



**HAL**  
open science

# Optimisation de techniques analytiques pour caractériser les antibiotiques dans les systèmes aquatiques

Samia Mokh

► **To cite this version:**

Samia Mokh. Optimisation de techniques analytiques pour caractériser les antibiotiques dans les systèmes aquatiques. Autre. Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2013. Français. NNT : 2013BOR14950 . tel-01396114

**HAL Id: tel-01396114**

**<https://theses.hal.science/tel-01396114>**

Submitted on 14 Nov 2016

**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.

N° ordre : 4950



# THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Samia MOKH

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

## **Optimisation de techniques analytiques pour caractériser les antibiotiques dans les systèmes aquatiques**

Directeurs de recherche : Hélène BUDZINSKI, EPOC-LPTC, Bordeaux 1  
Mohamad AL ISKANDARANI, CLEA-LACO, Beyrouth

Date de Soutenance: 13 Décembre 2013

Devant la commission d'examen formée de :

Mme PICHON, Valérie

Mr VERDON, Eric

Mr MAZELLIER, Patrick

Mme BUDZINSKI, Hélène

Mr AL ISKANDARANI, Mohamad

Professeur, Université Pierre et Marie Curie-Paris

Chargé de recherches (CR1), Anses, Fougères

Professeur, Université Bordeaux 1

Directeur de recherches, Université Bordeaux 1

Professeur CLEA, Beyrouth

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

## REMERCIEMENTS

**« En automne, je récoltai toutes mes peines et les enterrai dans mon jardin. Lorsque avril refleurit et que la terre et le printemps célébrèrent leurs noces, mon jardin fut jonché de fleurs splendides et exceptionnelles. »**

**Gibran Khalil Gibran**

Extrait de *Le Sable et l'écume*

*Ce manuscrit est le résultat d'un travail de recherche, réalisé au sein du Laboratoire d'Analyse des Composés Organiques (LACO), à la Commission Libanaise de l'Energie Atomique (CLEA) et dans le Laboratoire de Physico - et Toxicologie-Chimie (LPTC) de l'Université de Bordeaux I.*

*Je tiens d'abord à remercier Monsieur Mohamad Al Iskandarani, Professeur à la CLEA, pour m'avoir confié ce travail de recherches, pour son aide ainsi que pour sa disponibilité et son soutien scientifique. Je remercie également Madame Hélène Budzinski, directeur de recherches au CNRS (LPTC), qui a dirigé ma thèse et m'a accordée sa confiance dans mes travaux et pour l'accueil chaleureux dans son laboratoire et ses précieux conseils.*

*Je remercie Madame Valérie Pichon, Professeur à l'Université de Paris VI et Monsieur Eric Verdon, Chargé de recherches au Laboratoire de l'Anses de Fougères, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs de thèse et d'avoir apporté leurs observations avisées à ce manuscrit. Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Patrick Mazellier, Professeur à l'Université Bordeaux I, pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse.*

*Mes remerciements vont également au Conseil National de la Recherche Scientifique au Liban, représenté par son secrétaire général Monsieur le Professeur Mouïin Hamzé. Je remercie également Monsieur le Professeur Bilal Nsouli, directeur de CLEA, pour son soutien moral et son encouragement accordé tout au long de mon travail.*

*Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur Farouk Jaber, directeur du laboratoire (LACO) pour son aide et son encouragement.*

*J'aimerais adresser mes remerciements à toutes les personnes que j'ai côtoyées au LPTC. Je pense particulièrement dans un premier temps à Patrick Pardon, Karyn Le Menach, Sylvie Augagneur et Pierre Labadie, les permanents du groupe, mais également à Yann Aminot, Coralie Soulier, Rami Kanan et tous les autres doctorants que j'ai rencontré au laboratoire LPTC, pour l'ambiance agréable qui a régné.*

*J'ai une pensée particulière à mes collègues et mes amis de l'équipe LACO : Khaled Hawari, Radwan Sidaoui, Hiba Abdallah, Rania Nassar, Aisha Ashi et Montaha Yassine pour les encouragements et pour l'ambiance chaleureuse qu'ils ont su créer au laboratoire. Le travail à leurs côtés est un réel plaisir !*

*Je remercie aussi très sincèrement mes collègues et amis à la commission CLEA : Maria Aoun, Rana Baydoun, Rola Abou kozam, Najla Kayouf, Najla Kanan, Rana Abou el Hoda, Adnan Dimashkiye, Salam Bazzi et tout le personnel.*

*Enfin, mes vifs remerciements s'adressent à ma famille au Liban et surtout à mes parents, source de mon bonheur, et qui m'ont particulièrement aidée dans les situations difficiles.*

*Merci à tous !!!*

## Résumé

Les antibiotiques sont considérés comme des polluants lorsqu'ils sont présents dans les écosystèmes aquatiques, réceptacles ultimes des substances anthropiques. L'étude de ces composés porte sur leur rémanence dans le milieu ou leurs effets sur des organismes naturels. De nombreux efforts ont été faits à l'échelle mondiale pour l'évaluation de la qualité environnementale des différentes ressources en eau pour la survie des espèces aquatiques mais aussi pour la consommation humaine et le risque sanitaire lié. Dans ce but, l'optimisation des techniques analytiques pour ces composés dans les systèmes aquatiques demeure une nécessité. Notre objectif est de développer des méthodes d'extraction et de détection pour 12 molécules appartenant à la famille des aminoglycosides et de la colistine dans les eaux des stations d'épuration et les eaux hospitalières. L'absence des méthodes d'analyse pour ces composés ainsi que le manque des études permettant leur détection dans l'eau sont les raisons de leur étude. L'Extraction sur Phase Solide (SPE) en mode classique (hors ligne) ou en ligne, suivie d'une analyse par la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC/MS/MS) est la méthode la plus couramment employée pour ce type d'analyse. Les paramètres sont optimisés et validés afin d'assurer les meilleures conditions utilisées dans les analyses environnementales. Cette technique a été appliquée sur des échantillons réels des eaux des stations d'épuration à Bordeaux et au Liban.

**Mots Clés :** Aminoglycosides, Colistine, Extraction sur phase solide, LC/MS/MS, ZIC-HILIC, Acide pentafluoropropionique, Eau usée.

## **Abstract**

Antibiotics are considered as pollutants when they are present in aquatic ecosystems, ultimate receptacles of anthropogenic substances. These compounds are studied as their persistence in the environment or their effects on natural organisms. Numerous efforts have been made worldwide to assess the environmental quality of different water resources for the survival of aquatic species, but also for human consumption and health risk related. Towards goal, the optimization of analytical techniques for these compounds in aquatic systems remains a necessity. Our objective is to develop extraction and detection methods for 12 molecules of aminoglycosides and colistin in sewage treatment plants and hospitals waters. The lack of analytical methods for analysis of these compounds and the deficiency of studies for their detection in water is the reason for their study. Solid Phase Extraction (SPE) in classic mode (offline) or online followed by Liquid Chromatography analysis coupled with Mass Spectrometry (LC/MS/MS) is the most method commonly used for this type of analysis. The parameters are optimized and validated to ensure the best conditions for the environmental analysis. This technique was applied to real samples of wastewater treatment plants in Bordeaux and Lebanon.

**Keywords:** Aminoglycosides, Colistin, Solid phase extraction, LC/MS/MS, ZIC-HILIC Pentafluoropropionic acid, Wastewater.

# Table des matières

LISTE DES TABLEAUX.....	1
LISTE DES FIGURES.....	2
GLOSSAIRE.....	3
INTRODUCTION.....	5

## CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les antibiotiques dans les systèmes aquatiques.....	8
1.1. Problématique.....	8
1.2. Classification, mode d'action et utilisation.....	10
1.2.1. Mode d'action de différentes familles des antibiotiques.....	11
1.2.2. Utilisation et propriétés de principales familles des antibiotiques.....	12
1.3. Propriétés physico-chimique des principales familles.....	18
1.4. Cycle biogéochimique.....	20
1.4.1. Origine, source et transport .....	20
1.4.2. Occurrence dans les eaux environnementales.....	23
1.4.3. Dégradation en milieu aquatique.....	27
1.4.4. Développement et effets de la résistance aux antibiotiques.....	30
I.4.4.1- Développement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries...	31
I.4.4.2- Effets sur les espèces aquatiques.....	32
I.4.4.3- Effets directs sur la santé humaine par la consommation de l'eau potable. ....	34
1.4.5. Législations.....	35
2. Méthodologie d'analyse dans les systèmes aquatiques .....	38
2.1. Techniques d'extraction.....	38
2.1.1. Extraction Liquide- Liquide (LLE) .....	38
2.1.2. Extraction sur Phase Solide (SPE) .....	38
2.1.2.1- Principe.....	38
2.1.2.2- Formats et les types d'adsorbants.....	38
2.1.2.3- L'extraction en ligne (Online) et hors ligne (Offline).....	40
2.1.3. Micro- Extraction sur Phase Solide (SPME) .....	40
2.2. Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC/MS/MS)	41

<b>2.3. Revue des principales méthodes d'analyse de traces des antibiotiques dans les systèmes aquatiques.....</b>	46
<b>3. Molécules choisies pour notre étude.....</b>	51
<b>4. Objectifs de la recherche.....</b>	52

## **CHAPITRE II : METHODES ET MATERIELS**

<b>1. Molécules étudiées .....</b>	54
<b>2. Matériels utilisés et solutions étalons.....</b>	56
<b>3. Sites de prélèvements des échantillons d'eau.....</b>	56
<b>3.1. Sites de prélèvements de Bordeaux.....</b>	56
<b>3.2. Sites de prélèvements du Liban.....</b>	58
<b>4. Extraction et préparation des échantillons.....</b>	61
<b>4.1. Extraction des aminoglycosides (Publication 2) .....</b>	61
<b>4.2. Extraction de la colistine (Publication 3) .....</b>	62
<b>5. Analyse et quantification par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse.....</b>	63
<b>6. Méthodes et critères de validation.....</b>	63
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	65

## **CHAPITRE III : RESULTATS**

### **Liste de publication :**

<b>Publication 1: Optimization and comparisons for separation, detection and quantification of 12 aminoglycosides using 2 chromatographic conditions by LC-MS/MS. ....</b>	79
Démarche et principaux résultats de la publication 1.....	96
<b>Publication 2: Optimization of a solid-phase extraction method for determination of 12 aminoglycosides in water samples using LC/MS/MS.....</b>	98
Démarche et principaux résultats de la publication 2.....	115
<b>Publication 3: Comparaison of offline and online SPE-LC/MS/MS for Determination of Colistin A and B in Water Samples.....</b>	118
Démarche et principaux résultats de la publication 3.....	135
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES.....</b>	138
<b>ANNEXES.....</b>	140

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau I-1:</b>	<b>Présence des résidus des antibiotiques dans les plans d'eau (Diaz Cruz. M et Barcelo. D, 2007).</b>	<b>24</b>
<b>Tableau I-2:</b>	<b>Taux d'élimination par voie rénale et pourcentage de dégradation selon les différents tests effectués (Pedro Alejandro Segura, 2009).</b>	<b>29</b>
<b>Tableau I-3:</b>	<b>Concentrations effectives des antibiotiques (Pedro Alejandro Segura, 2009).</b>	<b>34</b>
<b>Tableau I-4:</b>	<b>Conditions d'extraction et de détection utilisées pour le dosage des antibiotiques dans les différentes matrices d'eau.</b>	<b>48</b>
<b>Tableau II-1:</b>	<b>Récapitulatif présentant plusieurs informations pour les 12 AGs et la Colistine.</b>	<b>54</b>
<b>Tableau II-2:</b>	<b>Qualité des eaux traitées à El Ghadir comparées aux normes proposées par le ministère de l'Environnement en 1996.</b>	<b>60</b>
<b>Tableau II-3:</b>	<b>Paramètres mesurés pour la station de Hammana.</b>	<b>61</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure I-1:</b>	<b>Répartition du nombre des articles publiés sur la contamination de l'environnement par des molécules pharmaceutiques sur les 24 dernières années.</b>	<b>9</b>
<b>Figure I-2:</b>	<b>Structure de Sulfonamides les plus mentionnées dans la littérature environnementale.</b>	<b>12</b>
<b>Figure I-3:</b>	<b>Structure de <math>\beta</math>-lactamines les plus mentionnées dans la littérature environnementale.</b>	<b>13</b>
<b>Figure I-4:</b>	<b>Structure de quelques Aminoglycosides.</b>	<b>14</b>
<b>Figure I-5:</b>	<b>Structure de quelques Tétracyclines utilisées.</b>	<b>15</b>
<b>Figure I-6:</b>	<b>Structure de quelques Macrolides.</b>	<b>16</b>
<b>Figure I-7:</b>	<b>Structure de plusieurs Quinolones.</b>	<b>17</b>
<b>Figure I-8:</b>	<b>Structure de la Colistine.</b>	<b>18</b>
<b>Figure I-9:</b>	<b>Equilibre de dissociation de sulfonamides.</b>	<b>19</b>
<b>Figure I-10:</b>	<b>Les diverses sources d'entrée des antibiotiques dans l'environnement aquatique.</b>	<b>20</b>
<b>Figure I-11:</b>	<b>Chemin représentant l'hydrolyse de l'amoxicilline (Längin et al, 2009).</b>	<b>28</b>
<b>Figure I-12:</b>	<b>Les étapes d'extraction par SPE.</b>	<b>39</b>
<b>Figure I-13:</b>	<b>Représentation graphique du SPME.</b>	<b>41</b>
<b>Figure I-14:</b>	<b>Principe de l'ionisation en mode ESI (Finnigan, 1996).</b>	<b>43</b>
<b>Figure II-1:</b>	<b>Localisation de deux stations d'épuration.</b>	<b>57</b>
<b>Figure II-2:</b>	<b>Principales étapes du traitement des eaux dans les STEP.</b>	<b>57</b>
<b>Figure II-3:</b>	<b>Photo d'un préleveur automatique.</b>	<b>58</b>
<b>Figure II-4:</b>	<b>Localisation des sites d'études et poursuite des points de prélèvements.</b>	<b>59</b>
<b>Figure II-5 :</b>	<b>Chemin représentatif de la station d'épuration de Hammana.</b>	<b>60</b>
<b>Figure II-6:</b>	<b>Présentation du système SPE-LC/MS/MS.</b>	<b>62</b>
<b>Figure II-7:</b>	<b>Chemin représentatif du fonctionnement du système SPE-LC/MS/MS.</b>	<b>63</b>

## GLOSSAIRE

<b>ACN</b>	<b>Acétonitrile</b>
<b>AGs</b>	<b>Aminoglycosides</b>
<b>CLHP</b>	<b>Chromatographie Liquide à Haute Performance</b>
<b>AmAc</b>	<b>Ammonium acétate</b>
<b>AP</b>	<b>Associated Press</b>
<b>APCI</b>	<b>Atmospheric pressure chemical ionization</b>
<b>CH</b>	<b>Clos de Hilde</b>
<b>CV</b>	<b>Coefficient de variation</b>
<b>DOM</b>	<b>Matière organique dissoute</b>
<b>EC50</b>	<b>Concentration Efficace pour 50% des individus de l'espèce testée</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylene diamine tetraacetic acid</b>
<b>ESI</b>	<b>Electrospray ionisation</b>
<b>FAO</b>	<b>Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture</b>
<b>FLD</b>	<b>Fluorescence Detectors</b>
<b>FQs</b>	<b>Fluoroquinolones</b>
<b>HILIC</b>	<b>Hydrophilic interaction chromatography</b>
<b>IMS</b>	<b>Intercontinental medical service</b>
<b>LC/MS/MS</b>	<b>Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse</b>
<b>LC 50</b>	<b>Concentration Létale pour 50% des individus de l'espèce testée</b>
<b>LOEC</b>	<b>Lowest Observed Effect Concentration (plus petite concentration provoquant les effets observés)</b>
<b>LLE</b>	<b>Extraction Liquide – Liquide</b>
<b>LF</b>	<b>Louis Fargue</b>
<b>LOD</b>	<b>Limit of detection</b>
<b>LOQ</b>	<b>Limit of quantification</b>
<b>MBR</b>	<b>Bioréacteur à membrane</b>
<b>MeOH</b>	<b>Méthanol</b>
<b>MIC50</b>	<b>Concentration inhibitoire minimale à 50</b>
<b>MLs</b>	<b>Macrolides</b>
<b>MRM</b>	<b>Multiple reaction monitoring</b>
<b>NOEC</b>	<b>No Observed Effect Concentration</b>
<b>OIE</b>	<b>Office international des épizooties</b>

<b>OMS</b>	<b>Organisation mondiale de la santé</b>
<b>PFPA</b>	<b>Acide pentafluoropropionique</b>
<b>POCIS</b>	<b>Polar organic chemical integrative sampler</b>
<b>RPLC/UV</b>	<b>Rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet detection</b>
<b>STEP</b>	<b>Stations d'épuration</b>
<b>S/N</b>	<b>Signal sur bruit</b>
<b>SPE</b>	<b>Solid Phase Extraction</b>
<b>SPME</b>	<b>Solid Phase Micro-Extraction</b>
<b>TCs</b>	<b>Tetracyclines</b>
<b>USGS</b>	<b>United States Geological Survey</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra-violet</b>

## INTRODUCTION

Le milieu scientifique s'est beaucoup intéressé aux pollutions des milieux aquatiques provenant des rejets de produits chimiques industriels et agricoles. Les effets de ces pollutions sur les écosystèmes, sur la santé humaine et animale ont été évalués et des réglementations ont pu être décidées et mises en œuvre. Néanmoins, d'autres sources de pollutions des milieux aquatiques sont apparues ces dernières années, notamment les résidus médicamenteux qui ont été identifiés comme potentiellement toxiques. Cette situation fait récemment l'objet d'inquiétude croissante, d'où une préoccupation au niveau nationale et internationale (Zuccato et al, 2000; Heberer, 2002a; Jones et al, 2004). Des études menées dans plusieurs pays ont montré la présence de plus de 80 produits pharmaceutiques dans des eaux usées urbaines à des concentrations variant du 1 ng L<sup>-1</sup> au 1 mg L<sup>-1</sup> (Kümmerer, 2001; Heberer, 2002b). La protection des eaux de surface comme source d'eau potable est donc devenue une question importante pour la société. Alors, l'évaluation régulière de ces polluants nous donne une idée sur la qualité des eaux utilisées.

Au cours de la deuxième moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, une révolution dans l'usage des antibiotiques s'est produite en médecine humaine et aussi vétérinaire. En 1997, 10500 tonnes d'antibiotiques sont consommées en Europe dont la France est l'un des premiers consommateurs (Capdeville, 2011). En élevage, l'utilisation et les progrès dans la découverte de nouveaux antibiotiques ont permis non seulement de traiter des maladies bactériennes digestives, respiratoires post-natales, mais également de contrôler les épisodes pathologiques et d'optimiser leur performance. En outre, l'industrie agroalimentaire moderne intègre souvent des antibiotiques dans l'alimentation des animaux d'élevage afin d'en accélérer la croissance. Ils sont également pulvérisés dans les vergers afin de combattre ou de prévenir les maladies des fruits. Malheureusement, l'espoir apporté par les antibiotiques a été progressivement remplacé par une constatation préoccupante provenant de l'utilisation inadaptée et inconsidérée de ces produits, couplé à la capacité d'adaptation des microorganismes et aux possibilités de transferts génétiques. En effet, cet emploi contribue au phénomène de l'émergence et de la dissémination de germes résistants, ainsi qu'à des échecs de l'antibiothérapie (Corvaglia, 2006) qui ont des conséquences sur la santé humaine et animale. D'autre part, plusieurs experts croient que la montée des allergies ou le dérèglement du système immunitaire dans les sociétés modernes pourraient s'expliquer par l'omniprésence des antibiotiques dans l'environnement. L'utilisation abusive des antibiotiques, dénoncée aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, notamment piscicole, contribue à ce processus. En effet, généralement administrés sous forme d'aliments médicamenteux, ils

sont en contact avec l'eau avant d'atteindre l'animal. On considère que 70 à 80% des antibiotiques ainsi administrés aux poissons atteignent l'environnement, notamment le milieu aquatique soit directement par la fraction d'aliment non ingérée, soit sous forme d'urine et de fèces (Haug et Hals, 2000; Samuelsen et al, 2000).

La problématique se place dans le contexte de la faible potentialité du traitement par les stations d'épuration (STEP) où leurs résidus quittent le plus souvent ces dernières presque inchangés (Dirany, 2010). Du fait de leur faible concentration dans les milieux aquatiques et de leur forte polarité, le développement des techniques analytiques capables de détecter ces molécules présentes en très faibles quantités devient une nécessité. Généralement, l'évolution de la technique d'extraction sur phase solide a été mise en évidence dans la majorité des travaux de recherches concernant les antibiotiques dans les eaux environnementales (Seifrtova, 2009). Le développement analytique va permettre leurs analyses dans des matrices chargées surtout dans les eaux des stations d'épuration et les eaux hospitalières. L'identification et la quantification de ces composés sont effectuées au moyen de la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse.

L'objectif de notre travail est donc d'optimiser une technique analytique permettant la caractérisation des antibiotiques dans les milieux aquatiques Libanais et Français. Dans ce contexte, les travaux de cette thèse sont répartis comme suit:

- Le chapitre I rassemble les données bibliographiques concernant la présence, l'utilisation, la toxicité des antibiotiques et fait un point sur les techniques d'extraction et de détection utilisées.
- Le chapitre II présente les produits utilisés et décrit les techniques expérimentales employées au cours de cette étude.
- Le chapitre III regroupe les résultats expérimentaux sous forme de publications concernant l'optimisation des méthodes d'extraction et de détection de 12 aminoglycosides et de la colistine dans les eaux hospitalières et les stations d'épuration à Bordeaux et au Liban.

## **CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

Ce chapitre regroupe les informations essentielles concernant les molécules étudiées, les Antibiotiques. Après une description des principales familles ainsi que leurs propriétés physico-chimiques, un état des lieux des connaissances sur ces composés, en termes de sources potentielles, de niveaux de présence dans les différents compartiments d'eau, de stabilité dans le milieu aquatique et de toxicité, est présenté. En outre, les différentes techniques d'extraction et d'analyse font l'objet de la deuxième partie de cette synthèse bibliographique.

## **1. Les antibiotiques dans les systèmes aquatiques**

Les antibiotiques désignent des substances produites par des bactéries ou des champignons ou des substances obtenues par semi-synthèse ou synthèse totale. Nos ancêtres connaissaient les propriétés thérapeutiques de nombreuses substances naturelles et avant le XVIème siècle, les Amérindiens du Brésil utilisaient de l'extrait du rhizome de l'ipéca (*Psychotria ipecacuanha*) pour traiter la dysenterie amibienne (Alves Garcia et al, 2005). Plusieurs savants, tels Pasteur et Joubert, en 1877, et Vuillemin, en 1889, ont observé que certains micro-organismes en inhibaient d'autres ou combattaient diverses maladies. C'est ainsi que la première constatation de l'effet inhibiteur de la moisissure *Penicillium notatum* sur des cultures de *Staphylococcus aureus* par Fleming en 1929, puis les travaux d'Abraham et de Florey ont aboutit à la purification de la pénicilline en 1940. Les Sulfonamides ont été découverts en 1930 par Gerhard Domagk, et depuis, des milliers d'antibiotiques ont été décelés ou synthétisés (Greenwood, 2003). En effet, l'introduction de la benzylpénicilline, de la streptomycine et d'autres médicaments a réduit la mortalité en Etats-Unis de 30 % en 1947 comparée à celle de 1938 et aussi a contribué à augmenter l'espérance de vie qui est passée de 47 ans en 1900 à 70 ans en 1960 (Bunker, 2001).

### **1.1. Problématique**

Au cours des trois dernières décennies, la recherche en écotoxicologie est portée presque exclusivement sur les polluants classiques, en particulier les pesticides hautement toxiques et / ou cancérigènes et des produits industriels intermédiaires présentant une persistance dans l'environnement. Cependant, ces dernières années la communauté scientifique s'est beaucoup intéressée à la pollution venant des contaminants émergents tels que les surfactants, les pharmaceutiques, les hormones, les filtres solaires, les retardateurs de flammes et les toxines algales. L'étude et la surveillance de ces contaminants sont relativement récentes (Erickson, 2002; Snow et al, 2007) et leur présence dans l'environnement date du temps où ils ont été introduits pour la première fois sur le marché (Erickson, 2002; Daughton, 2004a). Ce problème a réellement pris de l'ampleur récemment en regardant le nombre croissant d'articles scientifiques publiés surtout pour les contaminants pharmaceutiques (Figure I-1). La revue de la littérature pour la période 2004-2006, effectuée par Glassmeyer et al, en 2008, montre que, pendant cette période, la pollution par des résidus de médicaments dans des matrices aqueuses est principalement documentée aux États-Unis d'Amérique (26 articles sur 80) puis au Canada, en Allemagne, en Espagne (entre 5 et 10 articles sur 80) et enfin dans les autres pays déjà cités (moins de cinq articles sur 80).

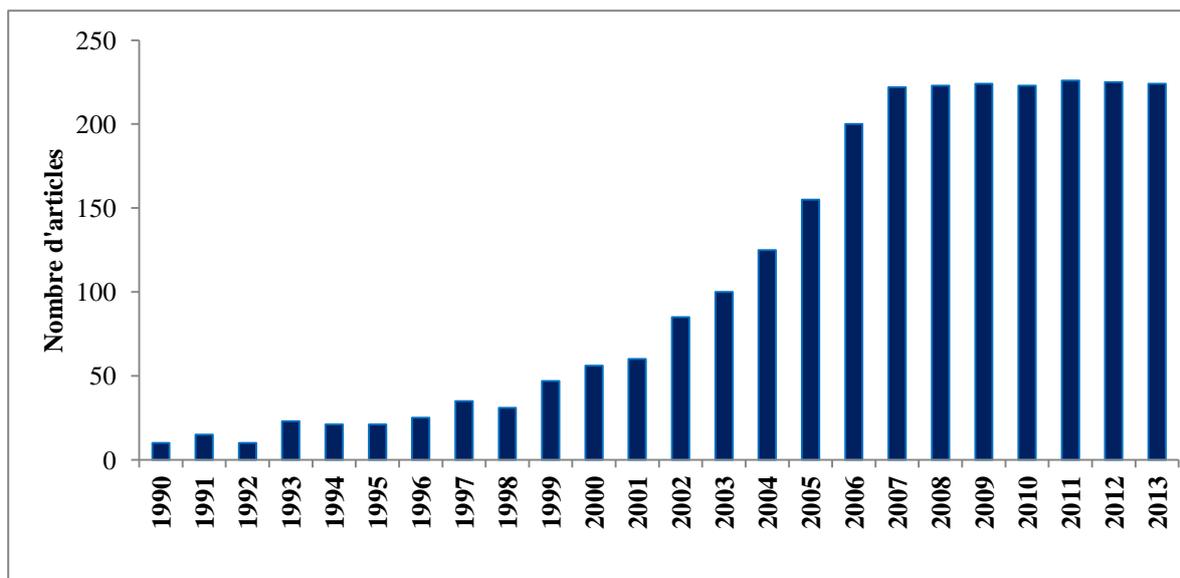


Figure I - 1 : Répartition du nombre des articles publiés sur la contamination de l'environnement par des molécules pharmaceutiques sur les 24 dernières années.

Le milieu aquatique est exposé depuis plus de 70 ans aux antibiotiques qui sont identifiés pour la première fois dans les eaux de surface du Royaume-Uni par Watts et son équipe (Watts et al, 1983). Ces composés proviennent aussi bien de la médecine humaine et vétérinaire, que du domaine agrochimique. Notons que le progrès de la médecine et de la pharmacologie ne cesse de donner naissance à de multiples substances antibactériennes qui peuvent intervenir dans la pollution de l'environnement. En conséquence, la popularité des antibiotiques a vite grandi et, durant les années 1970, ces substances étaient la classe de pharmaceutiques la plus prescrite aux Etats-Unis (Korolkovas, 1976). En 1997, le marché mondial des antibiotiques s'élevait à 17 milliards de dollars américains (Carbon et Bax, 1998). Nous estimons qu'entre 100 000 et 200 000 tonnes de ces substances sont consommées annuellement dans le monde entier (Wise, 2002). La présence de ces molécules dans les eaux usées et les effluents des stations d'épuration ainsi que dans les milieux récepteurs (Hilton et Thomas, 2003 ; Brown et al, 2006) paraît préoccupante, en raison de la toxicité directe de nombreuses molécules ou des effets cumulatifs ou synergiques avec d'autres composés pharmaceutiques (Pomati et al, 2008) ou d'autres classes de polluants. En plus l'emploi non maîtrisé des antibiotiques contribue au phénomène de l'émergence et de la propagation des souches bactériennes multi-résistantes. Cependant, ces effets sont signalés par la présence de ces composés dans différents cours d'eau comme les effluents des usines pharmaceutiques et des hôpitaux (Goni-Urriza et al, 2000). Par conséquent, cette exposition entraîne des maladies infectieuses de moins en moins facile à traiter. Il est intéressant de noter une sensibilité particulière du grand public à cette problématique que certains auteurs attribuent au fait que

chacun ayant conscience d'utiliser des antibiotiques, se sent concerné par leur présence indésirable dans l'environnement (Aga, 2008). D'après Glassmeyer et al, (2008) dans les six premiers jours de publication du rapport de l'USGS en 2002 sur la présence des antibiotiques dans l'eau, 72 journaux nord-américains rapportaient cette étude, ainsi que de nombreuses chaînes de radio et de télévision régionales et nationales. Cet impact médiatique relativement fort pour un sujet très technique, régulièrement alimenté par des publications scientifiques, ne s'est pas démenti depuis les années 2000. Il a connu un nouvel épisode relativement intense aux Etats-Unis au cours de l'année 2008 (AP, 2008), confirmant que l'une des spécificités de cette problématique était la réceptivité de la part du public et des relais d'information et une certaine forme d'inquiétude quant aux possibles effets.

D'autre part, les études sur l'occurrence des antibiotiques dans l'environnement ont été poussées en vue de la disponibilité de techniques d'analyse assez sensibles et particulières telles que la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC-MS) (Ternes et al, 2004). En effet, l'intérêt est naissant non pas à cause de la négligence de la communauté scientifique, mais plutôt à cause de son incapacité à détecter leur présence (Daughton, 2004a). C'est entre les années 1990 et 2000 que des méthodes sensibles d'analyse de traces sont publiées (Golet et al, 2001; Lindsey et al, 2001). Les limites instrumentales de détection de la LC-MS sont abaissées d'un facteur de  $\sim 10^4$  (Barceló et Petrovic, 2007). Cette nouvelle préoccupation est le résultat de deux phénomènes : l'émergence d'outils analytiques pour doser ces traces d'une part et l'apport de preuves scientifiques d'effets biologiques même à de très faibles doses d'autre part (Halling-Sorensen et al, 1998). Ces données illustrent les capacités sans cesse améliorées des méthodes modernes d'analyse capables de mesurer des concentrations à des niveaux de plus en plus faibles dans différents milieux (Capdeville, 2011).

Finalement, les études environnementales sur les molécules d'antibiotiques se répartissent alors selon différents thèmes de recherche. Le développement de techniques et de protocoles analytiques demeure une nécessité pour connaître leurs concentrations dans le milieu et pour étudier leur devenir. C'est ainsi que des observations sont faites pour évaluer leurs toxicités et le risque environnemental et sanitaire qu'elles représentent.

## **1.2. Classification, mode d'action et utilisation**

Les antibiotiques appartiennent à une classe de médicaments très prescrits car ils luttent contre les infections bactériennes. Ce sont des substances capables d'inhiber à petites doses la croissance ou la survie de nombreux microbes sans affecter l'hôte. Ces substances montrent

alors une toxicité sélective puisqu'elles empêchent le déroulement de certains processus vitaux des microorganismes sans être nocives pour les cellules des macro-organismes (Walsh, 2003). Ils sont d'origine naturelle comme la benzylpénicilline, semisynthétiques, comme l'azithromycine, dérivée de l'érythromycine ou complètement synthétiques comme le sulfaméthoxazole (Katz et Ashley, 2005).

En médecine humaine 60% environ des antibiotiques sont prescrits pour des infections d'appareil respiratoire supérieur même si, dans leur grande majorité, celles-ci sont provoquées par des virus. En 2003, les traitements mondiaux par les antibiotiques représentent un chiffre d'affaire de 30,8 milliards de dollars soit 6,6% du marché pharmaceutique (données IMS Health). Près de la moitié des antibiotiques consommés dans le monde sont utilisés pour soigner des animaux malades, ou comme promoteur de croissance et aussi parfois pour détruire divers agents pathogènes dans les aliments (Levi, 2006). Une enquête postale a été menée en France en 2007 auprès des éleveurs de bovins afin de décrire les principales molécules antibiotiques utilisées et leurs conditions d'utilisation. Dans cette enquête, il a été observé que plus de 80 % des traitements antibiotiques étaient destinés à un seul animal, et près de la moitié concernait des animaux laitiers, les animaux allaitants et les veaux étant représentés à parts égales autour de 20 %. Les traitements antibiotiques concernaient principalement des problèmes liés à la mamelle (37 %) et dans une moindre mesure des problèmes locomoteurs (14 %) (Cazeau et al, 2010). Les aminoglycosides, pénicillines, tétracyclines et polypeptides étaient les quatre familles les plus représentées, utilisées respectivement dans 45 %, 42 %, 30 % et 27 % des traitements.

Le besoin de nouvelles substances dont les spectres d'activités sont plus larges ainsi que l'apparition de micro-organismes résistants aux antibiotiques encourage la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques. Notons que la prolifération de la résistance antibactérienne fait diminuer l'efficacité des premières substances découvertes, en les rendant parfois inopérantes (Bryskier, 2005).

La classification des antibiotiques est basée soit sur le spectre bactérien (étroit, général), soit sur le chemin d'administration (oral, injectable) ou encore sur l'activité (bactériostatique, bactéricide), mais du point de vue analytique, la classification par structure chimique est la plus utilisée (Petrovic, 2007).

### ***1.2.1. Mode d'action de différentes familles des antibiotiques***

Actuellement, il existe un grand nombre d'antibiotiques dont les modes d'action sont variés. En effet, ils agissent de manière spécifique sur les bactéries, en bloquant en étape essentielle de leur développement. Certains opèrent sur la paroi ou la membrane cytoplasmique des

bactéries provoquant ainsi leur destruction. D'autres modifient le métabolisme de l'ADN ou de l'ARN bactérien, la synthèse protéique ou la respiration cellulaire, ou agissent à la fois de plusieurs façons (Gauthier, 1993).

On regroupe souvent les familles des antibiotiques selon leur mode d'action. D'autre part, certains antibiotiques sont bactéricides, c'est-à-dire qu'ils détruisent la bactérie, tandis que d'autres, bactériostatiques, l'empêchent simplement de se multiplier (Gauthier, 1993). L'activité bactériostatique des sulfonamides perturbe efficacement la synthèse d'acide folique dans les organismes susceptibles. L'action bactéricide des aminoglycosides consiste à perturber la synthèse de certaines protéines bactériennes. Les tétracyclines, sont bactériostatiques : elles inhibent la synthèse des protéines de la membrane cellulaire bactérienne (Chopra et Roberts, 2001)

### 1.2.2. Utilisation et propriétés de principales familles des antibiotiques

Les propriétés des principales familles des antibiotiques sont présentées ci-dessous :

- Les sulfonamides, dérivés de sulfanilamide, sont utilisés pour le traitement des infections par Streptocoque. Cette famille est utilisée largement en médecine humaine mais aussi dans la nourriture des animaux pour prévenir des maladies infectieuses (Turnipseed et Andersen, 2008). Il est démontré que la substitution d'un hydrogène sur le groupement aminosulfonyle par certains groupements fonctionnels augmente son activité antimicrobienne (Veyssier et Bryskier, 2005). Les structures de plusieurs molécules de cette famille sont présentées dans la Figure 1- 2.

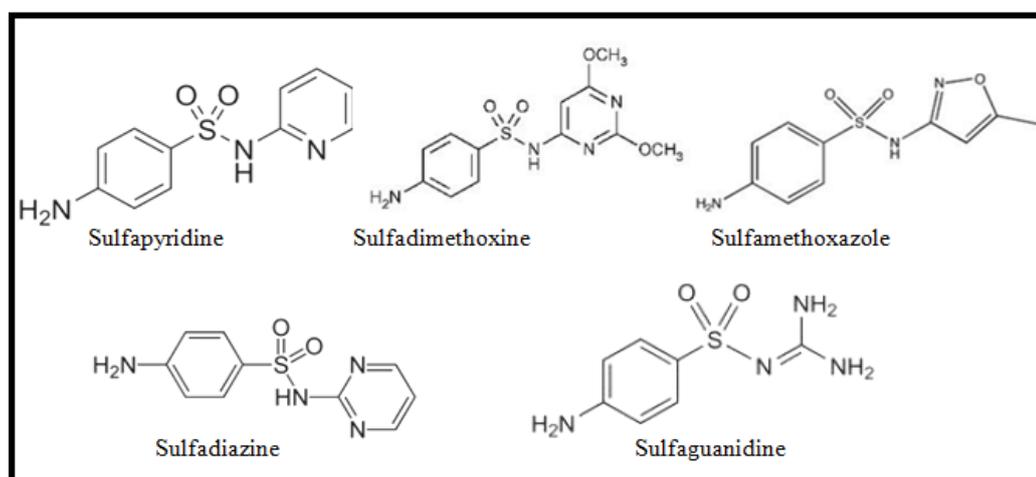


Figure I-2 : Structure de Sulfonamides les plus mentionnées dans la littérature environnementale (Stoob et al, 2005 ; Choi et al, 2007 ; Bing et al, 2009)

- Les  $\beta$ -lactamines comportent plusieurs sous-classes telles que les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Les pénicillines et les céphalosporines sont les plus utilisées. Ainsi ils se différencient par le cycle attaché à l'anneau azetidone (anneau  $\beta$ -lactam): pour les pénicillines un pentacycle (thiazolidine) et pour les céphalosporines un hexacycle insaturé (dihydrothiazine) (Bryskier, 2005a). Les  $\beta$ -lactamines les plus mentionnées dans la littérature environnementale apparaissent dans la Figure 1-3.

Actuellement les céphalosporines, avec les pénicillines et les autres  $\beta$ -lactamines, représentent entre 50 et 70% de la consommation humaine des antibiotiques dans nombreux pays (Kummerer, 2009). En revanche, la benzylpénicilline est un exemple d'un antibiotique des  $\beta$ -lactamines utilisé historiquement dans la médecine vétérinaire. Beaucoup de  $\beta$ -lactamines approuvées comme médicaments vétérinaires sont basées sur la molécule de la pénicilline, incluant ampicilline, amoxicilline et cloxacilline. En effet, elles sont efficaces pour lutter contre les infections respiratoires et intestinales chez le bétail. Elles sont aussi administrées au porc et dans quelques pays sont autorisées pour être utilisées dans les fermes d'élevage aquacoles (Turnipseed et Andersen, 2008).

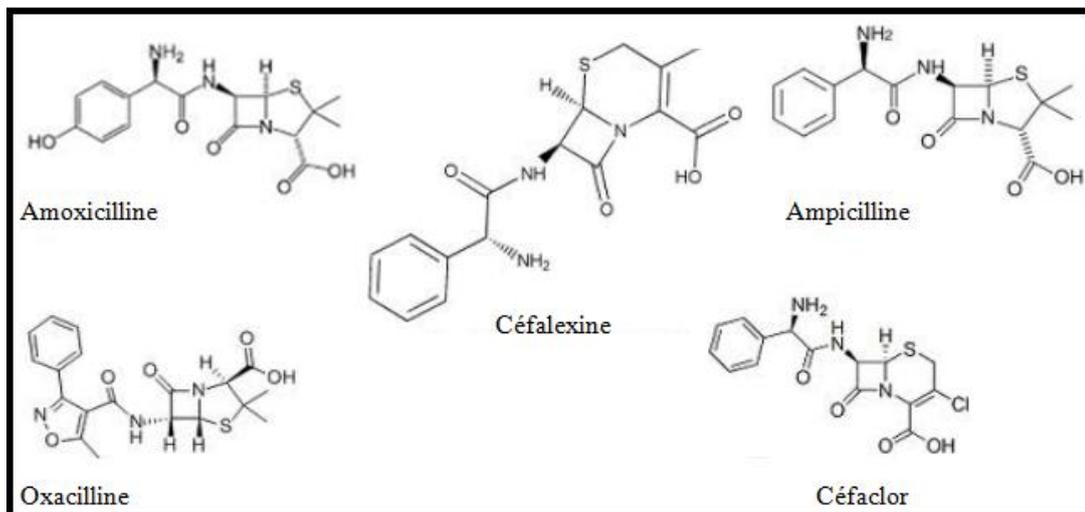


Figure I-3 : Structure de  $\beta$ -lactamines les plus mentionnées dans la littérature environnementale (Benito-Pena et al, 2006 ; Bing et al, 2009).

- Les Aminoglycosides sont des antibiotiques efficaces pour les traitements humains et vétérinaires contre la plupart des bactéries aérobies à gram-négatif et positif qui diffèrent par la constitution de leur paroi bactérienne (Isoherranen et Soback, 1999). Ils sont isolés de l'espèce *Streptomyces* ou *Micromonospora*. Ils sont actifs contre certains bacilles à Gram négatif, en particulier les entérobactéries et *Pseudomonas*

*aeruginosa*. La streptomycine découverte en 1944 est utile pour traiter la tuberculose résistante aux traitements habituels, la spectinomycine combat les infections résistantes à gonocoques, responsable de la *gonorrhée*, et la paromomycine est employée contre certaines *amibes* et le *Cryptosporidium*.

La plupart d'entre eux (Figure 1-4) sont constitués d'un noyau central commun de 2-déoxystreptamine et de glucosamine. La plupart de leurs molécules utilisées en médecine humaine comporte d'autres sucres aminés, substitués soit en position 4, soit en position 5 du cycle désoxystreptamine (Stead. D, 2000). Les plus importantes sous-classes d'aminoglycosides sont :

- 1- Les 4,6 disubstitués, tels que la kanamycine, la gentamicine ou l'amikacine.
- 2- Les 4,5 disubstitués, tels que la néomycine.

Certain nombre de ces molécules actuellement utilisées en médecine humaine est produites par hémisynthèse à partir d'un antibiotique naturel de première génération. C'est le cas de l'amikacine, une forme alkylée de la kanamycine, où l'une des deux fonctions amines de la désoxystreptamine est modifiée chimiquement. Cette modification permet à l'amikacine d'échapper à un certain nombre de mécanismes bactériens de résistance. En raison de leurs effets toxiques (néphrotoxicité et ototoxicité), les aminoglycosides doivent être évités pendant la grossesse (Drusano et al, 2007). Ils ne sont pas administrés oralement mais par injection intramusculaire. Ce sont des antibiotiques à usage quasi exclusivement hospitalier, et qui paraissent particulièrement utiles de par leur spectre et leur vitesse d'action dans le traitement des infections sévères ou à germes multirésistants. Ils sont utilisés parfois en combinaison avec les  $\beta$ -lactamines dans des cas très graves. Leurs résidus se concentrent dans le rein et sont donc excrétés généralement inchangés par l'urine (Seifrtova, 2009 ; Turnipseed et Andersen, 2008).

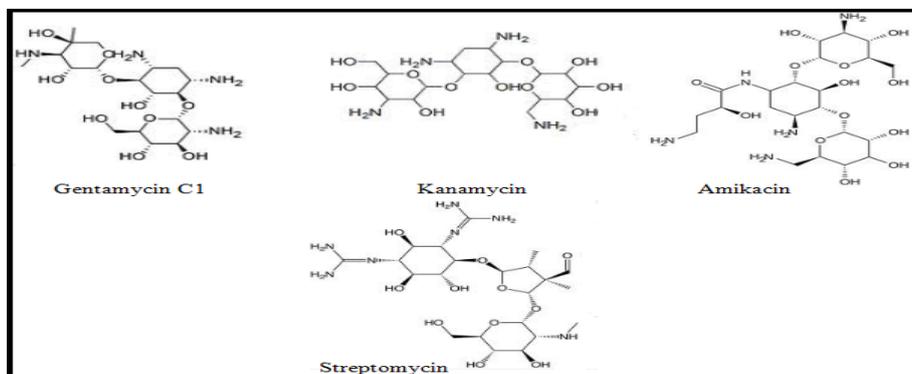


Figure I-4 : Structure de quelques Aminoglycosides les plus utilisés en médecine vétérinaire (Kaufmann et al, 2011).

