found in the environment due to their use in animals and are also found in human waste. Some steroidal compounds are endocrine disruptors, which can interfere with the endocrine functions of animals or invertebrates and increase the incidence of breast and testicular cancers in humans [3]. Although several analytical methods already exist for the detection of

veterinary antibiotics and steroids in aqueous matrices [4–8], the determination of the levels of these compounds in soils is poorly documented. Their presence and distribution in the soil *via* land application are far from known due primarily to a lack of appropriate methodologies.

Therefore, the development of a sensitive analytical method that allows for the determination of several classes of drugs and steroids at trace levels in the soil is necessary. The most difficult and time consuming task is the sample treatment to extract these substances from complex matrices such as soil. The treatment of the sample combines one or more extractions and purifications. Conventional techniques for the extraction of compounds from solid matrices are based on either mixing the solid with an organic solvent or using a Soxhlet extraction technique, which is still considered as the reference method. Recently, techniques such as pressurised liquid extraction (PLE) [9–15], ultrasound [16–19], microwave [20,21], or supercritical fluid extraction (SFE) [22] have been introduced. After extraction, purification is performed by solid-phase extraction (SPE), liquid–liquid extraction (LLE), gel-permeation chromatography (GPC) or semi-preparative liquid chromatography. SPE is often preferred because it is faster, requires less solvent and has a lower

* Corresponding author. Tel.: +33 4 78 02 22 04; fax: +33 4 78 02 71 87.
E-mail addresses: mv.salvia@sca.cnrs.fr (M.-V. Salvia), e.vulliet@sca.cnrs.fr (E. Vulliet), lwiest@sca.cnrs.fr (L. Wiest), r.baudot@sca.cnrs.fr (R. Baudot), c.cren@sca.cnrs.fr (C. Cren-Olivé).

risk of sample contamination [23]. These techniques allow for high extraction yields.

In 2003, a new extraction procedure called QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) was developed and was first used to extract pesticides from food matrices such as fruits and vegetables [24]. This method is based on a salting-out extraction with a solvent (mainly acetonitrile) followed by a dispersive SPE. Two differing standards exist with regard to the buffer type: the American standard (AOAC), which involves the use of acetate buffer [25], and the European standard EN 15662, which involves the use of citrate [26] buffer. This extraction is simple and rapid and requires low solvent consumption, which, in the era of green chemistry, represents a significant advantage. Therefore, this technology is of great interest because of its favourable toxicological, environmental and economic aspects. This procedure has recently been used for the extraction of various compounds (e.g., veterinary drugs, pesticides, and phenols) in different matrices, such as eggs [27] or soil [28–34]; it has not, however, been applied to the extraction of antibiotics and steroids from soil. Moreover, the different works in which this methodology was used have focused only on the specific analysis of limited chemical families of pollutants. Nevertheless, the use of a multi-residue, inter-family analysis to detect and quantify different chemical families in the same sample is essential.

The compounds separation and detection steps are based primarily on optimisation of the coupling between gas (GC) or liquid (LC) chromatography and mass spectrometry (MS) or tandem mass spectrometry (MS/MS). Because the analysis of non-volatile and thermolabile compounds by GC–MS requires an additional derivatisation step [14,17], and taking into account recent improvements in LC–MS/MS interfaces, the latter technique is more often preferred for the identification and quantification of contaminants [23,35,36,18].

In this context, the objective of this work was to develop an innovative, rapid, robust and sensitive method inspired by QuEChERS extraction for the LC–MS/MS analysis of 11 steroids, 14 veterinary antibiotics and 6 human contaminants in soil. Method limits of quantification (MLQ) in the ng/g range (or even lower) were required. To our knowledge, the development of such multi-residue, inter-family method for soil analyses using acetonitrile-based extraction has never been proposed.

The chosen substances correspond to the major natural steroids present in all vertebrates [34] (androgens, oestrogens and progestogens), as well as to some authorised products for growth control and the production of female cycles. The rare available data on steroid levels in soils have shown contamination up to several hundred ng/kg [37,38]. Thus, the natural androgens androstenedione (AE) and testosterone (T); the natural progestagen progesterone (P); the synthetic progestagens norethindrone (Nore), gestodene (G) and levonorgestrel (Levono); the natural oestrogens oestrilol (E3), oestrone (E1), 17 β -oestradiol and 17 α -oestradiol (E2 and α -E2, respectively); and the synthetic hormone 17 α -ethinyloestradiol (EE2) were selected. Among veterinary products, antibiotics are commonly used in Europe (80% of sales in France), especially those that belong to the sulfonamide, β -lactam and macrolid families [39]. Residual concentrations of antibiotics have been estimated in agricultural soils [40]: the residual concentrations of macrolids, for example, vary from 13 to 67 ng/g. Another study has shown the presence of antibiotics up to 300 ng/g in the first few centimetres of soil after the application of manure [41]. These data justify the selection of these compounds as molecules of interest for this study. As target compounds, the sulfonamides sulfanilamide, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfameter, trimethoprim, sulfadimidine, sulfabenzamide, sulfadimethoxine, the macrolids erythromycin, tylosin and roxithromycin, the β -lactam penicillin G, the antiparasitic dicyclanil and the phenicol florfenicol were selected. To this list were added

substances that are considered markers of human and industrial contamination that are found ubiquitously in the environment [42,43]. Most of the selected compounds are medicines (paracetamol, sulfamethoxazole, fluvoxamine, carbamazepine, ibuprofen); another well-known compound, bisphenol A, was included as a pollution tag.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Vetranal (V) or Pestanal (P) analytical standards were used in addition to others that meet United States Pharmacopeia testing specifications (USP). Sulfanilamide (V), sulfadiazine (V), sulfathiazole (99%), sulfameter (V), trimethoprim (V), sulfadimidine (V), sulfabenzamide, sulfadimethoxine, dicyclanil (V), erythromycin (USP), tylosin tartrate (V), roxithromycin (>90%), penicillin G potassium salt (V), florfenicol, AE (V), T (V), Nore (V), Levono (99%), P (>99%), E3 (V), E2 (>98%), α -E2 (V), EE2 (V), E1 (>99%), paracetamol (99%), sulfamethoxazole, fluvoxamine, carbamazepine (USP), ibuprofen (V) and bisphenol A (99%) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). The steroid G (98%) was purchased from AK Scientific (California, USA).

Individual stock solutions were prepared at concentrations of 200 mg/L in methanol (MeOH) and stored at -23°C . Working solutions were prepared by the adequate mixture and dilution of the stock solutions.

MeOH, acetonitrile (ACN) (LC–MS grade), heptane, acetone, ethyl acetate and dichloromethane (HPLC grade) were obtained from Sigma–Aldrich. Pure water was obtained from a MilliQ device from Millipore (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Formic acid (98%, LC–MS grade), acetic acid (LC–MS grade), ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ammonium hydroxide solution (NH_3 , aq; 25% in water) and citric acid monohydrate were purchased from Sigma–Aldrich. Phosphoric acid (min 85%) and sodium hydroxide were purchased from Prolabo (Paris, France). Acetic acid, sodium salt anhydrous was acquired from Arcos (Geel, Belgium).

QuEChERS extract tubes (AOAC and EN methods) were obtained from Agilent Technologies (Massy, France). The acetate buffer contained 1.5 g of NaOAc and 6 g of MgSO_4 (pH=4.8), whereas the citrate buffer contained 1 g of NaOCitrate, 4 g of MgSO_4 , 1 g of NaCl and 0.5 g of disodium citrate sesquihydrate (pH=5–5.5).

Dispersive SPE PSA (primary and secondary amine exchange, which contained 900 mg of MgSO_4 and 150 mg of CUPSA) and PSA C18 (which contained 900 mg of MgSO_4 , 150 mg of CUPSA and 150 mg of CEC18) were obtained from Carlo Erba–SDS (Val de Reuil, France). The Florisil phase was purchased from SDS (Peypin, France), SampliQ Silica SAX SPE was purchased from Agilent Technologies, and the aluminium oxide phase and anhydrous magnesium sulfate were obtained from Sigma–Aldrich. Solid-phase extractions were performed using SiOH Backerbond (500 mg, 3 mL) cartridges from JT Baker (Paris, France), Agilent Technologies SAX (500 mg, 3 mL) cartridges and Phenomenex (Le Pecq, France) Strata-X (200 mg, 3 mL) cartridges.

2.2. Soil samples

For optimisation of the method, a clay-loam soil that was not treated with manure or sludge was collected. It contained 32.4% clay, 45.1% loam, 22.5% sand and 2.99% organic matter.