- Les Tétracyclines (Figure 1-5) ont été isolées à l'origine dans des souches de Streptomyces. Dans le secteur de l'élevage, les tétracyclines sont parmi les antibiotiques les plus utilisés (Sarmah et al, 2006). Les tétracyclines sont encore utilisées pour le traitement de la gastrite et des ulcères peptidiques causés par Helicobacter pylori, le cholera, l'acné et certaines infections génitales. Elles sont actives contre les bactéries Gram positif tels que *S. pyogènes*, et aussi celles du Gram négatif telles que *N. gonorrhoeae* et *H. influenzae*. Cependant, leur utilisation tend à diminuer à cause de l'apparition de souches bactériennes résistantes, et elles sont alors substituées par d'autres familles plus efficaces (Chopra et Roberts, 2001; Chopra, 2003). Les molécules de tétracyclines les plus utilisées en santé animale sont la tétracycline, l'oxytétracycline, et la chlortétracycline. Aux Etats-Unis, ces médicaments sont approuvés pour le bétail : bœuf, veau, porc, mouton, poulet et dinde. Il faut signaler aussi que l'oxytétracycline est approuvée spécifiquement pour l'usage en bétail de laiterie et en aquaculture du poisson-chat, du saumon et du homard mais interdit en aquaculture de la crevette (Turnipseed et Andersen, 2008).

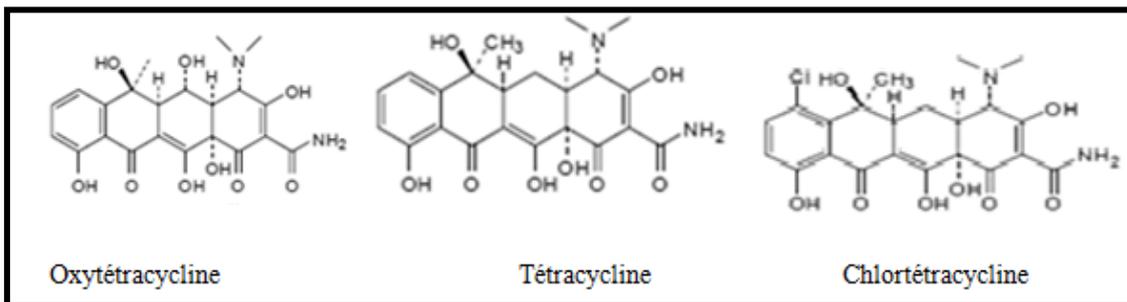


Figure I-5: Structure de deux Tétracyclines les plus utilisées en médecine humaine et vétérinaire (Abbasi et al, 2012).

- Les macrolides dont le terme est une abréviation de « antibiotiques à macrolactone hétéroside », ont été isolés à l'origine de Streptomyces. Ils sont formés par un hétérocycle oxygéné lié à un ou plusieurs désoxyoses (Figure 1-6) (Katz et Ashley, 2005). Le premier macrolide introduit pour des utilisations cliniques, l'érythromycine, a été découvert par les chercheurs de la société Eli Lilly vers le début des années 1950 et a servi de piste pour le développement de la classe des macrolides (Bryskier et Bergogne-Bérézin, 2005). Ils sont utilisés pour traiter les infections urogénitales, mais aussi des voies respiratoires supérieures et inférieures, de la peau, et des tissus mous, entre autres (Bryskier et Butzler, 2003). Le spectre d'activité des macrolides inclut les bactéries Gram positif, les coccus et bacilles Gram négatif, les bactéries anaérobies et les spirochètes. Ils sont aussi très efficaces sur plusieurs types de Listeria et de

Mycoplasma. L'érythromycine et la tylosine sont notamment très utilisées dans la nourriture des animaux. Oléandomycine, Spiramycine, Sedamycine et Tilmicosine sont aussi utilisées en élevage pour le traitement des infections respiratoires des bovins et également comme additif alimentaire pour augmenter l'efficacité de la production animale (Turnipseed et Andersen, 2008).

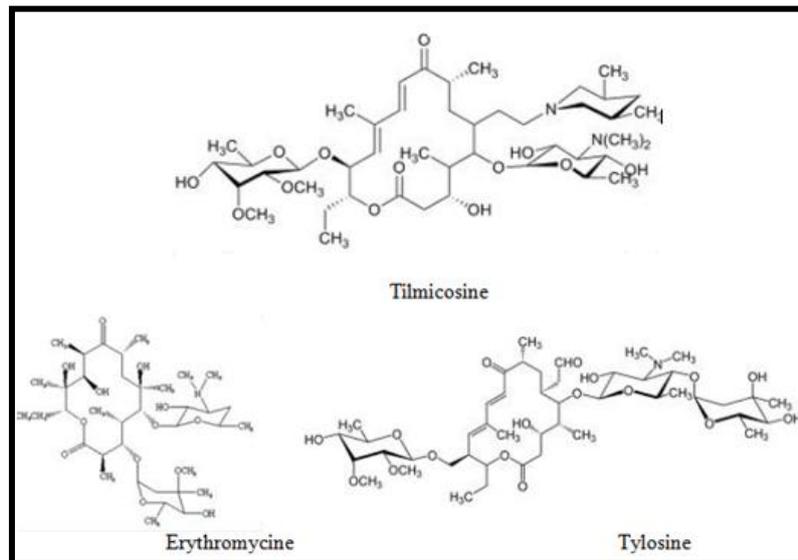


Figure I-6 : Structure de quelques Macrolides retrouvés dans l'eau environnementale (Ding et al, 2009).

- En 1960, la modification chimique de la chloroquine, découverte par Leshner et ses collaborateurs, contribue à la découverte de l'acide nalidixique qui a été la molécule pivot de la famille des quinolones (Bryskier, 2005b; Mitscher, 2005). Les quinolones sont souvent prescrites pour le traitement de différents types d'infections: gastro-intestinales, gynécologiques, urinaires, des voies respiratoires supérieures et inférieures, de la peau, des os et des tissus mous. De plus, elles sont utilisées pour le traitement des maladies transmissibles sexuellement et la prostatite (Mitscher, 2005). En outre, elles sont reconnues pour être efficaces en traitement prophylactique sur des espèces animales en aquaculture et en élevage du porc et de la volaille. Les fluoroquinolones, un sous groupe des quinolones, ont été introduites plus tard lors de la découverte de la norfloxacine, un dérivé possédant un atome de fluor en position 6 et un groupement piperazinyle en position 7, et étant 10 à 100 plus active que l'acide nalidixique (Bryskier, 2005b). Elles inhibent l'activité des bactéries à gram-positif. Sarafloxacin, enrofloxacin, difloxacin, ciprofloxacine, norfloxacine et ofloxacine sont juste quelques exemples de fluoroquinolones. Il y a des inquiétudes croissantes dans l'usage irraisonné de ces

antibiotiques dans la nourriture d'origine animale du fait de problèmes de résistance antibactériennes associés à cette sous-classe d'antibiotiques (Turnipseed et Andersen, 2008). La Figure I-7 représente les molécules les plus connues de cette famille.

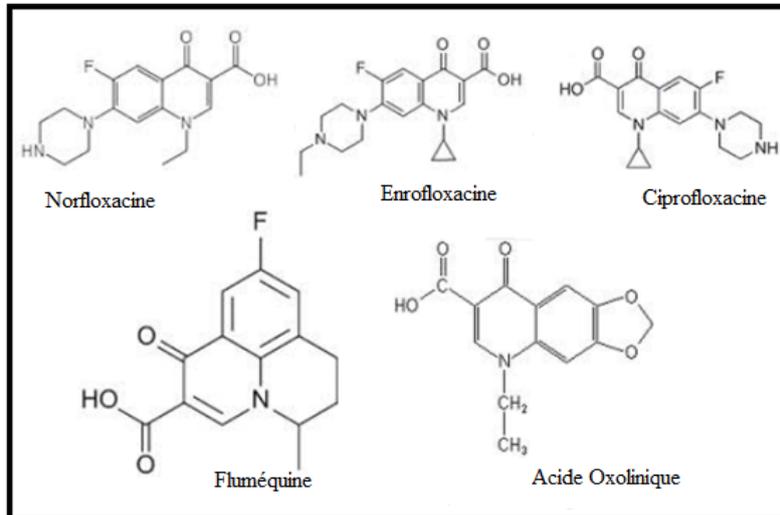


Figure I-7 : Structure de plusieurs Quinolones retrouvés dans l'eau environnementale (Tamtam et al, 2009).

- Pour la première fois, des chercheurs américains isolent un peptide antibiotique produit par les cellules mastocytes d'un poisson : la piscidine. Les peptides sont un mélange qui sont produire par le *Bacille Streptomyces*. Cette famille est utilisée en médecine vétérinaire et inclue la bacitracine, la colistine, la virginiamycine et l'avoparcine. Elles sont ajoutées dans la nourriture des animaux pour promouvoir leur croissance. Il y a des inquiétudes concernant la résistance antibiotique des glycopeptides à cause de leur ressemblance structurelle avec certains médicaments humains. Cependant, l'usage de la colistine (Figure I-8) s'est répandu au cours des dernières années avec l'apparition de bactéries à Gram négatif multirésistantes. En pratique hospitalière, cet antibiotique initialement abandonné en raison d'une toxicité supposée, revient en première ligne pour le traitement des infections à *Actinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants (Frasca et al, 2008).

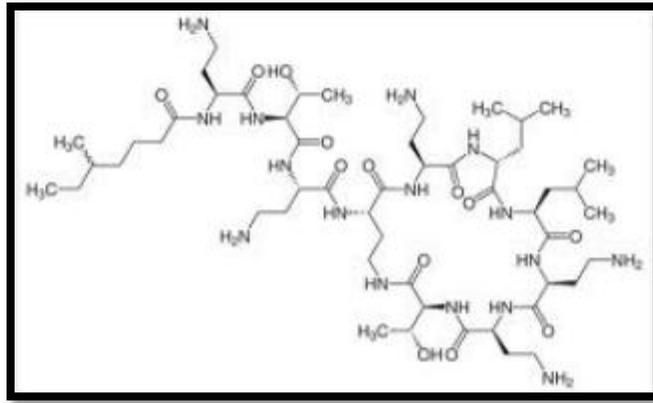


Figure I-8 : Structure de la Colistine.

### 1.3. Propriétés physico-chimique des principales familles

Les antibiotiques peuvent dans certains cas persister longtemps dans les matrices solides de l'environnement. Cette persistance dépend de leur photostabilité, de leurs liaisons chimiques et de leurs capacités d'adsorption, du taux de dégradation et de leur aptitude au lessivage dans l'eau. Chaque famille possède différentes structures moléculaires et des groupes fonctionnels variés, ceci leur confère diverses propriétés physico-chimiques. Ces propriétés sont évaluées afin de déterminer les paramètres optimaux pour l'extraction, la séparation et la détection des niveaux de résidus présents dans l'environnement (Petrovic, 2007).

Par adsorption, certains antibiotiques ont tendance à s'accumuler dans les sols ou les sédiments comme les tétracyclines et les fluoroquinolones. Par contre, d'autres antibiotiques très mobiles comme les sulfonamides ont la possibilité de résister à la dégradation et d'avoir une tendance à se transporter vers les eaux de drainage et de ruissellement des eaux de surface et subir un lessivage vers les eaux souterraines. D'où la formation des complexes entre l'antibiotique et les ions métalliques présents tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Al}^{3+}$ . La complexation est importante pour différentes familles d'antibiotiques: les tétracyclines, les fluoroquinolones et les macrolides; ce qui augmente leur persistance dans l'environnement (Seifrtova, 2009 ; Petrovic, 2007).

Les  $\beta$ -lactamines incluant les pénicillines et les céphalosporines ont un noyau  $\beta$ -lactam instable chimiquement qui subit facilement une hydrolyse; pour cela ils ne sont pas souvent détectés dans l'eau environnementale (Seifrtova, 2009).

Les sulfonamides contiennent un groupe amine basique ( $-\text{NH}_2$ ) et un groupe amide acide ( $-\text{SO}_2\text{NH}-$ ). Ce sont des ampholytes avec des faibles caractères de base et d'acide. Le groupe amine est en mesure d'obtenir un proton, tandis que l'amide est un groupe capable de libérer des protons dans des conditions de pH spécifiques (Babic et al, 2007). Comme le montre la

Figure I-9,  $K_{a,1}$  est la constante de dissociation de l'équilibre entre la charge positive du groupe amine d'un sulfonamide et sa base conjuguée neutre, alors que  $K_{a,2}$  se réfère à un équilibre impliquant la perte d'un proton du sulfonamide pour donner le conjugué chargé négativement (Qiang et al, 2004).

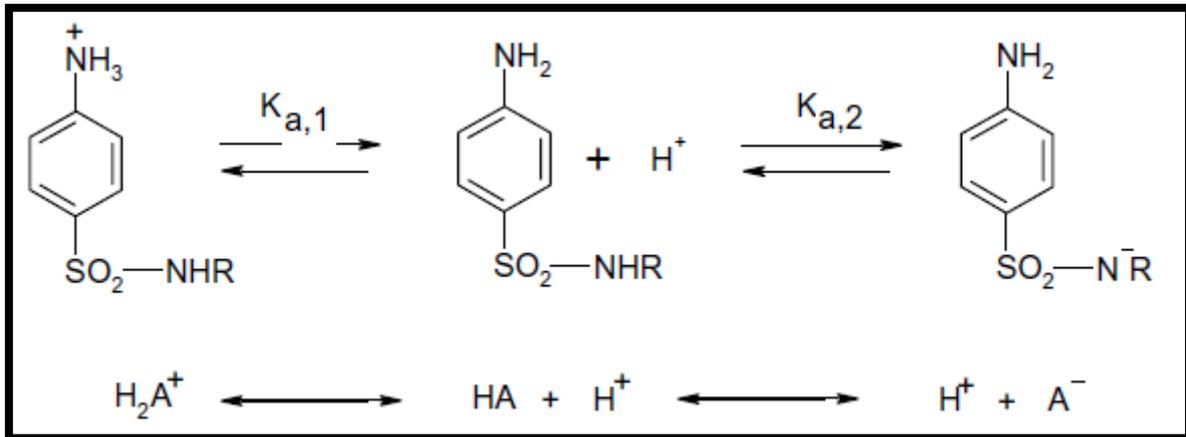


Figure I-9 : Equilibre de dissociation des sulfonamides.

Cette famille ne forme pas de complexe avec les cations polyvalents, donc l'ajout d'EDTA n'est pas nécessaire lors de la préparation des analyses des échantillons d'eau (Petrovic, 2007).

Les tétracyclines possèdent trois pKa (3, 8 et 9). Ce sont des zwitterions dans la zone de pH allant de 3 à 9. Ainsi l'ajustement du pH demeure nécessaire lors de l'analyse de cette famille. Ce sont des amphotères et la plupart d'entre eux ont une forte tendance à être liés irréversiblement au groupe silanol dans les phases stationnaires à base de silice. L'addition d'EDTA est réalisée dans la majorité des méthodes d'extraction pour empêcher les tétracyclines de se lier aux ions divalents et par suite pour accroître le rendement d'extraction (Seifrtova, 2009).

Les macrolides contiennent tous un groupe basique, diméthylamine [ $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ]. Ainsi, selon leurs structures chimiques, ce sont des composés basiques possédant un pKa autour de 8. Le milieu acide favorise la dégradation de l'érythromycine, qui se convertit immédiatement en un seul produit de dégradation suite à la perte d'une molécule d'eau (ERY- $\text{H}_2\text{O}$ ). En conséquence, la détection de cette molécule se focalise sur son produit de dégradation. L'ERY- $\text{H}_2\text{O}$  est quantifié dans plusieurs études, en supposant que l'ERY est convertie totalement en ERY- $\text{H}_2\text{O}$ . L'addition d'EDTA est recommandée car il est démontré que les macrolides peuvent se lier aux ions divalents et polyvalents mais d'une façon moins marquée que les tétracyclines ou les fluoroquinolones (Seifrtova, 2009).

Les quinolones contiennent un groupe carboxyle qui rend ces composés acides. En plus, la seconde génération (fluoroquinolones) contient un groupe amine porté par le noyau

hétérocyclique (piperazinyl). Alors ce groupe se divise en deux sous groupes selon les propriétés physico-chimiques. Ces composés acides possèdent un seul pKa (6-6,9) générant en milieu acide leur forme neutre. Par contre, le piperazinyl quinolone possède deux pKa (5,5/6,3 – 7,6/8,5), de fait en milieu acide il revêt sa forme cationique. L'addition d'EDTA demeure nécessaire puisqu'elle forme des complexes neutres avec les anions des fluoroquinolones.

Les aminoglycosides comprennent deux ou trois sucres aminés liés par une liaison osidique. Le monosaccharide central est un hexose (noyau aminocyclitol). Le groupe amine contribue à leur nature basique et le groupe hydroxyle à leur haute solubilité en milieu aqueux et à leur faible solubilité dans les lipides (Gentili, 2005).

## 1.4. Cycle biogéochimique

### 1.4.1. Origine, source et transport

Les sources d'antibiotiques dans l'environnement aquatique sont très diverses (Figure 1-10). Cependant, il est reconnu que les sources principales de ces substances dans l'environnement sont les excréments des personnes ou des animaux d'élevage (Hirsch et al, 1999; Golet et al, 2002). Il est important d'identifier, de manière quantitative et qualitative, les principales sources de contamination et les voies prédominantes d'introduction de ces composés pharmaceutiques dans l'environnement.

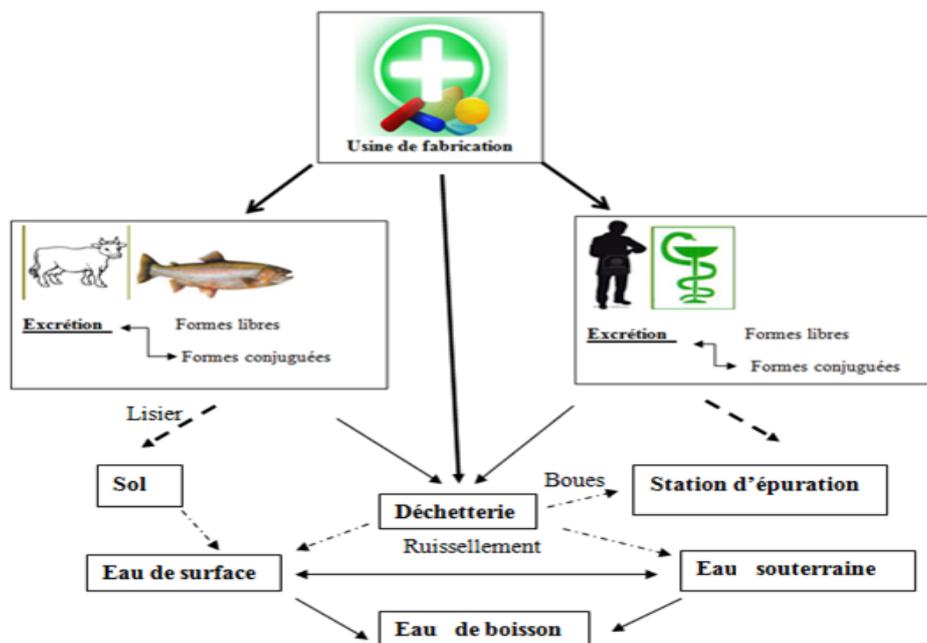


Figure I- 10 : Les diverses sources d'entrée des antibiotiques dans l'environnement aquatique.

Lorsqu'un individu consomme un antibiotique, une partie de cette substance est éliminée par les voies d'excrétion (urine, fèces) sans être métabolisée (Cooper et al, 2008). Une partie importante de la dose ingérée se retrouve dans les eaux usées domestiques ou des hôpitaux (dans les cas de la consommation humaine), ou dans les eaux usées agricoles et le fumier (dans le cas de la consommation animale). Par conséquent, les deux voies de contamination majeures sont la voie urbaine et la voie agricole. Généralement, ces deux voies se différencient principalement par la manière dont les eaux contaminées sont rejetées dans l'environnement. D'après les connaissances actuelles, la présence naturelle d'antibiotiques dans l'environnement, due à la production des antibiotiques par les bactéries du sol, peut être négligée. Leurs contributions dans les eaux de surface doivent être davantage négligeables étant donné la faible densité des bactéries dans ces matrices par rapport aux sols (Kummerer, 2009). Le transport des antibiotiques dans la phase aqueuse est affecté par d'autres facteurs que l'hydrophobie; parmi les plus importants se retrouvent l'échange cationique, la formation de liaisons hydrogènes et la complexation. Pour ces raisons leur comportement dans l'environnement ne peut pas être prédit facilement par la constante de partition octanol-eau ( $\log K_{ow}$ ) (Tolls, 2001).

Dans la voie urbaine, les eaux contenant les antibiotiques excrétés sont généralement conduites par les égouts vers les stations d'épuration des eaux usées (STEP). Le but des techniques de traitement utilisées dans les STEP est de retirer les solides en suspension, d'évaluer et ajuster la demande biologique en oxygène, le phosphore total ainsi que l'ammoniaque (Ternes et al, 2004). Cependant, les STEP ne sont pas conçues pour éliminer les molécules d'antibiotiques ou d'autres contaminants chimiques émergents et, par conséquent, ceux-ci sont déversés en presque totalité ou partiellement dans les cours d'eau. Il s'agit alors d'une source ponctuelle de contamination, puisque les antibiotiques sont rejetés dans un endroit précis. Dans les STEP, les antibiotiques sont partiellement éliminés des eaux usées, cependant ils se retrouvent alors dans les boues d'épuration (Golet et al, 2003). L'épandage de ces boues sur les sols agricoles donne lieu à une autre voie de transport des antibiotiques dans l'environnement. Les antibiotiques qui ne sont pas éliminés par les STEP rejoignent les eaux de surface avec des concentrations variables. La présence d'antibiotiques dans l'eau potable résulte de la contamination des captages d'eau et illustre la mobilité de ces composés dans l'environnement aquatique.

Les hôpitaux sont considérés comme une des sources majeures de rejet d'antibiotiques dans la voie urbaine (Gómez et al, 2006), cependant des études récentes (Kummerer, 2009) indiquent que l'impact des hôpitaux n'est pas aussi élevé qu'attendu puisque l'usage communautaire

représente plus de deux tiers de la consommation totale dans plusieurs pays (70% dans le Royaume-Uni, 75% dans les États-Unis et 75% en Allemagne) et les concentrations reportées sont souvent similaires ou inférieures à celles trouvées dans les STEP.

Dans l'Union européenne et en Suisse plus de 4000 tonnes d'antibiotiques vétérinaires ont été utilisées en 1999 et aux États-Unis plus de 11 000 tonnes en 2001 (Kemper, 2008; Kummerer, 2009). Dans la voie agricole, les antibiotiques utilisés à des fins thérapeutiques, prophylactiques ou pour l'augmentation de la croissance chez les animaux d'élevage sont excrétés sous leur forme active à des taux pouvant aller jusqu'à 95% de la dose administrée (Sarmah et al, 2006). Dans les fermes, les excréments des animaux sont souvent stockés dans des lagunes de rejet ou d'autres structures d'entreposage de fumier et ensuite appliquées comme fertilisants sur les sols agricoles (Boxall, 2004). Les antibiotiques peuvent alors être drainés des sols aux eaux de surface par ruissellement ou encore s'écouler dans les eaux souterraines par percolation (Lee et al, 2007). Les phénomènes de ruissellement vont alors entraîner une remobilisation des composés pharmaceutiques (Pedersen et al, 2003 ; Pedersen et al, 2005) vers les milieux aquatiques, notamment les eaux de surface, mais aussi, indirectement dans les eaux souterraines.

Les antibiotiques sont aussi utilisés pour le contrôle des infections chez les plantes et pour les abeilles (Kummerer, 2009). Cependant, la contribution de cette voie de contamination n'est encore que peu documentée.

Dans les aquacultures et les maricultures, les antibiotiques sont administrés aux animaux d'élevage par la nourriture. Ces substances sont alors introduites directement dans l'environnement aquatique par la nourriture non consommée ou par les excréments des animaux. Les antibiotiques libérés peuvent aussi se déposer dans les sédiments et être ensuite relargués dans l'eau (Cabello, 2006). Le transport des antibiotiques vers les milieux récepteurs diffuse et c'est pour cette raison que les zones agricoles sont considérées comme des sources de contamination non-ponctuelles (Ternes et Joss, 2006).

Les antibiotiques peuvent aussi être captés dans les eaux souterraines par l'écoulement à partir des produits associés aux rejets domestiques solides dans les sites d'enfouissement. Cette voie de transport, considérée comme une voie mineure (Boxall, 2004), ne doit pas être négligée, surtout lorsqu'on considère qu'une proportion significative de la population des États-Unis (54%) et du Royaume-Uni (71%) éliminent les médicaments inutilisés en les jetant à la poubelle (Bound et Voulvoulis, 2005).

La fabrication et le conditionnement des médicaments ne sont pas les sources de contamination les plus importantes ; néanmoins, aux emplacements dédiés aux rejets de ces

usines, les concentrations sont extrêmement importantes et contribuent de façon majoritaire à la pollution (Larsson et al, 2007 ; Phillips et al, 2010). La production naturelle de ces molécules par les végétaux ou les bactéries, comme pour les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines ou la streptomycine par exemple, est minoritaire dans les sols et n'est jamais mise en évidence dans les systèmes aquatiques (Kümmerer, 2009). Les formes, sous lesquelles ces molécules sont retrouvées dans le milieu aquatique, sont très variables. En effet quand il y a épandage direct dans les fermes aquacoles, quand ils sont rejetés par les usines de production ou quand ils sont excrétés sans avoir subi de transformation métabolique, les composés se retrouvent sous leurs formes natives. De plus, quand ils proviennent des usines de production, leurs précurseurs, issus des déchets intermédiaires de la chaîne de production, peuvent également être observés dans les rejets et donc dans l'environnement (Velagaleti, 1997). Quand au contraire ils sont métabolisés dans le corps ou bio-transformés par les bactéries dans les STEP, ce sont leurs métabolites qui sont rencontrés dans l'environnement. Ces derniers peuvent alors être des molécules bien différentes des composés parents et ont leur propre comportement et influence sur le milieu et les organismes. Dans d'autres cas, ils sont sous formes conjuguées et peuvent retrouver leur forme native lors des processus de biodégradation/biotransformation.

#### ***1.4.2. Occurrence dans les eaux environnementales***

Le rejet des antibiotiques et de leurs métabolites conduit à leur accumulation dans le milieu aquatique. La recherche sur l'occurrence des antibiotiques démontre la présence de ces substances dans les eaux usées, les eaux de surface, les eaux souterraines (Clara et al, 2004 ; Rabiet et al, 2006 ; Schulte-Oehlmann et al, 2007 ; Barnes et al, 2008) et l'eau potable (Zuccato et al, 2000; Kolpin et al, 2002; Göbel et al, 2005) avec des quantités variables comme le tableau I-1 le montre.

Cette présence a été étudiée dans plusieurs pays tels que: le Brésil, (Stumpf et al, 1999), le Canada (Stumpf et al, 1999), l'Angleterre (Thomas et Hilton, 2004), la France (Ferrari et al, 2003), l'Allemagne (Heberer, 2002b), la Grèce (Koutsouba et al, 2003), l'Italie (Castiglioni et al, 2004), l'Espagne (Farré et al, 2001), la Suisse (Golet et al, 2002), la Suède (Andreozzi et al, 2003) et aux Etats-Unis (Kolpin et al, 2002).

Tableau I -1 : Présence des résidus des antibiotiques dans les plans d'eau dans plusieurs pays (Diaz- Cruz et Barcelo, 2004).

<b>Matrice</b>	<b>Molécules</b>	<b>Gamme de concentration</b>
Eau de Surface	Trimethoprim, dihydro-erythromycine, roxythromycine, clarithromycine, tétracycline, chlortétracycline, oxytétracycline, ionophore, sulfadiméthoxine, sulfaméthoxazole, sulfadiazine, N <sup>4</sup> -acetylsulfaméthoxazole	7 -15 ng L <sup>-1</sup>
Eau Souterraine	Chloramphenicol, sulfaméthoxazole, sulfadiméthoxine, sulfaméthazine, oxytétracycline, tétracycline, lincomycine, dihydro-erythromycine	0,05 – 1,4 µg L <sup>-1</sup>
Eau potable	Sulfaméthoxazole	<25 ng L <sup>-1</sup>
Station d'épuration (Effluents)	Sulfaméthoxazole, trimetoprim, N <sup>4</sup> -acethylsulfaméthoxazole, sulfadiazine, sulfacetamide, sulfisoxazole, sulfaméthazine, sulfapyridine, roxythromycine, ciprofloxacine, clarithromycine, azythromycine, ofloxacine, norfloxacine, chloramphenicol, dihydro-erythromycine, lincomycine, doxycycline, tétracycline, spiramycine, cephalaxine, amoxicilline, tylosine	10 - 6000 ng L <sup>-1</sup>
Eau hospitalier	Gentamycine, ciprofloxacine, sulfaméthoxazole, trimethoprim, doxycycline	0,4 - 125 µg L <sup>-1</sup>

Tel que mentionné antérieurement, la présence de ces composés dans les eaux est due à leur utilisation courante ainsi qu'à certaines de leurs propriétés (mobilité, non-biodégradabilité) qui permettent leur transport et leur dissémination en quantités suffisantes pour qu'elles soient détectées dans les systèmes aquatiques. Cependant, les antibiotiques vont aussi se retrouver dans l'environnement par l'effet de leur déversement continu. Les concentrations rapportées dans l'environnement font périodiquement l'objet de revues bibliographiques rassemblant un très grand nombre de résultats de mesure ponctuels (Christensen et al, 2009; Segura et al, 2009). La présence de ces composés a été également mise en évidence dans les eaux de boisson (Zwiener, 2007) comme le souligne Kuehn en 2008 dans le Journal de l'Association Américaine de Médecine «Traces of drugs found in drinking water: Health effects unknown, safer disposal urged». En France, une étude récente montre la présence de plusieurs antibiotiques dans les eaux de boisson (Rabiet et al, 2006; Togola et Budzinski, 2008), ce qui devient un problème très préoccupant au niveau de la santé publique.

Avec un grand nombre de données collectées, les eaux de surface et les eaux de rejets de station d'épuration (STEP) sont les matrices les plus analysées et pour lesquelles nous disposons du plus grand nombre d'information. Les composés pharmaceutiques sont identifiés pour la première fois dans les eaux usées par plusieurs chercheurs (Henschel et al, 1997 ; Stumpf et al, 1999).

Dans les eaux de surface, plusieurs antibiotiques sont aussi détectés comme les sulfonamides (Boxall et al, 2006). En 2002, Kolpin et al détecte des traces d'antibiotiques dans 139 sites d'eaux étudiés sur le territoire nord-américain.

Les antibiotiques les plus dosés sont le sulfaméthoxazole et le triméthoprim pour la famille des sulfonamides et la norfloxacine pour les fluoroquinolones. Le sulfaméthoxazole est le plus abondant de la famille des sulfonamides avec des concentrations maximales de  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  (Australie, Watkinson et al. 2009) et  $1,9 \mu\text{g L}^{-1}$  (U.S.A, Kolpin et al, 2002). En 2001, Lindsey et al détecte la concentration la plus élevée,  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ , pour la sulfadiméthoxine, aux U.S.A. Au sein des macrolides, l'érythromycine et la déhydroérythromycine sont les 2 composés quantifiés aux plus fortes concentrations de  $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$  (Kolpin et al, 2002). La ciprofloxacine ( $1,3 \mu\text{g L}^{-1}$ ) et la norfloxacine ( $1,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) sont les deux fluoroquinolones présentes à  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  dans les eaux de surface (Australie, Watkinson et al, 2009). L'oxytétracycline est l'antibiotique de la famille des tétracyclines présente à  $1,34 \mu\text{g L}^{-1}$  (U.S.A, Lindsey et al, 2001).

Les antibiotiques sont les composés les plus abondants dans les boues de STEP avec des concentrations dépassant fréquemment le  $1 \mu\text{g/g}$  en particulier pour les familles des macrolides (ex. : azithromycine  $5,2 \mu\text{g/g}$  (US EPA, 2009) ; tylosine  $4 \mu\text{g/g}$  (Nieto et al, 2007)) ; des fluoroquinolones (ex. ciprofloxacine  $97,5 \mu\text{g/g}$  (Thomas et al, 2007) ; ofloxacine  $58,1 \mu\text{g/g}$  (US EPA, 2009)) ou des tétracyclines (ex. : tétracycline  $5,27 \mu\text{g.L}^{-1}$  (US EPA, 2009) ; doxycycline  $5,09 \mu\text{g.L}^{-1}$  (US EPA, 2009)). L'efficacité du traitement est variable selon la nature du composé, les saisons et les techniques, entraînant une contamination importante et variable des effluents qui sont rejetés généralement dans les eaux de surface.

D'après les données bibliographiques, la ciprofloxacine, l'enrofloxacine, la norfloxacine et l'ofloxacine pour les fluoroquinolones et le sulfaméthoxazole et le triméthoprim pour les sulfonamides, sont les plus recherchées et les plus retrouvées dans les eaux usées brutes. Les concentrations les plus élevées sont celles de la ciprofloxacine ( $6,3 \mu\text{g L}^{-1}$  ; France, Mullot, 2009). Ainsi, malgré des traitements appliqués dans les STEP, les composés identifiés à l'entrée sont les mêmes à la sortie. Les  $\beta$ -lactamines ne sont que très peu détectées dans l'eau malgré leur consommation importante (Kümmerer, 2009). Si les données de Larsson et al, en

2007, sont exclues, les macrolides sont les plus abondants avec des concentrations comprises entre  $1 \text{ ng L}^{-1}$  et  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ . L'érythromycine, la roxithromycine, l'azithromycine et la clarithromycine sont les 4 molécules de cette famille les plus souvent recherchées et détectées. Les fluoroquinolones (ciprofloxacine, norfloxacine, ofloxacine, etc.) sont recensés dans les effluents des STEP à des concentrations allant de 10 à  $100 \text{ ng L}^{-1}$ . Le sulfaméthoxazole et le triméthoprim sont les sulfonamides les plus détectés dans les effluents des STEP avec des concentrations généralement aux alentours de  $100 \text{ ng L}^{-1}$  et des valeurs maximales, respectivement, de  $2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Allemagne, Hirsch et al, 1999) et de  $1,26 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Suède, Thomas et al, 2007). Quelques tétracyclines comme la chlortétracycline, l'oxytétracycline ou la doxycycline sont détectées aussi dans les eaux des STEP.

La source potentielle de rejets constituée par les effluents des industries productrices de médicaments est actuellement mal évaluée mais Larsson et al, en 2007, attirent l'attention sur cette problématique en révélant les résultats de mesures effectuées dans un contexte très particulier d'un site de production indien : la station d'épuration raccordée à 90 établissements de production pharmaceutique est à l'origine d'un rejet moyen quotidien de près de 45 kilogrammes de ciprofloxacine dans le milieu naturel.

Les antibiotiques sont une classe thérapeutique possédant aussi des plages de contamination étendues dans les eaux usées provenant d'hôpitaux. Les niveaux de concentrations sont variés et les valeurs maximales sont relevées pour la ciprofloxacine ( $101 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ; Suède, Lindberg et al, 2004), le triméthoprim ( $15 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ; Suède, Thomas et al, 2007) et le sulfaméthoxazole ( $12,8 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  ; Suède, Lindberg et al, 2004). La gentamicine est détectée dans les eaux usées d'hôpitaux en Allemagne avec des concentrations variant entre 0,4 et  $7,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Löffler et al, 2003). Cependant, il faut savoir que les concentrations varient fortement suivant le moment de la journée où le prélèvement est effectué (Lindberg et al, 2004).

Finalement, les études de la contamination des eaux souterraines sont encore peu nombreuses (Heberer, 2002b ; Sacher et al, 2001), notamment parce qu'elles restent difficiles à mettre en oeuvre, compte tenu des difficultés d'échantillonnage (accessibilité) et des méthodes possédant des limites de détection faibles sont nécessaires pour mesurer des concentrations de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$ . Le sulfaméthoxazole est le composé le plus recherché dans les eaux souterraines et pour lequel le plus d'informations est recueilli. Compte tenu des difficultés analytiques rencontrées quand il s'agit de doser des composés à des niveaux de l'ordre du  $\text{ng L}^{-1}$  dans le milieu marin, il n'existe que très peu d'études sur la présence des substances pharmaceutiques dans un tel milieu (Thomas et Hilton, 2004).

### *1.4.3. Dégradation en milieu aquatique*

Les antibiotiques sont souvent considérés comme des contaminants pseudo-persistants (Khetan et Collins, 2007). En effet, le devenir des contaminants émergents tels que les antibiotiques dépend évidemment des propriétés physico-chimiques de chaque substance ainsi que des conditions du milieu récepteur (Boxall et al, 2004; Peschka et al, 2007). La dégradation des antibiotiques dépend de plusieurs facteurs : la structure chimique, le pH du milieu, la complexation, la présence de bactéries et aussi de la photodégradation. Le transport des antibiotiques dans l'environnement aquatique entraîne la diminution de leur concentration depuis la source jusqu'aux milieux récepteurs. Cette diminution est causée par trois facteurs principaux durant leur cycle de vie : l'adsorption, la dilution et la dégradation. Une fois dans les eaux de rejet domestiques, les antibiotiques subissent généralement une dilution (Pedro Alejandro Segura, 2009). Ce phénomène est essentiel lorsque ces substances sont rejetées par les STEP. En effet, les rivières ayant des faibles débits par rapport à ceux des STEP qui ont de leur côté un plus petit pouvoir de dilution, les concentrations des antibiotiques sont supérieures.

Certains antibiotiques tels que les quinolones et les tétracyclines ont la capacité de s'adsorber aux particules en suspension. Ces substances sont capables de former des complexes avec les cations divalents et trivalents tels qu' $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Tolls, 2001). Ces interactions sont de nature électrostatique et sont affectées par le pH (Lee et al, 2007) et la force ionique du milieu (Gu et Karthikeyan, 2005a; Gu et Karthikeyan, 2005b). Les antibiotiques peuvent aussi s'associer avec la matière organique dissoute (DOM). Contrairement à l'adsorption sur des solides, l'association à la DOM augmente la mobilité des substances (Tolls, 2001; Lee et al, 2007).

En effet, la dégradation a lieu tout au long de leur trajet vers les milieux récepteurs et aussi une fois dispersés dans les eaux naturelles. La nature des phénomènes de dégradation naturelle peut être abiotique ou biotique. La transformation biotique des substances aboutit généralement à des produits de dégradation plus polaires et hydrophiles que le composé parent (Boxall et al, 2004). Par ailleurs, les principaux mécanismes de dégradation abiotique des antibiotiques sont la photolyse, l'hydrolyse et l'oxydoréduction. Cependant, la photodégradation est l'un des principaux mécanismes de réduction des concentrations des antibiotiques sensibles à la lumière (quinolones, tétracyclines) dans les eaux de surface (Boreen et al, 2004). La réactivité de ces substances à la lumière est due à leurs structures moléculaires contenant des groupements fonctionnels capables d'absorber les longueurs

d'onde de la lumière naturelle (350-800 nm) ou de réagir avec des espèces réactives ( $O_2$  singulet et  $OH\bullet$ ) présentes dans les milieux aquatiques (Boreen et al, 2004). En ce qui concerne l'oxydoréduction, les études récentes (Zhang et Huang, 2005) démontrent que les quinolones sont oxydées rapidement par les oxydes de Mn (IV). Ces processus réactifs ont plus d'importance dans les milieux terrestres, étant donné la présence commune des oxydes de manganèse dans les sols et les sédiments, mais contribuent à la diminution des concentrations de ces antibiotiques dans les zones agricoles.

D'un autre côté, la dégradation par hydrolyse est l'un des principaux phénomènes expliquant les basses concentrations des  $\beta$ -lactamines dans les eaux (Andreozzi et al, 2004). L'anneau  $\beta$ -lactam (anneau azetidione) est clivé en milieu aqueux aboutissant à la formation d'un groupement carboxylique et d'une amine secondaire (Figure 1-11). Certaines tétracyclines semblent aussi être affectées par ce type de dégradation (Halling-Sorensen, 2000). Cependant, d'autres classes telles que les quinolones et les sulfonamides semblent être résistantes à l'hydrolyse (Kummerer, 2009).

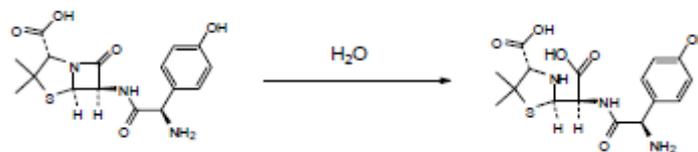


Figure I-11 : Chemin représentant l'hydrolyse de l'amoxicilline (Längin *et al*, 2009).

La biodégradabilité des contaminants organiques est mesurée par des tests standardisés. Par exemple, le test de la bouteille fermée détermine la biodégradabilité du composé dans l'environnement aquatique sous des conditions aérobies. Ce test mesure la quantité d'oxygène consommée par une population microbienne durant la biodégradation de la substance testée (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1992). Le test de biodégradabilité ultime combiné développé par Gartiser (Gartiser et al, 2007) détermine si une substance sera totalement utilisée par les micro-organismes pour former du  $CO_2(g)$ , de l'eau, des sels et de la biomasse. Ce test mesure la production de  $CO_2(g)$  et l'élimination du carbone organique dissout par adsorption. Ces tests démontrent que la plupart des antibiotiques ne sont pas facilement biodégradables (Alexy et al, 2004; Gartiser et al, 2007). Le tableau 1-2 présente des valeurs du taux d'élimination selon plusieurs critères de quelques molécules d'antibiotiques.

Tableau I-2 : Taux d'élimination par voie rénale et pourcentage de dégradation selon les différents tests effectués (Pedro Alejandro Segura, 2009)

<b>Molécules</b>	<b>Taux d'élimination<sup>a</sup>(%)</b>	<b>Dégradation (%)</b>	
Amoxicilline	44 - 79	5 <sup>b</sup>	13 - 63 <sup>c</sup>
Azithromycine	6 - 10	ND	ND
Céfuroxime	30 -32	-1 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>
Ciprofloxacine	29-33	0 <sup>b</sup>	ND
Clarithromycine	20 - 40	0 <sup>b</sup>	ND
Clindamycine	13	3 <sup>b</sup>	- 4 <sup>c</sup>
Levofloxacine	69,6 – 80,8	0 <sup>b</sup>	-19 <sup>c</sup>
Minocycline	4 - 10	4 <sup>b</sup>	ND
Sulfamethoxazole	10 - 30	0 <sup>b</sup>	-10 <sup>c</sup>
Trimethoprim	33,1 - 90	ND	-11 <sup>c</sup>

*ND : Non Disponible ; a : Elimination rénale pour une dose orale ; b : test de la bouteille fermée (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1992) ; c : test de biodégradabilité ultime combiné. Les valeurs négatives indiquent possiblement des effets d'inhibition de la population des micro-organismes utilisés dans le test.*

Les sols agricoles agissent comme des réservoirs environnementaux pour les antibiotiques, puisque certaines substances peuvent se lier aux particules du sol en s'adsorbant sur les argiles ou sur et la matière organique naturelle (Rooklidge, 2004; Kumar et al, 2005). Il est important de remarquer l'importance des interactions avec la phase particulaire. Certains antibiotiques ont la capacité de s'associer aux particules en suspension ce qui modifie leur transport ainsi que leur dégradation environnementale.

Tous les phénomènes contribuant à la réduction des concentrations des antibiotiques dans l'environnement diminuent aussi leur activité. Par exemple, des études démontrent que l'adsorption des antibiotiques aux sols diminue leur effet inhibitoire sur les bactéries (Koschorreck et al, 2002). Les concentrations des produits de dégradation ont une importance environnementale seulement si ceux-ci possèdent une activité biologique.

L'efficacité des STEP d'éliminer les antibiotiques présents dans les affluents municipaux dépend évidemment du type de traitement appliqué, mais aussi de la conception de la STEP et des propriétés physico-chimiques des composés (Gulkowska et al, 2008).

Pour le sulfaméthoxazole, le taux d'élimination dépend du procédé de traitement: il est éliminé de 5 à 21% dans une station à boues activées conventionnelle et son élimination augmente à 80 % dans un bioréacteur à membrane MBR (Göbel et al, 2007). Watkinson et al, en 2007, évaluent la dégradation de 28 molécules dans des STEP conventionnelles au charbon actif ainsi que dans des stations utilisant la microfiltration et l'osmose inverse. L'effet du type de traitement est illustré aussi par les résultats obtenus par Göbel (Göbel et al, 2005) lors de

mesures de l'occurrence de triméthoprimine dans deux STEP en Suisse. La concentration médiane de l'effluent était de 290 ng L<sup>-1</sup>, après traitement primaire (dégrillage, dessablage aéré et clarification), elle diminue à 230 ng L<sup>-1</sup> (réduction de 21%). Suite au traitement secondaire (boues activées et bioréacteur) la concentration médiane de triméthoprimine passe à 200 ng L<sup>-1</sup> (réduction de 31%). Finalement après traitement tertiaire (filtration sur lit de sable), la concentration dans l'effluent est de 70 ng L<sup>-1</sup> (réduction de 76%).