For the application of the method to real samples, five soils (A, B, C, D and E) were collected in amber glass bottles from March to July 2010 in several areas of France (Loire, Haute-Savoie) at a depth

of 10 cm; the samples were stored at $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to analysis. Soils A, B, and C were treated with three different cow manures on 15 April 2010, 20 April 2010 and 11 June 2010, respectively. They were collected on 13 July 2010. Moreover, soil B was collected on 19 May 2010. Soil D was treated with pig manure on 20 January 2010, and soil E was contaminated with sludge at the end of February, 2010. Both soils D and E were collected on 31 March 2010.

Soil samples were dried at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ in an oven (Etuve Kottermann 2771) and passed through a 3-mm sieve to remove coarse particles. They were subsequently ground in a mortar and passed through a 0.63 mm sieve to obtain a homogeneous sample.

For development of the method, a sieved soil sample (5 g) was introduced into a 50 mL polypropylene extract tube and spiked at 50 ng/g by the addition of 2 mL of a MeOH solution that contained the 31 substances. The tube was then shaken on a vortex mixer (IKA VORTEX Genius 3) to achieve homogeneity. Finally, the tube was left overnight under a nitrogen stream to evaporate the solvent (Liebisch LABORTECHNIK).

2.3. Acetonitrile-based extraction step

Ten millilitres of MilliQ water and 15 mL of ACN were added to the tube that contained the spiked soil, and the tube was shaken with a vortex device (Vortex Fischer Scientific FB15013 TopMix). Acetate buffer was then added, and the tube was immediately manually shaken for 30 s and swirled on a vortex mixer for 30 s. The tube was then shaken for 3 min at 750 rpm in a sample homogeniser (SPEX Sample Prep, 2010 GenoGrinder, Delta Labo, Avignon, France). After centrifugation at 5000 rpm for 2 min (Sigma Laboratory Centrifuges 3K30H, Fisher Bioblock Scientific), 10 mL of the ACN layer was transferred into a 12 mL glass tube. The extract was then evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at a temperature of $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.4. SPE clean-up

After the extraction, a two-step clean-up was performed using SPE (Rapid Trace SPE Workstation, Caliper). First, after pre-conditioning the SAX cartridge with MeOH and a conditioning buffer (0.04 M citric acid), 10 mL extract (dissolved in 97/3 citric acid (0.04 M)/MeOH, pH = 2.5) was passed through the cartridge at a flow rate of 1 mL/min and recovered in a tube. Second, a Strata-X cartridge was also conditioned with both MeOH and 0.04 M citric acid, and then the recovered extract was passed through the cartridge at 1 mL/min. The strata-X cartridge was subsequently washed with 2 mL of 0.04 M citric acid and 2 mL of 0.1 M NaOAc. The cartridge was then dried for 30 min under a stream of nitrogen and eluted with 10 mL of MeOH at a flow rate of 1 mL/min. Finally, the extract was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen at a temperature of $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

The dry residue was dissolved in 200 μL of 95/5 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ and mixed for 20 s prior to LC-MS/MS analysis. All of the extractions were performed in duplicate.

2.5. Analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Liquid chromatography was performed on a HP1100 HPLC system (Agilent Technologies) equipped with a degasser, a binary pump, an autosampler and a column oven.

The positively ionised compounds were analysed with a Zorbax Eclipse PLUS C18 (50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm , Agilent Technologies) column and a pre-column (Phenomenex, AF0-8497). The mobile phases were (A) 0.01% formic acid in MilliQ water (pH = 3.3) and (B) MeOH with the following gradient: from 0% to 10% (B) in 2 min; 10% (B) for 2 min; from 10% to 20% (B) in 3 min; from 20% to 29% (B) in

1.80 min; 29% (B) for 0.40 min; and from 29% to 100% (B) in 5.80 min. Chromatographic separation of the negatively ionised compounds was performed with a Zorbax Eclipse XDB C18 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm , Agilent Technologies) column and the same pre-column used for the positive mode. The mobile phases were (A) MilliQ water and (B) 50/50 ACN/MeOH with the following gradient: from 5% to 20% (B) in 1.5 min; from 20% to 46% (B) in 1.5 min; 46% (B) for 2.40 min; from 46% to 80% (B) in 11.40 min; and from 80% to 100% (B) in 0.60 min. For both separations, the column oven temperature was $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, the flow-rate was 0.3 mL/min, and the injection volume was 25 μL .

The LC system was coupled to a triple-stage quadrupole mass spectrometer (3200 QTrap, ABSciex) with an electrospray ion (ESI) source (TurboV, ABSciex). Nitrogen was used as the nebuliser gas. The MS/MS settings and the parameters of the ESI source were optimised by manual infusion with a syringe pump and by the flow injection of standards. The MS/MS conditions and source parameters are summarised in Tables 1 and 2, respectively.

2.6. Data analysis

The analytes were identified by both their chromatographic characteristics and their multiple reaction monitoring (MRM) specific fragmentation. Indeed, we compared the specific retention times of the analytes, two of their characteristic ion transitions and the specific ratios of the intensities of their product ions (deviation $< 20\%$ with respect to analytical standards ratios [44–49]) with standards. Data processing was performed with the software Analyst (version 1.5.1).

Analytes in the various soils were quantified using the standard-addition method. The range of spiking concentrations, that comprised 10 points, was performed from 0.005 to 5 ng/g.

2.7. Validation of the method

The performance of the method was evaluated based on the ICH/2005 standard [50].

Linearity was evaluated by analysing spiked samples over a range of concentrations from 0.01 ng/g to 1000 ng/g. The linearity was evaluated in triplicate on three days for each compound.

Intra-day precision was evaluated for three concentrations (low, 1.5 ng/g; medium, 50 ng/g; and high, 500 ng/g), in 5 replicates for each concentration. Inter-day precision was tested for the same three concentrations on three days. The intra-day and inter-day precisions were evaluated by calculating the relative standard deviation (RSD, %) for the different concentrations.

Recoveries were determined by analysis of soil samples spiked at the different concentrations and comparison of the results to those of soil extracts spiked after the sample preparation.

The MLD was determined as the analyte concentration that produced a peak signal of 3 times the background noise from the chromatogram. The MLQ was determined as the analyte concentration that produced a peak signal of 10 times the background noise from the chromatogram regarding the most intense ion transition for quantification and the ion transition ratio used for confirmation.

3. Results and discussion

3.1. Development of the acetonitrile-based extraction

The analysis of complex matrices such as soil requires rigorous sample preparation to obtain a repeatable and sufficiently sensitive analysis to achieve the detection limits required (in the ng/g range). Because the 31 studied molecules exhibit different characteristics and physical/chemical properties, the optimisation of this stage was delicate. The extraction method is based on a liquid–liquid

Table 1

Retention time (t_R), precursor and product ions, collision energy (CE), declustering potential (DP), instrumental limit of detection and quantification (ILOD and ILOQ) of the target compounds, ionized in positive (ESI+) or negative (ESI-) mode.

Compounds	t_R (min)	Precursor ion > product ion (CE (eV))	DP (V)	ILOD ($\mu\text{g/L}$)	ILOQ ($\mu\text{g/L}$)
Veterinary antibiotics					
Sulfonamides (ESI+)					
Sulfanilamide	1.04 (1)	173 > 156 (11) and 173 > 92 (23)	16	0.18	0.58
Sulfadiazine	5.80 (4)	251 > 156 (19) and 251 > 92 (35)	36	0.007	0.022
Sulfathiazole	7.91 (5)	256 > 156 (19) and 256 > 92 (35)	36	0.005	0.017
Sulfamer	11.53 (6)	281 > 92 (39) and 281 > 156 (23)	41	0.011	0.036
Trimethoprim	11.65 (7)	291 > 230 (31) and 291 > 261 (37)	46	0.006	0.021
Sulfadimidine	12.30 (8)	279 > 92 (43) and 279 > 124 (33)	41	0.005	0.017
Sulfabenzamide	13.91 (10)	277 > 156 (17) and 277 > 92 (37)	31	0.009	0.029
Sulfadimethoxine	15.11 (11)	311 > 156 (27) and 311 > 92 (45)	46	0.005	0.016
Antiparasitic (ESI+)					
Dicyclanil	5.13 (3)	191 > 150 (27) and 191 > 109 (33)	46	0.17	0.31
Macrolids (ESI+)					
Erythromycin	16.17 (13)	734 > 158 (47) and 734 > 83 (73)	46	0.033	0.18
Tylosin	16.24 (15)	916 > 174 (49) and 916 > 101 (67)	86	0.79	1.27
Roxithromycin	16.62 (17)	837 > 679 (29) and 837 > 158 (43)	56	0.49	0.61
β-Lactam (ESI+)					
Penicillin G	16.14 (12)	335 > 217 (19) and 335 > 91 (59)	71	0.036	0.12
Phenicol (ESI-)					
Florfenicol	8.81 (1')	356 > 336 (-22) and 356 > 185 (-12)	-25	0.049	0.16
Hormonal steroids					
Progestagens (ESI+)					
Nore	17.05 (18)	299 > 109 (33) and 299 > 91 (57)	51	0.017	0.058
G	17.09 (20)	311 > 109 (35) and 311 > 91 (63)	46	0.031	0.14
Levono	17.37 (22)	313 > 91 (67) and 313 > 109 (39)	56	0.40	0.97
P	17.76 (23)	315 > 97 (31) and 315 > 109 (31)	66	0.025	0.082
Androgens (ESI+)					
AE	17.07 (19)	287 > 97 (27) and 287 > 109 (29)	51	0.037	0.068
T	17.22 (21)	289 > 97 (31) and 289 > 109 (35)	46	0.046	0.091
Oestrogens (ESI-)					
E3	10.54 (2')	287 > 145 (-52) and 287 > 171 (-50)	-85	0.14	0.46
E2	15.23 (4')	271 > 145 (-54) and 271 > 183 (-52)	-70	0.37	1.23
α -E2	15.82 (5')	271 > 145 (-52) and 271 > 143 (-66)	-90	0.14	0.48
EE2	15.83 (6')	295 > 145 (-56) and 295 > 143 (-58)	-75	1.07	3.57
E1	15.97 (7')	269 > 145 (-50) and 269 > 143 (-78)	-65	0.044	0.15
Human contaminants					
Human drugs					
Paracetamol (ESI+)	4.15 (2)	152 > 110 (23) and 152 > 93 (31)	36	0.052	0.17
Sulfamethoxazole (ESI+)	12.67 (9)	254 > 156 (31) and 254 > 92 (37)	36	0.008	0.026
Fluvoxamine (ESI+)	16.20 (14)	319 > 71 (29) and 319 > 258 (15)	31	0.31	0.59
Carbamazepine (ESI+)	16.34 (16)	237 > 194 (27) and 237 > 165 (53)	41	0.006	0.026
Ibuprofen (ESI-)	18.41 (8')	205 > 161 (-8) and 205 > 159 (-6)	-20	0.36	1.21
Plasticizer (ESI-)					
Bisphenol A	14.24 (3')	227 > 133 (-36) and 227 > 117 (-58)	-40	0.015	0.050

extraction principle. An organic solvent allows the extraction of the analytes from the matrix, and the addition of a buffer permits a separation of phases. An additional purification step by dispersive SPE can also be performed. This supplementary stage allows for the removal of matrix interferents and excess water but can also cause analytes loss. Therefore, this step is sometimes omitted. To determine the best extraction step, several parameters were studied: the choice of the buffer, the nature of the solvent, and the volumes of MilliQ water and solvent.

The efficiency obtained with the two buffers recommended in the European [26] and the American [25] standards were compared. For that, the extraction was performed with 10 mL of water and 10 mL of ACN. For most of the compounds, the acetate-based method resulted in better recoveries than those obtained with the citrate-based method in particularly for veterinary antibiotics such as sulfonamides (recoveries from 1.5 to 2 times better with the acetate buffer), macrolids (from 1.5 to 4 times better) and β -lactams (2 times better). Therefore, the acetate-based method was chosen for the extraction. This buffer has already been used to extract organochlorine pesticides in soil [28] and was determined to be the best for the extraction of chlorophenols, alkylphenols, nitrophenols and cresol in agricultural soils [29].

ACN was the first solvent used for QuEChERS extraction by Anastasiades et al. in 2003 [24]. ACN [34], ACN with 1% acetic acid [25,28,29], ACN with 1% ammonia or ACN with phosphoric acid are often used to extract antibiotics from solid matrices [10,51,52]. For the development of our method, all of these solvents were tested. In addition, ACN with acetic acid [27,28] and with phosphoric acid were also tested by replacing the 10 mL of water with a solution of 0.1 M Na_2EDTA . The EDTA was added to facilitate the extraction of bound compounds by avoiding the complexation of these analytes with cations such as Mg^{2+} or Ca^{2+} [53]. MeOH-based solvents were also tested; however, viscous extracts were obtained after evaporation, which might be due to a reaction between the salts and MeOH. This solvent was therefore abandoned. Among the

Table 2
Source parameters in positive and negative modes.

	ESI (+)	ESI (-)
Ion source gas 1 nebulizer (psi)	45	40
Ion source gas 2 turbo gas (psi)	55	50
Ion spray voltage (V)	5500	-4500
T ($^{\circ}\text{C}$)	600	500

various tests performed, two of the solvents, acidified ACN combined with the Na₂EDTA and 100% ACN, allowed for high recoveries. Finally, 100% ACN was chosen as the organic solvent for the extraction because the presence of EDTA reduced the effectiveness of the purification step (see Section 3.2.2).

Several volumes of ACN (10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL and 30 mL) were subsequently tested. The results indicated that the volume of 15 mL gave higher recoveries than the volume of 10 mL, especially for estrogens (recoveries about 1.5 times higher). On the other hand, the volumes 20 mL, 25 mL or 30 mL did not increase the recoveries, compared to 15 mL. Therefore, to get the best recoveries while minimising the consumption of solvent, a volume of 15 mL of ACN was chosen.

Ten millilitres of the supernatant were then evaporated to dryness and dissolved in 200 µL of various solutions with compositions that ranged from 100% H₂O to 75/25 H₂O/MeOH. The results indicated that the presence of MeOH was necessary to permit good solubilisation of all of the target compounds. However, the presence of an organic solvent in the final extract affected the chromatographic separation, particularly for the compounds detected in the positive ionisation mode. The best compromise was 95/5 H₂O/MeOH.

3.2. Optimisation of the SPE clean-up

Because the solid matrix is complex, a purification step was necessary to limit the presence of interfering substances. Matrix effects are common in reports on the analysis of soil. Indeed, residual components of the matrix can promote either ion suppression or improvement of the analyte in the electrospray interface, which causes errors that lead to inaccurate results. To evaluate this matrix effect, soil extracts were spiked at 17 µg/L with a methanol solution containing the 31 substances, and the signals (S_{matrix}) were compared with those of the standards (S_{solvent}) with the same concentrations. The matrix effect was determined with the following equation:

$$\text{matrix effect (\%)} = \left(\frac{S_{\text{matrix}} - S_{\text{blank}}}{S_{\text{solvent}}} - 1 \right) \times 100,$$

where S_{blank} corresponds to the signal of the non-spiked extract of soil.

Therefore, several extraction steps were tested by evaluation of both the recovery of the target compounds and the diminution of the matrix effect.

3.2.1. Dispersive SPE tests

Our first attempts focused on dispersive SPE (d-SPE) for the development of an easy and rapid protocol for sample preparation. The extract recovered after the extraction was placed into a tube that contained a sorbent for purification and MgSO₄ to eliminate the excess water. Several sorbents were tested: PSA, PSA C18, Florisil, silica, aluminium oxide and SAX.

The PSA sorbent caused the loss of several compounds, particularly the sulfonamides and the hormonal steroids; this sorbent was consequently abandoned. With the silica, aluminium oxide and SAX, matrix effects remained relatively high for most of the compounds. Finally, the Florisil and PSA C18 sorbents reduced the matrix effects of some products, but most of the steroids still exhibited high signal suppressions: from 50% to 80% and from 57% to 85% with Florisil and PSA C18, respectively. To illustrate these results, Fig. 1 shows the trend of the matrix effects for the different sorbents tested for 10 compounds, including 4 veterinary antibiotics (sulfathiazole, sulfameter, sulfadimethoxine, and erythromycin), 4 hormonal steroids (G, P, AE, EE2) and 2 human contaminants (sulfamethoxazole, fluvoxamine).