Aussi, la conception de la STEP est prépondérante puisque deux traitements similaires ont des efficacités distinctes comme le démontre le cas des STEP de Tai Po et Shatin en Chine. Ces deux STEP appliquent un traitement secondaire (boues activées), cependant la STEP de Shatin est capable d'éliminer 58% de norfloxacine de plus que la STEP de Tai Po (Gulkowska et al, 2008). D'après les auteurs cette différence pourrait être expliquée par les différences dans la capacité de traitement.

De plus, l'efficacité dépend de la nature du composé comme illustré par l'étude faite par Batt et al (2007) dans la STEP de East Aurora aux États-Unis. Cette STEP appliquant un traitement tertiaire (filtration sur lit de sable et chloration) est capable de réduire 97% de la concentration initiale de triméthoprimine, alors que pour la ciprofloxacine l'élimination atteint 67%. Certains antibiotiques sont faiblement dégradés par les STEP, comme par exemple le sulfaméthoxazole (Carballa et al, 2004).

D'autre part, l'adsorption à des micro-organismes ou à des solides en suspension est un processus clé pour l'élimination des contaminants dans les STEP, celle-ci résulte des interactions hydrophobes (Ternes et al, 2004). Par conséquent, l'élimination des antibiotiques est liée à la composition des boues activées, ainsi qu'au pH de l'eau usée qui a un effet sur la ou les formes prédominantes des composés présents. La biodégradation partielle et la minéralisation dans les STEP sont possibles parce que les bactéries peuvent co-métaboliser ces substances ou les utiliser directement comme une source de carbone et d'énergie pour se multiplier (Ternes et al, 2004).

#### ***1.4.4. Développement et effets de la résistance aux antibiotiques***

À ce jour, une des principales inquiétudes de la communauté scientifique par rapport à la présence d'antibiotiques dans l'environnement aquatique est leur contribution potentielle au développement de la résistance chez les bactéries présentes dans l'eau. Plusieurs molécules sont excrétées de l'organisme sous forme inchangée, et peuvent donc rester actives. Elles présentent des risques pour l'environnement et peuvent aussi se concentrer dans la chaîne alimentaire. D'après une étude récente d'analyse de risque (Cooper et al, 2008), les

antibiotiques se retrouvent parmi les substances pharmaceutiques posant un grand risque pour l'environnement. Grâce à des tests de germination, Liu et al en 2009 ont étudié les effets de six antibiotiques (Chlortétracycline, tétracycline, tylosine, sulfaméthoxazole, sulfaméthazine et triméthoprime) sur la croissance des plantes et sur l'activité bactérienne et enzymatique dans le sol. Les deux sulfonamides étudiés ainsi que le triméthoprime se sont avérés les plus toxiques pour la croissance des plantes, l'avoine et le riz étant plus sensibles à ces antibiotiques que le concombre. Toutes les molécules examinées ont empêché l'activité de la phosphatase du sol. L'investigation scientifique a prêté peu d'attention aux effets directs sur la santé humaine (la résistance chez les bactéries est considérée comme un effet indirect). Outre les effets immédiats des produits présent dans l'eau, les effets des mélanges et des interactions possibles avec d'autres polluants déjà présents dans les milieux aquatiques (par exemple chimiques ou pesticides), appelés parfois effet « cocktail », ne sont pas forcément connus.

#### I.4.4.1- Développement de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries

La résistance aux antibiotiques est définie comme la capacité d'un micro-organisme à désactiver l'effet toxique des antibiotiques par l'acquisition de mécanismes de protection (Helms et al, 2005). Évidemment, ils doivent exercer leur fonction à l'intérieur de l'organisme du patient, mais une fois rejetés dans les eaux environnementales (excrétés sous leur forme d'origine), ils conservent leur activité biologique et ont un effet sur les populations des bactéries présentes dans ces milieux. Ce sujet est très controversé puisqu'il est aussi argumenté que les concentrations de ces composés ne sont pas assez élevées pour avoir un effet marqué sur les bactéries (Summers, 2002). Cependant plusieurs études signalent une incidence sur la prolifération de la résistance chez les bactéries dans les eaux usées contaminées (Kümmerer, 2004). Le facteur le plus important dans la sélection de bactéries résistantes est admis comme étant l'usage d'antibiotique. En général, il y a une relation étroite entre la quantité d'antibiotiques utilisée et le degré de développement de la résistance. Le développement de la résistance des bactéries aux antibiotiques est rendu possible (Kouadio, 2009) par :

- la mutation sur des gènes communs, qui étendent le spectre de résistance de ces mutants
- le transfert de gènes de résistance entre des micro-organismes.
- la croissance de la pression de sélection qui entraîne le développement d'organismes résistants au détriment des organismes vulnérables.

En effet, prenons par exemple, les antibiotiques utilisés comme promoteurs de croissance, ils sont analogues à ceux utilisés en médecine humaine et génèrent des résistances croisées avec eux. Les animaux qui les consomment rejettent donc une grande quantité de bactéries résistantes dans leurs fèces. Et celles-ci sont transférées à l'homme par voie directe ou indirecte via les aliments d'origine animale. Elles colonisent ainsi directement le tube digestif de l'homme ou échangent leurs gènes de résistance avec des bactéries commensales de l'intestin et avec certaines bactéries potentiellement pathogènes. Cet exemple est applicable à tous les antibiotiques utilisés à des fins thérapeutiques ou prophylactiques. En plus, Binh et al en 2007 ont montré le transfert de gènes résistants aux bactéries présentes dans le sol par l'amoxicilline. À Bagdad, dans les eaux de rivières, ils ont isolé 92 % d'*Escherichia coli* résistants à l'ampicilline. Également dans les eaux de rivière, en Chine, ont été isolés 18 à 55 % d'*E. Coli* résistants à divers antibiotiques (Levi, 2006).

De plus, la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait entraîne des conséquences néfastes pour la technologie laitière dans la fabrication des produits fermentés. Ces conséquences néfastes résultent essentiellement de l'inhibition partielle ou totale des phénomènes de fermentation bactérienne nécessaires à la fabrication de nombreux produits laitiers (Stoltz, 2008). En conclusion, la présence dans les aliments d'antibiotiques, de leurs résidus ou leurs produits de dégradation peut entraîner plusieurs risques pour les consommateurs (Châtaigner, 2004) :

- des modifications de la flore intestinale de l'homme,
- des effets toxiques ou allergènes,
- la sélection de bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques.

#### I.4.4.2- Effets sur les espèces aquatiques

Des études réalisées sur des espèces aquatiques démontrent la toxicité des antibiotiques à des concentrations variables dans l'environnement (Tableau 1-3). Ces études indiquent que certaines espèces aquatiques telles que les cyanobactéries, les algues et les diatomées sont particulièrement sensibles à leur présence dans le milieu aquatique. Ces composés présentent des effets immunosuppresseurs (Rijkers et al, 1980) et hépatotoxiques chez le poisson (Bruno, 1989). La toxicité d'une substance est quantifiée par la détermination de seuils limites, tels que la concentration toxique effective à 50% (EC50) ou la plus petite concentration ayant un effet toxique observable (LOEC). L'EC50 représente la concentration d'une substance ayant un effet donné sur 50% des individus de l'espèce bactérienne testée lors d'un temps exposition fini. Plus spécifiquement, la toxicité aigüe est mesurée par la

concentration létale à 50% (LC50) qui est en effet une EC50 où l'effet étudié est la mortalité. Ces tests de toxicité aigüe sont réalisés pour une courte période de temps tandis que les tests de toxicité chronique étudient d'autres effets sur l'espèce bactérienne considérée (croissance de la population, reproduction) et généralement pour une période de temps plus élevée (Cunningham et al, 2006).

Des études montrent que les antibiotiques possèdent une toxicité aigüe limitée envers les organismes non cibles (Isidori et al, 2005), cependant leur toxicité chronique peut être plus importante. Une étude réalisée avec des communautés d'algues d'eau douce (Wilson et al, 2003) démontre la capacité de la ciprofloxacine à modifier sa structure et ses fonctions à des concentrations inférieures à 12 ng L<sup>-1</sup>.

Les EC50 relevées dans la littérature pour les antibiotiques sont majoritairement comprises entre 1 et 100 µg L<sup>-1</sup> ce qui est proche ou du même ordre de grandeur que certaines concentrations mesurées dans les eaux de surface (ex. : ciprofloxacine 1,3 µg L<sup>-1</sup>, Watkinson et al, 2009). Selon la molécule concernée et l'organisme testé, les valeurs des concentrations effectives sont très variables. Par exemple, l'amoxicilline est le composé qui possède à la fois la plus forte (3,7 µg L<sup>-1</sup> vis-à-vis de *Microcystis aeruginosa*) et la plus faible toxicité (108 mg L<sup>-1</sup> vis-à-vis de *Rhodomonas salina*). De même, Holten Lützhøft et ses collaborateurs, en 1999, montrent que la sensibilité d'une même molécule ou classe d'antibiotiques était très variable entre une cyanobactérie d'eau douce (*Microcystis aeruginosa*), une algue verte d'eau douce (*Selenastrum capricornutum*) et une cryptophycée marine (*Rhodomonas salina*).

Il existe un certain décalage entre le développement de la physico-chimie analytique et celui de l'écotoxicologie. Les avancées qui ont eu lieu en physico- chimie analytique et qui permettent la détection des antibiotiques dans les eaux environnementales n'a pas de contrepartie en écotoxicologie et maintenant nous pouvons détecter des concentrations dont les effets sur le microbiote sont encore inconnus. L'étude de nouveaux seuils de toxicité tels que l'inhibition des réactions métaboliques comme celles du pABA chez les plantes aquatiques (Brain et al, 2008) est un exemple des effets ignorés qui ne pouvaient pas être détectés par les méthodes conventionnelles.

Tableau I- 3 : Concentrations effectives des antibiotiques (Pedro AlejandroSegura, 2009)

<b>Antibiotiques</b>	<b>Espèce</b>	<b>Effet</b>	<b>Temps d'exposition</b>	<b>Point de toxicité</b>	<b>Cone (ng L<sup>-1</sup>)</b>
Ciprofloxacin	Algues diatomée	Réduction de la biomasse	13 j	LOEC	12
Ciprofloxacin	Diatomée	Biomasse	13 j	LOEC	120
Ciprofloxacin	Bactérie	Genotoxicité	2 h	SOS	200
Ofloxacin	Bactérie	Inhibition de la bioluminescence	24 h	EC01	940
Ofloxacin	Bactérie	Inhibition de la croissance	2 h	SOS	1000
Lomefloxacin	Bactérie	Inhibition de la bioluminescence	24 h	EC01	1610
Clarithromycine	Algue	Inhibition de la croissance	72 h	EC50	2000
Sulfaméthoxazole	Bactérie	Inhibition de la population	NA	EC50	2000
Ciprofloxacin	Bactérie	Inhibition de la population	NA	MIC50	2000
Spiramycine	Cyanobactérie	Inhibition de la croissance	7 j	EC50	5000
Sulfaméthoxazole	Bactérie	Inhibition de la population	NA	MIC50	2000
Benzylpenicilline	Bactérie	Inhibition de la population	NA	MIC50	4000
Ciprofloxacin	Cyanobactérie	Inhibition de la croissance	4 - 6 h	EC50	5000
Ciprofloxacin	Bactérie	Genotoxicité	30 min	LOEC	5000
Spiramycine	Cyanobactérie	Inhibition de la croissance	7 j	EC50	5000
Clarithromycine	Crustacé	Inhibition de la reproduction	21 j	EC50	6300
Clarithromycine	Algue	Inhibition de la croissance	96 h	EC50	6300
Sulfaméthoxazole	Plante aquatique	pABA total	7 j	LOEC	9000

#### I.4.4.3- Effets directs sur la santé humaine par la consommation de l'eau potable

Il est difficile d'étudier les effets des antibiotiques sur la santé humaine à cause des faibles concentrations (0,1 - 5 ng L<sup>-1</sup>) trouvées dans l'eau potable. Comparées aux doses recommandées pour les adultes (Conseil du médicament, 2005), ces concentrations sont moyennement 10<sup>9</sup> fois plus faibles. Même si l'on détermine la quantité totale d'un antibiotique ingérée durant une période de 70 ans (en supposant une consommation journalière de 2 L d'eau potable contaminée avec 2 ng L<sup>-1</sup> d'ofloxacin) celle-ci est encore environ 2500 fois inférieure à la dose journalière recommandée pour un patient.

Cependant, des études récentes démontrent que les effets sur la santé humaine sont possibles surtout pour les fœtus et les jeunes enfants (Pomati et al, 2008), lorsqu'on considère l'effet combiné des mélanges de substances pharmaceutiques. Yargeau et ses collaborateurs montrent que l'exposition des cellules humaines à des produits de dégradation de l'ozonation de sulfaméthoxazole cause des changements de morphologie, indiquant ainsi la possibilité d'effets sur la santé humaine par l'ingestion d'eau potable contaminée (Yargeau et al, 2008). En 2005, Ternak propose une hypothèse d'après laquelle les traces des antibiotiques dans la nourriture et dans l'eau potable peuvent agir comme des promoteurs de la croissance et de l'obésité chez les humains, de façon similaire à ce qui est observé chez les animaux de rente.

#### *1.4.5. Législations*

Depuis des années, la question se pose sur la présence, dans les milieux aquatiques, à l'état de traces de résidus des produits pharmaceutiques notamment les antibiotiques, ainsi que sur leurs effets sur l'environnement et sur la santé. Or, il n'existe pas actuellement de réglementation sur les normes à respecter en qualifiant l'impact et la présence de leurs résidus dans les eaux. Il en existe pour certains micropolluants (substances susceptibles d'avoir une action toxique à faible dose dans un milieu donné : de l'ordre du nano ou du microgramme par litre d'eau) tels que : pesticides, hydrocarbures aromatiques polycycliques. Dernièrement, l'inquiétude concernant la résistance aux antibiotiques des bactéries, mises en contact prolongé et répété dans l'environnement, vient s'ajouter à celle liée à l'usage des antibiotiques chez l'animal.

En revanche, des programmes de recherche sont élaborés pour étudier et évaluer le risque de rejet des médicaments dans l'environnement. Cependant, la loi cadre sur l'eau (DCE), adoptée en 2000 par l'Union Européenne (Directive 2000/60/CE) établit un cadre communautaire pour la protection des eaux de surface, de transition, côtières et souterraines, en vue de prévenir et de réduire leur pollution ainsi que d'améliorer l'état des écosystèmes aquatiques. Dans ce contexte, plusieurs projets en France sont adoptés pour lutter contre la pollution aquatique tels que : PNAR (2010-2013), PNRM (2009-2013). En effet, pour cerner le risque éventuel pour la santé et pour l'environnement et les milieux aquatiques, il est nécessaire d'engager des actions de réduction de la dispersion médicamenteuse dans l'eau. Un Plan National sur les Résidus de Médicaments (PNRM) dans l'eau a été élaboré par les ministères chargés de l'Ecologie et de la Santé. Ce plan, comprenant trois axes, a été présenté le 30 mai 2011 :

- Evaluer les risques : acquérir des connaissances sur la présence, le devenir et l'impact des résidus de médicaments dans les eaux.

- Définir les mesures de gestion à court terme.
- Développer les connaissances scientifiques et techniques et structurer les actions de recherches.

La résistance aux antibiotiques est affichée au niveau européen comme un sujet majeur en termes de santé humaine et animale. Les premières recommandations européennes dans ce domaine ont été émises à l'issue d'une conférence européenne, organisée en 1998 à Copenhague, qui a réuni des représentants de la recherche, des ministères chargés de la santé, de l'agriculture, du corps médical et vétérinaire, des industriels du secteur pharmaceutique, et de l'Union européenne.

Plus récemment, une commission tripartite, rassemblant des représentants de l'Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), l'organisation mondiale pour la santé (OMS) et l'office international des épizooties (OIE), a été constituée afin de faire le point, à partir des connaissances actuelles, de l'utilisation des antibiotiques hors le domaine humain, et de s'intéresser aux conséquences de l'utilisation des antibiotiques dans l'agriculture et dans l'élevage. Cette consultation a conduit, lors d'une conférence organisée à Oslo, en mars 2004, à élaborer des stratégies pour lutter contre le développement des résistances bactériennes d'origines non humaines, stratégies destinées à être discutées dans le cadre du Codex Alimentarius.

La directive 70/254/CEE du Conseil de l'Union Européenne subordonne l'utilisation des antibiotiques en tant qu'additifs au niveau vétérinaire à une autorisation des principes actifs dans des conditions d'utilisation définies, pour chaque espèce de destination, à des doses faibles, en vue d'améliorer la croissance des animaux par un effet « régulateur » au niveau de la flore intestinale. Cette utilisation a été très controversée et en 1998, quatre antibiotiques ont été supprimés au sein de l'Union européenne (virginiamycine, bacitracine Zinc, spiramycine, phosphate de tylosine). Le règlement N°1831/2003 du 22/11/2003 prévoit la suppression définitive de l'usage des antibiotiques comme additifs en alimentation animale dès la fin de l'année 2005. Dans ce contexte, l'utilisation des 4 antibiotiques (Monensin : E714, Salinomycine : E716, Avilamycine : E717 et Flavophospholipol : E712) est supprimée depuis 2005. En France depuis 1999, un suivi national des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques est mis en place.

Au Liban, il n'y a pas de réglementation au niveau de l'autorité gouvernementale destinée à limiter et empêcher la pollution du système aquatique par les médicaments tels que les antibiotiques. En plus, les projets d'évaluation du niveau de contamination et de risques écotoxicologiques sont absents.



## **2. Méthodologie d'analyse dans les eaux environnementales**

Le développement de techniques de dosage dans des matrices de plus en plus complexes et à des concentrations de plus en plus faibles nécessite l'utilisation d'une méthodologie fiable, utilisant les dernières techniques disponibles. Dans cette partie, nous allons présenter les principales techniques employées, leurs spécificités, leurs avantages et leurs inconvénients, aussi bien en ce qui concerne l'extraction que l'analyse.

### **2.1. Techniques d'extraction**

Les techniques d'extraction ont évoluées, de l'extraction liquide- liquide, fastidieuse et encombrante, vers des techniques d'extraction liquide- solide miniaturisées (SPE et SPME..) et automatisées.

#### **2.1.1. Extraction Liquide- Liquide(LLE)**

L'extraction liquide – liquide consiste à extraire les composés cibles d'une matrice aqueuse vers un solvant organique non miscible avec l'eau par agitation et dans une ampoule à décanter. Cette technique demande de nombreuses manipulations (agitation, reconcentration et évaporation), entraînant de faibles rendements par perte de composés et des risques de contamination de l'échantillon (Alpendurada, 2000). Elle est devenue de moins en moins utilisée avec le développement de techniques d'extraction plus performantes au niveau des demandes requises et de la possibilité d'automatisation.

#### **2.1.2. Extraction sur Phase Solide (SPE)**

##### 2.1.2.1- Principe

L'extraction sur phase solide (SPE) est une technique simple, rapide et efficace qui permet d'extraire les composés d'intérêt en les retenant sur une phase solide. La polyvalence de la SPE réside dans son utilisation à de nombreuses fins, comme la purification, l'enrichissement de traces, le dessalage et le fractionnement de classe (Żwir-Ferenc et Biziuk, 2006). En plus, les limitations des techniques de détection nécessitent d'utiliser des méthodes de prétraitement en reconcentrant l'échantillon dans un faible volume (de quelques  $\mu\text{L}$ ). En effet, cette technique est devenue le choix dans l'analyse des composés de polarité variable et à l'état de traces. La figure I-12 montre les différentes étapes d'extraction par SPE :

- a- Conditionnement : étape primordiale nécessaire pour préparer la phase stationnaire à la rétention des molécules cibles en solvantant les groupements fonctionnels de la phase.

- b- Percolation de l'échantillon : la percolation de l'échantillon se fait à travers la phase stationnaire sous atmosphère réduite.
- c- Lavage de l'adsorbant : Cette étape permet d'éliminer les interférents.
- d- Elution : Les composés retenus doivent être élués par un solvant approprié capable de rompre la liaison entre ces composés et le support solide.

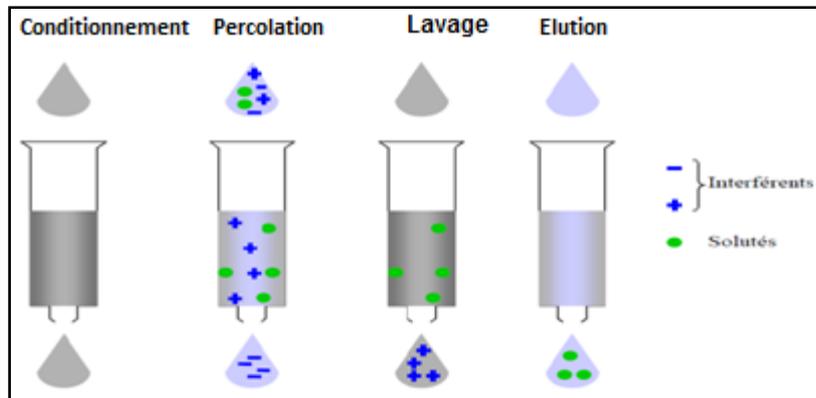


Figure I- 12 : Les étapes d'extraction par SPE.

#### 2.1.2.2- Formats et types d'adsorbants

L'évolution de la SPE est facilitée par la commercialisation de phases de natures variées et dédiées à des échantillons très différents, et soutenue par une évolution rapide des formats disponibles ainsi que des automates adaptés à ces différents formats.

Plusieurs formats dans la technique SPE sont commercialisés : Cartouches, disques, plaques à 96 puits et pipettes SPE.

Les cartouches sont formées par des seringues en plastiques (Polyéthylène ou polypropylène) ou en verre contenant une variété d'adsorbants. L'adsorbant est piégé entre deux frittés. Ces cartouches sont disponibles avec une large gamme et quantité de types de phase stationnaire à base de silice ou de polymère de granulométrie variés. La filtration des échantillons (ex : Whatman - 0,7  $\mu\text{m}$ ) avant la percolation demeure nécessaire pour éviter le blocage de la cartouche par les particules. Pour cette raison, des fournisseurs intègrent les filtres dans les cartouches ex : Envirelut (Bond Elut).

Les disques constituent le second type utilisé largement, ils supportent des débits très élevés (Hennion, 1999). Ils se composent d'une membrane de 0,5 mm d'épaisseur dont l'adsorbant est immobilisé dans un réseau de microfibrilles enfoncé dans une bande de PTFE ou fibres en verre (Żwir-Ferenc et Biziuk, 2006). Les cartouches sont toujours plus fréquemment utilisées que les disques, en raison du nombre limité d'adsorbants commercialisés dans les disques SPE (Sabik et al, 2000).

En raison de la demande de beaucoup d'applications, dans plusieurs domaines (chimie combinatoire, détection des drogues.....), et la nécessité d'automatisation, plusieurs formats ont été développés récemment comme par exemple les pipettes SPE et les plaques à 96 puits. L'objectif était de réduire le temps de préparation, le volume d'élution et la masse d'adsorbant.

Cette technique tire sa richesse de la diversité des supports disponibles actuellement ou en cours de développement, comme les matériaux à empreintes moléculaires ou les immunoadsorbants, qui permettent d'augmenter la sélectivité d'extraction.

#### 2.1.2.3- L'extraction en ligne (Online) et hors ligne (Offline)

Le principe de la SPE est similaire dans l'extraction en ligne et hors ligne (classique). La seule différence entre les deux réside dans l'élution des composés retenus sur la précolonne par une phase mobile appropriée qui joue aussi le rôle de la séparation dans la colonne chromatographique (Hennion, 1999). La méthode classique (hors ligne) utilise des cartouches jetables ou disques contenant 50 à 2000 mg d'adsorbants. Cette méthode s'effectue sur des supports (Supelco, Varian...) avec la possibilité de faire une séquence de 24 échantillons en même temps. La méthode en ligne est couplée directement au système séparatifs tels que : LC/MS/MS. Cependant, deux étapes sont nécessaires pour extraire en ligne un échantillon d'eau à analyser : le chargement de l'échantillon sur colonne SPE avec un temps de percolation et l'élution des composés du support vers la colonne analytique, qui sont ensuite dirigés vers la source du spectromètre de masse. Plusieurs fournisseurs produisent des dispositifs pour la SPE en ligne ex : PROSPEKT (Spark, Holland), OSP-2 (Merck, Allemagne) et ASPEC (Gilson, USA). En outre, la perte des analytes durant l'étape d'évaporation et le faible facteur d'enrichissement suite à l'injection d'une aliquote d'échantillon constitue des inconvénients pour la SPE hors ligne (Pichon, 2000). Les procédures automatisées sont connues pour donner de meilleurs résultats concernant l'exactitude et la précision comparées aux techniques manuelles ainsi elles sont appliquées avec succès à l'analyse de divers médicaments (Dinh et al, 2011).

#### **2.1.3. Micro- Extraction sur Phase Solide (SPME)**

Le principe de concentration par SPME repose sur l'adsorption ou l'absorption des composés d'intérêt sur une phase polymérique supportée par une fibre en silice, enduite de différents films avec différents épaisseurs (Figure I- 13). En fonction de la tension de vapeur des composés recherchés, l'adsorption sur la fibre SPME est conduite soit en mode espace de tête

(Head space), soit en mode immersion. Une fois concentrés sur la fibre SPME, les composés sont désorbés thermiquement dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse, ou par rinçage par un solvant spécifique dans le cas d'un couplage avec un chromatographe en phase liquide (Kumazawa et al. 2000 ; Volmer et Hui, 1998). La SPME est une technique rapide, nécessitant peu de matériel qui peut être appliquée à de nombreux milieux : aussi bien l'air, les eaux de surface que les effluents des stations d'épuration, les sols... L'application aux composés pharmaceutiques est plus développée dans le domaine de la toxicologie biomédicale, avec le dosage dans le sang, le plasma et les urines (Salgado-Petinal et al. 2005 ; Ulrich, 2000). Du point de vue environnemental, l'utilisation de la SPME est la plus récente, suite aux développements de techniques analytiques de plus en plus performantes. En effet, le principe de la SPME nécessite de travailler sur un faible volume d'échantillon, ce qui, dans le cas de milieux faiblement contaminés, peut poser un problème de seuil de détection. Mais les avancées dans le domaine analytique avec l'utilisation notamment de la spectrométrie de masse en tandem, permettent aujourd'hui d'envisager la SPME comme une technique d'avenir.

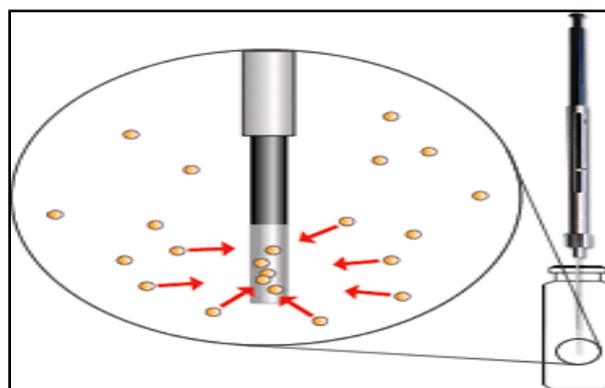


Figure I - 13 : Représentation graphique du SPME (<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme>)

## 2.2. Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (LC/MS/MS)

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est apparue pour la première fois comme technique de séparation en 1967 (Capdeville. M, 2011). Son principe est basé sur le partage des molécules entre deux phases : une fixe appelée stationnaire et l'autre mobile appelé éluant. Les facteurs intervenant dans le partage des molécules à séparer entre les deux phases sont: la solubilité, la taille, la polarité et la charge électrique.

La chaîne chromatographique est principalement constituée de quatre modules : injecteur, pompe, colonne et détecteurs. Les colonnes employées surtout pour les molécules apolaires et

moyennement polaires sont principalement des colonnes utilisant des phases greffées C18. Certains emploient des colonnes polaires de type HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) pour les molécules très polaires ex : aminoglycosides (Oertel et al, 2004). L'automatisation ainsi que le couplage direct de la CLHP avec un Spectromètre de Masse rendent possible l'étude d'un nombre important de contaminants organiques dans beaucoup d'échantillons avec des niveaux de détection très faibles.

La Spectrométrie de Masse (MS) est une technique de détection très puissante qui permet l'identification et la quantification des composés d'un mélange complexe à partir de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) et de caractériser leurs structures chimiques par fragmentation. Son principe réside dans la séparation sous vide des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ), avec la mesure de leur temps d'attente du détecteur (TOF), pour certains détecteurs.

Le spectromètre de masse est formé de plusieurs modules : une source d'ionisation pour évaporer les molécules ionisées, un analyseur de masse qui sépare les analytes ionisés selon leur rapport  $m/z$  et d'un détecteur qui enregistre le nombre d'ions relié directement à leur abondance pour chaque valeur de  $m/z$ .

Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction de l'énergie interne transférée pendant le processus d'ionisation et de la nature physico-chimique des analytes qu'elles ionisent. Cependant, les deux principales sources utilisées pour l'ionisation des produits pharmaceutiques sont l'ionisation électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).

L'électrospray ou électro-nébulisation (Figure I - 14) nébulise l'effluent venant de la CLHP à travers un potentiel électrique élevé. L'évaporation de la phase mobile est facilitée par un courant d'azote gazeux chauffé. Les ions sont transformés à partir d'une phase dissoute en une phase gazeuse avant leur introduction dans la région sous atmosphère ultra-réduite du spectromètre de masse. Le débit d'introduction est faible pour ce type de source, de l'ordre de quelques  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Les fines gouttelettes formées sont chargées à la surface positivement ou négativement. L'ionisation des analytes cibles est affectée par la présence des composés Co-élués provenant de la matrice. Ces composés sont susceptibles d'empêcher le transfert des ions dissous en ions gazeux au cours de l'étape d'évaporation. Mais, malgré ces difficultés liées à l'effet matrice, l'ESI reste la source d'ionisation la plus utilisée en spectrométrie de masse pour les molécules pharmaceutiques (Garcia A, 2010).

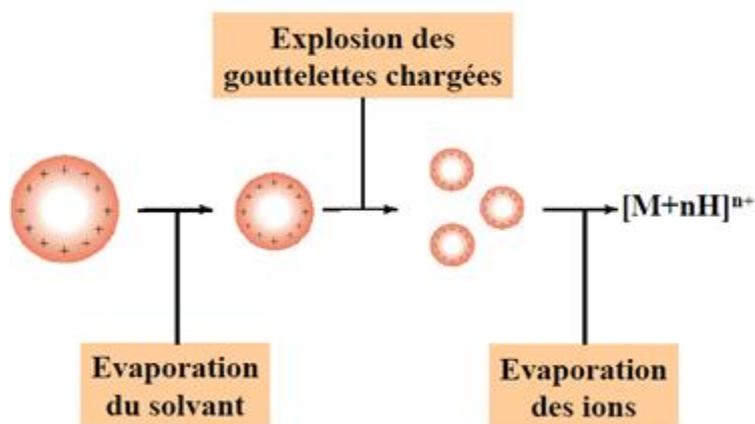


Figure I - 14 : Principe de l'ionisation en mode ESI (Finnigan, 1996)

L'APCI est un autre procédé d'ionisation plus énergétique pour la LC/MS et utilise une décharge corona (plasma) en combinaison avec le chauffage et l'évaporation pour produire des ions. Contrairement à l'ESI, l'ionisation a lieu dans la phase gazeuse et se traduit souvent par la formation d'ions de fragments en même temps que les ions moléculaires. L'APCI est mieux adaptée pour les faibles masses moléculaires et les composés organiques moins polaires.

Le développement de la méthode LC/MS/MS pour les analyses des multi-résidus regroupe plusieurs étapes d'optimisation : nature de la phase mobile, type de la phase stationnaire et les paramètres de la spectrométrie de masse (mode MRM) des composés étudiés. Cependant, les phases mobiles citées dans la bibliographie sont l'eau et l'acétonitrile ou le méthanol. Le pH de la phase mobile qui influe sur la forme des molécules analysées est ajusté avec de l'acide (formique ou acétique) ou à l'aide de sels comme l'acétate d'ammonium. L'optimisation des paramètres de la source dépend du type d'appareil utilisé du fait des différences de technologie entre marques, ex : Agilent, Waters...

Le mode ESI est le plus cité pour les analyses des produits pharmaceutiques surtout pour les antibiotiques. Ces derniers temps, plusieurs séries de systèmes spectrométriques ont été améliorés pour augmenter la sensibilité de détecteur, comme le MS/MS Agilent 6490.

Pour résoudre le problème de l'effet de matrice engendré au niveau de l'analyse par LC/MS/MS, plusieurs stratégies sont mises en œuvre (Kloepfer et al, 2005 ; Antignac et al, 2005) : purification de l'échantillon (complexe à mettre en œuvre dans les analyses multi-résidus, problème de pertes des composés d'intérêt), amélioration de la technique de séparation (Van De Steene et al, 2006 ; Van De Steene et Lambert, 2008), dilution des extraits. Généralement, l'utilisation de différentes méthodes de calibration sont envisagées

pour générer des données plus fiables : méthode des ajouts dosés (Baugros et al, 2008), double étalonnage (étalon interne et étalon d'injection).

### **2.3. Revue des principales méthodes d'analyse de traces des antibiotiques dans les eaux environnementales.**

Suite à la disponibilité de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), les recherches des contaminants organiques dans les eaux environnementales sont focalisées sur l'identification et la quantification des composés organiques non volatils (Kostopoulou et al, 2000). Cependant, la fraction volatile ne représente que 20% du carbone organique total et l'identification de la fraction organique non volatile (d'origine non humique) est restée difficile à étudier avant l'apparition des sources d'ionisation « douces » permettant l'analyse des substances plutôt polaires (Crathorne et al, 1984). D'autre part, la GC/MS est appliquée sur des composés polaires et volatils, mais après dérivatisation. Les inconvénients de la dérivatisation résident dans la non reproductibilité, la formation des sous produits indésirables et le temps élevé de la procédure (Petrovic et al, 2003). Or, l'introduction et la commercialisation des interfaces robustes et fiables telles que, les sources d'ionisation à pression atmosphérique (ESI et APCI) couplées à la Chromatographie Liquide ont élargi rapidement l'analyse des molécules polaires non volatiles (ex : les antibiotiques). La LC/MS/MS est la technique la plus utilisée pour la détection et la quantification des antibiotiques dans l'eau (Tableau 1-4), en raison de sa grande sensibilité et sélectivité, surtout dans les matrices chargées (ex : Eaux usées), par rapport aux systèmes de détection classiques UV ou FLD (Petrovic, 2007).

En 1983, Watt et al ont rédigé le premier rapport sur la présence des antibiotiques dans l'environnement aquatique. Ils utilisent l'extraction sur phase solide avec une résine à base de copolymère de styrène divinylbenzène ou la lyophilisation comme technique de préparation des échantillons et la RPLC/UV pour la détection (Crathorne et al, 1982). Plusieurs techniques d'extraction sont signalées pour les analyses des antibiotiques dans l'eau (LLE, lyophilisation, SPE, SPME...). Le tableau I-4 montre que la SPE est la technique d'extraction la plus utilisée. Au début, ces méthodes sont incapables d'analyser les antibiotiques à de faibles concentrations ( $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

La RPLC-UV a été utilisée dans plusieurs travaux d'analyse des antibiotiques : Smith et al (1994) pour l'oxytétracycline dans les eaux de rejet d'une aquaculture ; Holm et al (1995) pour les cinq sulfonamides (sulfadiazine, sulfadimidine, sulfaguanidine, sulfaméthizole et sulfonilamide) dans les eaux souterraines proches d'un site d'enfouissement de déchets

domestiques et industriels ; Migliore et al (1996) la fluméquine dans les eaux de mariculture ; Jen et al (1998) pour les sept sulfonamides (sulfacétamide, sulfadiazine, sulfadimidine, sulfamérazine, sulfaméthoxazole, sulfamonométhoxine, sulfathiazole) dans les eaux usées d'une ferme d'élevage de porcs.

Les limites de quantification dans ces travaux sont situées entre 1 et 49,5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , soient des valeurs nettement trop élevées pour pouvoir réaliser des évaluations environnementales. En 1998, Hartmann et al introduisent la première méthode capable de quantifier les traces d'antibiotiques à des concentrations inférieures à 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  dans les eaux usées d'un hôpital. Ils détectent le ciprofloxacine en utilisant la Chromatographie Liquide à polarité de phases inverse avec détection par fluorescence (RPLC-FLD). La limite de quantification de leur méthode est de 500  $\text{ng L}^{-1}$ . En cette année, Hirsch et ses collaborateurs publient la première méthode utilisant la lyophilisation ou la SPE suivie par la chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec un triple quadripôle [RPLC (ESI)- MS/MS] (Hirsch et al, 1998). Cette méthode dont le recouvrement dans l'eau de surface est entre 54 et 108 %, est capable de quantifier 18 antibiotiques dans l'eau de surface avec des limites de quantification (LOQ) de 50  $\text{ng L}^{-1}$  pour les quatre tétracyclines étudiées et de 20  $\text{ng L}^{-1}$  pour le reste des analytes.

En 2001, le premier article portant sur l'analyse de traces de quinolones dans les eaux usées municipales est publié (Golet et al, 2001). Les auteurs utilisent des disques d'extraction mixtes (en phase inverse avec échangeur de cations), ensuite l'analyse par RPLC-FLD et obtiennent des limites de quantification de 45 à 150  $\text{ng L}^{-1}$  dans les effluents primaires et de 15 à 45  $\text{ng L}^{-1}$  dans les effluents tertiaires pour neuf fluoroquinolones. Le taux de recouvrement dans l'effluent primaire est situé entre 81 et 96 %. En 2003, Calamari et al introduisent de nouvelles approches d'extraction pour l'analyse d'antibiotiques et d'autres contaminants émergents dans les eaux de surface. Les auteurs choisissent 25 produits pharmaceutiques pour leurs études et ensuite ils les distribuent en trois groupes d'après les conditions d'extraction. Lincomycine, oxytétracycline, ciprofloxacine, tilmicosine et oléandomycine sont extraits avec des cartouches mixtes à pH acide. Pour extraire les spiramycine, érythromycine, tylosine et clarithromycine, une cartouche de styrène-divinylbenzène est utilisée et le pH est fixé à 7. Finalement pour l'amoxicilline, l'échantillon est rendu basique et chargé dans une cartouche C18. La modification du pH de l'échantillon favorise la rétention puisque ces antibiotiques sont des composés ionisables et selon la phase stationnaire utilisée, la forme neutre ou la forme ionique montrent une meilleure affinité envers celle-ci (Simpson, 2000). Les limites de quantification déterminées dans cette étude

sont parmi les plus basses publiées à l'époque : 0,02 à 0,29 ng L<sup>-1</sup> et les taux de recouvrement entre 26 et 135%.

Les méthodes publiées postérieurement en 2004 (Göbel et al, 2004; Miao et al, 2004; Renew et Huang, 2004) et 2005 (Batt et Aga, 2005) cherchent à développer des méthodes de SPE capables d'analyser plusieurs familles d'antibiotiques pour diminuer le temps d'extraction. En 2004, Renew et al, proposent une méthode utilisant deux cartouches SPE en tandem (cartouche à échangeur d'anions et cartouche à polarité de phase inverse). La cartouche à échangeur d'anions est utilisée pour retenir les interférents présents dans la matrice. Cette méthode permet l'analyse de traces des quinolones, des sulfonamides et du triméthoprime (LOQ : 30 - 90 ng L<sup>-1</sup> dans les effluents secondaires), mais les taux de recouvrement pour certaines sulfonamides sont très faibles (37- 57%).

La méthode proposée par Miao et ses collaborateurs (Miao et al, 2004) pour un groupe de 31 antibiotiques comportant des sulfonamides, des macrolides, des quinolones et des tétracyclines montre une amélioration des taux de recouvrement (74- 99%) par rapport à celle de Renew et ses collègues et des LOQ assez basses pour l'analyse de traces dans les effluents finaux des STEP (1- 8 ng L<sup>-1</sup>). Deux méthodes à base de SPE sont proposées: la première pour l'extraction des macrolides (pH 6) et la deuxième (pH 3 avec ajout de Na<sub>2</sub>EDTA) pour le reste des antibiotiques.

En 2004, la méthode développée par Göbel et al détermine un nombre plus restreint de composés que celle de Miao. Cependant cette méthode est validée pour l'analyse des matrices plus difficiles telles que les effluents tertiaires, secondaires et primaires. En plus, ses travaux démontrent les difficultés rencontrées lors de l'analyse des effluents primaires et l'impact de la matrice sur les LOQ. Par exemple pour le sulfathiazole, la LOQ dans l'effluent tertiaire est de 16 ng L<sup>-1</sup> tandis que pour l'effluent primaire elle est de 214 ng L<sup>-1</sup>.

Finalement, la revue faite par Seifrtova, en 2009, sur les méthodes d'analyse démontre la nécessité d'ajout d'un agent chélatant tels que l'EDTA, acide citrique et oxalique dans les analyses des tétracyclines, macrolides et fluoroquinolones pour empêcher la complexation avec les ions présents. La méthode développée par Capdeville, en 2011, introduit l'EDTA dans la préparation des échantillons d'entrée et de sortie des stations d'épuration pour l'analyse d'un large nombre de composés pharmaceutiques incluant les antibiotiques en utilisant l'Oasis HLB suivie par une analyse sur LC /MS/MS. Tous ces travaux permettent d'établir un point de départ pour le développement d'une nouvelle méthode analytique mieux adaptée à l'analyse des antibiotiques en mode multi - résidus dans les différentes matrices d'eau.



Tableau 1- 4 : Conditions d'extraction et de détection utilisées pour les dosages des antibiotiques dans les différentes matrices d'eau.

<b>Familles ou substances analysés</b>	<b>Matrice</b>	<b>Préparation des échantillons</b>	<b>Type d'adsorbant</b>	<b>Recouvrement et Facteur d'enrichissement</b>	<b>Analyse</b>	<b>Référence</b>
β-lactamines, Sulfonamides, Tétracyclines, Quinolones, Chloramphénicol, Vancomycine,	Eau usée (STEP) (250 mL)	pH 3 (1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) Ajout de Na <sub>2</sub> EDTA	Oasis HLB (500mg)	72,8 – 109 % 1250	UPLC/MS/MS	Bing et al, 2009
PEN G, AMOX, AMPI, PEN V, OXA, CLOX, DICLOX, NAFCI, OXY, DOXY, et Chloramphénicol	Eau usée (STEP) (250 mL)	pH 7,5 (Tampon phosphate)	Oasis MAX (500mg)	99 – 107 % 1250	HPLC/UV - DAD	Benito-Pena et al, 2006
AMOX, CIP, OFLO, LIN, SMX VANCO, OLEA OXY, TIL CLAR, ERY, ERY-H <sub>2</sub> O	Eau de surface (500 mL) Eau usée (STEP) (50 mL)	pH 2 (HCl) pH 7	Oasis MCX (60 mg) Lichrolut EN (200 mg)	> 60% 5000 - 500	HPLC/MS/MS	Zuccato et al, 2010
Fluoroquinolones Quinolones Sulfonamides	Eau usée (STEP) (100 mL)	pH 7	Oasis HLB (200mg)	>70 % 200	UPLC/MS/MS	Tamtam et al, 2009

Ionophores	Eau de surface (120 mL)	pH 7.5 (NaOH)	Oasis HLB (60mg)	>93 % 1000	LC/MS/MS	Cha et al, 2005
Sulfonamides, Tétracyclines, Analgésiques, Hormones	Eau de surface (1 L) Eau usée (STEP) (1 L)	pH 4 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) Ajout de Na <sub>2</sub> EDTA	Oasis HLB (200mg)	70 – 94% 1000	LC/MS/MS	Pailler et al, 2009
Fluoroquinolones, Sulfonamides, Trimethoprime	Eau usée (STEP) (1 L)	Ajout NaCl pH 2.5 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Oasis HLB (500mg) Anion Exchange (500mg)	90 – 129% 1000	LC/MS/MS	Renew et al, 2004
Macrolides	Eau environnementale (1mL)	-	Capcell Pak MF Ph-1 (long hydrophilic polyoxyethylene chains and hydrophobic phenyl groups on the surface of 80Å silica)	86,5 – 98,3% 100	SPE en ligne - LC/MS/MS	Ding et al, 2009
Sulfonamides, Tétracyclines, Fluoroquinolones, Macrolides, Carbamazepine, Propranolol	Eau usée (STEP) (50 mL)	Ajout Na <sub>2</sub> EDTA et Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> pH 2 (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	HySphere Resin GP Oasis HLB et MCX (10 mm * 2 mm)	55 – 120 % 833	SPE en ligne - LC/MS/MS	Felizzola et al, 2007

Sulfonamides, Tétracyclines,	Eau usée (STEP) (10 mL)	Ajout Na <sub>2</sub> EDTA	Prospekt <sup>TM</sup> (10 mm * 2 mm) Oasis HLB	74,3 – 116,5% 5	SPE en ligne – LC/MSD	Choi et al, 2007
Sulfonamides, Pesticides,	Eau de surface (18 mL)	pH 4 (Tampon acétate)	Oasis HLB (10 mm * 2 mm)	85 – 112 % 490	SPE en ligne LC/MS/MS	Stoob et al, 2005
Sulfonamides, Tétracyclines, Fluoroquinolones, Chloramphénicol	Eau de surface (250 mL) Eau souterraine (500 mL) Eau usée (50 mL)	Ajout Na <sub>2</sub> EDTA	Oasis HLB (60mg)	58,4 – 115 % 500 1000 100	HPLC/MS/MS	Tong et al, 2009
Gentamicine	Eau Hospitalier (20 -50 mL)	pH 7 - 8	Widepore CBX (COOH) (500 mg)	107 – 111% 40- 100	HPLC/MS/MS	Loffler et al, 2003

*Oasis HLB: Hydrophilic Lipophilic Balanced Reversed Phase; Oasis MAX: Mixed Mode Anion Exchange and reversed phase; Oasis MCX: Mixed Mode Cation Exchange and Reversed Phase; HySphere Resin GP: General Phase- polystyrene-divinylbenzene*

### 3. Molécules choisies pour notre étude

Plusieurs critères étaient considérés pour le choix des molécules des antibiotiques pour notre étude. La famille des aminoglycosides et la colistine ont été sélectionnées.