Consequently, additional tests were performed with the Florisil-based sorbent. Because the efficiency of the Florisil clean-up increased with low-polarity solvents, the extract was evaporated to dryness and dissolved in various solvent before the purification mixture (Florisil + MgSO₄) was added: heptane, acetone, ethyl acetate, dichloromethane, MeOH, acetone/heptane (50/50), ethyl acetate/heptane (50/50), dichloromethane/heptane (50/50), dichloromethane/acetone (50/50), dichloromethane/MeOH (50/50), acetone/MeOH (50/50) or ethyl acetate/ACN (50/50). For most of the tested solvents, recoveries were low (<40% for most of the analytes), most likely due to a lack of solubility of the analytes in these solvents. Nevertheless, MeOH, dichloromethane/MeOH (50/50), acetone/MeOH (50/50) and ethyl acetate/ACN (50/50) showed relatively good recoveries (>60%). However, matrix effects were still greater than 80%, particularly for hormonal steroids.

Because the different d-SPE tests were inconclusive, purifications using cartridges and off-line SPE were evaluated.

3.2.2. SPE tests

A method based on SiOH cartridges, which have already been used for the purification of sludges [54], was tested. The ACN extract was evaporated to dryness and then dissolved in heptane/acetone (30/70). The cartridge was first conditioned with heptane and heptane/acetone (30/70). The extract was then passed through the cartridge and directly recovered in a tube. This methodology gave good recoveries (>60% for most of the substances) but strong matrix effects persisted (>70%); therefore, this procedure was not retained.

Another method was tested that consisted of a tandem SPE clean-up using both a SAX and a Strata-X cartridge, which have previously been used for solid matrices [9,11,16,55–58]. The SAX cartridge permits the removal of the matrix interferences such as humic and fulvic acids, while the Strata-X allows the target compounds to be retained. First, the extract was dissolved in 97/3 citric acid (0.04 M)/MeOH. The presence of MeOH resulted in better solubilisation of the target compounds; however, a percentage greater than 5% was detrimental to the recovery of the analytes. The best compromise was 3% MeOH. Various pH conditions were tested (pH=2.5, 4.3 and 7) by adjustment with 10 M NaOH. In the case of pH=7, the recoveries were greater than 70%, but matrix effects were still high (>45–50% for most of the substances and >60% for most of the steroids); therefore, this pH was not adopted. By contrast, recoveries were higher at pH=2.5 than at pH=4.3. Moreover, the use of pH=2.5 resulted in reasonable matrix effects (<40%, except for some steroids that exhibited matrix effects of approximately 50%); thus, a pH of 2.5 was adopted. Other authors have shown that pH levels less than 3 gave good recoveries for sulfonamides [58]. The pH range of 2–3 has typically been used when a SAX cartridge was employed to remove most of the interferences from soils [59]. At this pH, all the target compounds are either neutral or positively charged and are therefore not retained by the SAX cartridge. However, the humic and fulvic substances that possess carboxylic acid and phenolic hydroxyl functional groups are negatively ionised and are therefore retained by the SAX cartridge. Indeed, the carboxylic acids are sufficiently acidic to remain mostly deprotonated when dissolved in water [60].

Finally, two drying times for the Strata-X cartridge were tested: 15 min and 30 min. No changes were observed among the drug compounds; however, a drying time of 30 min increased the recoveries of the hormonal steroids. Thus, this drying time was retained.

Fig. 2 shows the recoveries of the target compounds. For an initial concentration of 50 ng/g. Results indicate that most of the sulfonamide antibiotics exhibited recoveries between 65% and 75%, which is in accordance with the values found in the literature [9]. The antiparasitic and the phenolic antibiotics displayed recoveries of approximately 80% and the recoveries of hormonal steroids were in the 60–90% range. By contrast, macrolids and β-lactams showed

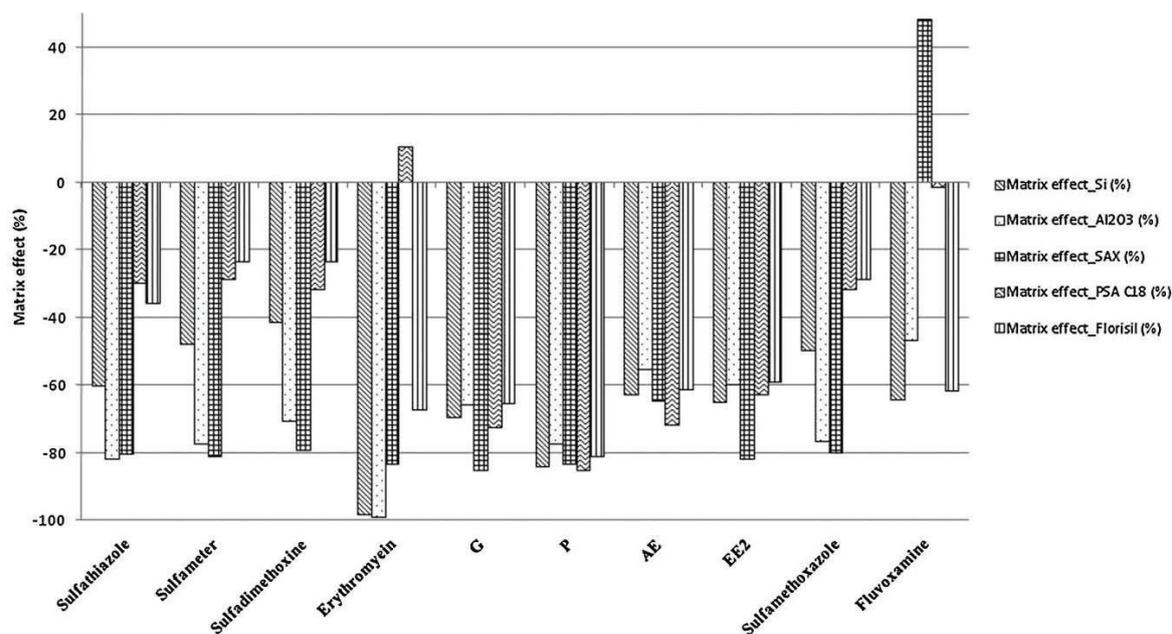


Fig. 1. Matrix effects for 10 compounds obtained with the different d-SPE tested.

relatively low recoveries: between 20% and 40%. Finally, in regard to the human contaminants, paracetamol, sulfamethoxazole, carbamazepine and ibuprofen exhibited recoveries of 83%, 71%, 75% and 44%, respectively, which are comparable with the recoveries reported in the literature of 70%, 60%, 80% and 50%, respectively [57].

3.3. LC-MS/MS optimisation

For the analysis in positive mode, the Zorbax Eclipse PLUS C18 (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column was chosen. This column was not suitable, however, for the analysis of compounds in the negative mode. Indeed, E2, α-E2 and E1, which have similar MRM transitions,

co-elute. The Zorbax Eclipse XDB C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column was therefore used because more organosilane ligands are bonded onto the stationary phase, which results in higher selectivity. Moreover, the 10 cm column length further enhances the separation.

With regard to the mobile phases, MeOH increased the ionisation of the positively ionised compounds relative to the ionisation achieved with ACN. For the negative mode, several aqueous phases were tested, including MilliQ water with formic acid, MilliQ water with ammonium hydroxide, 10 mM ammonium formate solution and pure MilliQ water. No modifiers showed good results for all products. Therefore, MilliQ water was chosen, and a post column (MeOH with 0.1% NH₄OH (v/v)) was added to improve the

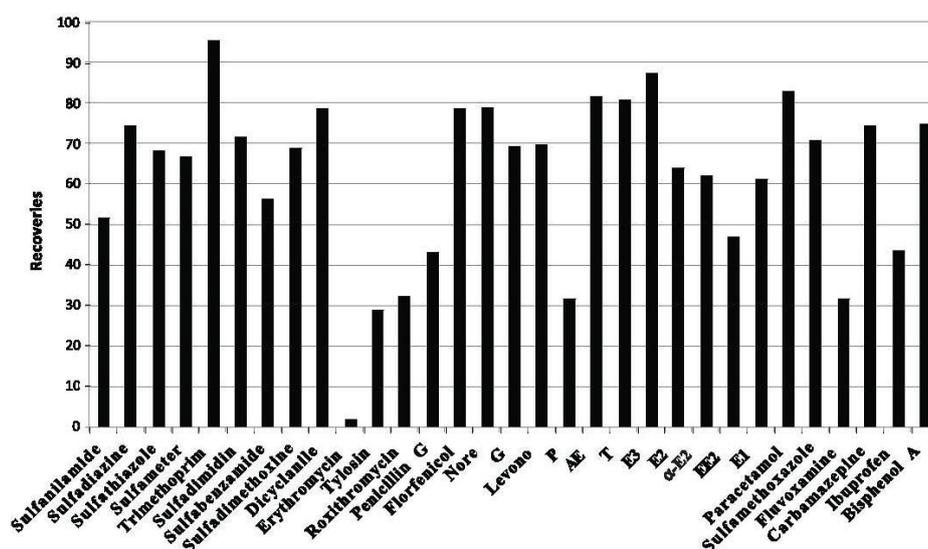


Fig. 2. Recoveries (at 50 ng/g) for the 31 target compounds obtained using the tandem SPE clean up: SAX + Strata-X.

Table 3
Validation parameters: linearity, limits of detection and quantification (MLD and MLQ), recoveries (R), intra and inter day precisions (relative standard deviation RSD) at 3 concentrations (1.5 ng/g, 50 ng/g and 500 ng/g).

Compounds	Linearity range (ng/g)	R ²	MLD (ng/g)	MLQ (ng/g)	R (%)	Intra-day precision RSD (%) (n = 5)			Inter-day precision RSD (%) (n = 3)		
						1.5 ng/g	50 ng/g	500 ng/g	1.5 ng/g	50 ng/g	500 ng/g
Veterinary antibiotics											
Sulfonamides (ESI+)											
Sulfanilamide	50–1000	0.995	7	17	ND	ND	15	12	ND	20	28
Sulfadiazine	0.05–1000	0.997	0.020	0.055	55	5	4	5	7	8	15
Sulfathiazole	0.01–1000	0.993	0.011	0.036	45	5	5	5	6	2	21
Sulfamer	0.01–1000	0.993	0.014	0.048	55	6	6	6	7	7	14
Trimethoprim	0.01–1000	0.999	0.006	0.019	75	7	2	6	10	4	13
Sulfadimidine	0.01–1000	0.994	0.005	0.015	55	8	6	6	11	6	9
Sulfabenzamide	0.01–1000	0.996	0.010	0.024	35	42	7	3	4	9	4
Sulfadimethoxine	0.01–500	0.991	0.009	0.026	53	4	4	3	1	6	9
Antiparasitic (ESI+)											
Dicyclanil	0.05–1000	0.998	0.024	0.080	71	4	4	5	5	8	14
Macrolids (ESI+)											
Erythromycin	1.5–1000	0.998	0.700	2.140	2	20	13	11	37	12	9
Tylosin	0.1–125	0.998	0.100	0.330	17	14	17	36	33	17	10
	125–1000	0.990									
	0.05–1000	0.999	0.046	0.155	14	20	11	28	16	25	15
Roxithromycin											
β-Lactam (ESI+)											
Penicillin G	0.5–500	0.998	0.220	0.730	29	19	8	9	31	9	22
Phenicol (ESI–)											
Florfenicol	0.01–130	0.997	0.004	0.013	94	12	6	3	31	26	8
	130–1000	0.994									
Hormonal steroids											
Progesteragens (ESI+)											
Nore	0.5–500	0.996	0.140	0.460	80	89	3	6	4	7	12
G	0.5–500	0.995	0.420	1.140	82	93	7	9	14	14	14
Levonorgestrel	0.5–500	0.995	0.420	1.400	88	70	5	14	28	9	21
P	0.05–1000	0.994	0.052	0.180	74	61	8	21	7	23	17
Androgens (ESI+)											
AE	0.05–500	0.991	0.017	0.072	76	98	4	5	8	5	13
T	0.05–500	0.996	0.050	0.160	80	84	2	8	12	6	7
Oestrogens (ESI–)											
E3	0.5–500	0.997	0.170	0.550	48	91	5	4	4	8	16
E2	0.5–500	0.996	0.140	0.500	47	80	11	20	18	14	18
α-E2	0.5–500	0.995	0.150	0.500	41	44	6	20	13	9	12
EE2	0.5–500	0.996	0.245	0.900	47	96	11	20	15	15	27
E1	0.1–500	0.995	0.060	0.180	46	104	5	18	11	4	13
Human contaminants											
Human drugs											
Paracetamol (ESI+)	1.5–1000	0.995	0.900	3	18	23	8	7	25	26	11
Sulfamethoxazole (ESI+)	0.05–1000	0.995	0.035	0.110	51	100	7	4	11	12	6
Fluvoxamine (ESI+)	1.5–1000	0.993	0.640	2.200	11	9	8	17	14	10	8
Carbamazepine (ESI+)	0.01–130	0.998	0.006	0.018	69	93	3	2	6	8	5
	130–1000	0.994									
Ibuprofen (ESI–)	0.05–1000	0.998	0.030	0.100	71	35	4	18	25	23	33
Plasticizer (ESI–)											
Bisphenol A	0.5–1000	0.998	0.520	0.940	68	47	8	16	10	6	1

ND: not detected.

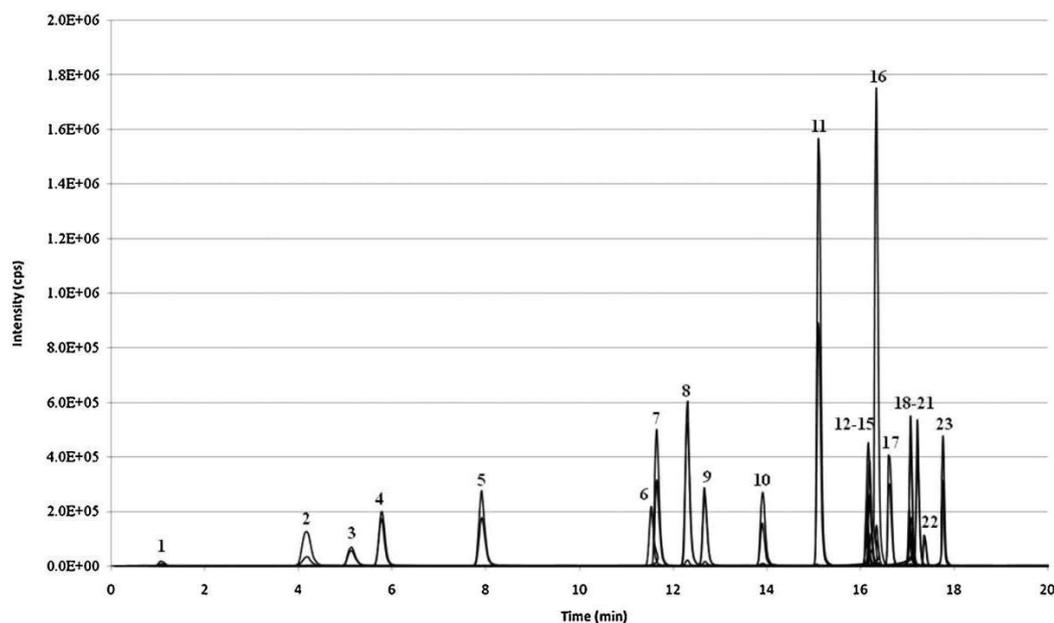


Fig. 3. Chromatographic separation of the positively ionised compounds ($C = 2 \text{ mg/L}$ and $V_{inj} = 2 \text{ }\mu\text{L}$ – the substance numbers are found in Table 1 in brackets).

ionisation. As previously discussed, E2, α -E2 and E1 must be separated. This separation is achieved in the case of 100% ACN but not with 100% MeOH. However, some compounds are better ionised in the presence of MeOH compared with ACN. The best compromise to separate the 3 oestrogens with the higher MeOH quantity was the use of 50/50 ACN/MeOH for the organic mobile phase.

For all the compounds, precursor ions corresponded to the protonated molecules $[M+H]^+$ in positive mode and $[M-H]^-$ in the negative mode (Table 1).

Positively and negatively ionised products were separated in approximately 18 min (Table 1 and Figs. 3 and 4).