Les études n'ont pas réussi à démontrer la supériorité des régimes contenant des aminoglycosides dans un certain nombre d'infections par rapport aux autres familles. Toutefois, l'émergence récente des infections dues à des souches bactériennes à Gram négatif avec des motifs avancés de la résistance aux autres antibiotiques a incité les médecins à reconsidérer cette famille dans le traitement et par suite être toujours précieux en médecine humaine d'aujourd'hui (Mangoni et al, 2009). En France, une enquête a été menée en 2007 auprès des éleveurs de bovins afin de décrire les principales familles d'antibiotiques utilisées. Les aminoglycosides représentaient 45 % des traitements (Cazeau et al, 2010). De même, l'usage de la colistine s'est répandu au cours des dernières années avec l'apparition de bactéries à Gram négatif multirésistantes. En réanimation, cet antibiotique initialement abandonné en raison d'une toxicité supposée, revient en première ligne pour le traitement des infections à *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* multirésistants (Frasca et al, 2008). La consommation hospitalière en France a été évaluée dont la Dose Définie Journalière/1000 habitants/jour est de 2,7% pour les aminoglycosides et 6,6% pour la colistine (ANSM, 2013).

En bibliographie :

- A- Les aminoglycosides sont très analysés dans les matrices alimentaires ou biologiques (porc, poisson, veau...) (Kaufmann et al, 2011). Ces molécules présentent des difficultés analytiques : Polarité élevée et absence de noyaux chromophore ou fluorophore) (Zhu et al, 2008).
- B- Plusieurs recherches ont été développées pour évaluer la présence de différents familles d'antibiotiques dans les eaux environnementales (Gros et al, 2013 ; Zuccato et al, 2010 ; Tong et al, 2009). En revanche, deux études ont développé une méthode pour la mise en évidence des aminoglycosides dans l'eau de rejet d'hôpitaux en Allemagne (Loffler et al, 2003) et dans l'eau de robinet et de rivière en Espagne (Serrano et al, 2006). Aussi, une absence de donnée sur la présence de la colistine dans les eaux malgré leur utilisation.

Dans ce contexte, les intérêts thérapeutiques et le manque de données sur la présence dans les eaux environnementales des molécules choisies sont pris en compte.

#### 4. Objectifs de la recherche

La synthèse bibliographique a fait ressortir le fait que la présence des antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire dans les eaux environnementales devient de plus en plus problématique. Plusieurs chercheurs visent à développer des méthodes analytiques avec plus de performance pour atteindre des faibles limites de quantification. La recherche doit englober toutes les molécules d'antibiotiques utilisées. Dans ces travaux de thèse, des molécules appartenant à la famille des aminoglycosides et la colistine ont été choisies vue le manque de donnée de leur présence dans les eaux en raison de l'accroissement de leur utilisation (intérêt thérapeutique vue l'apparition de bactéries à Gram négatif multirésistantes).

L'objectif principal de cette thèse est de développer des méthodes analytiques LC/MS/MS pour étudier la présence des antibiotiques choisis dans les eaux hospitalières et les eaux de stations d'épuration. Les molécules choisies présentent des difficultés dans leur analyse. Ainsi, différents aspects ont été étudiés : (a) la performance des deux techniques de séparations (HILIC et C18) pour les 12 molécules d'aminoglycosides choisis; (b) le développement de l'extraction sur phase solide (SPE) pour les 12 AGs en comparant deux types de cartouches Oasis MCX et Chromabond C18 (c) une comparaison entre la SPE en ligne et hors ligne pour la colistine, (d) la quantification de la présence des antibiotiques ciblés dans des échantillons d'eau usée et d'eau de rejet d'hôpitaux. Dans un premier temps, une méthode d'analyse pour la séparation et la détection de 12 AGs a été développée et optimisée. Après optimisation des paramètres spectrométriques, une comparaison entre deux techniques de séparation : la chromatographie à phase inverse (C18) et la chromatographie à interactions hydrophiles (HILIC) a été étudié et optimisé. Plusieurs paramètres ont été comparés : le temps de rétention, la surface et la forme du pic, la limite de détection et la linéarité. Les résultats de ces études sont présentés dans la **publication 1**.

Dans un second temps, des tests sur deux types de cartouche, Chromabond C18 et Oasis MCX, ont été effectués pour optimiser l'extraction de 12 AGs dans l'eau. L'appariement d'ion avec l'acide pentafluoropropionique, est utilisé pour améliorer la rétention des AGs sur la Chromabond C18. Les résultats et l'application de cette méthode d'extraction sur des échantillons réels sont l'objectif de la **publication 2**.

Enfin, le développement d'une méthode d'analyse et d'extraction de la colistine dans l'eau usée a été étudié. Après optimisation des paramètres spectrométriques et chromatographiques, une comparaison entre l'extraction sur phase solide en ligne et hors ligne a été effectuée. Notre but est d'évaluer les résultats obtenus par les deux méthodes d'extraction afin de retenir les meilleurs paramètres applicables sur des échantillons de stations d'épuration de la ville de Bordeaux. Les résultats figurent dans la **publication 3**.

## **CHAPITRE II : METHODES ET MATERIELS**

Ce chapitre traite des travaux effectués pour l'analyse des Aminoglycosides et de la Colistine dans les systèmes aquatiques. Les sites de prélèvement, les procédures et les techniques d'analyse appliquées sur ces composés sont décrites et qualifiées. Les méthodes développées et validées ont été appliquées sur des échantillons réels de stations d'épuration à Bordeaux et au Liban.

## 1. Molécules étudiées

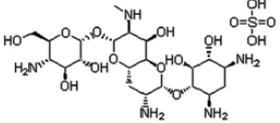
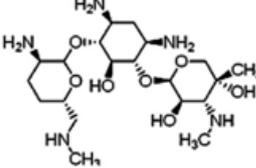
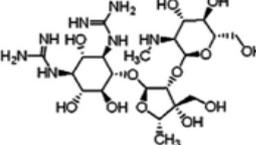
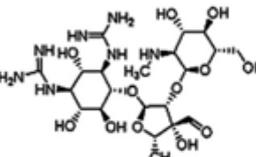
Les antibiotiques sont rassemblés par familles en fonction des groupements chimiques qui leur confèrent leur activité thérapeutique. La diversité des propriétés chimiques de ces molécules induisent une variété de leurs comportements dans l'environnement. Les molécules étudiées répondent aux critères suivants :

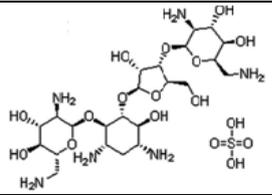
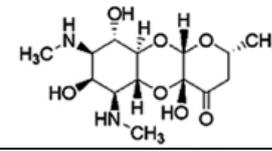
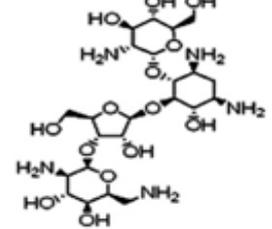
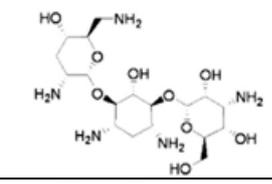
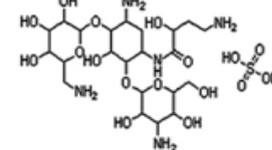
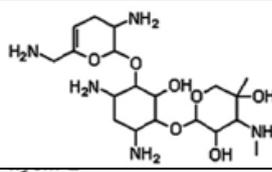
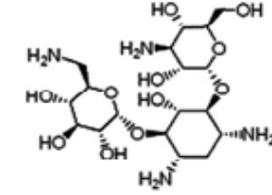
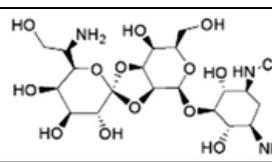
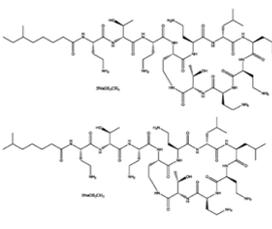
- a- Les plus consommés parmi les produits pharmaceutiques.
- b- Ceux recherchés fréquemment et retrouvés dans les eaux environnementales.
- c- Ceux peu éliminés de la phase dissoute lors des traitements effectués dans les stations d'épuration.

En plus des critères généraux ci-dessus, notre étude a regroupé 12 molécules de la famille des aminoglycosides (AGs) et la colistine, molécules qui ne sont pas couvertes par la méthode multi-résidus mise au point au LPTC (Capdeville, 2011). Le choix de ces molécules se justifie d'une part par l'existence des données de la consommation en France (Anses, 2011) et d'autre part par le manque, jusqu'à présent, de travaux d'analyse dont elles font l'objet dans notre travail.

Le tableau II- 1 regroupe la structure et quelques caractéristiques chimiques des composés étudiés.

Tableau II-1 : Récapitulatif présentant plusieurs informations pour les 12 AGs et la Colistine (<http://www.chemicalize.org/> dernière accès 2014/1/4 et Sigma Aldrich).

Molécules et abréviations	Structure	Masse molaire (g mol <sup>-1</sup> )	Pureté (%)	pKa	Log P	Solubilité dans l'eau à 25°C (g L <sup>-1</sup> )
Apramycine (APR)		539	98,5	Entre 7 et 13	-6,51	53,3
Gentamicine (GEN)		477 468 463 449	96,5	Entre 7 et 13	-3,14	100
Dihydrostreptomycine (DIH)		583	99	Entre 8 et 12	-7,47	50
Streptomycine (STR)		581	98	Entre 8 et 11	-7,65	12,8

Néomycine (NEO)		614	90	Entre 7 et 13	-8,42	64,7
Spectinomycine (SPEC)		333	99	Entre 8 et 14	-2,37	150
Paromomycine (PAR)		615	90	Entre 8 et 13	-8,31	79,7
Tobramycine (TOB)		467	93	Entre 7 et 13	-6,48	1000
Amikacine (AMK)		585	99	Entre 8 et 13	-8,58	50
Sisomycine (SIS)		447	87	Entre 7 et 13	-4,32	50
Kanamycine (KAN)		484	77	Entre 7 et 14	-7,06	50
Hygromycine (HYG)		527	66	Entre 7 et 14	-6,55	50
Colistine (COL)		A: 1169 B: 1155	99	Entre 8 et 12	-7,65	50

## **2. Matériels utilisés et solutions étalons**

Vue la forte adsorption des molécules étudiées sur le verre, les consommables (Flacon, Vial..) utilisés par leur analyse sont en plastique (polypropylène ou nalgène). Afin d'éviter les contaminations croisées, il existe différents jeux de verrerie dédiés selon le niveau de contamination des matrices (matrices naturelles, matrices de station d'épuration). Cependant, afin d'assurer la validité des analyses effectuées, les solvants et les réactifs sont de haute qualité et testés pour leur bruit de fond relativement aux signaux des composés d'intérêt.

Une solution mère contenant les 12 AGs à une concentration de  $35 \text{ mg L}^{-1}$  est utilisée. A cause de la non disponibilité des étalons deutérés relatifs aux l'AGs, l'Atrazine D5 est utilisé comme étalon d'injection suite à la ressemblance structurale en partie avec les AGs. La solution d'étalon est préparée, à partir d'une solution de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  par dilution dans l'eau, à une concentration de  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  utilisée comme solution de travail. En plus, l'Atrazine est utilisé comme étalon d'extraction au cours de l'extraction SPE des AGs.

La colistine est préparée à une concentration de  $111,54 \text{ mg L}^{-1}$ . L'absence de la colistine deutéré sur le marché nous oblige à l'utilisation d'autres méthodes d'étalonnages pour la quantification tels que : l'ajout dosé. La solution de travail pour la colistine est préparée par dilution dans l'eau à une concentration de  $4 \text{ mg L}^{-1}$ .

## **3. Sites de prélèvement des échantillons d'eau**

Les méthodes développées sont appliquées sur des échantillons réels d'eau. Ces échantillons ont été prélevés dans des stations d'épuration au Liban et à Bordeaux d'une part, et d'autre part dans les eaux usées d'un hôpital vétérinaire où sont utilisés les aminoglycosides.

### **3.1. Sites de prélèvement de Bordeaux**

Deux stations d'épuration de la Communauté Urbaine de Bordeaux ont leurs effluents de sortie qui se déversent dans la Garonne et peuvent constituer une source de contamination. L'unité de mesure EH se base sur la quantité de pollution émise par personne et par jour. (1 EH = 60 g de  $\text{DBO}_5/\text{jour}$  soit  $21,6 \text{ kg de DBO}_5/\text{an}$ , d'après la directive européenne du 21 mai 1991).

Il s'agit du Clos de Hilde (CH) et de Louis Fargue (LF) (Figure II-1). La capacité de traitement du Clos de Hilde est de plus de 400 000 EH. Sa zone d'influence draine essentiellement des eaux domestiques et industrielles. Louis Fargue a une capacité de traitement de 300 000 EH, actuellement en cours de rénovation. Cette dernière station d'épuration est ainsi plus impactée par les eaux pluviales que Clos de Hilde, en cas de forte pluie.



Figure II-1 : Localisation de deux stations d'épuration.

Les deux stations appliquent un traitement physico-chimique et biologique. Les stations LF et CH comportent les installations présentés en annexe 1, qui permettent une partie de ces traitements. Cependant, le traitement par boues activées de la station LF est sous dimensionné : plus de 50 % de l'effluent n'est traité que par des procédés physico-chimiques (floculation, décantation). Les rejets de l'eau traitée se font directement dans l'estuaire (Garonne).

L'eau qui arrive en station d'épuration subit plusieurs traitements, ce qui permet d'éliminer une partie des polluants, comme le montre schématiquement la Figure II-2.

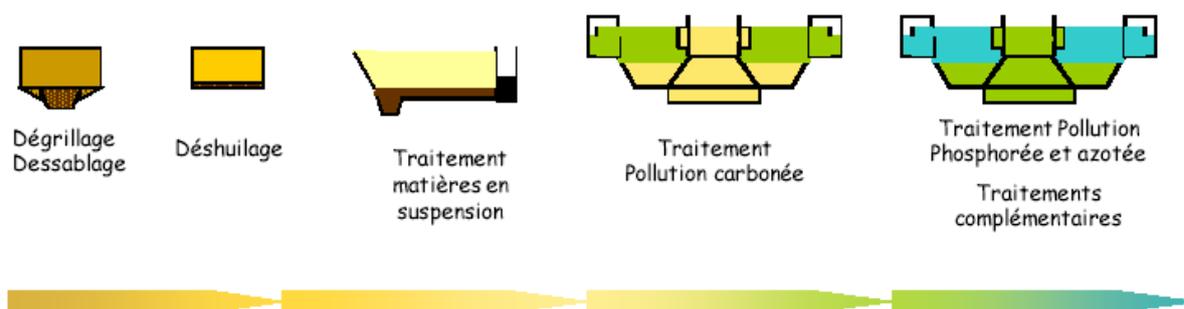


Figure II-2 : Principales étapes du traitement des eaux dans les STEP.

Le dégrillage consiste à retenir les déchets volumineux, le dessablage en l'abattement des particules dont le diamètre est supérieur à 100  $\mu\text{m}$  et le dégraissage-déshuilage en séparant les huiles et les graisses de l'effluent brut.

Les processus de traitement primaire de l'eau sont physiques (décantation, séparation solide – liquide par pesanteur) et physico-chimiques (coagulation-floculation, flottation). L'objectif est d'éliminer 60 à 80 % des matières en suspension d'une part et d'autre part de réduire la pollution

organique dont l'élimination complète se fait par traitement secondaire ou biologique (la sédimentation partielle des matières en suspension influence l'activité biologique des bactéries qui se multiplient en dégradant la matière organique). Le mécanisme d'élimination de l'azote s'effectue par les micro-organismes diazotrophes qui réduisent, le taux de nitrites et nitrates formant de l'azote gazeux. Les deux stations LF et CH diffèrent par leur mode de traitement biologique. A la station LF, le traitement des eaux se fait dans des bassins d'aération par l'intermédiaire de boues activées, alors que dans la station CH il se fait par des biofiltres (l'eau est pompée sur des filtres où se développent en continu des bactéries diazotrophes). Les installations des deux stations LF et CH sont présentées dans l'annexe 1.

Plusieurs campagnes d'échantillonnage sont effectuées dans les deux stations d'épuration en Septembre, Octobre, Décembre et Mars 2012-2013. Deux litres d'eau par échantillon sont pris depuis les préleveurs automatiques (Figure II-3). Les échantillons sont représentatifs puisque les préleveurs effectuent des prélèvements aliquotes dans les bassins sur 24 heures jusqu'à remplir les réservoirs. L'échantillon est ensuite réparti en 3 bouteilles en nalgène et une bouteille en verre dont le contenu de chacune est de 500 mL.



Figure II-3 : Photo d'un préleveur automatique

### 3.2. Sites de prélèvements du Liban

Au Liban, deux stations d'épuration (EL Ghadir et Hammana) et un hôpital vétérinaire H1(Mtaileb) ont été choisis (Figure II-4). La période des prélèvements est comprise entre le mois de Juillet et le mois de Septembre 2013.

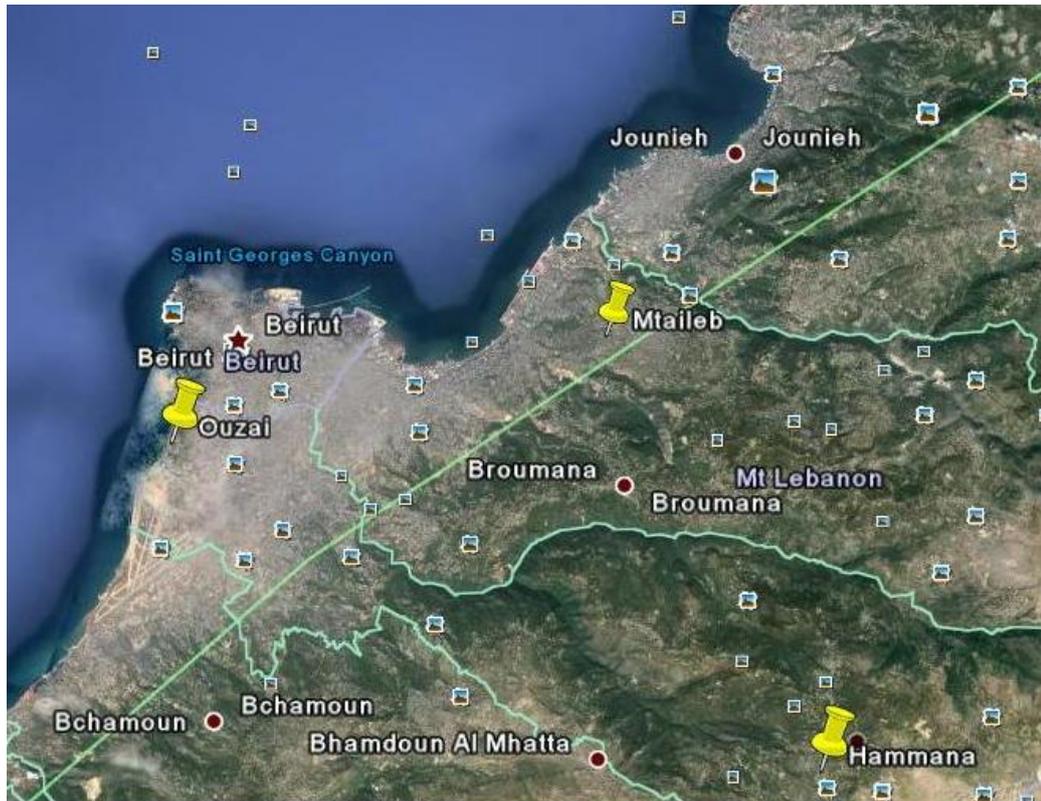


Figure II-4 : Localisation des sites d'études et poursuite des points de prélèvements.

La station El Ghadir est située à Beyrouth, Ouzai, avec un débit moyen d'entrée  $34481 \text{ m}^3/\text{j}$ . Cette station est suivie car elle est la seule station, à notre connaissance, en fonctionnement en milieu fortement urbanisé, à Beyrouth. Elle a été construite en 1985-1986 sur une surface de  $21\,500 \text{ m}^2$  environ, elle se situe dans la banlieue au sud de Beyrouth, à l'ouest de l'aéroport, sur la côte à  $50 \text{ m}$  de l'autoroute de Khaldeh. La station, mise en service en 1998, afin de traiter des eaux usées domestiques, applique un traitement impliquant : un dégrillage, un dessablage et un dégraissage. Actuellement une partie de cette zone est connectée à la station, principalement la banlieue sud et ses environs. En plus, la station reçoit les eaux usées provenant de vidanges ex situ et des camions venant de la zone non connectée directement à la station. Le volume ainsi rejeté à l'entrée de la station, sans que le gestionnaire de la station soit forcément averti, est équivalent à 100 citernes soit une capacité totale d'environ  $2\,000 \text{ m}^3/\text{j}$ . Cette station fonctionne actuellement à la moitié de sa capacité, soit  $46\,000 \text{ m}^3/\text{j}$ . La population desservie, initialement prévue, comptait environ 800 000 habitants (avec un équivalent habitant qui correspond à  $120 \text{ L/j}$  pour le Liban). Les effluents sont rejetés en Mer Méditerranée à une distance de  $2,6 \text{ km}$  du littoral, à une profondeur de  $60 \text{ m}$ . Dans les périodes de charge et durant la saison des pluies, la station arrête partiellement ou complètement son traitement et les effluents seront rejetés directement en mer à  $500 \text{ m}$  du rivage. Le tableau II- 2 présente des valeurs de plusieurs paramètres analysées sur des échantillons réels de la station et sont comparés aux normes proposées par le ministère de l'Environnement en 1996.

Tableau II-2 : Qualité des eaux traitées à El Ghadir comparées aux normes proposées par le ministère de l'Environnement en 1996.

Paramètres	Normes	Rejet
Température (°C)	35	28.2
pH	6 - 9	7.7
MES (mg L <sup>-1</sup> )	60	335.2
DCO (mg L <sup>-1</sup> )	100	792.5
DBO <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	60	222
Phosphate (mg L <sup>-1</sup> )	5	29.8
Fer (mg L <sup>-1</sup> )	1.5	0.12
Zinc (mg L <sup>-1</sup> )	5	0.04
Nickel (mg L <sup>-1</sup> )	0.1	0.014
Cadmium (mg L <sup>-1</sup> )	0.05	< 0.002

\* Source: Laboratoire d'autocontrôle de la station de El Ghadir (2003; B/ MOE, 1996)

MES: Matière en suspension; DCO : Demande Chimique en Oxygène; DBO<sub>5</sub> : Demande Biochimique en Oxygène pendant cinq jours.

La station Hammana traite les eaux usées avec une capacité nominale de 8000 EH. Le débit journalier est estimé à 360 m<sup>3</sup>/j. De même que LF et CH, cette station (Figure II- 5) effectue un traitement physico-chimique (floculation, décantation,..) et biologique.

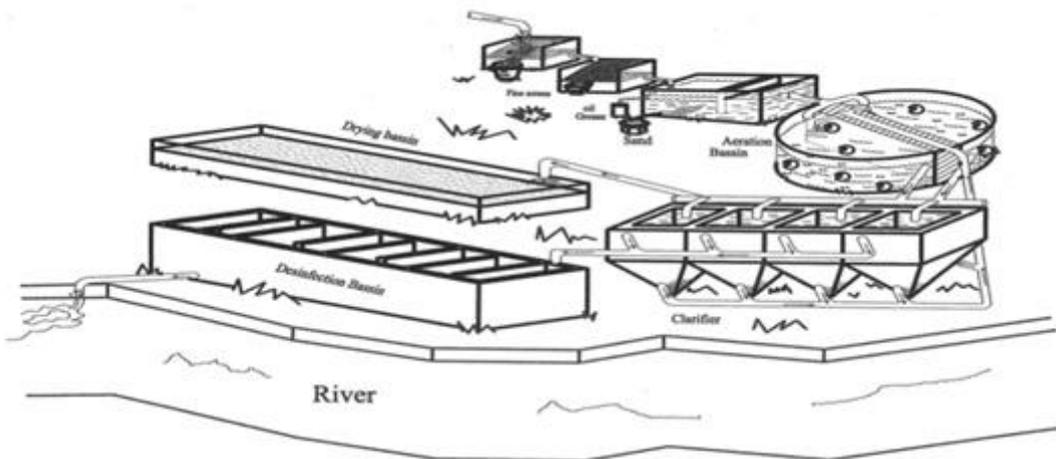


Figure II-5 : Chemin représentatif de la station d'épuration de Hammana

Le tableau II-3 regroupe plusieurs paramètres menés en 2010 pour cette station.

Tableau II-3 : Paramètres mesurés pour la station de Hammana.

Paramètres	Rejet
DCO (mg L <sup>-1</sup> )	52
DBO <sub>5</sub> entrée (mg L <sup>-1</sup> )	395
DBO <sub>5</sub> sortie (mg L <sup>-1</sup> )	17
MES (mg L <sup>-1</sup> )	28

*DCO : Demande Chimique en Oxygène; DBO<sub>5</sub> : Demande Biochimique en Oxygène pendant cinq jours ; MES: Matière en suspension.*

Pour ces deux stations (El Ghadir, Hammana) les échantillons sont prélevés à l'entrée et à la sortie.

L'hôpital H1, situé à Mtaileb, soigne entre 10 et 15 animaux domestiques par jour. Les échantillons d'eaux usées sont prélevés à la sortie de H1, en utilisant des bouteilles en plastique de 1L.

#### 4. Extraction et préparation des échantillons

Afin d'appliquer le protocole d'extraction, les différentes phases doivent être séparées. Les eaux, conservées dans des bouteilles en plastique à 4°C, sont filtrées par passage à travers un filtre en fibre de verre GF/F Whatman (préalablement chauffé à 450°C, pendant 6 heures) de diamètre de pores 0,7 µm (Sigma Aldrich, UK).

Lorsque la matrice aqueuse présente une charge particulaire importante (entrée de station d'épuration), une étape de pré-filtration est réalisée par passage sur un filtre en fibre de verre GF/A Whatman (préalablement chauffés à 450°C, pendant 6 heures) de diamètre de pores 1,7 µm (Sigma Aldrich, UK). Le volume des échantillons filtrés utilisés pour effectuer l'extraction étant de 50 mL.

Le problème dans l'application de la SPE réside dans le choix de la masse et de la nature d'adsorbant. Le développement de la méthode est lié principalement aux propriétés des composés étudiés. Le pH de l'échantillon joue un rôle important dans la rétention des molécules cibles sur la phase stationnaire. Le méthanol est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des produits pharmaceutiques dans la plupart des travaux (Seifrtova et al, 2009).

##### 4.1. Extraction des aminoglycosides

Les échantillons d'eau, stockés à 4°C durant 24 à 48 heures, sont mis à température ambiante. L'Atrazine a été utilisé comme étalon d'extraction lors du développement de la méthode vue l'absence des étalons deutérés dans notre laboratoire. Le volume d'Atrazine à 0,2 mg L<sup>-1</sup> ajouté aux échantillons était de 75 µL. La procédure d'extraction SPE hors ligne est mise en oeuvre sur un support contenant 24 positions avec une petite pompe. Les cartouches Octadécyle (Chromabond

C18, 200 mg, 3 cc, Agilent) sont conditionnées avec 3 mL de méthanol puis 5 mL d'eau contenant 0,7% PFPA. Les échantillons sont percolés à travers la cartouche avec un débit de 5 mL min<sup>-1</sup>. Les cartouches sont ensuite séchées sous vide (10 mm Hg) pendant 20 minutes. Enfin, les composés sont élués avec 5 mL de méthanol. L'extrait final est évaporé sous azote à une température de 50°C jusqu'à l'obtention d'un volume de 300 µL.

#### 4.2. Extraction de la colistine

La colistine est extraite en utilisant la SPE en ligne couplée au LC/MS/MS. Le système utilisé est présenté dans la Figure II-6.

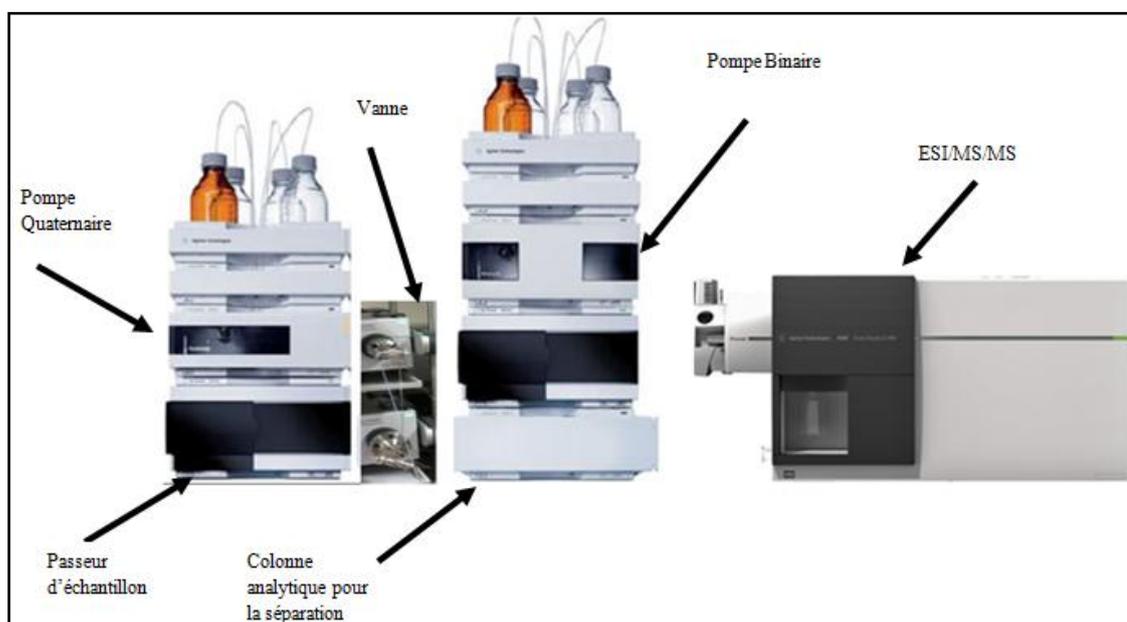


Figure II-6 : Présentation du système SPE-LC/MS/MS.

Le système d'analyse est composé d'un module de pré-concentration couplée à un système LC-MS/MS (Agilent Technologies, France). Il inclut un échantillonneur automatique (ALS) équipé d'une boucle d'injection de 900 µL avec une capacité multi-injection. Un programme de 6 ports / 2 voies de positions est utilisé pour basculer entre le mode de chargement et d'éluion (V1 et V2 dans la Figure II -7). La cartouche PLRPs du SPE est conditionnée avec de l'acétonitrile et de l'eau. Au début de la procédure, V1 est mis en position de dérivation et V2 en position de chargement. L'aiguille injecte 900µL de l'échantillon en présence de 0,1% PFPA dans la boucle. Ensuite, V1 commutée en position de passage principal, l'échantillon est élué dans la cartouche par la pompe quaternaire du LC. Un délai d'attente de 0,95 min, choisi en fonction du débit de la pompe quaternaire et du volume de l'échantillon, est nécessaire pour permettre l'éluion totale de l'échantillon dans la cartouche. Après cela, V2 est mise en position d'éluion et les analytes retenus

sont progressivement transférés à la colonne analytique LC en mode back-flush, en utilisant le gradient LC.

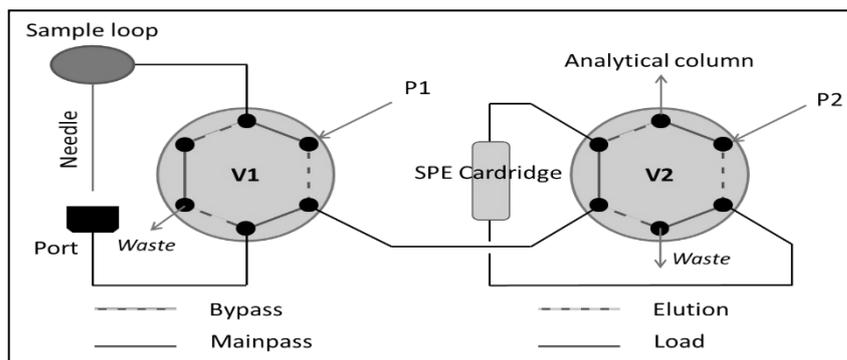


Figure II-7: Chemin représentatif du fonctionnement du système SPE-LC/MS/MS.

## 5. Analyse et quantification par Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

Deux séries du système de la spectrométrie de masse de chez Agilent (6410 et 6490) sont utilisés pour le développement des protocoles d'analyse dans nos travaux. La nouvelle série 6490 triple quadripôles est dotée de la technologie révolutionnaire iFunnel permettant d'obtenir la sensibilité la plus élevée par une augmentation du guidage plus efficace des ions de l'analyte dans le spectromètre de masse. En plus, ce système comprend : la technologie Jet Stream, l'assemblage de désolvatation plus court avec un capillaire Hexabore et le double entonnoir Ion Offset. Ces spécifications permettent d'atteindre une sensibilité plus élevée pour le 6490 en comparaison du 6410. Les conditions d'analyse sont décrites dans les publications 1, 2 et 3 avec tous les paramètres chromatographiques optimisés.

Pour la quantification de cette thèse, deux méthodes d'étalonnage sont réalisées : avec étalons interne et par ajout dosé. L'étalonnage interne a été appliqué dans le dosage des 12 molécules d'aminoglycosides étudiées en utilisant l'atrazine D5 (Importation difficile des molécules deutérés au Liban) possédant un comportement chimique proche des molécules étudiées, alors que l'absence des molécules deutérées proches de la colistine dans le laboratoire a conduit à l'application de l'ajout dosé en étalonnage.

## 6. Méthodes et critères de validation

La validation se définit comme la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies (ISO/CEI 17025). Lorsque les laboratoires développent ou utilisent des méthodes non normalisées, les performances analytiques doivent être évaluées par plusieurs tests et calculs statistiques. Ainsi, il faut d'abord s'assurer que la méthode utilisée permet de donner des résultats fiables en accord

avec des limites acceptables demandées par l'usage du produit analysé. La validation d'une méthode analytique est requise pour passer de la phase de développement à celle de l'utilisation en routine et elle permet de fixer les spécifications de contrôle. L'objectif de la validation d'une méthode analytique est de démontrer que chaque mesure réalisée ultérieurement en routine est suffisamment proche de la valeur vraie ou dans les limites acceptables et de garantir la fiabilité et la traçabilité des résultats fournis. Les critères de la validation sont fixés en fonction de la finalité de la procédure analytique.

Les performances d'une méthode analytique peuvent être évaluées selon plusieurs critères: spécificité, sélectivité, linéarité, répétabilité et reproductibilité, justesse, précision, limites de détection et de quantification. La validation d'une méthode analytique est indispensable avant de pouvoir l'utiliser en analyse de routine, car elle permet l'assurance de la fiabilité et des limites acceptables pour l'analyse des résultats obtenus lors d'une analyse effectuée.

Une méthode utilisée dans le cadre d'études de présence des antibiotiques dans l'eau doit posséder une sélectivité suffisante pour discriminer l'antibiotique en regard des impuretés venant de la matrice normalement chargée par beaucoup de composés ; c'est-à-dire posséder une bonne séparation chromatographique. La réponse doit être étudiée en fonction de la concentration de l'analyte dans un intervalle de dosage approprié autour de la valeur cible (ex. 50% - 120%). La mesure de la justesse est généralement exprimée en termes de recouvrement et de biais absolu ou relatif (erreur systématique). La répétabilité est estimée en calculant le coefficient de variation du rapport de l'écart type des résultats pour une même série sur la valeur moyenne de chaque concentration. De même, la reproductibilité est exprimée comme le coefficient de variation du rapport de l'écart type entre les différentes séries sur la valeur moyenne de chaque concentration. Enfin, l'exactitude porte sur l'évaluation de la fidélité intermédiaire et du biais par rapport à des valeurs de référence (dopages des échantillons par les analytes).

Dans ce travail basé sur Eurachem 1998, une erreur totale jusqu'à 30% est considérée acceptable. Des valeurs de LOD et LOQ les plus basses possibles sont des critères indispensables lorsque l'analyse de très faibles concentrations est envisagée, comme dans le cas de l'analyse de traces d'antibiotiques dans l'environnement. Le rapport signal/bruit (S/N) est calculé pour chaque composé. Pour déterminer la LOQ, il faut considérer un rapport S/N plus grand que 10. La linéarité est évaluée sur une gamme de concentrations par l'intermédiaire du coefficient de détermination  $R^2$ . Le coefficient de variation (CV) est déterminé par l'écart type de la série injectée divisé par sa moyenne ce qui nous permet d'évaluer la précision des méthodes optimisées.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbasi. M, Nemati. M, Babaei. H, Ansarin. M et Nourdadgar. AO, 2012, Solid-Phase Extraction and Simultaneous Determination of Tetracycline Residues in Edible Cattle Tissues Using an HPLC-FL Method, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 11, 781-787.
- Aga. DS, 2008, *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*, Boca Raton, CRC Press.
- Alexy. R, Kumpel. T, et Kummerer. K, 2004, Assessment of degradation of 18 antibiotics in the closed bottle test, *Chemosphere* 57, 505-512.
- Alpendurada. MF, 2000, SPME: a promising technique for sample preparation in environmental analysis, *Journal of Chromatography A* 889, 3-14.
- Alves Garcia. RM, De Oliveira. LO, Alves Moreira. M et Silva Barros.W, 2005, Variation in emetine and cephaeline contents in roots of wild Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*), *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 233-243.
- Andreozzi. R, Raffaele. M et Nicklas.P, 2003, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere* 50, 1319-1330.
- Anses, 2011, Rapport annuel : Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2011, <http://www.anses.fr/fr/content/suivi-des-ventes-dantibiotiques-v%C3%A9t%C3%A9rinaires>.
- ANSM, 2013, Rapport : Évolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012, <http://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Evolution-des-consommations-d-antibiotiques-en-France-entre-2000-et-2012-nouveau-rapport-d-analyse-de-l-ANSM-Point-d-Information>.
- Antignac. JP, De Wasch. K, Monteau. F, De Brabander. H, Andre. F et Le Bizec. B, 2005, The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis, *Analytica Chimica Acta* 529, 129-136.
- AP, 2008, "Pharmaceuticals lurking in U.S. drinking water - AP (Associated Press) probe found traces of meds in water supplies of 41 million Americans." Dernière consultation le 30 mars 2009. <http://www.msnbc.msn.com/id/23503485/>.
- Babic. S, Horvat. AJM, Pavlovic. DM et Macan. MK, 2007, Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients, *Trends in Analytical Chemistry* 26, 1043-106.
- Barceló. D et Petrovic. M, 2007, Challenges and achievements of LC-MS in environmental analysis: *Trends in Analytical Chemistry* 26, 2-11.
- Barnes. KK, Kolpin. DW, Furlong. ET, Zaugg. SD, Meyer. MT, et Barber. LB, 2008, A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States: I) Groundwater, *Science of the Total Environment* 402, 192-200.
- Batt. AL et Aga DS, 2005, Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination, *Analytical Chemistry* 77, 2940-2947.

- Batt. AL, Kim. S et Aga. DS, 2007, Comparison of the occurrence of antibiotics in four full-scale wastewater treatment plants with varying designs and operations, *Chemosphere* 68, 428-435.
- Baugros. JB, Giroud. B, Dessalces, G, Grenier-Loustalot. MF, et Cren-Olive. C, 2008, Multiresidue analytical methods for the ultra-trace quantification of 33 priority substances present in the list of *REACH* in real water samples, *Analytica Chimica Acta* 607, 191-203.
- Benito-Pena. E, Partal-Rodera.I, Leon-Gonzalez.E et Moreno-Bondi.C, 2006, Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DAD detection, *Analytica Chimica Acta* 556, 415-422.
- Bing. L, Tong. Z, Zhao. YX et Herbert. PF, 2009, Rapid analysis of 21 antibiotics of multiple classes in municipal wastewater using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 645, 64-72.
- Boreen. AL, Arnold. WA et McNeill. K, 2004, Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups, *Environmental Science & Technology* 38, 3933-3940.
- Bound. JP et Voulvoulis. N, 2005, Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental Health Perspectives* 113, 1705-1711.
- Boxall. AB, 2004, The environmental side effects of medication, *European Molecular Biology Organization* 5, 1110-1116.
- Boxall. AB, Sinclair. CJ, Kolpin. D et Maund. SJ, 2004, When Synthetic Chemicals Degrade in the Environment, *Environmental Science & Technology* 38, 368A-375A.
- Boxall. AB, Fogg. LA, Baird. DJ, Lewis. C, Telfer. TC, Kolpin. D, Gravell. A, Pemberton. E, et Boucard. T, 2006, Targeted monitoring study for veterinary medicines in the UK environment, Agency, Bristol, UK, <http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/dwi70-2-235.pdf>
- Brain. RA, Ramirez. AJ, Fulton. BA, Chambliss. CK et Brooks. BW, 2008, Herbicidal Effects of Sulfamethoxazole in *Lemna gibba*: Using p-Aminobenzoic Acid As a Biomarker of Effect, *Environmental Science & Technology* 42, 8965-8970.
- Brown. KD, Kulis. J, Thomson. B, Chapman. TH et Mawhinney. DB, 2006, Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico, *Science of the Total Environment* 366, 772-783.
- Bruno. DW, 1989, An investigation in to oxytetracycline residues in atlantic salmon, *Salmo salar* L, *Journal of Fish Diseases* 12, 77-86.
- Bryskier. A, 2005, Historical Review of Antibacterial Chemotherapy. In: *Antimicrobial Agents, Antibacterials and Antifungals* (Bryskier A, ed), Washington, D.C: ASM Press, 1-12.
- Bryskier.A, 2005a, Penicillins. In: *Antimicrobial Agents, Antibacterials and Antifungals* (Bryskier A, ed), Washington, DC: ASM Press, 113-162.
- Bryskier.A, 2005 b, Fluoroquinolones. In: *Antimicrobial Agents, Antibacterials and Antifungals* (Bryskier A, ed), Washington, DC: ASM Press, 668-788.
- Bryskier. A et Bergogne-Bérézin. E, 2005, Macrolides. In: *Antimicrobial Agents, Antibacterials and Antifungals* (Bryskier A, ed), Washington, DC: ASM Press, 475-526.

- Bryskier. A et Butzler. JP, 2003, Macrolides. In: Antibiotic and Chemotherapy: Anti-infective agents and their use in therapy (Finch RG, Greenwood, Norrby SR, Whitley RJ, eds), Edinburgh: Churchill Livingstone, 310-325.
- Bunker. JP, 2001, The role of medical care in contributing to health improvements within societies, *International Journal of Epidemiology* 30, 1260-1263.
- Cabello. FC, 2006, Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* 8, 1137-1144.
- Calamari. D, Zuccato. E, Castiglioni. S, Bagnati. R et Fanelli. R, 2003, Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy, *Environmental Science & Technology* 37, 1241-1248.
- Capdeville. M, 2011, Etudes des cycles biogéochimiques des contaminants dits « Emergents » dans les systèmes aquatiques- Thèse Bordeaux 1, N° 4303.
- Carballa. M, Omil. F, Lema. JM, Lompart. M, Garcia-Jares. C, Rodriguez. I, Gomez. M et Ternes. T, 2004, Behaviour of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Research* 38, 2918-2926.
- Carbon. C et Bax. RP, 1998, Regulating the use of antibiotics in the community, *British Medical Journal* 317, 663-665.
- Castiglioni. S, Fanelli. R, Calamari. D, Bagnati. R et Zuccato. E, 2004, Methodological approaches for studying pharmaceuticals in the environment by comparing predicted and measured concentrations in River Po- Italy, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39, 25-32.
- Cazeau. G, Chazel. M, Jarrige. N, Sala. C, Calavas. D, Gay. E, 2010, Anses - Utilisation des antibiotiques par les éleveurs en filière bovine en France, *Renc. Rech. Ruminants* 17.
- Cha. JM, Yang. S et Carlson. KH, 2005, Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* 1065, 187-198.
- Chataigner. B, 2004, Etude de la qualité sanitaire des viandes bovines et ovines à Dakar (Sénégal). Contamination par des résidus d'antibiotiques- Thèse Toulouse.
- Choi. JK, Sang-Goo. K, Chang-won.K, Seung-Hyun.K, 2007, Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD, *Chemosphere* 66, 977-984.
- Chopra. I, 2003, Tetracyclines. In: Antibiotic and Chemotherapy: Anti-infective agents and their use in therapy (Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ), Edinburgh: Churchill Livingstone, 393-406.
- Chopra. I et Roberts. M, 2001, Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology* 65, 232-260.
- Christensen, A. M., Markussen, B., Baun, A. et Halling-Sorensen, B., (2009). Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. *Chemosphere* 77, 351-358.