The instrumental limits of detection (ILODs) and quantification (ILOQs) were determined as the signal-to-noise ratio was equal to 3 and 10, respectively, when $25 \text{ }\mu\text{L}$ of the standard solutions in 95/5 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ was injected. The results are shown in Table 1. The veterinary antibiotics exhibited ILODs in the $0.005\text{--}0.79 \text{ }\mu\text{g/L}$ range and ILOQs in the $0.016\text{--}1.27 \text{ }\mu\text{g/L}$ range. The steroids displayed ILODs between $0.017 \text{ }\mu\text{g/L}$ and $1.07 \text{ }\mu\text{g/L}$ and ILOQ between $0.058 \text{ }\mu\text{g/L}$ and $3.57 \text{ }\mu\text{g/L}$. Finally, human contaminants exhibited ILODs from $0.006 \text{ }\mu\text{g/L}$ to 0.36 and ILOQs from $0.026 \text{ }\mu\text{g/L}$ to $1.21 \text{ }\mu\text{g/L}$. These results are of the same order of magnitude and sometimes better than those described elsewhere for a more

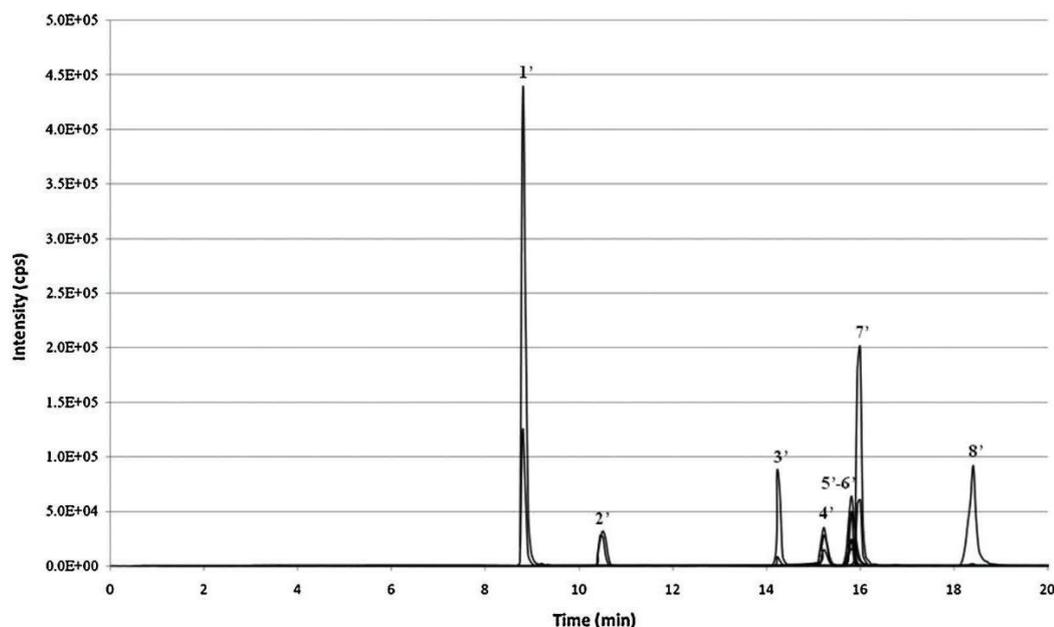


Fig. 4. Chromatographic separation of the negatively ionised compounds ($C = 2 \text{ mg/L}$ and $V_{inj} = 2 \text{ }\mu\text{L}$ – the substance numbers are found in Table 1 in brackets).

Table 4

Matrix effects for each compound (with SPE purification at three concentration: 1.5 ng/g, 5 ng/g and 50 ng/g and without any purification at 50 ng/g).

Matrix effect (%) Compounds	With SPE purification			Without SPE purification
	Spiked at 1.5 ng/g	Spiked at 5 ng/g	Spiked at 50 ng/g	Spiked at 50 ng/g
Veterinary antibiotics				
Sulfonamides (ESI+)				
Sulfanilamide	ND	ND	-78	-92
Sulfadiazine	-49	-40	-42	-47
Sulfathiazole	-34	-27	-31	-65
Sulfamer	-33	-20	-30	-46
Trimethoprim	-19	-5	-6	-12
Sulfadimidine	-29	-22	-30	-55
Sulfabenzamide	-47	-36	-41	-69
Sulfadimethoxine	-27	-23	-31	-55
Antiparasitic (ESI-)				
Dicyclanil	-11	-24	-30	-17
Macrolids (ESI+)				
Erythromycin	18	13	0.6	-95
Tylosin	108	116	108	58
Roxithromycin	162	203	242	40
β -Lactam (ESI+)				
Penicillin G	-19	-22	-34	-73
Phenicol (ESI-)				
Florfenicol	-23	-17	-13	-25
Hormonal steroids				
Progestagens (ESI+)				
Nore	-48	-48	-53	-70
G	-56	-43	-49	-83
Levono	-31	-20	-39	-83
P	-59	-36	-33	-92
Androgens (ESI+)				
AE	-44	-40	-47	-66
T	-42	-42	-42	-66
Oestrogens (ESI-)				
E3	-36	-31	-34	-48
E2	-61	-58	-51	-89
α -E2	-48	-44	-40	-85
EE2	-42	-44	-45	-87
E1	-39	-38	-41	-82
Human contaminants				
Human drugs				
Paracetamol (ESI+)	-40	-26	-33	-20
Sulfamethoxazole (ESI+)	-19	-4	-20	-53
Fluvoxamine (ESI +)	122	132	143	-74
Carbamazepine(ESI +)	-26	-18	-13	-23
Ibuprofen (ESI-)	-29	-26	-33	-76
Plasticizer (ESI-)				
Bisphenol A	-67	-64	-55	-77

ND: not detected.

limited number of substances compared with the number of substances investigated in this study. Indeed, in previous studies, the ILODs were found to be in the 0.1–3 $\mu\text{g/L}$ range and the ILOQs varied from 0.3 to 4 $\mu\text{g/L}$ during the analysis of 17 human and veterinary drugs [57], 12 sulfonamides [61] and 13 veterinary substances [62]. These reported values are higher than those obtained in this study. With regard to oestrogen, the reported limits are rarely less than the $\mu\text{g/L}$ level. Finally, for human contaminants, and particularly for human drugs, different values of ILODs have been reported in the literature, including the 0.05–1.7 $\mu\text{g/L}$ range [57,63], which is slightly higher compared to the ILODs found in this work.

3.4. Validation of the protocol

3.4.1. Performance of the method

Table 3 shows the results for the linearity of the method. For all the compounds, the correlation coefficients (R^2) are higher than 0.99. Some compounds such as some steroids and especially estrogens exhibit linearity only until 500 ng/g. Others, such as tylosine, florfenicol and carbamazepine, exhibit two domains of linearity over this large concentration range (a first linearity until about 130 ng/g and a second from 130 to 1000 ng/g).

With regard to intra-day precision (Table 3), good results were obtained, with a RSD of less than 20% except for roxythromycin and tylosin at 500 ng/g, which exhibited RSDs of 28% and 36%, respectively. The intra-day precision was less than 10% for many of the investigated compounds. The inter-day precision (Table 3) was less than 30% for all of the compounds except erythromycin at 1.5 ng/g and ibuprofen at 500 ng/g, which displayed RSDs of 37% and 33%, respectively. Inter-day precision was less than 20% for most of the compounds.

Table 3 reports also the recoveries. Sulfonamides exhibit recoveries between 35% and 107%, and antiparasitic and phenicol antibiotics exhibit recoveries between 70% and 114%. Macrolids and β -lactams showed relatively low recoveries (between 15% and 50%) because of their loss during the purification step. Steroids exhibited recoveries between 45% and 104%, and human contaminants exhibited recoveries in the 35–119% range. The recovery values depended on both the compound and the concentration. The results obtained in the present study were compared to those obtained in previously published works. No comparison could be performed with works that used acetonitrile-based extraction inspired by QuEChERS because, to our knowledge, this method has not yet been reported for the extraction of steroids, veterinary

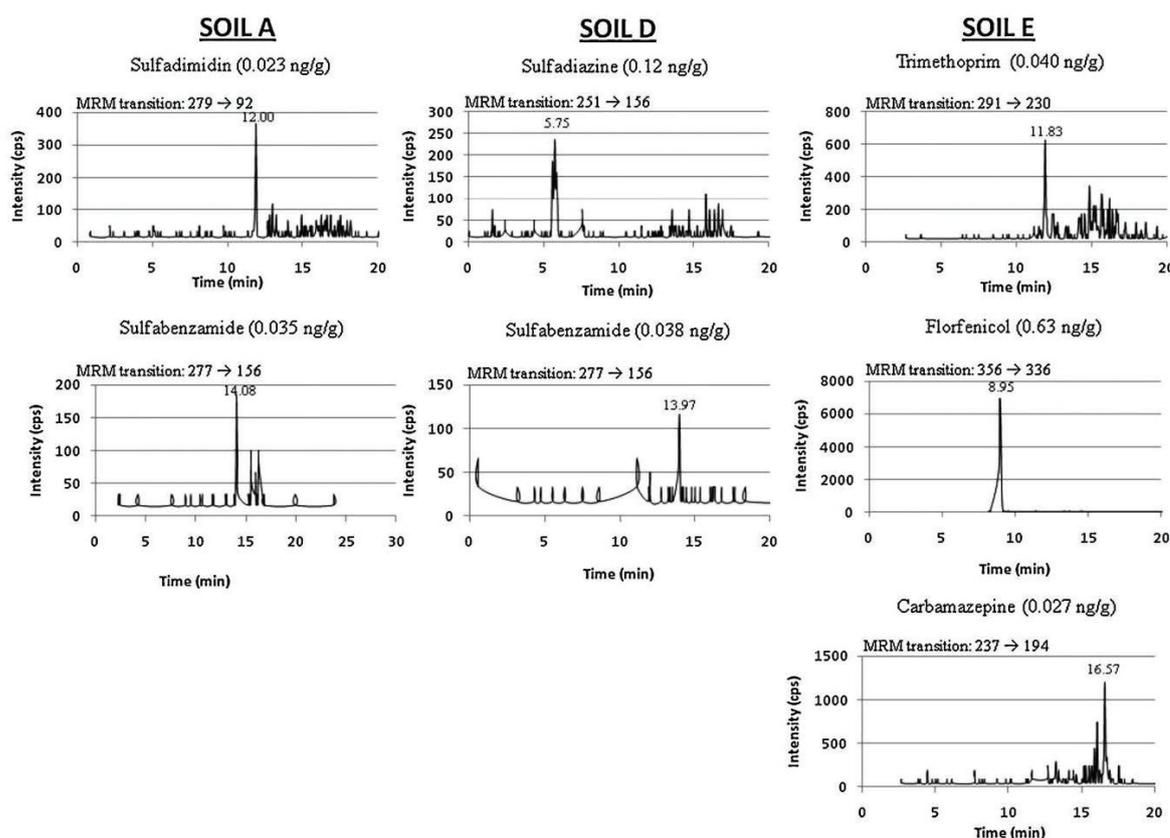


Fig. 5. Examples of chromatograms obtained during the analysis of the target compounds in soils A, D and E.

antibiotics and human contaminants from soil. The recoveries of sulfonamides antibiotics achieved using our method were of the same order of magnitude as those obtained by Karci et al. using ultrasound extraction [64]. Indeed, Karci et al. reported recoveries of 70% for sulfadiazine and sulfamethoxazole and a recovery of 100% for sulfathiazole at 200 ng/g, whereas we obtained recoveries of 61%, 64%, 55% at 50 ng/g and 84%, 100% and 76% at 500 ng/g for sulfadiazine, sulfamethoxazole and sulfathiazole, respectively. With respect to oestrogens, Zhang et al. [65] have reported recoveries between 70% and 90% at approximately 100 ng/g using PLE extraction. These results are comparable to our recoveries, which were approximately 40–50% at 50 ng/g and varied between 80% and 104% at 500 ng/g. Finally, with regard to the human drugs, the recoveries obtained in our study were compared with those reported by Vasquez-Roig et al., who performed PLE extraction on a loamy soil with a low level of organic matter [56]. These authors obtained recoveries of 76% and 86% at 50 ng/g for sulfamethoxazole and carbamazepine, respectively, whereas we obtained recoveries of 64% and 93% for the same compounds. Some results described in the literature for PLE are slightly higher than those attained in the present study [56,65]. However, loamy, loamy sand and sandy soils were often used. These types of soils typically allow fewer interactions between organic compounds and the matrix compared to our soil (clay loam), which contains a large amount of clay [1,9]. Furthermore, the recoveries are concentration-dependent, and comparisons between works performed at different concentrations are therefore sometimes difficult.

MLQ values (Table 3) were on the ng/g order of magnitude or even lower for most of the compounds. For sulfonamides, MLQs were in the 0.015–0.055 ng/g range (except sulfanilamide, with a

MLQ of 17 ng/g), whereas dicyclanil and florfenicol showed MLQs of 0.080 and 0.013, respectively. Macrolids and β -lactams displayed MLQs between 0.16 and 2.2 ng/g, whereas the MLQs of hormonal steroids were in the 0.072–1.4 ng/g range. Finally, human contaminants exhibited MLQs between 0.018 and 3 ng/g. These values are comparable with those found in the literature. Indeed, for veterinary antibiotics, Schüsener et al. [10] have obtained a MLQ of approximately 1 ng/g for macrolids. Another group of authors [9] have reported MLQs greater than 1 ng/g for sulfadiazine and erythromycin, whereas values of 0.055 ng/g and 2.14 ng/g were obtained with our method. The MLQs obtained in the current study for sulfonamides are lower than those reported in the literature. For oestrogens, however, Zhang et al. [65] have reported MLQs in the 0.06–0.64 ng/g range, which are slightly lower than our values. Zhang et al., however, focused on oestrogenic compounds, whereas a multi-residue methodology was established in our work. Concerning some of the human drugs, sulfamethoxazole, carbamazepine, paracetamol and ibuprofen exhibited MLDs in the 0.006 and 0.9 ng/g range in the current study, whereas Vasquez-Roig et al. [56] have reported values that vary from 0.1 to 1.8 ng/g. We achieved low MLD and MLQ values because the preconcentration factor is important (50 \times : 10 mL of supernatant evaporated to dryness then dissolved in 200 μ L prior to analysis).

3.4.2. Matrix effects

Matrix effects were evaluated at three concentrations: 1.5 ng/g, 5 ng/g and 50 ng/g. Table 4 summarises the matrix effect for each compound with and without SPE purification. For sulfonamides, matrix effects were in the –20%–40% range (except sulfanilamide, which exhibited a higher matrix effect: –78% at 50 ng/g). For

antiparasitics and phenicol antibiotics, the matrix effects were between –10% and –30%, and, for macrolids and β -lactams, the matrix effects decreased to –35% and were often positive (enhancement of the LC–MS/MS signal). The steroids exhibited matrix effects between –20% and –60% (most were lower than –50%). Finally, the human contaminants exhibited either positive matrix effects or negative ones down to –40% (except bisphenol A, which displayed a higher matrix effect between –55% and –67%). These matrix effects are dependent on both the compound and the concentration. They were significantly decreased compared to those obtained without any purification, particularly for the steroids, which exhibited matrix effects as high as –90% when no purification step was performed.

For environmental applications, the best method for compensating for matrix effects is the use of isotope standards. Indeed, the analytes and internal standards should exhibit the same behaviour during the sample preparation step and identical or very similar retention times during the separation. Consequently, the use of stable isotopes is recommended. However, some of our target compounds are not commercially available. Therefore, the standard addition method may represent an alternative and was further used for the quantification of environmental samples.

4. Application to real samples

The developed methodology was applied to 6 soils that had received various treatments. The results indicate that sulfonamide antibiotics were found at low concentrations in soils A and D, which were treated with cow and pig manures, respectively. Indeed, soil A contains sulfadimidine (0.023 ng/g) and sulfabenzamide (0.035 ng/g). Sulfadiazine (0.12 ng/g), sulfabenzamide (0.038 ng/g) and sulfadimethoxine (<MLQ) were found in soil D. These types of antibiotics are administered to animals to treat infections or coccidiosis (coccidian parasites that infect the intestinal tracts of animals); the antibiotics are then excreted by the animals and are therefore present in manures. The most commonly used sulfonamides in animal medicine are sulfadimidine and sulfadiazine. Sulfadimethoxine is also frequently used. Soil E, that received domestic sludge, contained the antibiotic trimethoprim (0.04 ng/g), florfenicol (0.63 ng/g) and two human contaminants (carbamazepine 0.027 ng/g and ibuprofen <MLQ). Florfenicol is used in veterinary medicine, and trimethoprim can be used in both humans and animals. No contaminants were found in soils B and C, which were treated with cow manures, except AE (<MLQ) in soil B collected on 13 July 2010. The androgen AE was also detected (<MLQ) in soils A and E. The chromatograms obtained during the analysis of soils A, D and E are presented in Fig. 5.

5. Conclusion

This work presents a new and robust procedure that allows for the determination of several hormonal steroids, veterinary antibiotics and human contaminants in soil. This innovative approach consists of both the use of a new extraction technique and its application to a wide range of substances that exhibit various chemical and physical properties. By coupling a quick and simple extraction step and a tandem SPE clean-up with LC–MS/MS analysis, a method that is both selective and sensitive was obtained. This method enables the determination of the target analytes in the low ng/g range. In addition to the speed of the extraction technique, low MLDs and MLQs were achieved.

This methodology was successfully applied to 6 amended soils, and several veterinary antibiotics of the sulfonamide and phenicol families, a steroid and some human contaminants were detected at low levels.