Clara. M, Strenn. B et Kreuzinger. N, 2004, Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: Investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration, *Water Research* 38, 947-954.

Conseil du médicament, 2005, Guide de posologie des antibiotiques courants chez l'adulte. Disponible sur :[<http://www.cdm.gouv.qc.ca/site/download.php?f=a3f2363a460b287c621241ce31691c69>], (dernier accès 2009/02/07).

Cooper. E, Siewicki. T et Phillips.K, 2008, Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment, *Science of the Total Environment* 398, 26-33.

Corvaglia. A, 2006, Rôle des résidus d'antibiotiques dans les environnements hydriques sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*, Thèse Genève, N° 3796.

Crathorne. B, Fielding. M, Steel. CP et Watts. CD, 1984, Organic compounds in water: analysis using coupled-column high-performance liquid chromatography and softionization mass spectrometry, *Environmental Science & Technology* 18, 797-802.

Crathorne. B, Watts. CD, Bjorseth. A et Angeletti.G, 1982, Identification of Non-Volatile Organics in Water, In: *Analysis of Organic Micropollutants in Water*, Dordrecht: D. Reidel Publishing Company, 159-173.

Cunningham. VL, Buzby. M, Hutchinson. T, Mastrocco. F, Parke. N et Roden. N, 2006, Effects of Human Pharmaceuticals on Aquatic Life: Next Steps, *Environmental Science & Technology* 40, 3457-3462.

Daughton. CG, 2004a, PPCPs in the Environment: Future Research- Beginning with the End Always in Mind, In: *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks* (Kummerer K, eds). Berlin: Springer, 463-495.

Diaz-Cruz. S et Barceló. D, 2004, Occurrence and analysis of selected pharmaceuticals and metabolites as contaminants present in wastewaters, sludge and sediments in D. Barceló (Ed), *The Handbook of Environmental Chemistry, Part I*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 5, 227-260.

Dinh. QT, Alliota. F, Guigona. EM, Eurina. J, Chevreuila. M et Labadie. P, 2011, Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS, *Talanta* 85, 1238-1245.

Ding. J, Ren. N, Chen. L, Ding. L, 2009, On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of macrolide antibiotics in environmental water, *Analytica Chimica Acta* 634, 215-221.

Dirani. A, 2010, Études cinétique et mécanistique d'oxydation/minéralisation des antibiotiques sulfaméthoxazole (SMX), amoxicilline (AMX) et sulfachloropyridazine (SPC) en milieux aqueux par procédés électrochimiques d'oxydation avancée. Mesure et suivi d'évolution de la toxicité lors du traitement, Thèse Université Paris Est.

Drusano. G, Ambrose. P, Bhavnani. S, Bertino. J, Nafziger. A, et Ordway. A, 2007, Back to the Future: Using Aminoglycosides Again and How to Dose Them Optimally, *Antimicrobial Resistance* 45, 753-60.

Erickson. BE, 2002, Analyzing the ignored environmental contaminants, *Environmental Science & Technology* 36, 140-145.

- Frasca. D, Dahyot-Fizelier. C et Mimosz. O, 2008, La colistine en reanimation: Colistin in the intensive care unit, *Réanimation* 17, 251-258.
- Farré. M, Ferrer. I, Ginebreda. A, Figueras. M, Olivella. L, Tirapu.L, Vilanova. M et Damia. B, 2001, Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*, *Journal of Chromatography A* 938, 187-197.
- Felizzola. FJ, Brice. T et Serge. C, 2007, Evaluating on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-ion trap mass spectrometry for reliable quantification and confirmation of several classes of antibiotics in urban wastewaters, *Journal of Chromatography A* 1164, 95-104.
- Finnigan ,1996, LCQ MS Detector Hardware. Rev. B, Finnigan Corporation, San Jose, CA.
- Garcia. A, 2010, Développement de méthodes analytiques pour la détection et la quantification de traces de produits pharmaceutiques dans les eaux du fleuve Saint Laurent, Thèse Université de Montréal.
- Gartiser.S, Urich. E, Alexy. Ret Kümmerer. K, 2007, Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests, *Chemosphere* 67, 604-613.
- Gauthier. E, 1993, Les Antibiotiques : l'envers du miracle, L'Agora, Vol 1, n° 2.
- Gentili. A, 2005, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trends in Analytical Chemistry* 24, n° 7
- Glassmeyer. ST, Kolpin. DW, Furlong. ET et Focazio. MJ, 2008, Environmental Presence and Persistence of Pharmaceuticals: An Overview, *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*, Boca Raton, CRC Press: 3-51.
- Göbel.A, McArdell. CS, Joss. B, Siegrist. H et Giger.W, 2007, Fate of sulfonamide, macrolides, and trimethoprim in different wastewater treatment technologies, *Science of the Total Environment* 372, 361-371.
- Göbel.A, McArdell. C, Suter. Met Giger. W, 2004, Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and Trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 76, 4756-4764.
- Göbel.A, Thomsen.A, McArdell.CS, Joss. A et Giger. W, 2005, Occurrence and sorption behavior of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in activated sludge treatment, *Environmental Science & Technology* 39, 3981-3989.
- Golet. EM., Alder. AC, Hartmann. A, Ternes T et Giger. W, 2001, Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by solid phase extraction and liquid chromatography with fluorescence detection, *Analytical Chemistry* 73, 3632-3638.
- Golet.EM., Xifra. I, Siegrist.H, Alder. AC et Giger.W, 2003, Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil, *Environmental Science & Technology* 37, 3243-3249.
- Golet. EM., Alder. AC et Giger. W, 2002, Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland, *Environmental Science & Technology* 36, 3645-3651.

- Gómez. MJ, Petrović. M, Fernández-Alba. AR et Barceló. D, 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, 224-233.
- Goni-Urriza. M, Michele. C, Corinne. A, Nathalie. R, Pierre. C et Claudine. Q, 2000, Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp, *Applied and Environmental Microbiology* 66, 125-132.
- Greenwood. D, 2003, The Evolution of Antimicrobial Drugs. In: *Antibiotic and Chemotherapy: Anti-infective agents and their use in therapy* (Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ). Edinburgh: Churchill Livingstone, 3- 10.
- Gros. M, Mozaz. SR, Barcelo. D, 2013, Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1292, 173-188.
- Gulkowska. A, Leung. HW, So. MK, Taniyasu. S, Yamashita. N, Yeung. LW, Richardson BJ, Lei. AP, Giesy. JP et Lam.P, 2008, Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, *Water Research* 42, 395-403.
- Halling-Sørensen. B, Nors Nielsen. S, Lanzky. PF, Ingerslev. F, Holten Lützhøft. HC, Jørgensen. SE, 1998, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment a review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- Halling-Sørensen. B, Holten Lützhøft. HC, Andersen.HR et Ingerslev. F, 2000, Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 53-58.
- Haug. T, Hals. P, 2000, Pharmacokinetics of oxytetracycline in arctic charr (*Salvelinus alpinus* L) in freshwater at low temperature, *Aquaculture* 186, 175-191.
- Heberer. T, 2002 a, Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of the recent research data, *Toxicology Letters* 131, 5 -17.
- Heberer. T, 2002 b, Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water, *Journal of Hydrology* 266, 175-189.
- Helms. M, Simonsen. J, Olsen. K, Molbak. K, 2005, Adverse Health Events Associated with Antimicrobial Drug Resistance in *Campylobacter* Species: A Registry-Based Cohort Study, *The Journal of Infectious Diseases* 191, 1050–5.
- Hennion. M, 1999, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 856, 3-54
- Henschel. KP, Wenzel. A, Diedrich. M et Fliedner. A, 1997, Environmental hazard assessment of pharmaceuticals, *Regulatory Toxicology Pharmacology* 25, 220-225
- Hilton. MJ et Thomas. KV, 2003, Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1015, 129-141.

- Hirsch. R, Ternes. T, Haberer. K, Kratz. KL, 1999, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Science of the Total Environment* 225, 109-118
- Hirsch. R, Ternes.T., Haberer. K, Mehlich.A, Ballwanz. F et Kratz. KL, 1998, Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 815, 213-223.
- Holm. JV, Ruegge. K, Bjerg PL, et Christensen. TH, 1995, Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark), *Science of the Total Environment* 29, 1415-1420.
- Holten-Lützhøft.HC, Halling-Sørensen. Bet Jørgensen. SE, 1999, Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming, *Archive of Environmental Contamination Toxicology* 36, 1-6.
- Isidori. M, Lavorgna. M, Nardelli. A, Pascarella. L et Parrella. A, 2005, Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms, *Science of the Total Environment* 346, 87-98.
- Isoherranen. N et Soback. S, 1999, Chromatographic Methods for Analysis of Aminoglycoside Antibiotics, *Journal of AOAC International* 82, 1017- 1045.
- Jen. JF, Lee. HL et Lee. BN, 1998, Simultaneous determination of seven sulfonamide residues in swine wastewater by high-performance liquid chromatography, *Journal of ChromatographyA* 793.378-382.
- Jones. OA, Voulvoulis. N et Lester. JN, 2004, Potential ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment, *Critical Reviews in Toxicology* 34, 335-350.
- Kaufmann. A, Butcher. P et Maden. K, 2011, Determination of aminoglycoside residues by LC-MS/MS in a variety of matrices, *Analytica Chimica Acta* 711, 46-53.
- Katz. L et Ashley. GW, 2005, Translation and protein synthesis: macrolides, *Chemical Review* 105, 499-528.
- Kemper.N, 2008, Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological Indicators* 8, 1-13.
- Khetan. SK et Collins. TJ, 2007, Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry, *Chemical Reviews* 107, 2319-2364.
- Kloepfer. A, Quintana. JB, et Reemtsma.T, 2005, Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples.*Journal of Chromatography A* 1067, 153-160.
- Kolpin. DW, Furlong. ET, Meyer. MT, Thurman. EM., Zaugg. SD et Barber. LB, 2002, Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance, *Environmental Science & Technology* 36, 1202-1211.
- Korolkovas. A, 1976, *Essentials of medicinal chemistry*, New York, NY: Wiley.
- Koschorreck. J, Koch. C et Rönnefahrt. I, 2002, Environmental risk assessment of veterinary medicinal products in the EU-a regulatory perspective, *Toxicology Letters* 131, 117-124.

- Kostopoulou. M, Golfinopoulos. SK, Nikolaou. AD, Xilourgidis. NK et Lekkas. D, 2000, Volatile organic compounds in the surface waters of Northern Greece, *Chemosphere* 40, 527-532.
- Kouadio. D, 2009, Contamination des Eaux de Surface par les Produits Pharmaceutiques en Zones Urbaines de Côte D'ivoire: Cas du District D'Abidjan, *Européen Journal of Scientific Research* 27, <http://www.eurojournals.com/ejsr.htm>.
- Koutsouba. V, Heberer. T, Fuhrmann. B, Schmidt-Baumler.K, Tsipi. D et Hiskia.A, 2003, Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry, *Chemosphere* 51, 69-75.
- Kumar. K, Gupta. SC, Chander. Y et Singh. AK, 2005, Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment, *Advances Agronomy* 87, 1-54.
- Kumazawa. T, Hiroshi.S, Watanabe-Suzuki. K, Hattori. H, Ishii.A, Sato.K et Suzuki. O, 2000, Determination of phenothiazines in human body fluids by solid phase microextraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 35, 1091-1099.
- Kümmerer.K, 2004, Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54, 311-320.
- Kümmerer. K, 2009, Antibiotics in the environment - A review - Part I, *Chemosphere* 75, 417-434.
- Kümmerer.K, 2001, *Pharmaceuticals in the aquatic Environment.Sources, Fate, Effects and Risks*.Berlin, Springer-Verlag.
- Längin.A, Alexy.R, König. A et Kümmerer.K, 2009,Deactivation and transformation products in biodegradability testing of  $\beta$ -lactams amoxicillin and piperacillin, *Chemosphere* 75, 347-354.
- Larsson. D, de Pedro. C et Paxeus. N, 2007, Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals, *Journal Hazardous Materials* 148, 751-755.
- Lee. LS, Carmosini. N, Sassman.SA, Dion. HM et Sepúlveda. MS, 2007, Agricultural contributions of antimicrobials and hormones on soil and water quality, *Advances in Agronomy* 93, 1-68.
- Levi.Y, 2006, Inquiétudes sur la présence d'antibiotiques et de bactéries antibiorésistantes dans les eaux, *Environnement Risques & Santé* 5, 261-265.
- Lindberg.R, Jarnheimer. PA, Olsen. B, Johansson. Met Tysklind. M,2004,Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards, *Chemosphere* 57, 1479-1488.
- Lindsey. ME, Meyer. M et Thurman. EM, 2001, Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass-spectrometry, *Analytical Chemistry* 73, 4640-4646.
- Liu. F, Ying. GG, Tao. R, Zhao.JL, Yang. JF et Zhao.LF, 2009, Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution* 157, 1636-1642.
- Loffler. D et Thomas. T, 2003, Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography– electrospray-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1000, 583-588.

- Mangoni. ED, Grammatikos. A, Utili. R, 2009, Falagas. ME, Do we still need the aminoglycosides? , *International Journal of Antimicrobial Agents* 33, 201-205.
- Miao. X, Bishay.F, Chen. M et Metcalfe. C, 2004, Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada, *Environmental Science & Technology* 38, 3533-3541.
- Migliore. L, Brambilla. G, Casoria. P, Civitareale. C et Cozzolino. S, 1996, Effects of antimicrobials for agriculture as environmental pollutants, *Fresenius Environmental Bulletin* 5, 735-739.
- Mitscher. L, 2005, Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridone Antibacterial Agents. *Chemical Reviews* 105, 559-592.
- Mullot. JU, 2009, Modélisation des flux de médicaments dans les effluents hospitaliers- Thèse Université Paris-Sud, N° 1303.
- Nieto.A, Borrull. F, Marce. R, et Pocurull. E, 2007, Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A* 1174, 125-131.
- Pailler.YJ , Krein. A, Pfister. L, Hoffmann. L et Guignard . C, 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- 4743.
- Pedersen. JA, Soliman. M et Suffet.IH, 2005, Human Pharmaceuticals, Hormones, and Personal Care Product Ingredients in Runoff from Agricultural Fields Irrigated with Treated Wastewater, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1625-1632.
- Pedersen. JA, Yeager. MA et Suffet. IH, 2003, Xenobiotic Organic Compounds in Runoff from Fields Irrigated with Treated Wastewater, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1360-1372.
- Pedro Alejandro Segura, 2009, Développement de techniques analytiques pour la détermination des agents anti-infectieux dans les eaux environnementales, Thèse Université de Montréal.
- Peschka.M, Roberts. PH et Knepper. TP, 2007, Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 959-968.
- Petrovic. M, 2007, Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle, 1-564.
- Petrovic. M, Gonzalez. S et Barcelo. D, 2003, Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water, *Trends of Analytical Chemistry* 22, 685-696.
- Phillips. PJ, Smith. SG, Kolpin. D, Zaugg. SD, Buxton. HT, Furlong. ET et Esposito. K, 2010, Pharmaceutical Formulation Facilities as Sources of Opioids and Other Pharmaceuticals to Wastewater Treatment Plant Effluents, *Environmental Science & Technology* 44, 4910-4916.
- Pichon.V, 2000, Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water-areview, *Journal of Chromatography A* 885, 195-215.
- Pomati. F, Orlandi. C, Clerici. M, Luciani. F et Zuccato. E, 2008, Effects and Interactions in an Environmentally Relevant Mixture of Pharmaceuticals, *Toxicological Sciences* 102,129-137.

- Oertel. R, Neumeister. V et Kirch. W, 2004, Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum, *Journal of Chromatography A* 1058, 197-201.
- Qiang. Z et Adams. C, 2004, Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics, *Water Research* 38, 2874-90.
- Rabiet. M, Togola.A, Brissaud. F, Seidel. JL, Budzinski. H, et Elbaz-Poulichet. F, 2006, Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized mediterranean catchment, *Environmental Science and Technology* 40, 5282-5288.
- Renew. JE et Huang. CH, 2004, Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Journal Chromatography A* 1042,113-121.
- Rijkers. GT, Teunissen. AG, Van Oosteron. R et Van Muiswinckel. WB, 1980, The immune system of cyprinid fish: the immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L), *Aquaculture* 19, 177-189.
- Rooklidge. SJ, 2004, Environmental antimicrobial contamination from terraccumulation and diffuse pollution pathways, *Science of the Total Environment*325, 1-13.
- Sabik. H, Jeannot. R et Rondeau. B, 2000, Multiresidue methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation products in ground and surface waters, *Journal of Chromatography A* 885, 217-236.
- Sacher. F, Lange.FT, Brauch. HJ et Blankenhorn. I, 2001, Pharmaceuticals in ground waters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg- Germany, *Journal of Chromatography A*938, 199-210.
- Salgado-Petinal. C, Lamas. JP, Garcia-Jares. C, Llompарт. M et Cela. R, 2005, Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography- mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*382, 1351-1359.
- Samuelson. O, Ervik. A, Pursell. L et Smith. P, 2000, Single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol an oxolinic acid ester in atlantic salmon (*Salmo salar* ) held in seawater and in vitro antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*,*Aquaculture* 187, 213-224.
- Sarmah. AK, Meyer. MT et Boxall. AB, 2006, A global perspective on the use sales exposure pathways occurrence fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment, *Chemosphere* 65, 725-759.
- Schulte-Oehlmann.U, Oehlmann. J et Puttmann. W, 2007, Pharmaceutical agents in the environment, their entries occurrence and an inventory of them. *Human pharmakawirk stoffe in der Umwelt: Eintrage Vorkommen undder Versucheiner Bestandsaufnahme* 19, 168-179.
- Segura. P, François. M, Gagnon.C et Sauvé.S, 2009, Review of the Occurrence of Anti-infectives in Contaminated Wastewaters and Natural and Drinking Waters, *Environmental Health Perspective* 117, 675-684.
- Seifrtova. M, 2009, An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters, *Analytica Chimica Acta* 649, 158–179.

- Serrano. JM et Silva. M, 2006, Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection, *Journal of Chromatography A* 1117, 176–183.
- Simpson. NJ, 2000, *Solid-Phase Extraction: Principles Techniques and Applications*, New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Smith. P, Donlon. J, Coyne. Ret Cazabon. DJ, 1994, Fate of oxytetracycline in a freshwater fish farm: Influence of effluent treatment systems, *Aquaculture* 120, 319-325.
- Snow. DD, Bartelt-Hunt. SL, Saunders. SE et Cassada. DA, 2007, Detection Occurrence and Fate of Emerging Contaminants in Agricultural Environments, *Water Environmental Research* 24, 1061-1084.
- Stead. D, 2000, current methodologies for the analysis of aminoglycosides, *Journal of Chromatography B* 747, 69-93.
- Stoob. K, Heinz. PS, Christian. G, Matthias. R et Stephan. RM , 2005, Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography–tandem mass spectrometry Quantification of sulfonamide antibiotics neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters, *Journal of Chromatography A* 1097, 138–147.
- Stumpf. M, Ternes, T, Wilken. RD, Rodrigues. SV et Baumann. W, 1999, Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro- Brazil, *The Science of the Total environment* 225, 135-141.
- Summers. AO, 2002, Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology, *Clinical Infection Disease* 34, S85–S92.
- Tamtam. F, Fabien. M, Joelle. E, Marc. C et Barbara. L, 2009, Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry performance evaluation for analysis of antibiotics in natural waters, *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393, 1709–1718.
- Ternak. G, 2005, Antibiotics may act as growth/obesity promoters in humans as an inadvertent result of antibiotic pollution?, *Medical Hypotheses* 64, 14-16.
- Ternes. T, et Joss. A, 2006, *Human Pharmaceuticals Hormones and Fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management-* London: IWA Publishing.
- Ternes. T, Joss. A et Siegrist. H, 2004, Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment, *Environmental Science Technology* 38, 392A-399A.
- Thomas. KV et Hilton. MJ, 2004, The occurrence of selected human pharmaceuticals compounds in UK estuaries, *Marine Pollution Bulletin* 49, 436-444.
- Thomas. KV, Dye. C, Schlabach. M et Langford. KH, 2007, Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works, *Journal of Environmental Monitoring* 9, 1410-1418.
- Togola. A et Budzinski. H, 2008, Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples, *Journal of Chromatography A* 1177, 150-158.
- Tolls. J, 2001, Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review, *Environmental Science Technology* 35, 3397-3406.

- Tong. L, Li. P, Wang. Y, Zhu. K, 2009, Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS, *Chemosphere* 74, 1090–1097.
- Turnipseed. S et Andersen. W, 2008, Veterinary Drug Residues, *Comprehensive Analytical Chemistry* 51, 307-338
- Ulrich. S, 2000, SPME in biomedical analysis, *Journal of Chromatography A* 902,167-194.
- US EPA, 2009, Targeted National Sewage Sludge Survey Statistical Analysis Report.
- Van De Steene. JC, et Lambert. WE, 2008, Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 19, 713-8.
- Van De Steene. JC, Mortier. KA et Lambert. WE, 2006, tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples, *Journal of Chromatography A* 1123, 71-81.
- Velagaleti.R, 1997, Behavior of pharmaceutical drugs (human and animal health) in the environment, *Drug Information Journal* 3, 715-722.
- Veyssier. P et Bryskier. A, 2005, Dihydrofolate Reductase Inhibitors, Nitroheterocycles (Furans), and 8-Hydroxyquinolines. In: *Antimicrobial Agents Antibacterials and Antifungals* (Bryskier A. ed). Washington-DC: ASM Press, 941-963.
- Volmer.DA et Hui.JP, 1998, Study of erythromycin A decomposition products in aqueous solution by solid-phase microextraction/liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 12, 123-129.
- Walsh. C, 2003, *Antibiotics: Actions, origins, resistance*-Washington, D.C: ASM Press.
- Watkinson.A, Murby.E , Kolpin. D, et Costanzo. S, 2009, The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water, *Science of The Total Environment* 407, 2711-2723.
- Watts. CD, Crathorne. B, Fielding. M et Steel. C, 1983, Identification of Non-Volatile Organics in Water Using Field Desorption Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography. In: *Analysis of Organic Micropollutants in Water* (Angeletti G, Bjorseth A, eds). Dordrecht: D. Reidel Publishing Company.
- Wilson. BA, Smith. VH, Denoyelles. F et Larive. CK, 2003, Effects of three pharmaceutical and personal care products on natural freshwater algal assemblages, *Environmental Science Technology* 37, 1713-1719.
- Wise. R, 2002, Antimicrobial resistance: priorities for action, *Journal of Antimicrobial Chemother* 49, 585-586.
- Yargeau. V, Huot. J, Rodayan. A, Rouleau. L, Roy. R et Leask. R, 2008, Impact of degradation products of sulfamethoxazole on mammalian cultured cells, *Environmental Toxicology* 23, 492- 8.
- Zhang. HC et Huang. CH, 2005, Oxidative transformation of fluoroquinolone antibacterial agents and structurally related amines by manganese oxide, *Environmental Science Technology* 39, 4474-4483.

Zhu. WX, Zhou. Ji, WeiWei. Yanga, Liu. YF, Zhang. SS, 2008, Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps, *Journal of Chromatography A* 1207, 29–37.

Zuccato. E, Sara. C, Renzo. B, Manuela. M et Roberto. F, 2010, Source occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment, *Journal of Hazardous Materials* 179, 1042–1048.

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

Zwiener.C, 2007, Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 1159-1162.

Żwir-Ferenc. A et Biziuk. M, 2006, Review Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications, *Polish Journal of Environmental Studies* 15, 677-690.

## **CHAPITRE III: RESULTATS**

Ce chapitre regroupe trois publications portant sur l'étude de 12 molécules appartenant à la famille des aminoglycosides et de la colistine en tant que contaminants dans les systèmes aquatiques.

- La première publication présente une comparaison entre deux stratégies d'analyse de 12 aminoglycosides par la LC/MS/MS. Etant donnée la forte polarité des molécules étudiées, elles ne peuvent pas être retenues sur des colonnes C18 et sortent alors dans le volume mort. La première stratégie se base sur l'utilisation d'un appariement d'ions qui permet d'améliorer leur rétention. La deuxième stratégie consiste à utiliser des colonnes polaires de type ZIC-HILIC permettant une interaction de type polaire entre le groupe sulfonique chargé négativement et les aminoglycosides chargés positivement. Les paramètres de ces deux méthodes sont étudiés et comparés afin de choisir la meilleure méthode chromatographique pour leur analyse.
- La deuxième publication regroupe nos résultats concernant l'extraction sur phase solide (SPE) des 12 aminoglycosides dans l'eau. Les différents paramètres (type d'adsorbant, solvants de conditionnement et d'élution, et séchage) sont optimisés. Ensuite, la méthode est appliquée sur des échantillons provenant des stations d'épuration et des eaux hospitalières.
- La troisième publication se focalise sur le développement d'une méthode automatisée pour le dosage de la colistine, molécule très polaire, ce qui rend son extraction difficile dans l'eau usée. La SPE en ligne couplée à la Chromatographie Liquide en tandem est développée et optimisée.

# Optimization and comparisons for separation, detection and quantification of 12 aminoglycosides using 2 chromatographic conditions by LC-MS/MS

*Samia Mokh*<sup>1</sup>, *Rania Nassar*<sup>2</sup>, *Abir Kouzayha*<sup>1</sup>, *Farouk Jaber*<sup>1</sup>, *Hélène Budzinski*<sup>3</sup> and *Mohamad Al iskandarani*<sup>1, 2\*</sup>

<sup>1</sup> National Council for Scientific Research CNRS - Lebanese Atomic Energy Commission LAEC - Laboratory for Analysis of Organic Compound LACO- Beirut, Lebanon.

<sup>2</sup> Lebanese University - Faculty of Public Health I - Hadath, Lebanon.

<sup>3</sup> Bordeaux University 1, CNRS, ISM-LPTC-UMR 5255 (Laboratory of Physico and Toxic Chemistry), 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France.

\*Corresponding author. *Mohamad Al iskandarani, Lebanese Atomic Energy Commission, P.O. Box: 11-8281 Riad El Solh 1107 2260 Beirut, Lebanon. Tel.: +961 1 450811 (303); fax: +961 1 450 810.*

Email address: [mohamad.iskandarani@cnrs.edu.lb](mailto:mohamad.iskandarani@cnrs.edu.lb)

**Keywords:** Aminoglycosides, Ion pairing, ZIC-HILIC, Liquid Chromatographic, Mass Spectrometry MS/MS.

## Abstract

Aminoglycosides are a family of antibiotics with important applications in veterinary medicine. Their ionic character, the similarity structures and the high polarity due to the presence of two or more amino and hydroxyl groups cause a difficulty in separation and make these compounds poorly retained on the reversed phase column. An analytical method for the separation and detection of 12 aminoglycosides has been optimized using two kinds of chromatographic conditions (HILIC, Ion pairing). In Hydrophilic Interaction, ZIC\_HILIC column was used, by which the following parameters for the mobile phase were evaluated: concentration of ammonium acetate buffer, percentage of formic acid and effect of acid type. The maximum and adequate concentration of ammonium acetate for the majority of analytes was set to 30 mM. The percentage 0.1% of formic acid increases the response for the majority of analytes. On the other side, the use of 0.1% of trifluoroacetic acid improves the response when compared with the response obtained with 0.1% of formic acid except for Spectinomycin Dihydrostreptomycin and Streptomycin. For ion pairing chromatography, the concentration of pentafluoropropionic acid was tested and the greatest value appeared to be 9.2 mM. Therefore, the comparison between the two separation methods shows that the response area of the majority of analytes tested increases when using the ion pair mode. Also, the high value of S/N and the lower detection limit (5 - 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) for most aminoglycosides studied make the ion pairing method more preferable than HILIC interaction.



performance liquid chromatographic (HPLC) methods in combination with tandem mass spectrometry may have the greatest potential for accomplishing multi-residue identifications in complex matrices [19]. For AGs ionization in MS, the analysis depends on two main types of atmospheric pressure ion sources: the electrospray ionization (ESI) and the atmospheric pressure chemical ionization (APCI). In fact, the ESI is the most commonly used and few publications relied on the APCI for AGs ionization by LC-MS [20, 21].

Sensitivity and selectivity related problems have prompted several researchers to use liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to analyze AGs [5, 13, 19]. AGs are well known for their high polarity, thus, they are not retained on the reversed-phase columns [5, 22]. This fact presents a big analytical challenge. So, there were numerous methods to produce some retention of the chromatographically unretained AGs using either ion pairing agents or hydrophilic interaction chromatography which is recently cited by researchers but no explanation was found for their choice [5, 22-24]. Our paper contributes to a better understanding of both, the advantages and disadvantages of these two methods HILIC and Ion pairing.

The main objective of our paper is to develop and optimize a reliable and generic LC-MS/MS method in order to quantify 12 AGs in water. The originality of our work is related to the presentation and discussion of the potential factors affecting response and sensitivity using ion pairing or HILIC for separation.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials, Chemicals and Reagents

Apramycin sulphate (APR) (purity 98.5%), Gentamicin-2.5-sulphate hydrate (GEN) (purity 96.5%), Tobramycin (TOB) (purity 93%), Streptomycin sulphate (STR) (purity 98%), Dihydrostreptomycin sesquisulfate hydrate (DIH) (purity 99%), Spectinomycin dihydrochloride hydrate (SPE)(purity 99%), Paromomycin sulphate (PAR) (purity 90%) and Neomycin sulphate (NEO) (purity 90%) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg-Germany). Sisomycin sulphate salt (SIS) (purity 87%), Kanamycin sulphate (KAN) (purity 77%), Amikacin Hydrate (AMK) (purity 98%) and Hygromycin B (HYG) (purity 66%) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO).

Water, acetonitrile (ACN) for LC-MS CHROMASOLV and pentafluoropropionic acid (PFPA) (purity 97%) were obtained from Sigma-Aldrich (GmbH Riedstr steinheim, Germany). Ammonium acetate (AmAc) and trifluoroacetic acid (TFA) were from MERCK (Darmstadt, Germany) and formic acid (FA) from BDH laboratory (England).

### 2.2. Preparations of standard solutions

Due to the high sorption affinity of the AGs to polar surfaces, only laboratory equipments made of polypropylene were used during sample preparation and storage. The use of organic acid, such as 1% FA in stock solution allows the adsorption to plastic tubes.

*Stock standard solutions preparations* ( $\sim 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ): 0.02 g of each AG were dissolved in 25 mL volumetric flask and then reconstituted with water at 1% FA. The solutions were stored at 4°C and were stable for at least 8 months. For the optimization of MS/MS parameters (tuning), an individual standard solution was prepared at  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  in ACN–Water (1:1, v/v). For the standard calibration curves, a mixture of standard solution at highest concentration ( $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) was prepared in water at 1% FA. This solution was then appropriately diluted to lower concentrations.

### 2.3. Mass spectrometer conditions

Analysis was applied using HPLC from Agilent (Agilent technologies, USA) series 1200 coupled with MS/MS triple quadruple Agilent 6410. The Agilent HPLC was equipped with an automatic degasser, a quaternary pump, a cooled autosampler and an ESI ion source. The optimization was carried out by infusing  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  of each standard in the HPLC mobile phase into the MS/MS system for automatic tuning to achieve the maximum response. Then, MS/MS data acquisition was performed in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode where two precursor-product ions were chosen for each AGs and listed in Table 1. The precursor ions of all analytes were  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , except SPE, which forms intensive water adducts. SPE has an unusual structural feature in which the carbonyl group is hydrated in an aqueous solution [28]. Therefore,  $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ , m/z 351 was selected as the precursor ion for MS/MS analysis.

The MS/MS instrument was operated in positive ion mode using nitrogen gas as a collision gas and also as nebulization gas at 30 and 40 psi respectively. The source temperature was maintained at 350°C and capillary voltage was set at 4 kV. The fragment ions, the optimized cone voltage and the

collision energy are shown in Table 1. Fragment ions with the highest intensity were chosen for quantification.

Table 1: The optimal parameters for multiple reaction monitoring (MRM) for 12 AGs.

Aminoglycosides	Precursor ion	Cone voltage (V)	Quantification ion	Collision energy (V)	Confirmation ion	Collision energy (V)
Apramycin	540.3	90	217	25	378	15
Gentamicin	478.3	120	322.2	10	156.9	20
	464.3		322.1			
	450.1		322			
Dihydrostreptomycin	584.3	120	262.9	30	245.9	35
Streptomycin	582.2	120	263.1	35	245.9	35
Néomycin	615.3	120	160.9	35	292.9	25
Spectinomycin	351.1	120	333.1	15	207.1	20
Paromomycin	616.3	100	162.9	40	324.1	20
Tobramycin	468.2	120	162.9	20	324.2	10
Amikacin	586.3	110	162.9	35	425.3	15
Sisomycin	448.3	100	254.1	15	271.1	15
Kanamycin	485	60	324.2	15	163.2	5
Hygromycin	528.2	110	177	30	352.1	25

## 2.4. Chromatographic separation

Two types of LC conditions were applied for the analysis of the 12 AGs: Ion pairing chromatography and HILIC. To optimize chromatographic separation, preliminary experiments were performed using both methods.

### 2.4.1. ZIC\_HILIC conditions

Separation of AGs was performed on a SeQuant ZIC\_HILIC PEEK column 50 mm \* 2.1 mm, 3.5 µm particle sizes. The column was contained in a thermostated column oven maintained at 30°C. Mobile phases were: A- Ultrapure water with 30 mM AmAc + ACN+ TFA (95/5/0.1) and B: Ultrapure water with 2 mM AmAc + ACN + TFA (5/95/0.2). The elution gradient program (A: B) was applied: (0:100) to (70:30) in 2 min at 0.3 mL.min<sup>-1</sup>; (70:30) to (95:5) in 1 min at 0.3 mL.min<sup>-1</sup>; (95:5) to (5:95) in 1min at 0.5 mL.min<sup>-1</sup>; (5:95) to (0:100) in 1 min at 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. Then, the column was equilibrated for 5 min until the next injection with the flow rates 0.3 mL.min<sup>-1</sup>; the total run time of the method was 19 min. An injection volume of 10 µL was employed for all samples tested.

### 2.4.2. Ion pairing chromatography

A suitable reversed phase separation of a mixture of AGs was achieved with a 150 mm\*4.6 mm 5 µm Zorbax Eclipse C18 column. Mobile phases were: A- Ultrapure water + 0.1% PFPA and B: ACN. The elution gradient program (A: B) was applied: (95:5) to (50:50) in 10.6 min; (50:50) to (0:100) in 0.4 min; (0:100) to (95:5) in 3 min. Then, the column was equilibrated for 3 min until the next injection; the total run time of the method was 16 min using 0.8 mL.min<sup>-1</sup>. A 10 µL injection volume was also used in this method.

## 3. Results and discussion

### 3.1. HILIC-ESI-MS/MS optimization

Recently, a HILIC phase prepared by graft polymerization to incorporate 3-sulfopropyl dimethylalkyl ammonium inner salts, i.e. sulfoalkylbetaine functional groups onto silica and polymer particles has been released. Sometimes, this phase is called a zwitterionic phase. These types of columns are available from SeQuant (Umeå, Sweden), as ZIC\_HILIC columns. Originally, this phase was prepared for cation exchange chromatography, and earlier reports described the separations of inorganic salts and proteins in fully aqueous mobile phases [26]. This phase can retain not only polar and charged compounds, but it also interacts with neutrally charged analytes (containing either positive or negative charges), increasing selectivity in the analysis of a wide range of compounds. This phase is widely accepted by many researchers, and used often in more recent publications [27].

As mentioned in Section 1, highly polar compounds are not retained and are eluted in the void volume of column when using reversed-phase separation. Polar analytes can be more strongly retained in the HILIC mode and are eluted by increasing the percentage of aqueous portion in the mobile phase. The stationary HILIC phase described in literature is a zwitterionic silica gel. Therefore, the HILIC technique is suitable for the analysis of polar compounds (e.g. folates [28], carbohydrates [29], peptides [30] or natural products [31]) with MS/MS detection. The separation mechanism of HILIC is opposite to that of reversed phase liquid chromatography (RPLC). Using a solvent with 95% ACN, a complete retention of the hydrophilic analytes was observed for more than 20 min. Otherwise, when using a solvent with 90% water, the hydrophilic analytes were eluted with the front [32].

A wide variety of HILIC columns are commercially available with different functionalities of stationary phase and other features (ZIC\_HILIC, Acquity UPLC BEH HILIC...)[33]. Mobile phase composition is an additional important consideration in LC-ESI-MS/MS, especially for trace analysis, in order to achieve high ionization and sufficient separation with minimum matrix interference [33].

R. Ishii et al found that ZIC\_HILIC column was better than other columns in separating the AGs and resolving the corresponding peak form. According to their work, ACN alone was better as a mobile phase than methanol (MeOH) or a mixture of ACN /MeOH (1: 1, v/v).

In HILIC, the presence of water in the mobile phase is fundamental for the establishment of a stagnant enriched aqueous layer on the surface of the stationary phase into which analytes may selectively be partitioned. The use of a buffered mobile phase is crucial in order to achieve acceptable repeatability for the LC separation of charged compounds, since electrostatic interactions between the solute and the stationary phase are controlled by the buffer. The concentration of the buffer should be low to avoid ionization suppression in the ESI.

Using zwitterionic ZIC\_HILIC columns, many problems were observed with the constancy of the retention times and backpressure after 250 samples. Analytes injected on new columns have up to 100% longer retention times than the same analytes after 20 injections on this column. To remove remaining organic solvent and polar impurities, 20  $\mu$ L of 0.5M sodium chloride solution were injected after 15 samples. If the backpressure increases or a shift in the selectivity is observed, an initial washing with deionised water is required to remove organic solvent and polar impurities, followed by a flush with 0.5 M sodium chloride solution. Removing salt solution with sufficient water is recommended and finally the column is filled with 80% ACN [32].

The effect of acid and salts added to the mobile phase for accelerating and stabilizing the ionization, was examined. AGs are eluted from HILIC columns starting with a high concentration

of AmAc. It seems necessary to use concentrated AmAc in the mobile phase for eluting all the tested compounds from the analytical column, especially NEO, APR and GEN. In order to investigate the efficiency of ZIC\_HILIC, we also designed experiments to compare the chromatographic responses of 12 AGs. Furthermore, mobile phase gradient conditions were also optimized in order to obtain the best chromatographic results with minimum analysis time. Therefore, we presented and discussed the effect of the percentage of organic solvent (ACN), the concentration of AmAc at the starting time, the percentage and the acid type used in the mobile phase, on the separation response area and the corresponding peak form of each compound. All experiment was performed in triplicate and the RSD were in the range 1- 20 %.

### 3.1.1. Effect of acetonitrile on aminoglycoside retention

The effect of ACN on analyte retention was investigated. The experiment demonstrated that, as the percentage of ACN in the starting gradient increased, the retention also increased. Above 60% ACN, most of the analytes appear to be retained. The organic modifier/aqueous portion ratio is the predominant factor in providing sufficient retention in HILIC. In this issue, the peak of GEN, PAR, NEO, SIS, TOB and APR has a broad and poor form when the percentage of ACN decreases. Thus, this result is related to the decreases of the AmAc concentration (Phase B) and the strong elution with the high percentage of water.

Hence, our optimized gradient started with 95% ACN then after 2 min the percentage decreases. In addition, the flow ( $0.3 \text{ mL min}^{-1}$ ) in the starting gradient with 95% ACN ensured a good retention and separation for all AGs (Fig. 2). Furthermore, the effect of ACN on the ending gradient was much less influential as the one in the starting gradient.

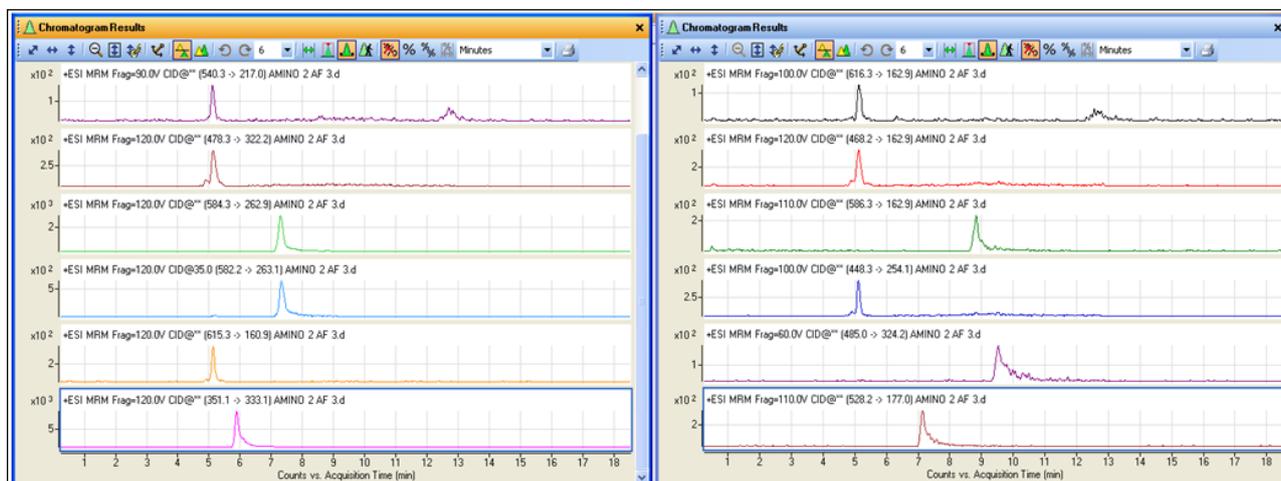


Fig. 2: Chromatogram obtained for the 12 AGs at 95% ACN (starting gradient) in ZIC-HILIC column.

### 3.1.2. Effect of Ammonium acetate concentration on AGs response

The mobile phase in HILIC separation plays important roles and its pH conditions are generally controlled by buffer solutions with a 10 - 65 mM salt concentration. With respect to the MS sensitivity, the AmAc was superior to the ammonium formate. Therefore, the AmAc was used in different concentrations to obtain sharp peaks and to achieve good responses for all AGs.

Fig. (3) show that the optimum concentration of AmAc was found at 30 mM except that of HYG and AMK. Once the concentration of AmAc increased, the area of majority of AGs was decreased. That's because increasing the concentration of AmAc induced an increase of the ionic strength in the mobile phase. As a consequence, the response of AGs was highly influenced and decreased. This is related to the compound properties. The high ionic strength in the mobile phase lead to discharges and poor spray performance of ionization by ESI.

The response of DIH, STR and GEN did not show a considerable change upon decreasing the concentration of AmAc.

Another fact assumed that the form of peaks of most AGs was improved by increasing AmAc concentration. The late eluted AGs (APR, PAR, SIS, TOB) showed broad peaks when the concentration of AmAc was decreased. This led to a poor limit of detection for this compound. On the other hand, the retention times were increased by raising the concentration of the buffer.

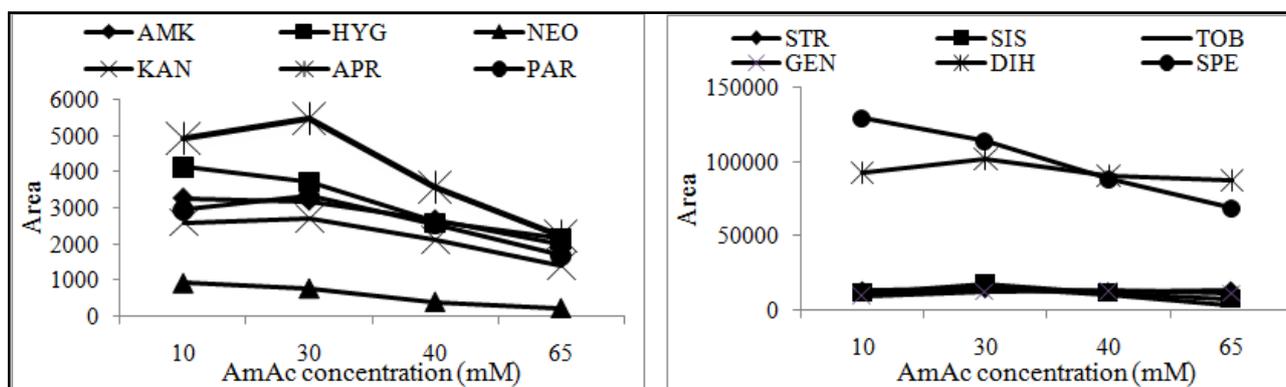


Fig. 3: Effect of the buffer (ammonium acetate AmAc) concentration in the mobile phase A on the response of the 12 AGs.

Neomycin has a bad response and a broad peak in ZIC\_HILIC column. Hence, many researchers found a great need to add 120 - 150 mM AmAc and a 1% FA in the mobile phase [1]. However, this was impossible to be done in our work as it negatively influenced the response of other AGs.

### 3.1.3. Effect of percentage and type of acid in the mobile phase on the ionization for AGs

The effect of three different percentages of FA (0.1, 0.2 and 0.5) added to the mobile phase A was studied. We found that the retention times were not affected when varying the pH of the mobile phase. This indicates the high selectivity and the pH independence of all compounds. Most of AGs showed an increase in response when changing the percentage of FA from 0.5 to 0.1. So the percentage 0.1% (pH 4.30) was shown to be better than 0.2% (pH 3.51) and 0.5% (pH 3.22) (Fig. 4). However, GEN, DIH, STR presented an exception as their response increase when 0.5% FA was used (Fig. 4).

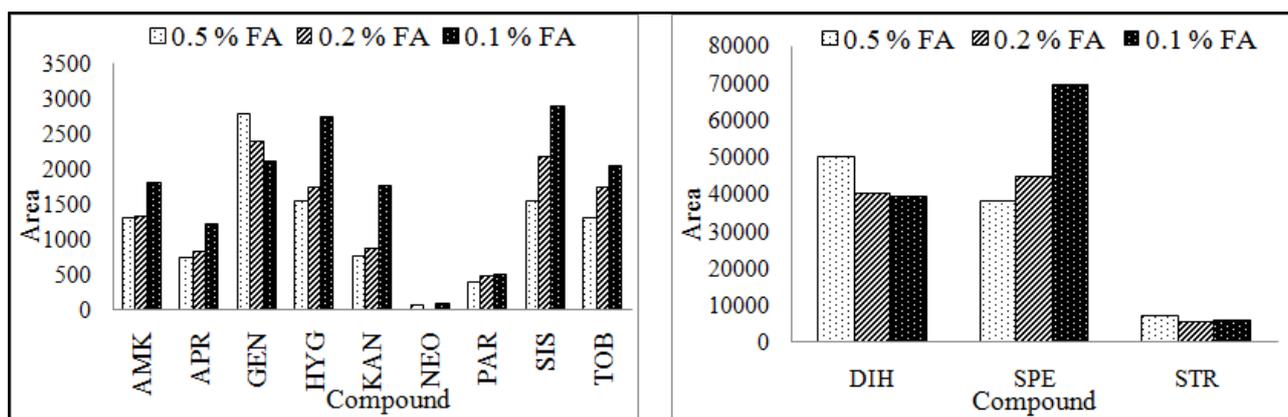


Fig. 4: Effect of the percentage of Formic acid (0.5, 0.2 and 0.1%) in the mobile phase A on the response of AGs.

Another experiment studied the effect of response for all AGs substituting FA by TFA. When using 0.1% TFA (pH 4.88), the results presented in the Fig. 5 showed an improvement in the peak area for majority of AGs (AMK- HYG- KAN- NEO-APR- GEN- PAR- SIS -TOB) to the detriment of 0.1% FA (pH 4.30). In contrast, the remaining AGs (SPE- DIH- STR) revealed an improvement in the response when using 0.1% FA.

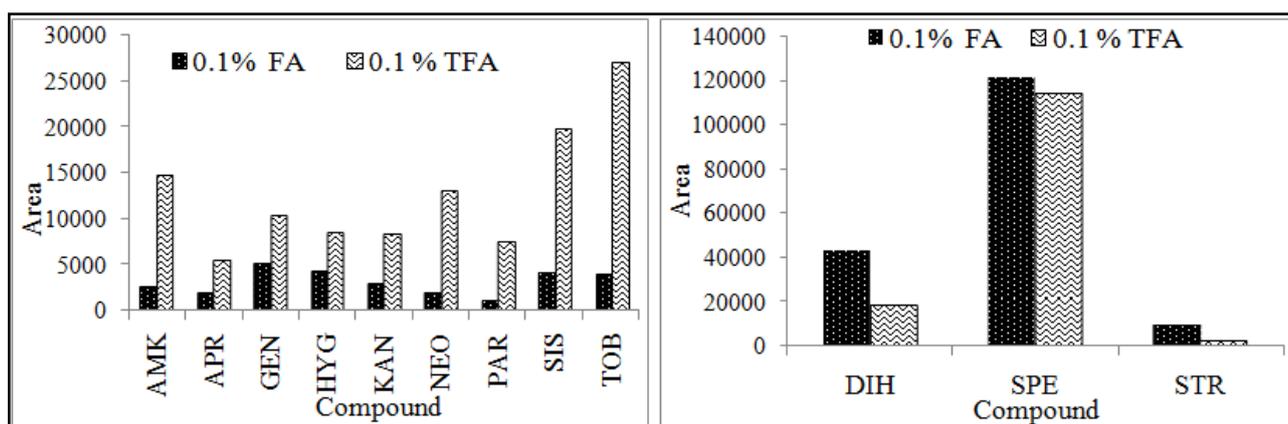


Fig. 5: Effect of the acid type, Trifluoroacetic acid (TFA) and Formic acid (FA), in the mobile phase A at 0.1% on the response of all AGs.

### 3.2. Ion pairing optimization

Most of previously reviewed methods are mainly based on reversed phase separation due to its applicability for a wide range of neutral compounds of different polarities. However, the main drawbacks encountered when using reversed phase for the most highly polar compounds, that they are poorly retained and produce poor peak shapes. Hammel et al [34] proposed ion pair chromatography for multiresidue antibiotics analysis in honey, including AGs. However, ion pair separation requires ion-pair reagent (mainly trifluoroacetic acid, heptafluorobutyric acid, phosphoric acid, etc.) in the mobile phase composition to regulate the retention of polar compounds on the stationary phase [33].

Therefore, some volatile and fluorinated ion-pair reagents including trifluoroacetic acid (TFA), pentafluoropropionic acid (PFPA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) are commonly used in the

previously published methods for the analysis of AGs combined with mass spectrometry [15, 24, 35].

When HFBA and PFPA are compared, PFPA can be considered as a better reagent, because it does not adsorb to the stationary phase as HFBA strongly does and the retention is clearly obtained through an ion-pair mechanism [36]. On the other hand, with trifluoroacetic acid (TFA) as an ion pair agent, dramatic ion suppression in the ESI occurs. Whereas with heptafluorobutyric acid (HFBA) the ion suppression was limited [9, 23].

In our work, the PFPA was used as an ion pairing reagent. Their concentration was optimized to get less signal suppression in the ESI. Therefore, the maximum concentration of additives that can be used depends on the design and technical solutions of the ion-source of the mass spectrometric instrument, e.g. orthogonal electrospray instruments can often tolerate higher concentration of additives [40]. Fig. 6 presents the comparison of response by using modified concentrations of PFPA [ $0.92 \text{ mmol L}^{-1}$  (0.01%),  $9.20 \text{ mmol L}^{-1}$  (0.1%),  $46 \text{ mmol L}^{-1}$  (0.5%)] in the mobile phase. This parameter was found in triplicate and the RSD was between 1- 12%.

All compound's areas present an optimum result at 0.1% PFPA. The variation of the results of the peak areas for AGs was designed between 18 - 80% when comparing 0.1% and 0.5% PFPA. This result became logic if one takes into account the suppression of signal in the ion source (ESI) with the use of high concentration of ion pair reagent. On the other hand, the area response of AGs was better when 0.1% PFPA was used at the expense of 0.01% PFPA. The deviation of response was 5 to 77%. Consequently, 0.01% PFPA is not sufficient to ensure the optimum retention of analyte in the column.

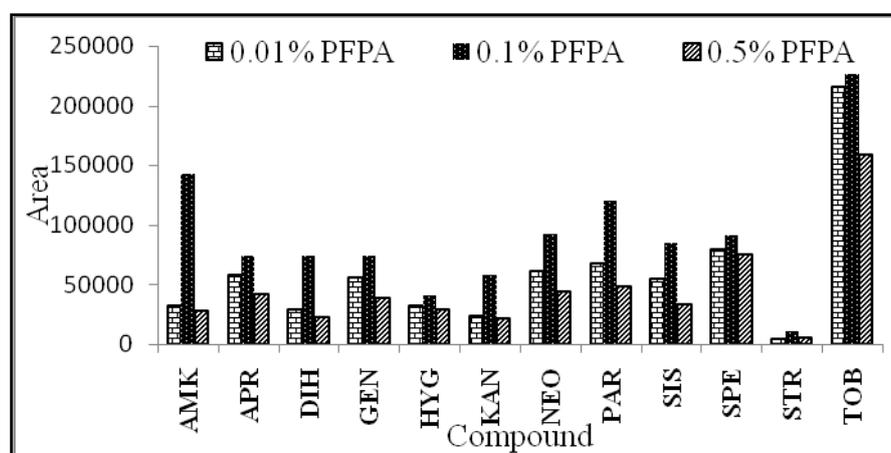


Fig. 6: The area response for AGs using 3 different percentages (0.01, 0.1 and 0.5%) of Pentafluoropropionic acid (PFPA).

### 3.3. Comparison between HILIC and Ion pairing

AGs are very hydrophilic compounds and are traditionally difficult to retain on conventional HPLC columns. Hence, ion-pair reversed phase LC is preferred to chromatograph aminoglycosides on a C18 column. The use of an ion-pairing reagent in the mobile phase has been reported earlier [5, 23, 24, 38]. On the other hand, the application of HILIC is known to be as an alternative for the determination of extremely polar compounds. Recently, literature and research on hydrophilic interaction chromatography (HILIC) have been increasing drastically, along with various stationary phases developed. HILIC is a kind of normal-phase liquid chromatography (NPLC), and has

attracted the attention of researchers that study the separation of polar compounds in a wide variety of scientific fields. In HILIC mode, a mixture of water and organic modifiers (mostly ACN) is employed with a polar stationary phase. Structural variations in HILIC type stationary phases are wider than those found in reversed-phase applications. This technique is suitable for ESI-MS, because of the compatibility of the aqueous organic mobile phase to ESI-MS, which is a very powerful tool in detecting and identifying a wide range of polar compounds [27].

The confirmation and quantification of AGs by LC-MS/MS was evaluated by ZIC\_HILIC and ion pairing separation. As seen in Fig. 2, the ion pairing separation was found better for most of AGs. The response by ion pair reagent showed an increase of the obtained value with ZIC\_HILIC conditions (Fig. 7). An exception of DIH, STR and SPE, the area was improved in HILIC than in ion pair mode. This led to higher S/N ratios and low limits of detection for the method using ion pairing separation.

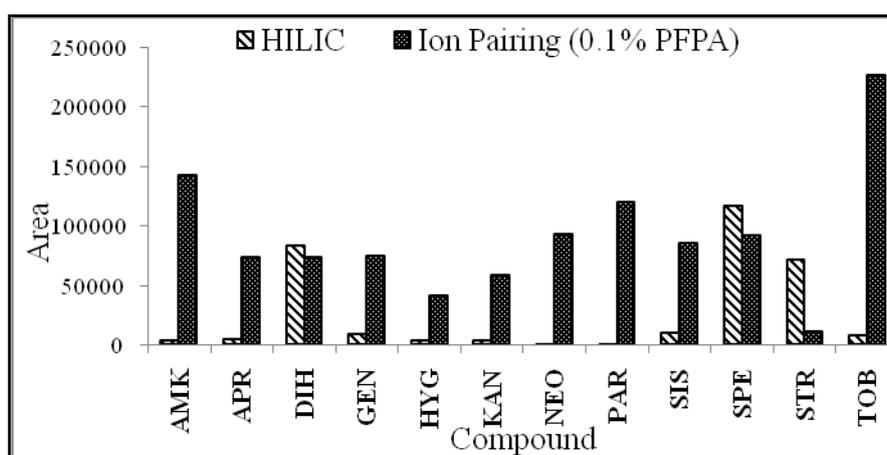


Fig. 7: Comparison of area response of AGs by the two methods of separation (HILIC and Ion pairing).

Tables 2 present the calculated values (at the same concentration  $700 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) of S/N and the limit of detection of the two methods of separation used in our work and certified results was cited above. In addition, the test of linearity for both methods is configured in Table 2 The best coefficient of correlation (0.982 - 0.998) was related to Ion pairing method for the majority of AGs.

Table 2: coefficients of correlation ( $R^2$ ) for the calibration curves, signal to noise (S/N) ratio and Limit of detection ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) of the two methods (HILIC and Ion Pairing).

Aminoglycosides	HILIC			Ion pairing		
	$R^2$	LOD	S/N	$R^2$	LOD	S/N
Amikacin	0.991	10	3.12	0.998	5	148
Apramycin	0.988	90	3.96	0.991	5	138
Dihydrostreptomycin	0.996	5	11.4	0.994	5	57.4
Gentamicin	0.989	60	4.99	0.989	5	204
Hygromycin	0.994	5	8.08	0.949	5	10
Kanamycin	0.995	90	3	0.982	5	138
Neomycin	0.420	200	4.05	0.994	5	161
Paromomycin	0.981	200	3.1	0.991	5	277
Sisomycin	0.979	200	2.10	0.990	5	168
Spectinomycin	0.942	5	52	0.979	15	12.6
Streptomycin	0.987	5	9.06	0.993	15	17.6
Tobramycin	0.968	200	3.4	0.987	5	169

ZIC\_HILIC columns need mobile phases with high organic content. This type of column gives large peak areas when used without modifiers, but they required high concentrations of AmAc to achieve reasonable peak shapes. But, the high concentration of AmAc greatly suppressed the response from the mass spectrometer [23].

Another problems were found, the ZIC\_HILIC column need more time for conditioning in comparison to the C18 column by using PFPA reagent. This fact was demonstrated by the injection of standards several times at the beginning of conditioning. The better result of separation by ZIC\_HILIC was performed for each AG after 1 h conditioning.

Moreover, the column of ZIC\_HILIC needs a wash for several hours by water and 0.5 mM NaCl solution in order to eliminate the back pressure after 250 injection samples. As a consequence, the use of ion pairing modifiers and reversed phase for LC was preferred over HILIC. The ion pair system was showed to be stable after two to three injections. It produced significantly higher sensitivities for late eluting AGs than HILIC and was very stable regarding the injection of high salt containing extracts.

The PFPA reagent was used to regulate the retention of AGs on the C18 column. But many researchers reported the serious problem of the affected MS performance by ionization suppression and the contamination of the ion source when using the ion pair reagent [33].

Sometimes, it is reported that these reagents adhere to the line on LC and MS detectors, which reduces the MS sensitivity and requires maintenance of LC and MS equipment due to these contaminants [].

Finally, regarding all the results and the problems cited above, the separation by reversed phase C18 using the PFPA is more suitable than the separation by ZIC\_HILIC. Yet, cleaning the instrument was not found to be a relevant problem when using the ion pair reagent.

## Conclusions

Two types of separation conditions (HILIC, Ion pairing) were examined and optimized to improve the chromatographic parameters for the analysis of 12 aminoglycosides by LC-MS/MS.

In ZIC\_HILIC column, different concentrations of ammonium acetate and formic acid have been tested. As a result, 30 mM ammonium acetate and 0.1% FA appear to induce better conditions for most analytes. As regards to the pentafluoropropionic acid (PFPA), an optimum concentration was evaluated for ion pairing using Zorbax Eclipse C18 column ( $9.2 \text{ mM L}^{-1}$ ). The advantages and the disadvantages of the two methods were discussed and reported. Both ion pairing and HILIC, demonstrated good separation of the majority of compounds tested.

When comparing the response area of HILIC and ion pairing, most of the AGs showed an increase of around 99% by ion pairing. However, Dihydrostreptomycin, Streptomycin and Spectinomycin showed better area responses when separation was made with HILIC.

Both limit of detection and S/N ratio were better when using ion pairing. On the other hand, the problems for the constancy of the retention times and the backpressure in the column make the ion pairing a reliable and powerful technique comparing to HILIC.

## **Acknowledgements**

We thank the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRSL) and the Lebanese Atomic Energy Commission (LAEC) for technical support.

## References

- [1] T.A. McGlinchey, P.A. Rafter, F. Regan, G.P. McMahon, *Analytica Chimica Acta*, 624 (2008) 1.
- [2] R.C. Stevens, J.H. Rodman, *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 9 (1998) 273.
- [3] F.J. Schenck, in: S.B. Turnipseed, & Long, A. R., (Ed.), *Analytical procedures for drug residues in food of animal origin CA: Science Technology System.*, 1998, p. 205.
- [4] A. Shen, L. Morgan, M.L. Barroso, X. Zhang, Sepracor Inc. , Tandem LabsTuyen Nguyen, 2008.
- [5] W.-x. Zhu, J.-z. Yang, W. Wei, Y.-f. Liu, S.-s. Zhang, *Journal of Chromatography A*, 1207 (2008) 29.
- [6] Commission Decision 2002/657/EC Performance of Analytical Methods, *Official Journal of European Commission* (2002) L221 8.
- [7] R. Oertel, U. Renner, W. Kirch, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (2004) 633.
- [8] N.C. Megoulas, M.A. Koupparis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382 (2005) 290.
- [9] M.A. Garcia-Mayor, R.M. Garcinuno, P. Fernandez-Hernando, J.S. Durand-Alegria, *Journal of Chromatography A*, 1122 (2006) 76.
- [10] S.n. Abuin, R. Codony, R. Compano, M. Granados, M.D. Prat, *Journal of Chromatography A*, 1114 (2006) 73.
- [11] M. Preu, D. Guyot, M. Petz, *Journal of Chromatography A*, 818 (1998) 95.
- [12] R. Tawa, H. Matsunaga, T. Fujimoto, *Journal of Chromatography A*, 812 (1998) 141.
- [13] A. Posyniak, J. Zmudzki, J. Niedzielska, *Journal of Chromatography A*, 914 (2001) 59.
- [14] J.-B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, *Journal of Chromatography A*, 932 (2001) 129.
- [15] T. McGlinchey, *The determination of Veterinary Antibiotics in live animals and animal products*, School of Chemical Sciences Dublin City University, Decembre 2010
- [16] Y.-q. Cai, Y.-e. Cai, S.-f. Mou, Y.-q. Lu, *Journal of Chromatography A*, 1081 (2005) 245.
- [17] I. Clarot, P. Chaimbault, F. Hasdenteufel, P. Netter, A. Nicolas, *Journal of Chromatography A*, 1031 (2004) 281.
- [18] J.M. Serrano, M. Silva, *Journal of Chromatography B*, 843 (2006) 20.
- [19] R. Ishii, M. Horie, W. Chan, J. MacNeil, *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25 (2008) 1509.
- [20] Y. Kato, M. Iwamoto, T. Koike, F. Suzuki, Y. Takano, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85 (1988) 9552.
- [21] M. Sakairi, H. Kambara, *Analytical Chemistry*, 60 (1988) 774.
- [22] Y. Tao, D. Chen, H. Yu, L. Huang, Z. Liu, X. Cao, C. Yan, Y. Pan, Z. Liu, Z. Yuan, *Food Chemistry*, 135 (2012) 676.
- [23] T. Plozza, V.C. Trenerry, P. Zeglinski, H. Nguyen, P. Johnstone, *International Food Research Journal* (2011) 1077.
- [24] D. Loffler, T.A. Ternes, *Journal of Chromatography A*, 1000 (2003) 583.
- [25] L.G. McLaughlin, J.D. Henion, *Biological Mass Spectrometry*, 23 (1994) 417.
- [26] SeQuant, *A Practical Guide to HILIC*, SeQuant, Umeå, Sweden, 2008.
- [27] T. Ikegami, K. Tomomatsu, H. Takubo, K. Horie, N. Tanaka, *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008) 474.
- [28] S.D. Garbis, A. Melse-Boonstra, C.E. West, R.B. van Breemen, *Analytical Chemistry*, 73 (2001) 5358.
- [29] A.J. Alpert, M. Shukla, A.K. Shukla, L.R. Zieske, S.W. Yuen, M.A.J. Ferguson, A. Mehlert, M. Pauly, R. Orlando, *Journal of Chromatography A*, 676 (1994) 191.
- [30] A.R. Oyler, B.L. Armstrong, J.Y. Cha, M.X. Zhou, Q. Yang, R.I. Robinson, R. Dunphy, D.J. Burinsky, *Journal of Chromatography A*, 724 (1996) 378.
- [31] M.A. Strege, *Analytical Chemistry*, 70 (1998) 2439.
- [32] R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch, *Journal of Chromatography A*, 1058 (2004) 197.
- [33] C. ChiaoChan, U. Koesukwiwat, S. Yudthavorasit, N. Leepipatpiboon, *Analytica Chimica Acta*, 682 (2010) 117.
- [34] Y.-A. Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud, M.-H.I.n. LeBreton, P.A. Guy, *Journal of Chromatography A*, 1177 (2008) 58.

- [35] Confirmation of Aminoglycosides by HPLC-MS/MS, United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Office of Public Health Science 2011, p. 1.
- [36] I. De Miguel, E. Puech-Costes, D. Samain, *Journal of Chromatography A*, 407 (1987) 109.
- [37] S.Å.k. Gustavsson, J. Samskog, K.E. Markides, B. Langstrom, *Journal of Chromatography A*, 937 (2001) 41.
- [38] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, *Analytica Chimica Acta*, 11 (2011).

## Démarche et principaux résultats de la publication 1

Les aminoglycosides (AGs) constituent une grande classe d'antibiotiques à usage vétérinaire puisqu'elles présentent un effet thérapeutique dans les infections sévères et ont une activité bactéricide vis-à-vis de nombreuses bactéries à Gram négatif ou à Gram positif. Elles agissent en inhibant la synthèse protéique des bactéries, par fixation sur le ribosome 30S. La plupart des AGs sont utilisées contre les bactéries et les parasites dans la production de viande (porc, poulet ou bœuf), du lait et des œufs à travers le monde.

En plus, elles sont utilisées en milieu hospitalier (prophylaxie des infections postopératoires). A forte dose, ces molécules présentent une toxicité pour les reins et les oreilles et leur administration doit s'accompagner de précautions bien particulières. Les AGs sont stables thermiquement et non volatiles, ce qui exige une dérivatisation pour les analyser par GC ou GC/MS. D'autre part, l'absence de noyau chromophore ou fluorophore dans la structure des AGs nécessite aussi l'utilisation d'agents dérivatisants pour leur détection par LC couplée au détecteur UV ou par fluorescence (FLD). Vu, les différents inconvénients de la dérivatisation (long temps d'analyse, ajout d'impuretés, faible reproductibilité...) sur l'analyse, ces techniques sont inapplicables à la détection de traces d'AGs. Par conséquent, la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP) couplée à la Spectrométrie de Masse en tandem donne le plus grand potentiel pour effectuer une détermination en multi-résidus et à l'état de traces des AGs dans des matrices complexes.

A cause de leur forte polarité, les aminoglycosides ne peuvent pas être retenues sur les colonnes chromatographiques en phase inverse (C18). Dans ce contexte deux stratégies analytiques (l'ion pair et la colonne HILIC) ont été utilisées dont le but d'améliorer la séparation des molécules aboutissant à une technique d'analyse fiable et robuste des 12 AGs dans l'eau.

Dans cette publication, nous faisons une étude comparative des avantages et des inconvénients de ces deux stratégies pour l'analyse des AGs. L'optimisation est effectuée en utilisant le système HPLC (Agilent, série 1200) couplée à la Spectrométrie de Masse à triple quadrupole (MS/MS) 6410 en utilisant la source ESI en mode positif. Les ions parents et fils sont choisis par infusion de chaque standard ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) dans le système. En plus, l'infusion permet l'optimisation des différents paramètres du MS/MS (Tension du capillaire et du cône, énergie de collision, température de la source et enfin les débits des gaz).

La séparation des 12 AGs, sur une colonne ZIC-HILIC (Sequant) (50 mm \* 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) nécessite 19 min avec un débit de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  au début du gradient (Annexe 2). La phase mobile est composée de deux voies A et B.

Phase A: 30 mM AmAc dans l'eau, ACN et FA (95/5/0,1)

Phase B: 2 mM AmAc dans l'eau, ACN et FA (5/95/0,2)

La composition de l'éluant a été définie après avoir étudié l'effet de l'ajout d'acétonitrile (ACN), la concentration du tampon acétate (AmAc), le pourcentage et le type de l'acide sur la rétention, la réponse et la forme du pic chromatographique. L'augmentation du pourcentage d'ACN au début du gradient améliore, en général, la rétention des molécules étudiées d'une manière considérable sauf pour la KAN, DIH et la NEO où la présence d'ACN n'a pas donné un effet sur la rétention. D'autre part, nous remarquons que la présence d'ACN aide à l'obtention de pics chromatographiques plus fins. Donc, l'utilisation d'une phase mobile eau/ACN (5/95) conduit à une bonne séparation des AGs en utilisant un débit de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ .

Bien que l'augmentation de la concentration de l'AmAc améliore la forme des pics chromatographique à la sortie du détecteur, elle favorise en revanche la diminution de la réponse des molécules étudiées à l'exception de DIH, SPE et GEN. Ceci s'explique par l'augmentation de la force ionique dans la phase mobile, d'où une faible ionisation par ESI. La diminution en pourcentages de 0,5 à 0,1 % de l'acide formique favorise une meilleure réponse à l'exception de GEN, DIH et STR. De nombreux essais montrent que l'utilisation de TFA à la place de FA améliore la réponse pour toutes les molécules à l'exception de DIH, SPE et STR. C'est la raison pour laquelle nous l'avons choisi comme tampon durant notre analyse.

La séparation sur la colonne Zorbax Eclipse C18 (150 mm\*4,6 mm 5  $\mu\text{m}$ ) nécessite 16 min avec un débit de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  (Annexe 2). Le pourcentage de l'ion pair (0,01, 0,1, 0,5%) dans la phase mobile est testé afin d'avoir une meilleure réponse pour les molécules étudiées. Pour avoir une bonne rétention, la valeur optimale en ion pair est de 0,1%. Si le pourcentage de l'ion pair est inférieur à 0,1 % la rétention de toutes les molécules n'est pas assurée. Par contre si ce pourcentage est supérieur à 0,1 % nous avons une suppression du signal qui, par la suite, affecte la surface des pics chromatographiques. Notre étude a montré que la réponse est meilleure en utilisant la méthode C18 - ion pair qu'en utilisant HILIC, pour toutes les AGs, à l'exception de DIH, STR et SPE. De même la limite de détection, le S/N et le coefficient de corrélation des droites d'étalonnages des molécules étudiées par la méthode d'ion pair est meilleure que celle d'HILIC pour la majorité des molécules.

L'utilisation de la colonne HILIC nécessite un rinçage plusieurs heures avec de l'eau concentrée en 0,5 mM NaCl porte un inconvénient supplémentaire de la méthode HILIC par rapport à celle de l'ion pair. La comparaison des résultats obtenus montre l'avantage de la méthode d'ion pair pour la détection et la quantification des 12 AGs dans les systèmes aquatiques.

# Optimization of a solid-phase extraction method for the determination of 12 aminoglycosides in water samples using LC/MS/MS

*Samia Mokh*<sup>1</sup>, *Rania Nassar*<sup>2</sup>, *Khaled El Hawari*<sup>1</sup>, *Hélène Budzinski*<sup>3</sup> and *Mohamad Al iskandarani*<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> National Council for Scientific Research CNRS - Lebanese Atomic Energy Commission LAEC - Laboratory for Analysis of Organic Compound LACO - Beirut, Lebanon.

<sup>2</sup> Lebanese University - Faculty of Public Health I - Hadath, Lebanon.

<sup>3</sup> Bordeaux University 1, CNRS, ISM-LPTC-UMR 5255 (Laboratory of Physico and Toxic Chemistry), 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France.

*\*Corresponding author. Mohamad Al Iskandarani, Lebanese Atomic Energy Commission, P.O. Box: 11-8281 Riad El Solh 1107 2260 Beirut, Lebanon. Tel.: +961 1 450811 (303); fax: +961 1 450 810.*

*Email address: [mohamad.iskandarani@cnrs.edu.lb](mailto:mohamad.iskandarani@cnrs.edu.lb)*

**Keywords:** Aminoglycosides (AGs), Solid phase extraction (SPE), Ion pairing, LC/ MS/MS, Wastewater.

## Abstract

A new and simple method has been developed for determination and quantification of 12 aminoglycosides in environmental water samples. The method is based on solid phase extraction (SPE) followed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) for analysis. After optimization of LC/MS/MS conditions, two SPE cartridges, Reversed phase Chromabond C18 with pentafluoropropionic acid (PFPA) and polymeric mixed mode cation exchange Oasis MCX, have been tested to determine aminoglycoside residues in water. Parameters affecting the extraction efficiency for the two cartridges such as eluent type, percolation volume and percentage of ion pair (PFPA) were optimized. Extraction on Chromabond C18 cartridges with PFPA reagent showed a better result in term of recovery (67 – 115%) and relative standard deviation (0.5 - 15%) relative to Oasis MCX. This method was validated and their limits of quantification were in the range 10 - 50 ng L<sup>-1</sup>. The method is applied to evaluate the occurrence of these compounds in influent and effluent wastewater treatment plant and hospital water samples in Lebanon. Gentamicin was found in hospital wastewater samples in a concentration at 30 ng L<sup>-1</sup>.

## 1. Introduction

Aminoglycosides (AGs) are a class of broad spectrum antibiotics, basic and very hydrophilic, that are used for treatment to human infections and they are also widely used in veterinary medicine[1]. These molecules have a bactericidal activity against some aerobic gram-positive and gram-negative organisms by inhibition their protein synthesis [2,3]. The structures of these compounds contain an aminocyclitol ring connected to two or more amino sugars in a glycosidic linkage[2]. Except for streptomycin and dihydrostreptomycin that are having a streptidine component (2-deoxystreptamine) [4,5].

These classes of antibiotics are not metabolized; to a small extent they are bound to plasma proteins, and therefore a significant amount of the original substance will leave the organism unchanged via urine or feces [6,7]. Several alternative sources of environmental contamination can be considered, such as households, emissions by hospitals, incomplete elimination in municipal sewage treatment plants, extensive use in farming and aquaculture [8-10]. Due to their toxicity and possible antibiotic resistance, their presence in water is considered as a potential risk not only for drinking water quality and human health, but also on ecosystems [10]. Recently, there has been a growing interest in the presence of these substances in the aquatic environment as emerging pollutants [11,12].

To predict the concentrations of these antibiotic residues in the aquatic environment and to design strategies to minimize their exposure to these compounds, there is a need for sensitive and reliable analytical methods to measure concentrations of AGs in different types of water samples that are found at trace levels ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Several analytical methods for the determination of AGs that includes microbiological methods, enzyme immunoassays and chromatographic analyses usually coupled with derivatisation steps [4]. Microbiological assays are simple and inexpensive, but time consuming and non-specific [4,13], and enzyme immunoassays also lack versatility in routine multi-component chemical analysis applications [13,14]. Among chromatographic methods, high-performance liquid chromatography (HPLC) is the most useful approach [13,15-17]. The HPLC determination of aminoglycosides is strongly related to their chemical structure. These compounds are very polar that shows no retention in reversed-phase HPLC columns and they also lack a chromophore or fluorophore group for appropriate detection. To overcome these drawbacks, an ion-pair is used with RPLC coupled to tandem MS [18].

However, because the concentration of aminoglycosides occurs at low level, preconcentration is required during sample preparation to obtain the high sensitivity. In addition, many coeluting compounds will affect the ionization; therefore cleanup step is usually necessary to minimize matrix effects.

For more than decades [19], Solid phase extraction (SPE) has become a popular extraction method, it offers many advantages over other techniques to retain contaminants with different polarities in aqueous samples. In addition, SPE also has the advantage of decreasing the amount of hazardous chemicals when used. So far, a few multi-residue analytical methods for the determination of AGs in the different matrices have been established [20-24] using SPE cartridges such as Oasis MCX, SCX, CBX....

Therefore, the objective of the current study was to develop and optimize a method based on SPE that would be simple and fast for routine analysis of the 12 aminoglycoside residues in water samples. Two types of cartridges (Oasis MCX, C18 with Ion Pairing Agent) were selected and evaluated to take a best result of extraction for AGs. In addition, potential factors affecting SPE extraction of AGs were presented and discussed in details.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and Chemicals

Apramycin sulphate (APR), Gentamicin-2.5-sulphate hydrate (GEN), Tobramycin (TOB), Streptomycin sulphate (STR), Dihydrostreptomycin sesquisulfate hydrate (DIH), Spectinomycin dihydrochloride hydrate (SPEC), Paromomycin sulphate (PAR), Neomycin sulphate (NEO) and Atrazine (ATR) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg-Germany). Sisomycin sulphate salt (SIS), Kanamycin sulphate (KAN), Amikacin Hydrate (AMK), Hygromycin B (HYG) and Atrazine D5 (ATRD) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). The purity of all products was higher than 90% except SIS, KAN, and HYG where their purity was 87%, 77%, and 66% respectively.

Acetonitrile (ACN) LC-MS grade, methanol (MeOH) HPLC grade and pentafluoropropionic acid (PFPA) (97%) were obtained from Sigma-Aldrich (Switzerland, GmbH Riedstrsteinheim, USA). Formic acid (FA) (99%) and ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) (25%) are respectively purchased from BDH laboratory (England) and Fluka (Germany). Ultrapure water with resistivity of 18.2 MΩ cm<sup>-1</sup> was obtained from Easypure™ II water purification system (Thermo Scientific, USA).

Stock standard solutions were prepared individually at approximately 1 g L<sup>-1</sup> dissolving each compound in water acidified with 1% FA except ATR and ATRD were prepared in acetonitrile solvent. These solutions were stored at 4°C and were stable for at least 8 months. Due to the high sorption affinity of AGs to polar surfaces, polypropylene materials were used during sample preparation and storage. Working solutions mixture was prepared at 4 mg L<sup>-1</sup> by diluting AGs stock solution with deionized water. A separate two solutions of ATR and ATRD with concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> were prepared also in water and ACN respectively. These solutions will be used as internal standard.

### 2.2. LC/MS/MS analysis

Chromatographic separation of AGs was performed with an Agilent 1200 HPLC system (Agilent technologies, USA) equipped with Zorbax Eclipse C18 reversed phase column (150 \*4.6 mm \*5 μm) (Agilent technologies, USA). The mobile phases were constituted with solvent A: UP-water containing 0.1% PFPA and solvent B: contain ACN only. The separation was performed at 30°C running a flow rate of 0.8 mL min<sup>-1</sup> and the following gradient program (A:B) was applied: (95:5) to (50:50) in 10.6 min; (50:50) to (0:100) in 0.4 min. Then, the column was equilibrated for 5 min until the next injection; the total time of the method was 16 min. An injection volume of 20 μL was employed for all analyzed samples.

The LC system was interfaced to an Agilent 6410 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent technologies, USA) via electrospray ionization (ESI) source and it was operated in positive mode using nitrogen gas as a collision gas and also as nebulization gas at 30 and 40 psi respectively. The source temperature was maintained at 350°C. The MS/MS data acquisition was performed in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode where two precursor-product ions were chosen for each AGs. This was carried out by infusing 5 µg mL<sup>-1</sup> of individual standards solutions directly into the MS/MS system. The precursor ions of all analytes were [M+H]<sup>+</sup>, except Spectinomycin, which contain a carbonyl group that can be hydrated in aqueous solution and cause water adducts formation, therefore, [M+H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, m/z 351 was selected as the precursor ion for MS/MS analysis. Fragment ions, cone voltage and collision energy are shown in Table 1. Fragment ion with highest intensity is used for quantification.

Table 1: The optimal parameters for multiple reaction monitoring (MRM) for the 12 AGs.

Aminoglycosides	Precursor ion	Cone voltage (V)	Quantification ion	Collision energy (V)	Confirmation ion	Collision energy (V)
<b>Apramycine</b>	540.3	90	217	25	378	15
<b>Gentamycine</b>	478.3 464.3 450.1	120	322.2 322.1 322	10	156.9	20
<b>Dihydrostreptomycine</b>	584.3	120	262.9	30	245.9	35
<b>Streptomycine</b>	582.2	120	263.1	35	245.9	35
<b>Néomycine</b>	615.3	120	160.9	35	292.9	25
<b>Spectinomycine</b>	351.1	120	333.1	15	207.1	20
<b>Paromomycine</b>	616.3	100	162.9	40	324.1	20
<b>Tobramycine</b>	468.2	120	162.9	20	324.2	10
<b>Amikacin</b>	586.3	110	162.9	35	425.3	15
<b>Sisomycin</b>	448.3	100	254.1	15	271.1	15
<b>Kanamycin</b>	485	60	324.2	15	163.2	5
<b>Hygromycin</b>	528.2	110	177	30	352.1	25

### 2.3. Solid-phase extraction

Our study is focused to optimize solid phase extraction method. Therefore, different factors have been considered regarding sorbent type, sample pH, sample volume and elution solvent. In addition, two different SPE cartridges were evaluated: Chromabond C18, 200 mg purchased from Machery-Nagel (Duren, Germany) and Oasis MCX, 60 mg obtained from Waters (Millipore ford, USA). SPE procedure was performed using 24 ports Visiprep SPE vacuum manifold with a KNF lab port mini pump from Supelco (Sigma Aldrich, Germany). For SPE optimization, triplicate blank water was spiked with standard mixed solution at 100 ng L<sup>-1</sup> and with surrogate standard (ATR).

Real water samples were extracted by using Chromabond C18. Then, C18 cartridges was conditioned and activated with 3mL of MEOH and 3ml 0.7% PFPA in pure water. Ion pair PFPA

was used to make interaction between AGs and reversed phase for the Chromabond C18. Each water sample (50 mL) then PFPA (0.7 %) was added, was percolated through the SPE cartridge under vacuum with a flow rate of 5 mL min<sup>-1</sup>. The cartridge was then dried immediately for 20 min under vacuum. Then 3 mL of MeOH was added, and kept for 30 min in contact with SPE sorbent to eliminate the excess of PFPA. Then analytes were eluted into a conical plastic tube. Finally, the eluate was evaporated to approximately 300 µL under nitrogen stream at 50°C, and then an internal standard (ATRD) was added to the final extract. Samples extract are stored in the dark at about -20°C until LC/MS/MS injection.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Solid phase extraction optimization**

Aminoglycoside antibiotics are extremely hydrophilic compounds due to the high number of amino and hydroxyl moieties [10]. They are very polybasic cations at low pH. For that reason AGs can be extracted on strong cation exchange adsorbent such as, Oasis MCX. Oasis MCX contain a mixed-mode polymeric sorbent with reversed-phase and strong cation functionalities (sulfonic group) that are able to interact selectively with basic and neutral compounds. Therefore, acidification of water samples was required prior extraction to make a good partitioning and interaction between ionized AGs and the bonded phase.

Formation of ion pairing(IP) using volatile reagent such as trifluoroacetic acid (TFA), pentafluoropropionic acid and heptafluorobutyric acid (HFBA) are more commonly used for AGs analysis using mass spectrometry [12,26,27]. IP reagents have been known and used for their ability to change selectivity and increase retention of highly polar compounds on RP analytical columns [25]. They contain a non polar portion, such as a long chain of aliphatic hydrocarbon to interact with RP media, and a polar portion, such as an acid or base which interacts with ionized analytes. Comparing HFBA and PFPA, PFPA can be considered as a better reagent, because it does not adsorb strongly to RP stationary phase as HFBA does and the retention is clearly obtained through an ion-pair mechanism [28]. On the other hand, trifluoroacetic acid (TFA) may cause dramatic ion suppression in the ESI source [28].

The objective of our study is to optimize potential parameters that affect the extraction of 12 AGs in water by using two different cartridges Oasis MCX and Chromabond C18 with pentafluoropropionic acid and comparing recoveries obtained from both cartridges.

##### **3.1.1. Oasis MCX SPE extraction**

AGs have a similar chemical structure, but showed significant differences regarding their interaction with ion exchangers. Percentage of  $\text{NH}_4\text{OH}$ , pH of samples and elution solvent were evaluated to access the retention of AGs analytes as well as their recovery on Oasis MCX cartridges.

#### A- Percentage of $\text{NH}_4\text{OH}$

Due to a strong electrostatic interaction bond between AGs positively charged and the sulfonyl group negatively charged a strong elution was required to elute all AGs molecules retained on stationary phase. Therefore, adding  $\text{NH}_4\text{OH}$  in elution step helps to neutralize AGs and improves leads their elution. Figure 1 shows the recoveries of AGs at different percentages of  $\text{NH}_4\text{OH}$ . At 2% (pH=10) AGs have low recoveries and increases when this percentage increases to 7%. Experiments show that the recovery are much better when 5 (pH = 11), 7 (pH = 11.5) and 10 (pH = 12) are used. However, at 7 % (pH = 11.5) AGs gave good recovery for the majority of molecules, except Spectinomycin which underwent a rapid degradation at high pH values [29]. This allows concluding that the 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  is not high enough to give a complete neutralization of AGs and the 10%  $\text{NH}_4\text{OH}$  can affect their stability.

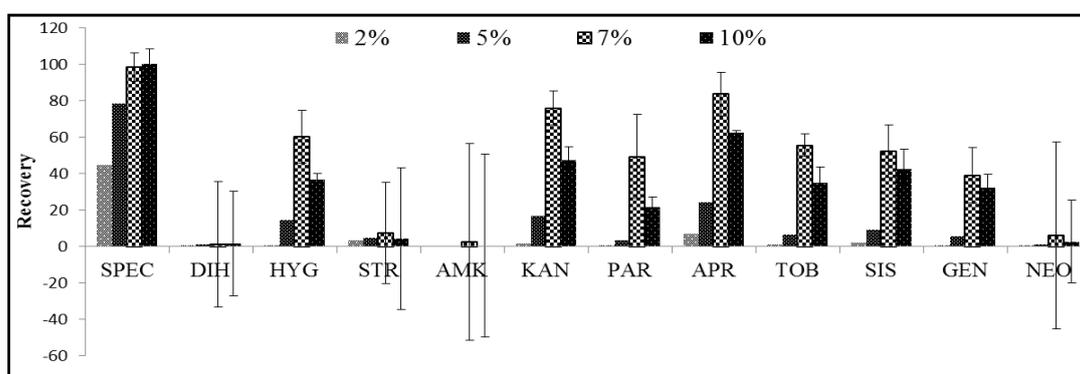


Figure 1: Effect of percentage of  $\text{NH}_4\text{OH}$  in the recovery of 12 AGs by Oasis MCX.

#### B- Samples pH

The pH of the samples must be adjusted between 2 and 6 to a maximize analytes retention on MCX cartridges. At this pH range, AGs molecules are protonated and sulfonyl group are deprotonated and carry a negative charge. In our study, we chose to extract AGs at three different pH values 2, 5 and 6. Results in Figure 2 show a better recovery at pH 6 (39 - 72%) comparing to those results obtained at pH 2 and pH 5 (21 - 69%) especially for GEN and NEO. When pH varied between 2 to 6, the recovery of DIH and STR are very low (12-20%) and maintained low even when sample pH was increased to 11 and 13. This result was maybe related to their chemical structures based on

aminocyclito streptidine which have differentiates than other AGs and cannot be retained on Oasis MCX.

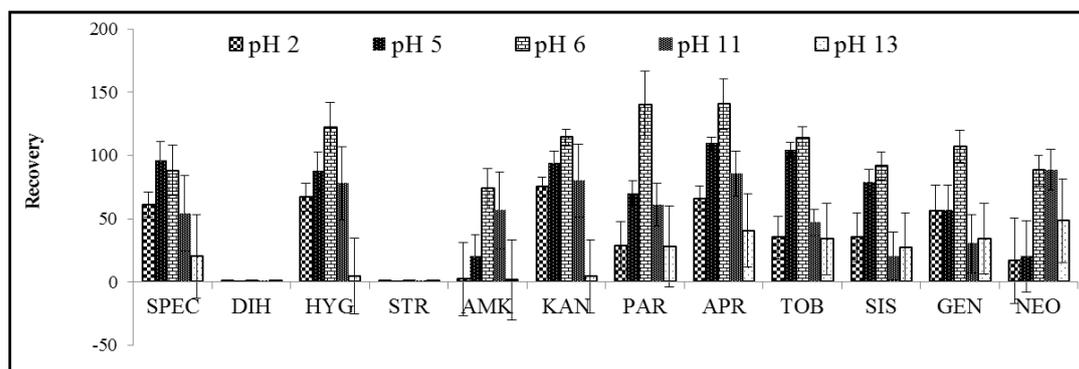


Figure 2: Effect of pH samples in the recovery of 12 AGs in Oasis MCX.