Although only 6 soils were analysed in this study, the method will be further applied to a wider variety of samples. Because of the speed of the extraction step, the acquisition of large amounts of data related to soil contamination will be possible, which will enable the large-scale screening of soils.

Acknowledgments

The authors thank the CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) for M.-V.S.'s doctoral-stage funding and the ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie) for the ARCOS program funding.

References

- [1] K. Kumar, S.C. Gupta, Y. Chander, A.K. Singh, *Adv. Agron.* 87 (2005) 1.
- [2] A.E. Van den Bogaard, E.E. Stobberingh, *Int. J. Antimicrob. Agents* 14 (2000) 327.
- [3] G.M. Solomon, T. Schettler, *Can. Med. Assoc. J.* 163 (2000) 1471.
- [4] E. Vulliet, L. Wiest, R. Baudot, M.F. Grenier-Loustalot, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 84.
- [5] M. Perovic, M.D. Hernando, M. Silvia Diaz-Cruz, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.
- [6] A. Kot Wasik, J. Debska, J. Namiesnik, D. Barcelo, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 557.
- [7] M. Lopez de alda, D. Barcelo, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437.
- [8] J. Debska, A. Kot Wasik, J. Namiesnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 371 (2001) 437.
- [9] A.M. Jacobsen, B. Halling-Sorensen, F. Ingerslev, S.H. Hansen, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 157.
- [10] M.P. Schlusener, M. Spittler, K. Bester, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 21.
- [11] HORIZONTAL – Organic – Pharmaceuticals. Ruggedness of analytical methods developed for hormones, antibiotics and pharmaceutical products in sludge, soil and biowaste, Sixth Framework Program (2002–2006), 2006, pp. 60.
- [12] V. Andrew, E. Ferrer, J.L. Rubio, G. Font, Y. Pico, *Sci. Total Environ.* 378 (2007) 124.
- [13] I. Ferrer, E.T. Furlong, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1275.
- [14] J.C. Duran-Alvarez, E. Becerril-Bravo, V. Silva Castro, B. Jimenez, R. Gibson, *Talanta* 78 (2009) 1159.
- [15] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 497.
- [16] P.A. Blackwell, H.-C. Holten Lutzhoft, H.P. Ma, B. Halling-Sorensen, A.B.A. Boxall, P. Kay, *Talanta* 64 (2004) 1058.
- [17] J. Xu, L. Wu, W. Chen, A.C. Chang, *J. Chromatogr. A* 1202 (2008) 189.
- [18] S.C. Kim, K. Carlson, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 635.
- [19] M. Rabolle, N.H. Spliid, *Chemosphere* 40 (2000) 715.
- [20] S.L. Rice, S. Mitra, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 125.
- [21] R. Liu, J.L. Zhou, A. Wilding, *J. Chromatogr. A* 1038 (2004) 19.
- [22] Y. Yamini, M. Asghari-Khiavi, N. Bahramifar, *Talanta* 58 (2002) 1003.
- [23] J. Wilga, A. Kot-Wasik, Namiesnik, *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 601.
- [24] M. Anastasiades, K. Mastovska, S.J. Lehotay, *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 163.
- [25] AOAC Official Method 2007.01. Pesticides residues in food by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate, AOAC International, 2007, pp. 9.
- [26] AFNOR (NF EN 15662), Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par GC-MS et SL/SM/SM avec extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE disperses (Méthode QuEChERS), France, 2009, pp. 11.
- [27] A. Garrido Frenich, M. del Mar Aguilera-Luiz, J.L. Martínez Vidal, R. Romero-Gonzalez, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 150.
- [28] A. Rashid, S. Nawaz, H. Barker, I. Ahmad, M. Ashraf, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2933.
- [29] J.A. Padilla-Sanchez, P. Plaza-Bolanos, R. Romero Gonzalez, A. Garrido-Frenich, J.L. Martínez Vidal, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5724.
- [30] C. Lesueur, M. Gartner, A. Mentler, M. Fuerhacker, *Talanta* 75 (2008) 284.
- [31] C. Garcia Pinto, M. Esther Fernandez Laespada, S. Herrero Martin, A.M. Casas Ferreira, J.L. Perez Pavon, B. Moreno Cordero, *Talanta* 81 (2010) 385.
- [32] D. Drozdzyński, J. Kowalska, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 2241.
- [33] X.B. Yang, G.G. Ying, R.S. Kookana, *J. Environ. Sci. Health* 45 (2010) 152.
- [34] M. Asensio-Ramos, J. Hernandez-Borges, L.M. Ravelo-Perez, M.A. Rodriguez-Delgado, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2307.
- [35] M.S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 637.
- [36] M. Petrovic, M.D. Hernando, M.S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.
- [37] L.S. Shore, M. Shemesh, *Pure Appl. Chem.* 75 (2003) 1859.
- [38] O. Finlay-Moore, P.G. Hartel, M.L. Cabrera, *J. Environ. Qual.* 29 (2000) 1604.
- [39] Rapport AFSSA-ANMV, Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2008, France, 2009.
- [40] S. Thiele-Bruhn, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166 (2003) 145.
- [41] J. Beausse, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 753.
- [42] M. Focazio, D. Kolpin, K. Barnes, E. Furlong, M. Meyer, S. Zaugg, L. Barber, M. Thurman, *Sci. Total Environ.* 402 (2008) 201.
- [43] R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 561.

- [44] A. Jia, Y. Xiao, J. Hu, M. Asami, S. Kunikane, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4655.
- [45] M.J. Lopez de Alda, S. Dia-Cruz, M. Petrovic, D. Barcelo, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 503.
- [46] L. Bijlsma, J.V. Sancho, E. Pitarch, M. Ibanez, F. Hernandez, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3078.
- [47] M. Wang, B. Guo, Z. Huang, J. Duan, Z. Chen, B. Chen, S. Yao, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2821.
- [48] S.J. Lehotay, K. Mastovska, A. Amirav, A.B. Fialkov, T. Aldon, P.A. Martos, A. de Kok, A.R. Fernandez-Alba, Trends Anal. Chem. 27 (2008) 1070.
- [49] European Commission Decision 2002/657/EC (17 August 2002), Off. J. Eur. Commun. 221 (2002) 8.
- [50] International Conference on Harmonization, Q2 (R1): Validation of Analytical procedures: Text and Methodology, November 2005. <http://www.ich.org/fileadmin/Public/Web/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf>.
- [51] M.P. Schlusener, K. Bester, Environ. Pollut. 143 (2006) 565.
- [52] M. Lillenberg, S. Yurchenko, K. Kipper, K. Herodes, V. Pihl, K. Sepp, R. Lohmus, L. Nei, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5949.
- [53] M.M. Aguilera-Luiz, J.L. Martinez Vidal, R. Romero-Gonzalez, A. Garrido Frenich, J. Chromatogr. A 1205 (2008) 10.
- [54] J.B. Baugros, C. Cren-Olivé, B. Giroud, J.Y. Gauthier, P. Lantéri, M.F. Grenier-Loustalot, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4941.
- [55] D.S. Aga, S. O'Connor, S. Ensley, J.O. Payero, D. Snow, D. Tarkalson, J. Agric. Food Chem. 53 (2005) 7165.
- [56] S. O'Connor, D.S. Aga, Trends Anal. Chem. 26 (2007) 456.
- [57] P. Vazquez-Roig, R. Segarra, C. Blasco, V. Andreu, Y. Pico, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 2471.
- [58] P.A. Blackwell, H.C. Hölten-Lützof, H.P. Ma, B. Halling-Sorensen, A.B.A. Boxall, P. Kay, J. Chromatogr. A 1045 (2004) 111.
- [59] D. Barcelo, M. Petrovic, Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Wastes: Occurrence, Analysis and Effects, Springer, 2008, p. 77.
- [60] J. Girard, Principles of Environmental Chemistry, Jones and Barlett Publishers, Canada, 2005, pp. 52.
- [61] A. Bialk-Bielinska, J. Kumirska, R. Palavinskas, P. Stepnowski, Talanta 80 (2009) 947.
- [62] L. Tong, P.P. Li, Y. Wang, K. Zhu, Chemosphere 74 (2009) 1090.
- [63] W. Ahrer, E. Scherwenk, W. Buchberger, J. Chromatogr. A 910 (2001) 69.
- [64] A. Karci, I.A. Balcioglu, Sci. Total Environ. 407 (2009) 4652.
- [65] Z. Zhang, S.M. Rhind, C. Kerr, M. Osprey, C.E. Kyle, Anal. Chim. Acta 685 (2011) 29.