### C- Elution solvent

Elution solvent plays a crucial role to elute all retained analytes on stationary phase. Three types of solvent mixture containing 7% NH<sub>4</sub>OH were tested to elute AGs from MCX cartridge using 5mL of MeOH, Water/MeOH (1/4, v/v) and Water/ACN (1/4, v/v). As shown in Figure 3, AGs recovery increase with the enhancement of polarity of the elution solvent. Recovery range was obtained between (31 -95 %) for all analytes with Water/MeOH comparing to MeOH (6 - 96%) and to Water/ACN (12 -91 %), except for NEO, SPEC and DIH which has a low recovery less than 31 %. Therefore, to ensure a good recovery of AGs, polar elution solvent (Water/MeOH) was recommended to elute all AGs analytes.

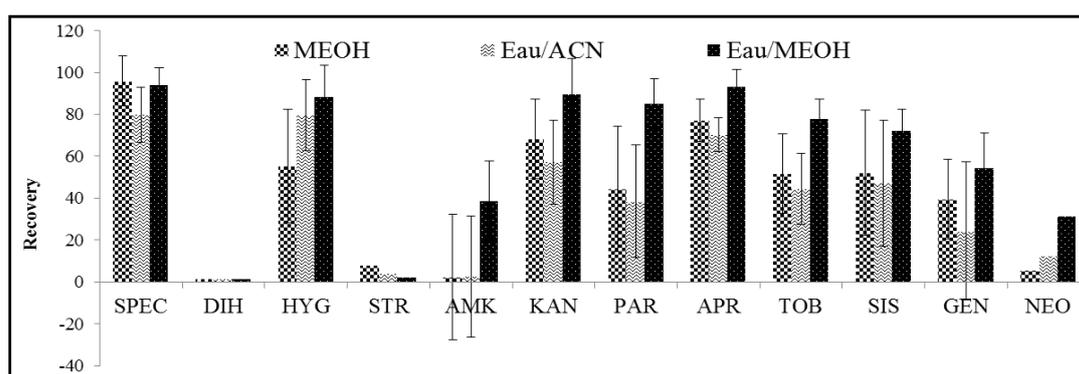


Figure 3: Yields of whole extraction by Oasis MCX for three different elution solvent.

### 3.1.2. Chromabond C18 SPE extraction

To improve the extraction efficiency of DIH and STR, reversed phase C18 cartridge with PFPA ion pairing reagent was tested. Different extraction parameters were also evaluated to select an optimal condition by assessing the recovery of each step.

### A- Percentage of PFPA reagent

Ion pair, PFPA, plays an important role in the retention of AGs on C18 reversed phases (Figure 4). In our study, retention of AGs was evaluated with and without PFPA on C18 cartridge by assessing their recovery. Therefore additional conditioning step is made prior extractions on SPE cartridges by adding PFPA reagent on different percentages which vary between 0.1 to 2%. Cartridge pretreated with PFPA reagent showed significantly higher recovery for AGs (50 - 95 %) comparing to non-treated cartridges less than 10 % (Figure 4). Ion pairing was effective to retain and recover polar molecules on C18 non polar sorbent. The retention increased with increment percentage of the PFPA. The recovery of HYG, AMK, KAN, PAR GEN and NEO was affected when PFPA percentage varies between 0.1 and 0.5%. Otherwise, there is no significant difference in recovery when C18 cartridges are treated with PFPA at 0.7-2%. Therefore, remaining test is conducted with PFPA at 0.7%. Moreover, Chromabond cartridges treated with ion pairing agent showed remarkable improvement on recovery (63 – 87 %) for DIH and STR comparing to MCX cartridges less than 7%.

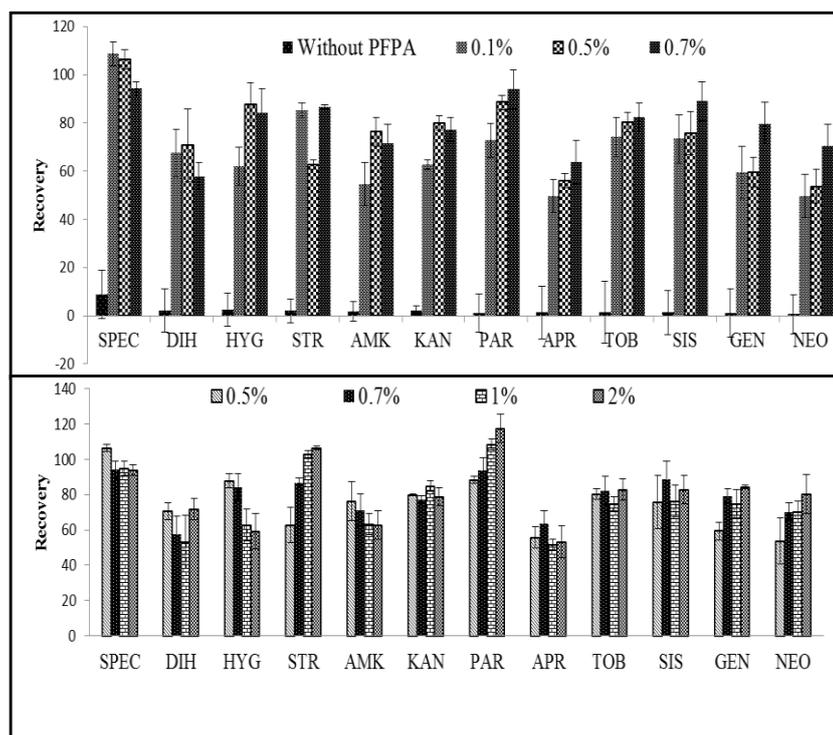


Figure 4: Effect of PFPA on the recovery of 12 AGs extracted Bond Elute C18.

### B- Elution solvent

In order to study the extraction efficiency for AGs, different elution solvents were tested to choose an appropriate solvent for the elution of AGs from C18. 5 mL of MeOH, Water/MeOH (1/4, v/v) and Water/ACN (1/4, v/v) were evaluated respectively. The results are shown in Figure 5 indicating a good recovery (51 – 102 %) for most analytes using MeOH. Poor recovery was obtained for the majorities of AGs when using Water/ACN. This is probably due to the high polarity of these two

solvents in comparison to mixed solvent Water/ACN. Therefore, MeOH was chosen as elution solvent.

Another test was performed to minimize the elution volume without affecting recoveries of AGs. In this context, 3mL of MeOH was kept inside cartridge for 30 minutes before the final elution. The results are shown in Figure 7 indicating an increase in recoveries for all molecules comparing to those obtained from 5mL except HYG, AMK and STR. This is explained by the need to increase the interaction between stationary phase and elution solvent to desorb all.

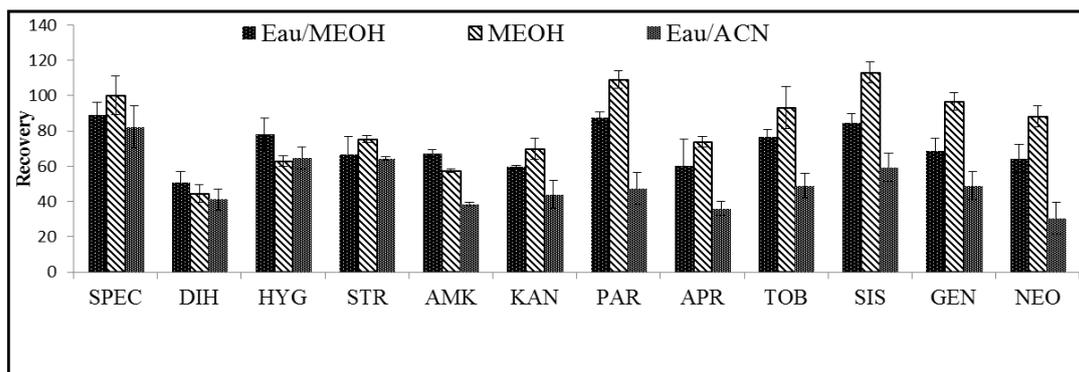


Figure 5: Yields of extraction by SPE C18: three nature of elution solvent

### C- Conditioning step

Conditioning is very important step when solid phase extraction is performed to ensure reproducible interaction with analytes of interest. MeOH became a solvation solvent which was used in C18 cartridges for wetting the stationary phase to produce a suitable interaction with analytes. In our study, two volumes was set 3 and 6 mL of methanol and was evaluated to study the effect of solvation on AGs retention. Results in Figure 6 shows no significant increase in recovery for all AGs when 6 mL was utilize for conditioning. Therefore, 3mL of MeOH was adapted to conditioning C18 Cartridges.

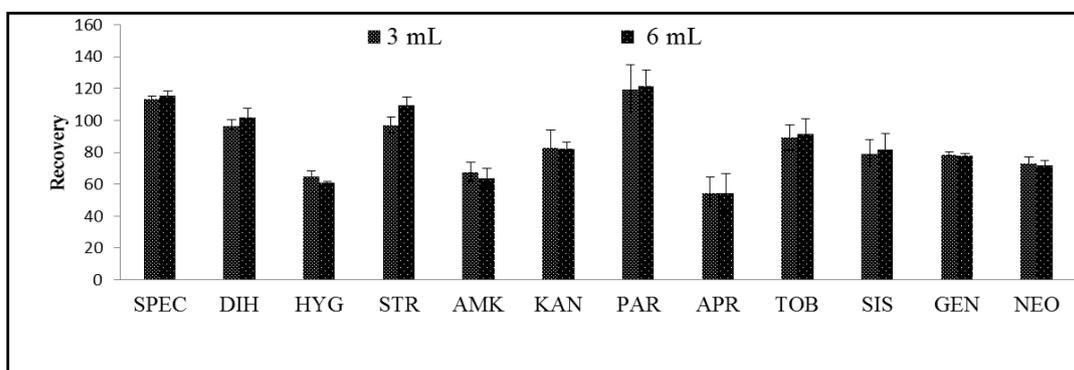


Figure 6: Recoveries of 12 AGs using C18 cartridge at two volume of MEOH as conditioning step.

#### D- Breakthrough volume

During the extraction process, breakthrough may occur because of large loading sample volume and this would decrease the recovery seriously. In this study, breakthrough was assessed by extracting spiked wastewater samples at  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  for all analytes using procedure that can be explained before in C18 cartridge. To evaluate the breakthrough volume, various aqueous solutions (5- 10- 50- 70- 100 and 200 mL) was loaded into Chromabond C18. Figure 7 showed results, the breakthrough volume was found to be 70 mL for most AGs but for KAN, AMK, DIH and SPEC it was 50 mL. Only HYG present a low breakthrough volume (5 mL). Consequently, the breakthrough volume of the entire method was set at 50 mL, excluding HYG.

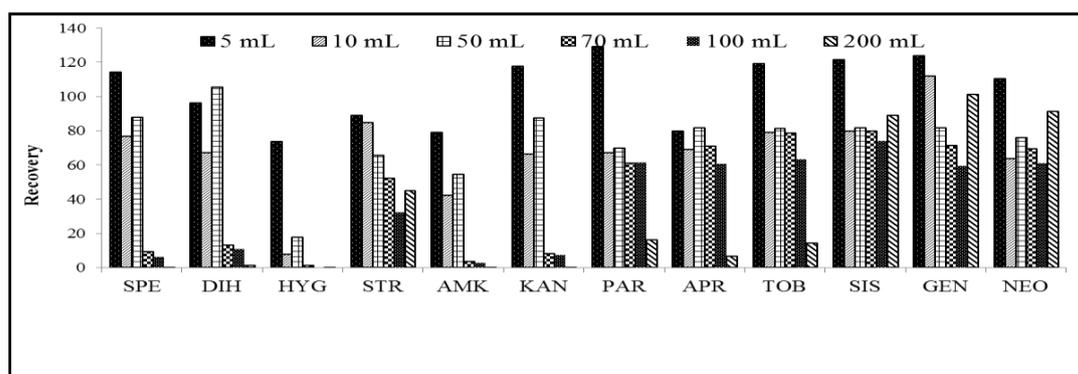


Figure 7: Evaluation of the breakthrough volume through the extraction recoveries of 12 AGs for different loading sample volumes

#### 3.1.3. Comparison between Oasis MCX and IP Chromabond C18

By comparing the extraction efficiency on both cartridges Oasis MCX and IP C18, we find clearly that the recovery of most AGs was higher on C18 cartridge (Figure 8). For SPEC and APR gives a slight highest recovery in the Oasis MCX but we can consider them acceptable (85-70%) on C18 for both molecules. DIH and STR have poor recoveries using ion exchanger sorbent. On the other hand, the relative standard deviation was calculated for each cartridges and the C18 (0.5-15%) offered a better range of values comparing to Oasis MCX (6 – 36 %). In addition, C18 cartridges are less expensive reflecting cost effective for routine analysis. For this reason, in our study we decided to use C18 Chromabond cartridge with PFPA for the extraction of AGs in all water samples.

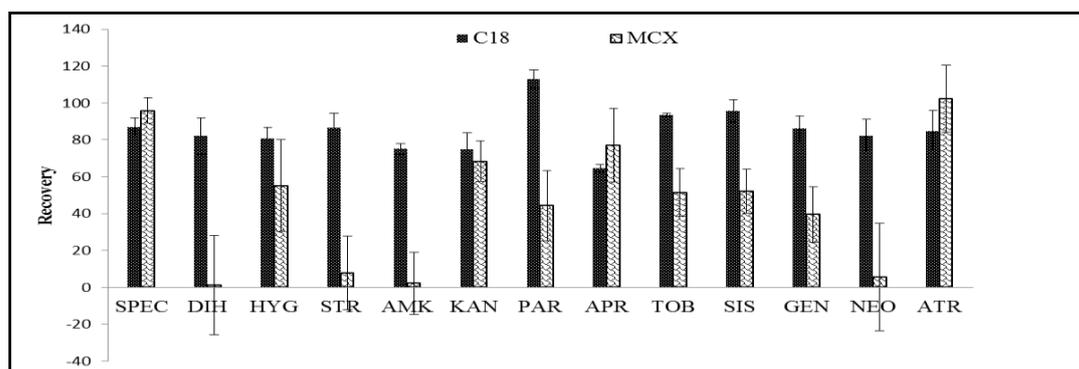


Figure 8: Average extraction recoveries of 12 AGs obtained by Oasis MCX and C18.

### 3.2. Method validation for C18 (PFPA) - LC/MS/MS

Each compound was analyzed with MRM mode using the two precursors - product ion for each AGs. Identification and confirmation of the target compounds was based on their retention times and on their relative ions intensity comparing to calibration standard. To evaluate the analytical procedure of SPE using LC-ESI/MS/MS validation plan was performed to assess the linearity, LOQ and repeatability. Linearity was determined by injection of standard solution at different concentration levels ranging from 10 to 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Each compound showed good linearity in studied working range, with coefficient of determination ( $R^2$ ) greater than 0.99 (Table 2).

Table 2: Validation results: Coefficient of determination  $R^2$ , recoveries, repeatability and LOQs.

Aminoglycosides	Coefficient of Correlation ( $R^2$ )	Recovery (%)	RSD (%)	LOQs ( $\text{ng L}^{-1}$ )
<b>Apramycine</b>	0.991	65	3	10
<b>Gentamycine</b>	0.990	86	10	5
<b>Dihydrostreptomycine</b>	0.996	82	8	20
<b>Streptomycine</b>	0.997	86	5	20
<b>Néomycine</b>	0.992	82	15	10
<b>Spectinomycine</b>	0.993	87	2	5
<b>Paromomycine</b>	0.992	115	0.5	5
<b>Tobramycine</b>	0.995	94	3	10
<b>Amikacin</b>	0.991	75	3	20
<b>Sisomycin</b>	0.990	96	1	10
<b>Kanamycin</b>	0.995	75	4	10
<b>Hygromycin</b>	0.990	81	4	50

Recoveries for all AGs were performed at 100  $\text{ng L}^{-1}$  spiking level calculated with internal standard (ATRD) and values were in the range between 65 – 115%. Repeatability and intra-reproducibility of the analytical method were described as the value of relative standard deviation (RSDs) of the areas obtained for each analyte after the replicate ( $n = 3$ ) analyses of spiked water samples per day which ranged between 0.5 -15%. LOQs were experimentally determined at a signal to noise ratio (S/N) of 10 and presented for each AGs. Recovery data, RSDs and LOQs values obtained are

shown in Table 2. After validation, this method can be applied to a routine analysis of the 12 AGs in sample water.

### 3.3. Determination of aminoglycosides in water samples

To assess the occurrence of the selected AGs in environmental samples, validated method was applied on water samples which was collected in Lebanon from two different waste water treatment plants (WWTPs), located at two different regions (Ouzai and Hammana) and from veterinary hospital waste water samples (H1) located at Mtaileb. EL GHADIR station which applied only wastewater pretreatment with an average flow rate at 34481 m<sup>3</sup>/Day. In fact, this WWTP applied only a pretreatment. On the other hand, nominal capacity of Hammana was set at 300000 EH and applied a primary and secondary treatment for waste water. Samples were collected from the two WWTPs and H1 in July, August and September in 2013. Water samples (50 mL) was filtered using GFA and GFF whatman glass filters (1.7 and 0.7 μm), than followed by SPE extraction procedure to evaluate the occurrence of AGs using LC/MS/MS. No analyte was detected for the two WWTPs. Only Gentamycin was detected in hospital water H1 at 30 ng L<sup>-1</sup> in Septembre sample.

## Conclusions

The aim of our work is to develop a new and suitable method for routine analysis of 12 aminoglycosides present in water. Solid phase extraction was used for isolation and preconcentration of our analytes on SPE sorbent. On the other hand, this method was ease and flexible to extract antibiotics from aqueous matrices. Two cartridges were tested Oasis MCX and C18 Chromabond using pentafluoropropionic acid ion pairing reagent. Results showed that the C18 cartridge with PFPA give better recovery for most aminoglycosides especially for dihydrostreptomycin and streptomycin compared to Oasis MCX. In addition, many SPE parameters were optimized and evaluated on C18 cartridges to choose best working condition (percentage of PFPA reagent, elution solvent, and volume of MEOH for conditioning and breakthrough volume) on C18. Moreover, this method showed good recovery ranging between 67-115% for all aminoglycosides using C18 with relative standard deviation values between 0.5 and 15 % which gives us a much higher intra-reproducibility. LOQs were calculated for each compound and were found in the range 5 -50 ng L<sup>-1</sup>. This method was applied to real samples collected from two waste water treatment plants and from one hospital waste water at Lebanon country.

## **Acknowledgements**

We thank the Lebanese National Council for Scientific Research (CNRSL) and the Lebanese Atomic Energy Commission (LAEC) for financial support.

## References

- [1] C. D. C. Salisbury, in: H. Oka, H. N., K. Harada, J.D. MacNeil (Eds.), *Chemical Analysis for Antibiotics Used in Agriculture*, AOAC International, Toronto, Vol. 1995.
- [2] R. Tawa, H. Matsunaga, T. Fujimoto, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 141.
- [3] S. Bogialli, R. Curini, A. Di Corcia, A. Laganà, M. Mele, M. Nazzari, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 93.
- [4] D. A. Stead, R. M. E. Richards, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 693 (1997) 415.
- [5] R. Oertel, V. Neumeister, W. Kirch, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 197.
- [6] H. M. V. D. E. L.E. Bryan, *Antimicrob. Agents Chemother.* 12 (1997) 163.
- [7] A. Marzo, L. Dal Bo, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 17.
- [8] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.-L. Kratz, *Sci. Total Environ.* 225 (1999) 109.
- [9] K. Kümmerer, *Chemosphere* 45 (2001) 957.
- [10] W.-x. Zhu, J.-z. Yang, W. Wei, Y.-f. Liu, S.-s. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 29.
- [11] J. M. Serrano, M. Silva, *J. Chromatogr. A* 1117 (2006) 176.
- [12] D. Löffler, T. A. Ternes, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 583.
- [13] A. V. S. J.J. Chaudhari, K.H. Thakore, J.K. Trivedi, *Indian Drugs* 36 (1999) 474.
- [14] D. S. Hage, *Anal. Chem.* 71 (1999) 294.
- [15] S. S. N. Isoherranen, *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1017.
- [16] L. Soltes, *Biomed. Chromatogr.* 13 (1999) 3.
- [17] D. Levêque, C. Gallion-Renault, H. Monteil, F. Jehl, *J. Chromatogr. A* 815 (1998) 163.
- [18] Y. Tao, D. Chen, H. Yu, L. Huang, Z. Liu, X. Cao, C. Yan, Y. Pan, Z. Liu, Z. Yuan, *Food Chem.* 135 (2012) 676.
- [19] E. S. P. Bouvier, *LC.GC* 13 (1995) 852.
- [20] S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato, *J. Chromatogr. A* 1092 (2005) 206.
- [21] R. A. P. B.J. Vanderford, D.J. Rexing, S.A. Snyder, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6265.
- [22] M. Gros, M. Petrović, D. Barceló, *Talanta* 70 (2006) 678.
- [23] M. Petrovic, M. Gros, D. Barcelo, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 68.
- [24] M. Petrović, M. D. Hernando, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 1.
- [25] M. C. Carson, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 343.
- [26] T. McGlinchey, Dublin City University, 2010.
- [27] United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Office of Public Health Science 2011, p 1.
- [28] I. De Miguel, E. Puech-Costes, D. Samain, *J. Chromatogr. A* 407 (1987) 109.
- [29] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, *Anal. Chim. Acta* 711 (2012) 46.

## Démarche et principaux résultats de la publication 2

Après leur introduction dans l'organisme, les aminoglycosides sont liées aux protéines plasmatiques. Elles ne sont pas métabolisées et donc une importante quantité de la substance d'origine quittera l'organisme inchangée et passera dans les urines ou les fèces. Les déchets domestiques, les hôpitaux, l'élimination incomplète dans les usines de traitement des eaux usées municipales, leur utilisation intensive dans l'agriculture et l'aquaculture sont des sources importantes de leurs émissions dans les systèmes aquatiques. L'analyse de ces molécules dans les eaux n'a pas été réalisée à l'exception d'une seule étude en Allemagne qui a mis en évidence la présence de Gentamicine dans les eaux hospitalières. En outre, la méthode d'extraction de ces molécules pour leur analyse dans l'eau est absente. Pour cette raison, notre objectif est de développer une méthode rapide et fiable pour l'extraction et le dosage de 12 aminoglycosides présents notamment dans les eaux provenant des stations d'épuration et les eaux hospitalières. L'extraction est testée sur deux cartouches l'Oasis MCX et le C18 en présence d'ion pair (PFPA). L'Oasis MCX est un adsorbant polymérique, échangeur de cation en mode mixte, qui est capable à la fois d'échanger des ions et de réaliser l'interaction en phase inverse. La présence de greffons de groupes sulfoniques permet une interaction d'échange de cations. En conséquence, l'adsorbant MCX est conçu pour l'extraction des composés basiques et neutres. L'acidité de la solution joue un rôle important dans l'ionisation des composés basiques et la neutralisation des composés acides. Le C18 est utilisé dans le cas des molécules apolaires dont l'interaction se fait en mode inverse. L'ajout de l'ion pair change la sélectivité et améliore la rétention des molécules polaires sur la phase inverse. L'ion pair contient une fraction non polaire et une autre ionique ce qui joue le rôle d'intermédiaire entre la phase inverse du C18 et les molécules chargées positivement.

Les paramètres étudiés concernant l'extraction sur l'Oasis MCX sont : le pourcentage en  $\text{NH}_4\text{OH}$ , le pH et la nature de l'éluant. Ces trois paramètres sont ajustés afin d'obtenir un meilleur rendement pour les 12 AGs. L'interaction mise en évidence est électrostatique entre les AGs chargés positivement et le groupement sulfonyle chargé négativement. Alors, le pH de l'échantillon est ajusté pour avoir une rétention sur la phase polymérique. Pour optimiser la valeur du pH, nous avons testés les valeurs de pH allant de 2 à 12. Les résultats montrent qu'à pH 6 le rendement est meilleur. L'ajout de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dans le MeOH aide à la neutralisation des charges des AGs ce qui favorise leur élution. Plusieurs pourcentages de  $\text{NH}_4\text{OH}$  ont été testés. Au début, le pourcentage de 2% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH=10) donnait un faible rendement donc les molécules n'ont pas été éluées complètement, ce qui nous a obligés essayer d'autres pourcentages d'une manière croissante afin de neutraliser toutes les molécules et par suite les

éluer. Les expériences montrent que les rendements sont beaucoup plus importants en utilisant les pourcentages 5 % (pH=11), 7% (pH=11,5) et 10 % (pH=12). Le pourcentage 7 % (pH=11,5) donne le meilleur rendement pour la majorité des molécules (à l'exception de SPEC). Ce qui permet de conclure que le 5 % n'est pas suffisant à la neutralisation complète des AGs et le 10% affecte leur stabilité. D'autre part, trois mélanges de solvants MeOH, Eau/ACN (1/4) et Eau/MeOH (1/4) avec 7% NH<sub>4</sub>OH ont été testés. L'élution par le mélange Eau/MeOH donne le meilleur rendement pour la plupart des AGs, ce qui prouve que l'élution complète des AGs nécessite une augmentation de la polarité de l'éluant. Pour améliorer le rendement d'extraction, un autre type de cartouche tel que le C18 en utilisant un ion pair, PFPA, a été utilisé. Plusieurs paramètres ont été étudiés pour connaître leurs effets sur l'extraction. L'ion pair, PFPA, joue un rôle très important dans la rétention des AGs sur la phase de C18. Les pourcentages de PFPA étudiés sont 0,1%, 0,5%, 0,7%, 1% et 2% dont le 0,7% a donné le meilleur rendement pour la majorité des molécules. Les faibles valeurs (0,1–0,5%) ne sont pas suffisantes pour la rétention complète d'HYG, AMK, KAN, PAR, GEN et NEO et les pourcentages les plus élevés (1-2%) n'améliorent pas beaucoup le rendement. Les trois éluants étudiés sont: Eau/MeOH (1/4), MeOH et Eau/ACN (1/4). Le rendement est meilleur en utilisant le MeOH ou l'Eau/MeOH que celui de l'Eau/ACN. Le MeOH à 100% a donné le rendement le plus élevé pour plusieurs AGs (PAR-APR-TOB-SIS-GEN-NEO). Un autre essai a été réalisé pour minimiser le volume d'élution en utilisant 3 mL MeOH et en le laissant en contact avec l'adsorbant 30 minutes avant de faire l'élution sous vide. Ce temps de contact favorise l'élution complète de tous les AGs à l'exception d'HYG, AMK et STR, en améliorant l'interaction entre le MeOH et les AGs. Durant tous les tests effectués, 6ml de MeOH ont été utilisés dans l'étape de conditionnement de la cartouche. Un volume de 3 mL de MeOH est testé dans le but de minimiser la consommation de MeOH, cependant les deux volumes (3 et 6 mL) ont donné approximativement le même rendement pour tous les AGs. Finalement, plusieurs volumes d'échantillon ont été examinés (5, 10, 50, 70, 100, 200 mL) pour évaluer le volume de fuite. Un volume de percolation égale à 70 mL pour la plupart des AGs à l'exception de KAN, AMK, DIH et SPEC dont le volume de percolation est de 50 mL. Seule, l'HYG présente un volume de fuite très faible de 5 mL.

En comparant le rendement d'extraction sur les deux cartouches Oasis MCX et C18, nous avons trouvé très clairement que le rendement pour la plupart des AGs est meilleur sur la cartouche C18. Le SPEC et l'APR donnent un meilleur rendement sur l'Oasis MCX mais nous considérons que le rendement sur C18 (85-70%) est acceptable pour les deux molécules. Les résultats montrent que la cartouche C18 en présence de l'ion pair PFPA donne un meilleur rendement pour la majorité des AGs comparé à celui obtenu avec l'Oasis MCX.

La méthode sur C18 est appliquée aux eaux de deux stations d'épuration (EL GHADIR, Hammana) et à l'eau hospitalière d'un hôpital vétérinaire, localisé au Liban, pour déceler la présence de ces composés. L'étude a été effectuée sur une période de trois mois de l'année 2013 (Juillet, Août et Septembre). Seule la Gentamicine a été détectée avec une concentration de 30 ng L<sup>-1</sup>.

# Comparison of Offline and Online SPE-LC/MS/MS for the Determination of Colistin A and B in Water Samples

*Samia Mokh<sup>1</sup>, Sebastien Schramm<sup>2</sup>, Patrick Pardon<sup>2</sup>, Emmanuel Geneste<sup>2</sup>, Mohamad Al iskandarani<sup>1,3</sup> and H el ene Budzinski<sup>2\*</sup>*

<sup>1</sup> National Council for Scientific Research CNRS - Lebanese Atomic Energy Commission LAEC - Laboratory for Analysis of Organic Compound LACO - Beirut, Lebanon.

<sup>2</sup>Bordeaux University 1, CNRS, EPOC-LPTC-UMR 5255 (Laboratory of Physico and Toxicology Chemistry), 351 Cours de la Lib eration, 33405 Talence, France.

<sup>3</sup>Lebanese University - Faculty of Health I - Hadath, Lebanon.

*\*Corresponding author. Tel: +33 5 56 8469 98; fax: +33 5 56 84 69 98 (H.Budzinski)*

*Email address: [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr)*

**Keywords:** Colistin A and B, LC/MS/MS, Online solid phase extraction, Wastewater, Pentafluoropropionic acid.

## **Abstract**

An automated online solid phase extraction (SPE) with liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method was developed for the determination of colistin A and B in environmental water samples. After optimization of LC–MS/MS conditions, SPE parameters such as sorbent nature, loading flow, percentage of pentafluoropropionic acid and sample volume were optimized. Method recoveries ranged from 70 to 98% and compared favorably with those achieved using Offline SPE. Limits of quantification were 90 ng L<sup>-1</sup> in Online and 150 ng L<sup>-1</sup> in Offline SPE. This online SPE\_LC–MS/MS procedure was applied to the analysis of water samples taken in two wastewater treatment plants (WWTPs) at Bordeaux city (Louis Fargues and Clos de Hilde). The obtained results revealed the absence of colistin between September and March 2012-2013.

## 1. Introduction

Colistin, known also as polymyxin E, is a cationic polypeptide antibiotic, isolated in 1950 from *Bacillus polymyxa*. *Colistinus* [1]. It is found to be effective to treat the infections caused by gram-negative bacteria, in particular, against multidrug-resistant such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* [2-4]. Colistin A and B are two major components of colistin. The two substances differ in the length of the fatty acid side chain (Figure 1). For effective treatment of the concerned diseases, these two form of Colistin, using in human and veterinary therapies, usually administered via various routes [5]. Colistin (base) exhibits both hydrophobicity attributable to the fatty acid moiety, and basic properties (pKa approximately 10) due to the five unmasked  $\gamma$ -amino groups [1]. Or, it is amphipathic and able to distribute well in both polar and non-polar environments, such as in water and in prokaryotic and eukaryotic lipid membranes[1].

Among different groups of pharmaceuticals, antibiotics are of special concern because of their potential to affect and harm organisms in aquatic media. Antibiotics in water, even at low concentrations, are of concern as one effect is increased bacterial resistance through continuous exposure to these compounds [6, 7]. This effect has been reported in different studies where increased bacterial resistance was observed in waste effluents from hospital and pharmaceutical plants [8, 9]. To improve control and monitoring of antibiotic compounds in the aquatic environment, it is necessary to develop suitable methods for their reliable determination at the low ng L<sup>-1</sup> range. The low concentration levels and the complexity of environmental matrices, make the use of highly sensitive and selective methods for antibiotic determination necessary, most of them are laborious, time and solvent consuming [10].

Existing conventional methods that have been applied for Colistin includes microbiological assay [11], thin-layer chromatography (TLC) [12], immunological assay [13], capillary electrophoresis [14, 15] and high-performance liquid chromatography (HPLC) [16, 17]. However, due to its poor ultraviolet absorption and lack of native fluorescence, the analysis of Colistin by HPLC poses problems. Decolin et al. [18] and Le Brun et al. [17] developed HPLC methods in which orthophthal aldehyde were employed as a derivatizing reagent. Since the derivatives were not overly stable, a complicated on-line derivatization procedure was required in such methods. Nowadays the technique of choice is liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and there has been an increasing number of papers published dealing with the determination of antibiotics in surface, ground, and wastewater by LC-MS [19, 20]. Although the use of MS, and especially MS/MS, allows increasing the sensitivity, a pre-concentration step is still necessary to reach suitable limits of detection (LOD). Until now, the



## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and Materials

Colistin sulphate salt mixture was obtained from Sigma–Aldrich (France). All solvents (Acetonitrile and Methanol) used of LC/MS grade, Formic acid (FA) (purity 99%) were obtained from J.T.Baker (Netherlands). Water was purified by a Milli-Q system (Millipore). Pentafluoropropionic acid (PFPA) (purity 97%) and ammonium acetate (AmAc) are from Sigma-Aldrich (Netherlands).

For colistin, stock standard solution was prepared in Milli-Q water ( $111.54 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Due to the high sorption affinity of colistin on polar, only laboratory equipments made of polypropylene were used during sample preparation and storage. Working solutions were prepared by diluting the standard solution with deionized water at a concentration  $4 \text{ mg L}^{-1}$ . All standard solutions (stock and working solution) were stored at  $-20^\circ\text{C}$ .

Two different Online SPE disposable cartridges were tested: PLRP-S (PLRP-S polystyrenedivinylbenzene  $10*2\text{mm} -12.69\text{mg}$ ) and BE Plexa PCX (BE- Plexa PCX- polymeric cation exchange resin  $10* 2 \text{ mm} - 11.7\text{mg}$ ) from Spark Agilent Netherlands. Oasis HLB (n-vinylpyrrolidone divinylbenzene polymer,  $200 \text{ mg- } 6 \text{ mL}$ ) from Waters (France) used for the offline SPE.

### 2.2. Online SPE-LC-MS/MS analysis of colistin

A schematic diagram for the Online Solid-phase extraction coupled to LC/MS/MS for the determination of colistin in water samples is depicted in Figure 2. The analytical system consisted of a preconcentration module coupled to a LC–MS/MS system (both from Agilent Technologies, France). Online SPE system included an automated liquid sampler (ALS) fitted with a  $900\mu\text{L}$  injection loop with multi-draw capability. A programmable 6 ports/2 positions valve was used to switch between loading and elution modes (*V2 in figure 2*). SPE cartridge was conditioned with acetonitrile and water. At the beginning of procedure, V1 was switched in by pass position and V2 in loading position. Needle draw defined volume of the sample in loop sample. Afterwards, V1 switched in main pass position and the sample was eluted in the cartridge according to the quaternary pump. A waiting time, depending on the quaternary pump flow and sample volume, was necessary to allow total elution of sample in to the cartridge. After that, V2 switched in elution position and the analytes retained were progressively transferred to the LC analytical column in back-flush mode, using LC solvent gradient described below.

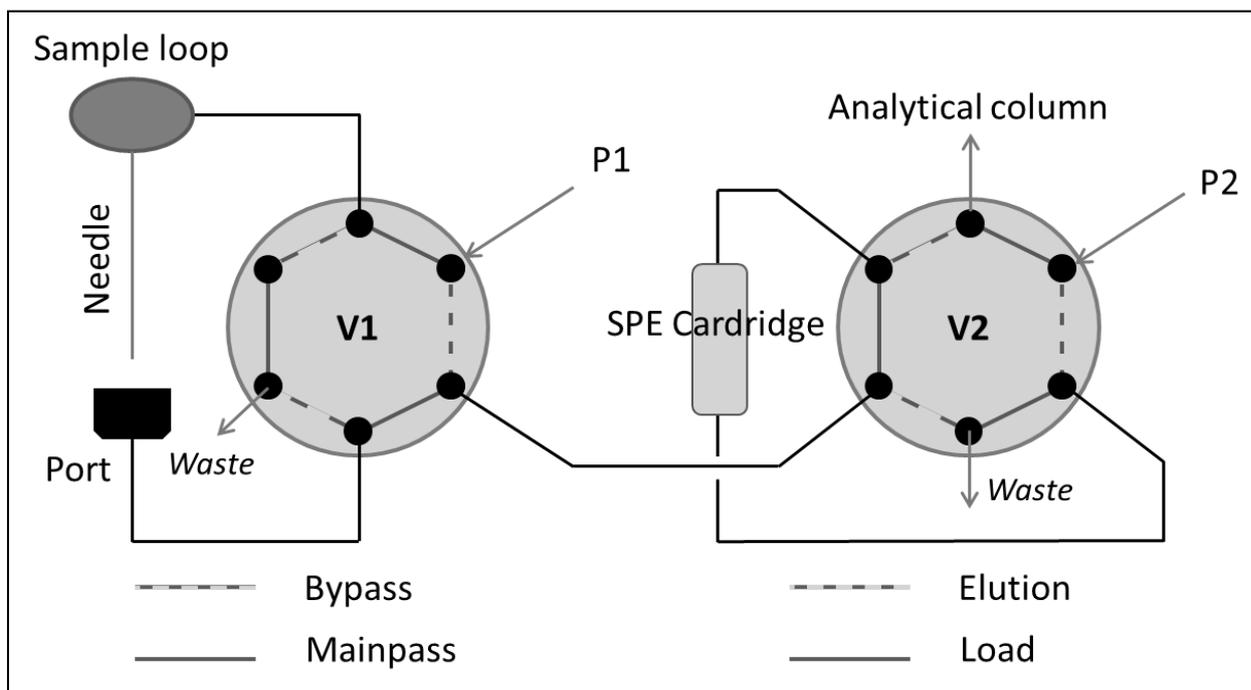


Figure 2: Schematic manifold of Online SPE-LC/MS/MS system. V1: selection valve; V2: switching valve; P1: Quaternary pump; P2: Binary pump.

In order to optimize chromatographic peak area of Colisin, several conditions of online SPE was tested in a  $2^4$  full factorial experimental design and repeated twice. All parameters and corresponding levels are described in table 1.

Table 1: Factors and Levels used for experimental design

Factor		N°	Level -	Level +
Injected volume	$\mu\text{L}$	1	500	900
Percentage of PFPA	%	2	0	5
Loading flow	$\text{mL min}^{-1}$	3	0,4	1
Sorbent nature	-----	4	PLRP	PCX

The effect of a factor corresponds to the half of the difference between the means response of positive level and negative level. Consequently, a positive effect reveals an increasing of the area of chromatographic peak.

Sorbent nature (factor 4) was tested using two types of cartridges (PLRP-S and PlexaPCX). PLRP-S contains rigid macroporous spherical particles of polystyrene and divinylbenzene. They are physically and chemically stable across complete pH range (1 – 14). Plexa PCX is another milestone that uses a cation exchanger with mixed mode sorbent characteristics and is therefore suitable for extraction and cleanup of weak bases. Plexa PCX sorbent removes neutral and acidic interferences from matrix concentrates basic analytes and therefore improves sensitivity in the determination of basic compounds.

Chromatographic separation was achieved using an Agilent Porochell 120- SB C18 column (2.1mm×50mm, 2.7µm particle size). Mobile phase solvents were water + 0.1% PFPA (A) and ACN (B) in an initial ratio (A: B) of 90:10. Separation was achieved at 40°C using a flow rate of 0.5mLmin<sup>-1</sup> with the following (A:B) gradient: 90:10 at 0min; 90:10 to 60:40 in 2min;60:40 to 0:100 in 0.5min; 0:100 during1min; 0:100 to 90:10 in 0.5min. Then, the system was equilibrated for 1 min prior to next injection (approximate total run time: 8 min).

For operation in MS/MS mode, Agilent6490 triple quadrupole mass spectrometer was equipped with an Agilent jet stream electrospray ionization (ESI) source and operating in positive detection mode. Nitrogen (99.999%, Linde Gas, France) was used as collision gas and as nebulising gas (20 L min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure 20 psi), then was produced via a nitrogen generator (Zefiro 35, F-DBS, France). Gas temperature was set at 225°C; Sheath Gas Heater and Gas Flow were used at 400°C and 12 L min<sup>-1</sup> respectively. The MS/MS signal acquisition was performed in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode (Table 2). For each colistin, two signals were monitored, corresponding to the transition between the precursor ion and the most abundant product ions. The most abundant one was used for quantification while the two other were used for confirmation. The ratio of quantification transition area to confirmation transitions area was compared to that obtained with an authentic standard (margin applied: ± 20%). Data were collected using Mass Hunter software from Agilent Technologies, which was also used for analyte quantification. Quantification was determined using a standard addition method by a least-square linear regression analysis of the peak area versus the concentration.

### 2.3. Offline SPE procedure

Offline preconcentration of colistin A and B was performed on Oasis HLB cartridges (200 mg/6 mL). Oasis HLB cartridges were conditioned with 5mL of MeOH, followed by 3mL of water (+1% PFPA). Samples (50mL +1% PFPA) were passed through the cartridges at a flow rate of 1– 2 mL min<sup>-1</sup>. Then, cartridges were dried under vacuum during 20 min. Finally, analytes were eluted with 5mL of MeOH and extracts were evaporated under a nitrogen stream at 45°C and

reconstituted to 0.3 mL in water/MeOH (10/90, v/v). Percentage of PFPA in samples for the Offline method was tested and optimized. Analyses were carried out using the LC/MS/MS system described above. The injection volume was set at 5  $\mu$ L.

## 2.4. Validation study

The methodology was validated with respect to linearity and sensitivity in order to evaluate reliability of results provided by online SPE system. Procedural blanks consisting of water spiked were analyzed as a control of contamination during sample handling in the laboratory and to assess potential memory effect in the online SPE apparatus. For colistin A, the limits of quantification (LOQs) were determined as the concentrations with a signal to noise ratio 10.

The noise levels correspond to the peak to peak amplitude of the signal on 2 minutes range before the chromatographic peak. The linearity of the method was investigated by performing injections of standard solutions. The range tested was 90 -1500 ng L<sup>-1</sup>. 5 concentrations levels were injected and replicated in five different days. To validate the method, the coefficient of correlation should be higher than 0.990. In addition, residuals errors correspond to the difference between concentrations calculated with linear regression and real concentration of colistin. They must be equitably distributed around zero value. Finally, the precision of the method was accepted for validation if the percentage of error was lower than 40% for the LOQ and lower than 20% for the other levels.

## 3. Results and discussion

All parameters were optimized for colistin A and B. Results showed similar deviation between the two colistin. In this context, results for all parameters and graphics were presented only for colistin A.

### 3.1. LC-MS/MS optimization

#### 3.1.1. ESI-MS/MS parameters

Colistin A and B were directly infused in full scan and positive mode ( $m/z$  50 - 1500) at 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, using water 0.1% PFPA/ACN (90:10). The negative mode signals were usually low and not recommended by other workers [21]. Intense doubly charged of colistin A and B at relative abundance ratio of about 4 to 1 were detected at  $m/z$  585.5 and 578.5 respectively, and much weaker singly charged parent ions were observed correspondingly at  $m/z$  1169.5 and 1155.4, respectively. Therefore, the doubly charged colistin A and B species were used as the precursor ions for establishing MRM analysis. Under such MRM conditions, dominant product ions were

found to be at 101.1 and 241.2 for Colistin A, while for Colistin B they were at 101.3 and 227.3. The fragment ions  $m/z$  101.1 and 101.3 were selected as a quantification ion for colistin A and B respectively (Table 2).

Table 2: LC/MS/MS conditions for Colistin A and B.

Compound	MW	Precursor ion(QqQ)	Product ion(QqQ)	CE (eV)
Colistin A	1169.5	585.5	101.1 241.1	36 22
Colistin B	1155.4	578.5	101.3 227.3	32 25

Then, ESI/MS/MS parameters were optimized in order to reach a maximum response for the two Colistin. Sheath gas temperature (200 – 400°C), Nozzle voltage (0, 1000, 2000 V) and finally capillary voltage (2000 – 4000 V) were tested and the optimized conditions was cited above.

### 3.1.2. LC separation optimization

Two composition of the mobile phase were tested: Water 5 mM ammonium acetate 0.5 % formic acid/ACN (1) and Water 0.1% PFPA/ACN (2). Then we investigated the influence of the following parameters: buffer modifier (5 – 20 mM AmAc), formic acid and PFPA percentage, flow rate (0.4 - 0.6 mL min<sup>-1</sup>) and column temperature (30 – 40°C).

For the two colistin, sharper peaks were observed when using the mobile phase (2) and the retention time was increased. Seeing that, the increasing of retention time is more preferable to removal a matrix effect that largely found in beginning of chromatogram. As regards column temperature, 40°C was found to be the optimum setting. Finally, we also observed that the optimal flow rate was set at 0.5 mL min<sup>-1</sup>, providing the best separation. Using these optimized conditions, the Colistin A and B were eluted within 5 min.

## 3.2. Online SPE optimization

### 3.2.1. Experimental design

Full factorial experimental design allows reliable short listing of a small number of factors for further optimization and allows one to obtain, unbiased estimates of effects of all the factors with maximum accuracy for a given number of observations, the accuracy being the same for all effect [22]. In this study, full factorial design was used to determine effect and optimum parameters values for chosen factor. Figure 3 represents the effect of each factor cited above and their interaction.

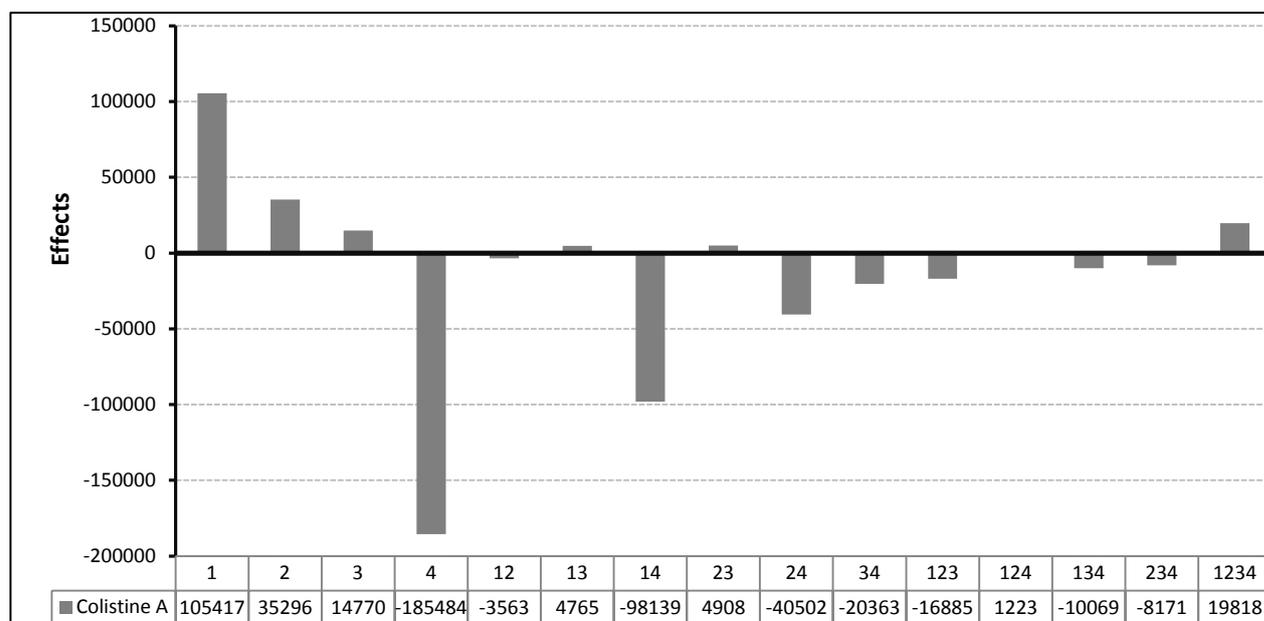


Figure 3: Histograms representing effects of factors and their interactions.

Positive effects of injected volume (factor 1) were showed. These results prove that the 900 $\mu$ L gives a gain in response for Colistin revealing the increase of quantity adsorbed on the stationary phase.

The factor having the most significant effect is the nature of the sorbent of the online SPE cartridge (factor 4). Its variation from the negative to the positive level is strongly negative, which means that the use of PLRP cartridge allows an increase of the Colistin response. This can be explained by the strong interaction for polymeric polystyrene divinylbenzene at the expense of cation exchanger (Plexa- PCX). The addition of PFPA in the sample lead to an increase of Colistin signal in spite of the nature of SPE sorbent. Several hypotheses can be assumed: higher ionization and best retention of Colistin in the stationary phase.

Injected volume (factor 1) has a positive effect using 900  $\mu$ L response area of Colistin increased. This result can be explained by a higher quantity of Colistin adsorbed on sorbent. However, the strong interaction of Colistin in PLRP-s sorbent (Van der Waals) and the small breakthrough

volume supposed in Plexa PCX (cationic interaction) showed that 900 $\mu$ L injected volume suitable for the first cartridge and not to the other (interaction 14) (figure 3).

Loading flow rate (factor 3) seems to be not influent. But, 1 mL min<sup>-1</sup> was chosen in order to decrease a waiting time for the loading sample volume consequently, to expect a shorter run time. The use of PFPA reagent as ion pair, increases the adsorption of Colistin in reversed phase polymer (PLRP-s) and explain the interaction between factor 2 and factor 4 (see section later). Otherwise, the optimum factor tacked place in experiment was set at PLRP-s cartridge using a PFPA reagent in the samples and 1 mL min<sup>-1</sup> with a 900  $\mu$ L injection volume.

### **3.2.2. Percentage of PFPA**

Ion pair reagents have been known and used for their ability to change selectivity and increase retention of highly polar compounds on reversed phase analytical columns [23]. Typical ion pair contains a non polar portion, such as a long chain aliphatic hydrocarbon, and a polar portion, such as an acid or base. The polar portion of these reagents interacts with the charged group on the analyte. While, the non polar portion interacts with the reversed phase media. Some volatile and fluorinated ion-pair reagents including pentafluoropropionic acid (PFPA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) are commonly used in the previously published methods for the analysis of highly polar antibiotics such as, aminoglycosides combined with mass spectrometry [24, 25]. When HFBA and PFPA are compared, PFPA can be considered as a better reagent, because it does not adsorb to the stationary phase as HFBA strongly does and the retention is clearly obtained through an ion-pair mechanism [26]. However, percentage of PFPA may affect ionization and retention of Colistin. For this reason, the effect of PFPA on the response area of colistin was evaluated. Different percentages in three replicates of PFPA were tested (0 - 0.5- 1- 2- 3- 4- 5 %) to perform maximum area response and retention of Colistin at PLRP-s cartridges.

Results obtained show an increase in the value of RSD especially for 0.5, 4 and 5 % PFPA. Our choice was set at 1% as percentage of PFPA regarding high response area and small variation of RSD comparing to others percentage.

### **3.2.3. Breakthrough volume**

Breakthrough volume is another critical parameters in online SPE-LC/MS/MS, since it may affect both signal suppression and Colistin recovery rate. Using entry sewage treatment plant and pure water samples spiked with Colistin A and B (900 ng L<sup>-1</sup>), were examined in the range (0.5–2.7 mL). Linear regression was showed between response area of Colistin and sample volume in the pure water. Consequently, breakthrough was not found in this range in pure water.

In entry sewage treatment plant no linear regression was found in the same range. So, breakthrough was observed when sample volume was set at 1.8 mL, hence suppression signal with increasing of matrix effect load. Thus, our choice will take a 0.9 mL as a sample volume in order to have a minimum matrix effect and an acceptable limit of quantification.

### 3.3. Method validation

Good linearity was observed in the study range ( $R^2 = 0.994$ ) (Figure 4). The LOQ of the method was  $90 \text{ ng L}^{-1}$ .

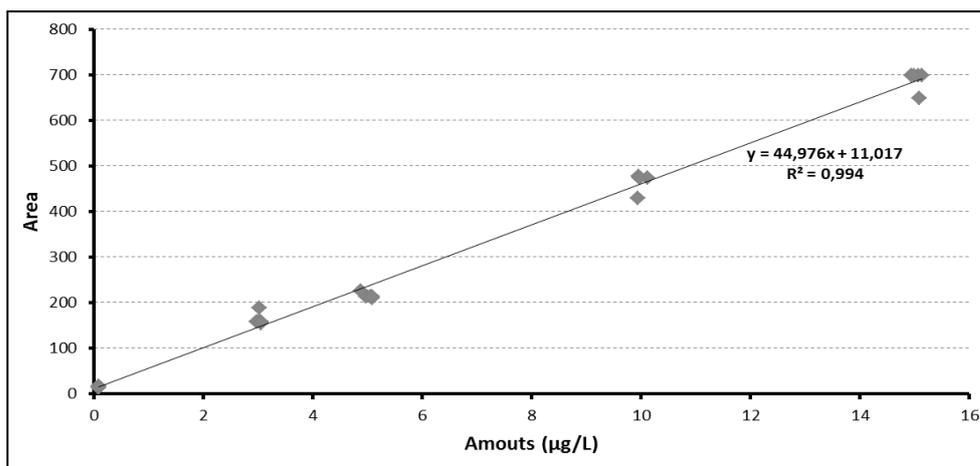


Figure 4: Linearity of Colistin A injected in five replicates for five levels.

Residuals were distributed equitably between 1 and  $-1 \mu\text{g L}^{-1}$  and the average equal to zero. Percentage error was lower than 40 % for LOQ and 20 % for other levels (Figure 5). These values were in accordance with validation criteria defined before. The relative error was also calculated and it must be between 40 and 20 %. Results were presented in Figure 5.

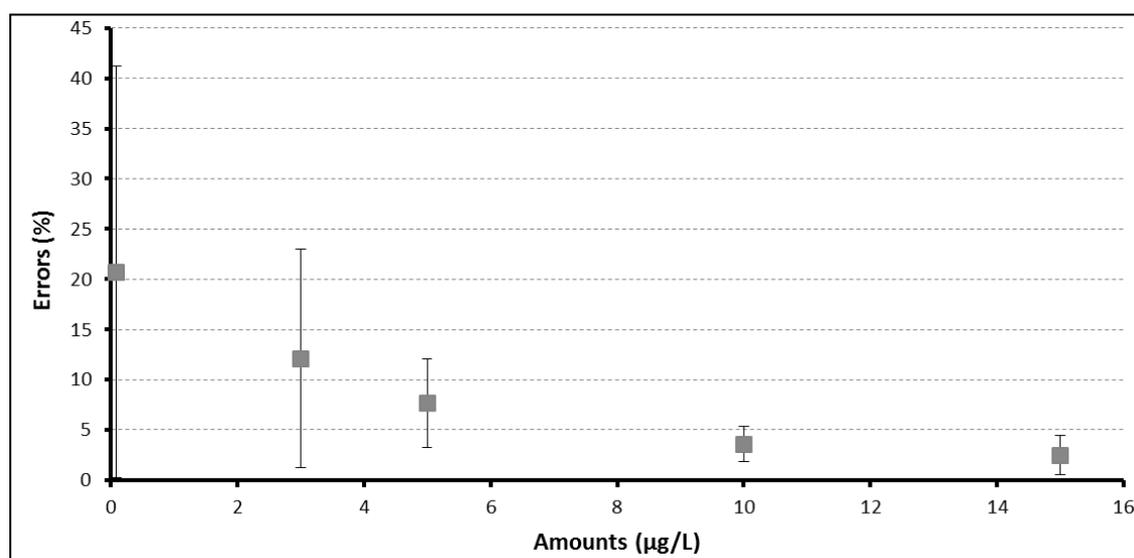


Figure 5: Relative error of Colistin A with the error bars calculated from 5 replicates with  $\alpha = 1\%$ .

### 3.4. Online SPE vs. Offline SPE

Although the basic principles of SPE are similar in offline and online methods, the parameters results are not almost the same. Recovery and RSD value (5 – 20 %) of Colistin A and B were comparable when using online (Recovery = 92 %  $\pm$  6; n = 5) and offline SPE (Recovery = 87%  $\pm$  10; n = 5) method. Limit of quantification in online (90 ng L<sup>-1</sup>) was lower than offline (150 ng L<sup>-1</sup>) procedure. An automation online SPE method has contributed to the high reproducibility in the extraction of Colistin and more accurate results can be expected because there is no sample manipulation between the extraction and the analytical steps. Moreover, the offline procedure has the inherent disadvantage of possible losses during the evaporation of the extract and losses of enrichment factors resulting from the injection of only an aliquot of the extract.

In the other hand, an inconvenience noted in the online procedure was the need to push for cleaning system between each injection, because a strong memory effect of Colistin in the injector, which increases the duration of the analysis of a large number of sample.

### 3.5. Colistin level in real water

The developed method was applied to analyze Colistin A and B concentrations in influent and effluent from two wastewater treatment plants (WWTPs) at Bordeaux city (Louis Fargues, Clos de Hilde). Nominal capacity of each WWTPS was set at 300000 EH for Louis Fargues (LFE) and 1012333 EH for Clos de Hilde (CHE). Samples were collected from the two WWTPs in September, October, December and March in 2012-2013 and at three different seasons (autumn, winter and spring). No Colistin (A and B) was found higher than LOQ in any of analyzed samples. In order to determine the LOQ in the matrix, samples were spiked at 10\*LOQ (Table 3).

Table 3: LOQ and concentration detected of Colistin in wastewater treatment plants.

<b>Samples</b>	<b>LOQ (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Concentration detected</b>
Influent_LFE_050912	0.577	< LOQ
Influent_CHE_050912	0.517	< LOQ
Influent_CHE_021012	0.205	< LOQ
Effluent_CHE_021012	2.8	< LOQ
Influent_LFE_071112	0.15	< LOQ
Influent_LFE_081112	1.584	< LOQ
Influent_LFE_051212	0.274	< LOQ
Influent_CHE_051212	0.168	< LOQ
Influent_LFE_061212	0.289	< LOQ
Influent_CHE_041212	0.372	< LOQ
Influent_LFE_200313	0.17	< LOQ
Influent_CHE_200313	0.595	< LOQ

The estimation of LOQ in matrix was calculated by standard addition method using spiked samples. However, LOQ in matrix became equal a concentration for spiking over S/N for Colistin peak in samples times 10. The minimum S/N must be 10 to quantify. High value of

LOQ was found in matrix (Table 3). This can be related for the high effect matrix found in this type of samples.

Colistin was used in French country as a veterinary drug (rabbit, chicken, pork and veal) [27]. For treatment, the recommended dose was set at 10 g powder of Colistin to 100 kg of body weight per day for 3-5 consecutive days. Then, prescript amount was administered in milk, liquid food or drinking water. The absence of Colistin from samples considered coherent with their use as a veterinary drugs. In addition, the functions of two station Louis Fargues and Clos de Hilde include sewage treatment such as, human waste, household waste and rainwater treatment.

## Conclusions

In this paper, online SPE-LC-(ESI)-MS/MS is shown to be a robust detection technique for the rapid and highly sensitive quantification of Colistin A and B antibiotics in wastewater treatment plants. This was a powerful analytical tool for the sensitive and selective determination of colistin in water. Experiment design (full factorial design) was used to determine effect and optimum parameters values for online SPE factor (Sorbent nature, injected volume, loading flow and pentafluoropropionic acid percentage). The direct injection of 900  $\mu\text{L}$  of sample into the system leads to LOD's in the low  $\text{ng L}^{-1}$  level making this approach very efficient and appropriate for monitoring programmes. Offline and online solid phase extraction was optimized and compared. The online trace enrichment facilitates the automation of the method, minimizes sample manipulation and reduces analysis time. In addition, online method has given a lower LOQ ( $90 \text{ ng L}^{-1}$ ) value than offline method ( $150 \text{ ng L}^{-1}$ ). The application of the online SPE-LC/MS/MS to the samples, collected from two wastewater treatment plants (WWTPs) at Bordeaux city (Louis Fargues, Clos de Hilde) with seasonal variability, revealed the absence of Colistin A and B. At the time of this study, no method was published concerning the analysis of Colistin in water samples and no data was get in the level of contamination. In this context, our work presents an important extraction method and its application on real water samples.

## References

1. Hytham Ahmed, F.E., Brian Clark, *Mixed Micellar Electrokinetic Chromatographic Analysis of Colistin, Polypeptide Antibiotic, Using Laser-Induced Fluorescence Detection*. American Journal of Analytical Chemistry, 2012. **3**: p. 233-241.
2. M.E. Evans, D.J.F., R.P. Rapp, *Annu. Pharmacother.*, 1999. **33**: p. 960.
3. Levin, A.S., Barone, A. A., Penc-o, J., Santos, M. V.,Marinho, I. S., Arruda, E. A., Manrique, E. I., Costa, S. F., *Clin. Infect. Dis.*, 1999. **28**: p. 1008-1011.
4. Pintado, V., San Miguel, L. G., Grill, F., Meji'a, B., Cobo,J., Fortu' n, J., Marti'n-Da' vila, P., Moreno, S., *J. Infect.*, 2008. **56**: p. 185-190.
5. Sin, D.W.-m., et al., *Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2005. **535**(1–2): p. 23-31.
6. J.C. Chee-Sanford, R.I.A., I.J. Krapac, N. Garrigues-Jeanjean, R.I.Mackie, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001. **67**: p. 1494.
7. Jørgensen, S.E. and B. Halling-Sørensen, *Drugs in the environment*. Chemosphere, 2000. **40**(7): p. 691-699.
8. L. Guardabassi, A.P., J.E. Olsen, A. Dalsgaard, *Appl. Environ. Microbiol.* , 1998. **64**: p. 3499.
9. M. Goni-Urriza, M.C., C. Arpin, N. Raymond, P. Caumette, P.Quentin, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000. **66**: p. 125.
10. Pozo, O.J., et al., *Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2006. **1103**(1): p. 83-93.
11. P. Leroy, D.D., S. Nicolas, P. Archimbault, A. Nicolas, *J. Pharm.Biomed. Anal.*, 1989. **7**: p. 1837.
12. A.H. Thomas, J.M.T., I. Holloway, *Analyst*, 1980. **105**: p. 1068.
13. T. Kitagawa, W.O., Y. Maeno, K. Fujiwara, Y. Kimura, *J.- Assoc.Official Anal. Chem.* , 1985. **68**: p. 661.
14. Kjærgaard Kristensen, H. and S. Honoré Hansen, *Separation of polymyxins by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Journal of Chromatography A, 1993. **628**(2): p. 309-315.
15. J. Kang, T.V., A. Van Schepdael, J. Orwa, E. Roets, J. Hoogmartens, *Electrophoresis*, 2000. **21**: p. 3199.
16. Whall, T.J., *High-performance liquid chromatography of polymyxin B sulfate and colistin sulfate*. Journal of Chromatography A, 1981. **208**(1): p. 118-123.
17. P.P.H. Le Brun, A.I.D.G., A.A.T.M.M. Vinks, *Ther. Drug Monit*, 2000. **22**: p. 589.
18. D. Decolin, P.L., A. Nicolas, P. Archimbault, *J. Chromatogr. Sci*, 1997. **35**: p. 557.
19. Hirsch, R., et al., *Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1998. **815**(2): p. 213-223.
20. L.K. Sorensen, T.H.E., *Chromatographia*, 2004. **60**: p. 287.
21. Van Poucke, C., et al., *Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed*. Analytica Chimica Acta, 2003. **483**(1–2): p. 99-109.
22. Krishnan S, P.S., Rajalkshmi D, Misra MC, Karanth NG, *Screening and selection of media components for lactic acid production using Plackett–Burman design*. Bioproc. Eng., 1998. **19**: p. 61-5.
23. Carson, M.C., review ion pair, 2000.
24. McGlinchey, T., *The determination of Veterinary Antibiotics in live animals and animal products*. School of Chemical Sciences Dublin City University, 2010.
25. *Confirmation of Aminoglycosides by HPLC-MS/MS*. United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service Office of Public Health Science 2011: p. 1.
26. De Miguel, I., E. Puech-Costes, and D. Samain, *Use of mixed perfluorinated ion-pairing agents as solvents in ion-pair high-performance liquid chromatography for the preparative purification of amino*. Journal of Chromatography A, 1987. **407**(0): p. 109-119.
27. *European agency for the evaluation of medicinal products, veterinary medicines and inspections (EMA) - Annexe I*. 2002.

### Démarche et principaux résultats de la publication 3

La colistine ou polymyxine E est un antibiotique polypeptidique qui agit sur les membranes des bactéries à Gram négatif. Elle est réservée en médecine humaine aux infections causées par des germes résistants en l'absence d'autres alternatives thérapeutiques. Cette molécule s'utilise en médecine humaine et vétérinaire. Elle diffuse très peu à travers les membranes biologiques et elle est mal absorbée par l'organisme. En effet, son excrétion se fait sous forme active dans les urines. Les colistines A et B sont les principaux composants de cette molécule. Elles diffèrent par la longueur de la chaîne latérale des acides gras.

La colistine dont le pKa est proche de 10 possède un caractère basique. A cause de son caractère amphipathique, la colistine est capable de se trouver dans les deux compartiments polaire et apolaire tels que l'eau et les membranes lipidiques des procaryotes et des eucaryotes. La présence de la colistine dans l'eau n'a pas été étudiée auparavant. La difficulté analytique concernant son extraction et sa détection explique l'absence de données.

Le but de cette publication est l'optimisation de la méthode d'extraction (SPE) selon les deux modes en ligne et hors ligne et la méthode de détection par LC/MS/MS (Agilent 6490) pour la recherche de la colistine A et B dans les systèmes aquatiques.

Ce travail a nécessité une optimisation de la partie spectrométrie de masse (MS/MS). Le standard de la colistine ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) est infusé directement en Full scan et en mode positif dans le système. En effet, les colistines A et B possèdent deux charges positives et les ions précurseurs sont respectivement de 585,5 et 578,5 m/z. Ensuite, les ions fils ont été déterminés pour les deux colistines (A : 101,1/241,2 m/z et B : 101,3/227,3 m/z). Les ions de quantification choisis pour les colistines A et B sont respectivement 101,1 m/z et 101,3 m/z. Les paramètres de l'ESI/MS/MS sont optimisés afin de donner une bonne réponse pour les deux colistines. La température de la sheath gaz (200 – 400°C) le nozzle voltage (0, 1000, 2000 V) et finalement le voltage du capillaire (2000 – 4000 V) ont été testés et optimisés. Concernant la phase mobile, deux compositions ont été testées:

(1) Eau 5 mM acétate d'ammonium 0.5 % acide formique/ACN

(2) Eau 0.1% PFPA/ACN

La 2<sup>ème</sup> phase mobile donne un meilleur résultat concernant la forme du pic chromatographique et le temps de rétention de deux colistines (Annexe 3). Vue la forte influence de l'effet matrice au début du chromatogramme, il était souhaitable d'améliorer le temps de rétention des

colistines dans la colonne. La valeur optimale de la température de la colonne (Porochell 120 - SB C18 - 2.1mm ×50 mm, 2.7µm) est de 40°C et le débit utilisé est de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Les deux colistines sortent dans ces conditions après 5 min.

Le système de la SPE en ligne, provenant d'Agilent, est couplé directement à la LC/MS/MS. Il inclut un passeur d'échantillon équipé d'une loupe d'injection à 900 µL avec la possibilité de faire plusieurs injections. Deux vannes (V1 et V2) sont utilisées pour passer du mode chargement au mode élution de la cartouche. Ensuite, l'échantillon éluée est transféré à la colonne de la LC en mode back-flush en utilisant le gradient de la phase mobile. Les quatre facteurs influençant l'extraction sont testés en effectuant un plan d'expérience à 2<sup>4</sup> (full factorial design) et répété deux fois. Le tableau suivant résume les facteurs étudiés et leurs niveaux positif et négatif.

Facteur		N°	Niveau -	Niveau +
Volume d'injection	µL	1	500	900
Pourcentage du PFPA	%	2	0	5
Debit du chargement	mL min <sup>-1</sup>	3	0,4	1
Nature d'adsorbant	-----	4	PLRP	PCX

L'effet de chaque facteur correspond à la moitié de la différence entre les moyennes des niveaux positif et négatif. L'interaction de chaque facteur et son effet sont été étudiés dans cet article. L'utilisation du PFPA à 1% montre une meilleure réponse avec un faible écart type relatif (RSD). Le volume de fuite choisi est de 0,9 mL, ce qui nous permet d'avoir un meilleur rendement.

L'extraction par SPE hors ligne s'est évaluée en utilisant une cartouche de type Oasis HLB (200 mg/6 mL). Bien que les deux types d'extraction (en ligne et hors ligne) donnent des valeurs acceptables en rendement [ $R_{\text{en ligne}} = 92 \% \pm 6; n = 5$ ,  $R_{\text{hors ligne}} = 87 \% \pm 10; n = 5$ ] et en RSD (5 -20%), la limite de quantification de deux colistines est plus faible pour la SPE en ligne (90 ng L<sup>-1</sup>) que celle de la SPE hors-ligne (150 ng L<sup>-1</sup>). La SPE en ligne est automatisée et contribue à une reproductibilité élevée pour l'extraction de la colistine et les résultats sont, par conséquent, plus précis. En plus, la procédure hors ligne présente l'inconvénient inhérent de

pertes possibles lors de l'évaporation de l'extrait et par suite des pertes de facteur d'enrichissement résultant de l'injection d'une aliquote de l'extrait. En revanche, à cause de l'effet de mémoire de la colistine dans l'injecteur, un inconvénient a été noté dans la procédure en ligne, dû au nettoyage indispensable du système avant chaque injection, ce qui s'est traduit par une perte de temps.

La méthode SPE-LC/MS/MS optimisée a été validée en termes de linéarité et de sensibilité afin d'évaluer la fiabilité des résultats fournis par le système. L'estimation de la limite de quantification dans la matrice est calculée par la méthode des ajouts dosés en utilisant des échantillons réels dopés. La valeur élevée du LOQ est trouvée dans la matrice de station d'épuration, cela peut être lié à l'effet matrice dans ce type d'échantillons. La linéarité de la méthode a été étudiée en effectuant des injections de solution standard dont la gamme testée est de 90 à 1500 ng L<sup>-1</sup>. Cinq niveaux de concentration sont injectés et reproduits durant cinq jours. Les résultats obtenus donnent des droites d'étalonnage dont les coefficients de corrélation sont supérieurs à 0,99. La précision de la méthode est bonne puisque le pourcentage d'erreur est inférieur à 40% pour la LOQ et inférieur à 20% pour les autres niveaux.

L'application de la méthode SPE-LC/MS/MS a été réalisée à Bordeaux sur deux stations d'épuration Louis Fargues et Clos de Hilde. Des échantillons ont été prélevés dans ces deux stations en Septembre, Octobre, Décembre et Mars en 2012-2013 couvrant les trois saisons différentes (automne, hiver et printemps). La colistine (A et B) n'est pas détectée dans les échantillons analysés des stations d'épuration et par suite nous attribuons son absence à son usage vétérinaire.

## CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Les résidus des médicaments sont consommés en médecine humaine et vétérinaire et en agriculture dans tous les domaines de l'environnement notamment dans les systèmes aquatiques. Les stations d'épuration, traitant les eaux usées en éliminent une partie importante des polluants mais ne sont pas conçues pour traiter ce type de contamination et ont des efficacités plus ou moins importantes. Dans ce contexte, les antibiotiques font particulièrement l'objet d'études concernant leurs effets produits sur les souches bactériennes ce qui relève non seulement d'un problème de santé publique mais aussi de problématiques environnementales. D'où la nécessité d'optimiser des techniques analytiques efficaces permettant de caractériser et de suivre l'évolution de ces molécules dans l'environnement aquatique.

La forte polarité des aminoglycosides et la difficulté de séparation et d'analyse rencontrée pour ces molécules nous a amenés à optimiser une technique analytique effectuée par la Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse (MS/MS). Deux stratégies d'analyse ont été étudiées et optimisées afin d'avoir les meilleures conditions chromatographiques. En effet, deux colonnes sont utilisées, l'une polaire du type ZIC-HILIC et l'autre apolaire de type Zorbax C18. L'utilisation de l'ion pair, acide pentafluoropropionique, en travaillant sur la colonne C18, montre une meilleure rétention pour les 12 aminoglycosides conduisant par la suite à une bonne séparation, en obtenant une meilleure réponse avec des pics chromatographiques fins. Ensuite, une technique d'extraction sur phase solide a été développée en utilisant deux cartouches, Chromabond C18 et Oasis MCX. Le rendement obtenu en utilisant la cartouche C18 en présence d'ion pair est meilleur pour la majorité des aminoglycosides. L'optimisation et la validation de l'extraction sur C18 en présence de PFPA comme ion pair ont été réalisées. La précision, la linéarité la reproductibilité, la limite de détection et de quantification obtenues sont valables pour effectuer des analyses fiables sur des échantillons d'eaux pour les molécules étudiées.

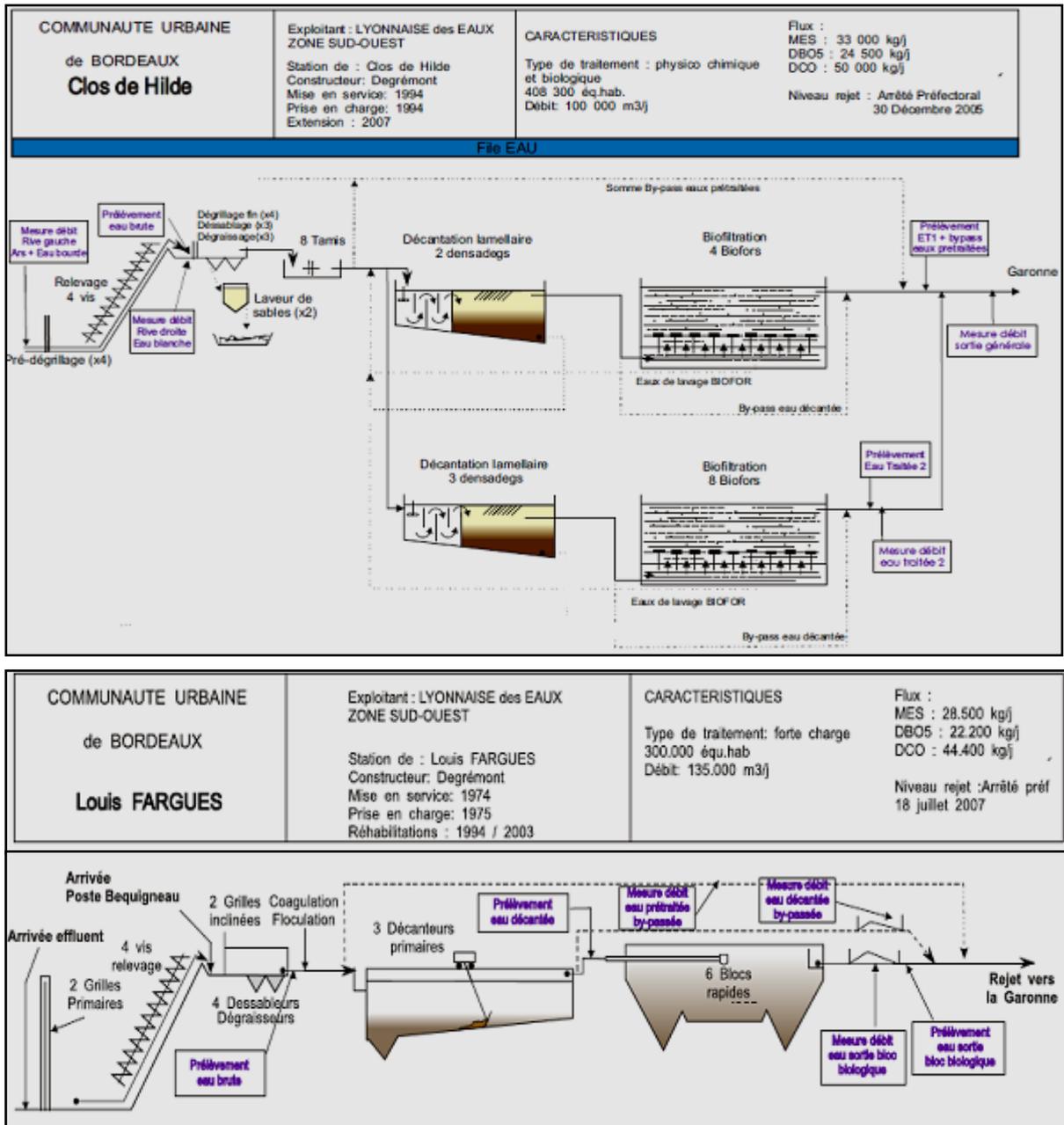
Le développement de la méthode d'extraction sur phase solide et de la méthode d'analyse sur LC/MS/MS permet d'avoir des résultats fiables dont l'évaluation des molécules étudiées dans les systèmes aquatiques. Les 12 composés sont extraits simultanément puis analysés en mode positif pour les quantifier par la suite. Ce protocole a été appliqué sur des échantillons réels des effluents de deux stations d'épurations Libanaises (El Ghadir et Hammana) et sur les eaux usées d'un hôpital vétérinaire (H1) situé à Mtaileb - Liban. La Gentamicine est la seule molécule détectée à une concentration de 30 ng L<sup>-1</sup> dans les eaux hospitalières.

L'usage de la colistine s'est répandu au cours des dernières années avec l'apparition de bactéries à Gram négatif multi résistantes. Les extractions sur phase solide en mode classique sur des cartouches Oasis HLB et en mode automatisé (en ligne) sur des cartouches PLRP-s ont été comparées. La méthode d'extraction en ligne, en utilisant les cartouches PLRP-s donne plus de reproductibilité et une faible limite de quantification. Cette méthode d'extraction couplée directement à la LC/MS/MS est optimisée pour la détection et la quantification de la colistine sur des matrices d'eaux usées.

Nos résultats montrent l'absence des deux colistines A et B dans les effluents des deux stations d'épuration Clos de Hilde et Louis Fargue situées à Bordeaux. Cependant, la colistine (A et B) n'a pas été détectée dans les échantillons analysés.

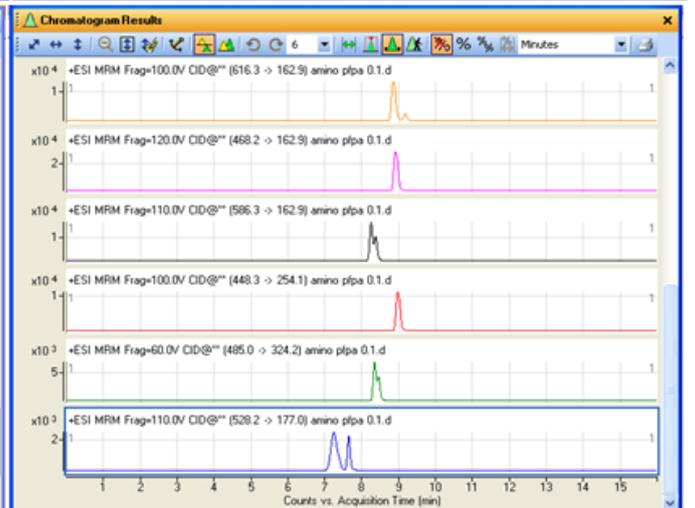
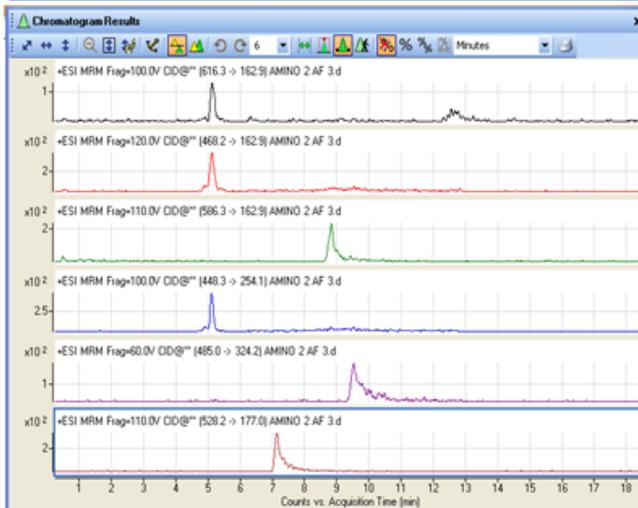
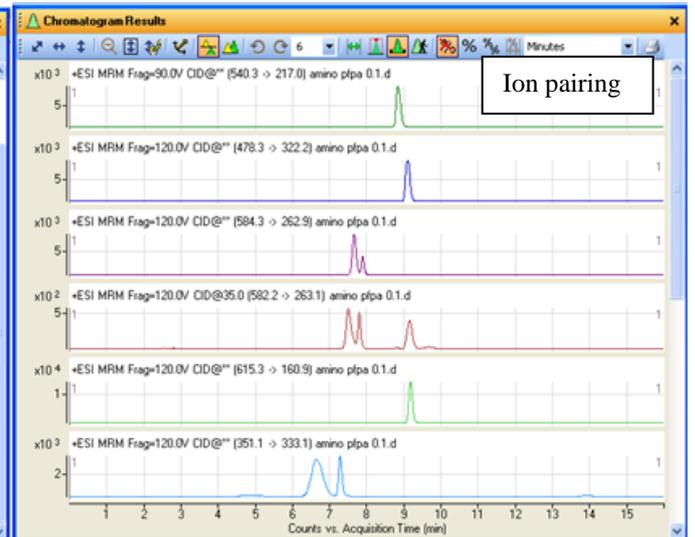
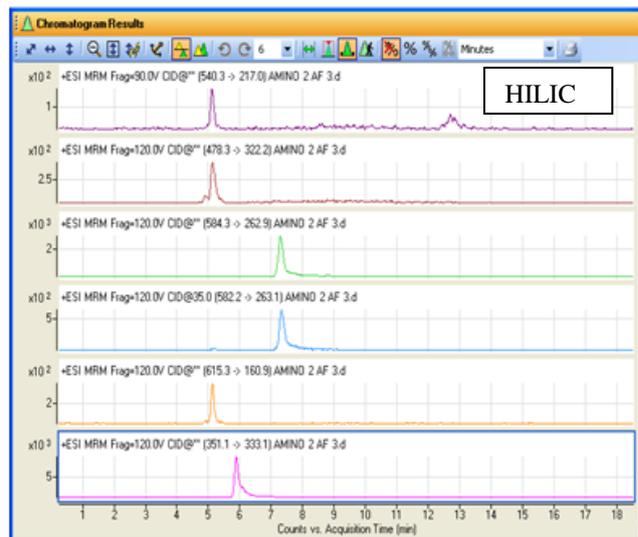
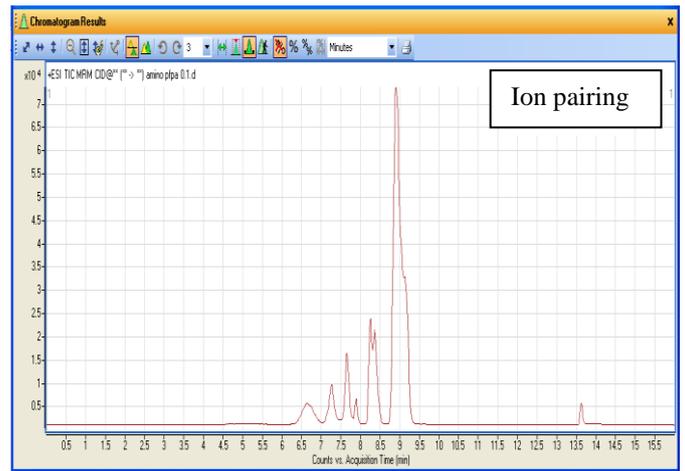
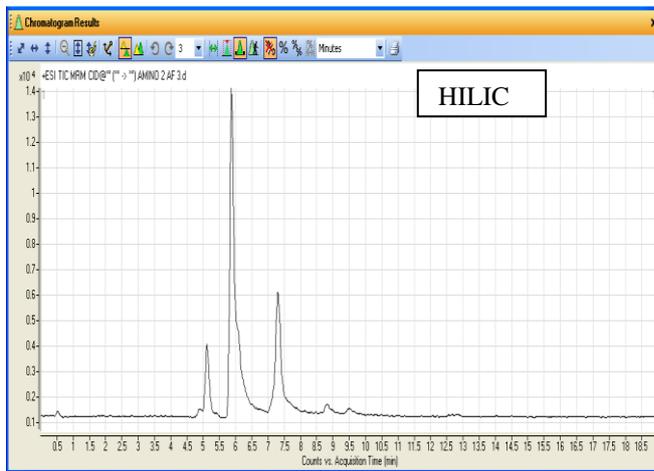
Des études complémentaires sur ces mêmes compartiments environnementaux ainsi que d'autres restent à mener afin d'évaluer les concentrations au cours de l'année, d'où la nécessité de développer une technique analytique permettant de regrouper toutes les familles d'antibiotiques pour pouvoir suivre leur évolution dans les systèmes aquatiques. Il est également fréquent qu'une partie plus ou moins importante des antibiotiques soit excrétée sous forme de métabolites qui restent à quantifier dans l'environnement selon des modèles qu'il faut définir afin d'avoir une meilleure photographie de l'état des eaux de surface, des eaux entrantes et sortantes des stations d'épuration et des rejets hospitaliers. L'analyse est réalisée seulement sur la phase dissoute de l'eau alors qu'il y a une répartition des contaminants entre la phase liquide et la phase solide ou en suspension dans l'eau. Il est donc intéressant de faire des analyses de la phase particulaire des échantillons des STEP. Il serait important de les identifier et de documenter l'impact des différents traitements sur leur création et leur stabilité dans les écosystèmes aquatiques. Cependant, vue l'absence d'études sur le niveau de contamination des antibiotiques dans les eaux Libanaises, le suivi environnemental implique l'analyse d'un plus grand nombre des molécules, surtout en se basant sur les données de consommation. L'utilisation des échantillonneurs intégratifs comme les POCIS faciliterait ce suivi et permettrait une première estimation du niveau global de contamination des milieux aquatiques au Liban. Le développement des POCIS pour couvrir un plus grand nombre d'antibiotiques est donc nécessaire.

# Annexe 1



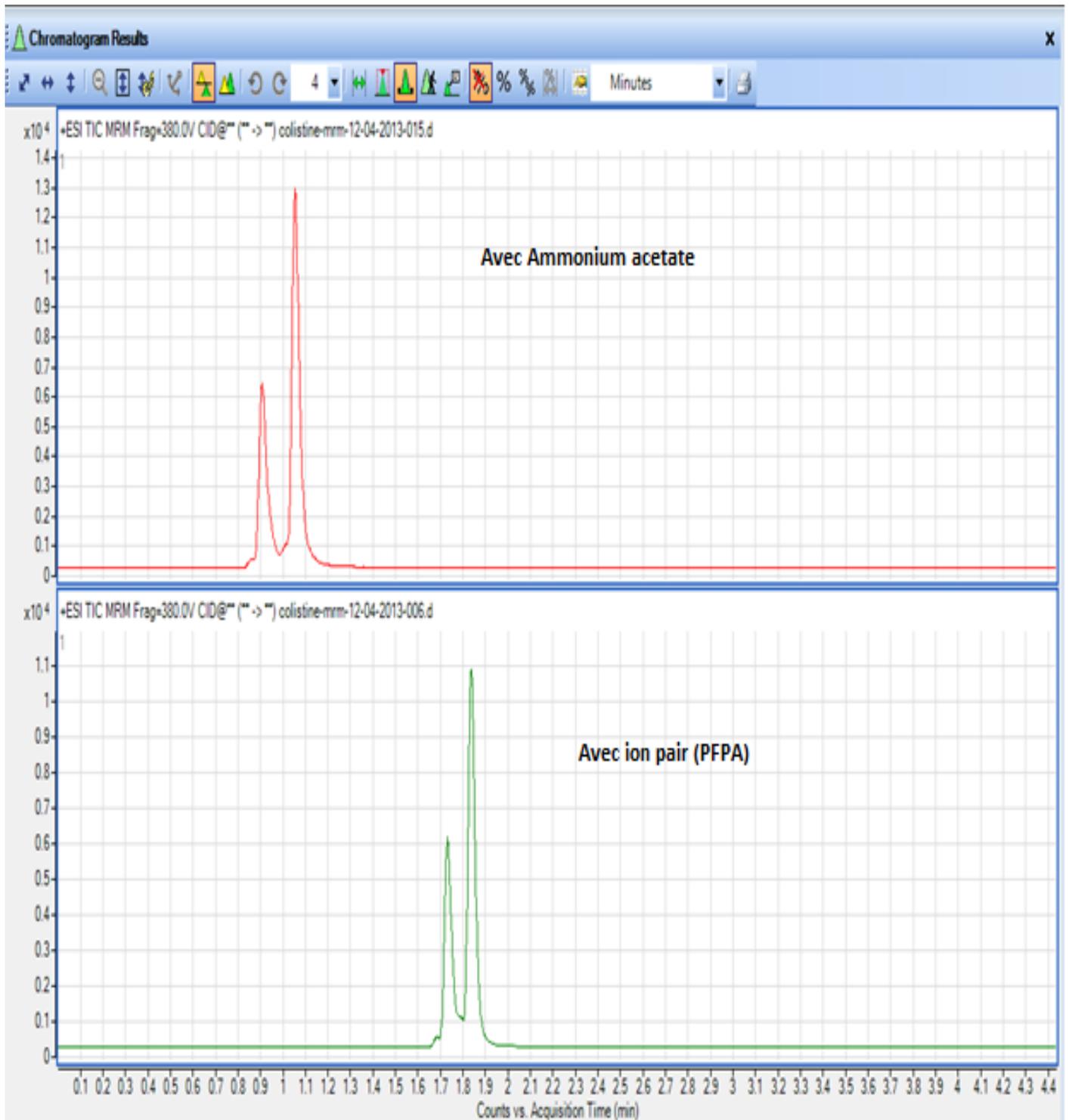
Principales caractéristiques des STEP LF et CH pour le traitement des eaux Bordelaises (d'après la Lyonnaise des eaux et la CUB, 2009)

## Annexe 2



Chromatogramme (TIC et MRM) obtenus lors de la séparation de 12 AGs étudiées avec la colonne ZIC\_HILIC et Zorbax Eclipse C18.

### Annexe 3



Chromatogramme obtenus lors de la séparation de la Colistine A et Bavec les deux phases mobiles testées (Ammonium acétate, ion pair PFPA)