



HAL
open science

Produits biocides désinfectants dans les produits laitiers : méthodes quantitatives d'analyse des résidus et étude de l'impact des procédés de transformation du lait sur l'apparition de produits néoformés selon des approches d'analyse ciblée et non ciblée par spectrométrie de masse

Kahina Slimani

► **To cite this version:**

Kahina Slimani. Produits biocides désinfectants dans les produits laitiers : méthodes quantitatives d'analyse des résidus et étude de l'impact des procédés de transformation du lait sur l'apparition de produits néoformés selon des approches d'analyse ciblée et non ciblée par spectrométrie de masse. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2018. Français. NNT : 2018REN1B011 . tel-02196168

HAL Id: tel-02196168

<https://theses.hal.science/tel-02196168v1>

Submitted on 27 Jul 2019

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

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

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire
pour le grade de*

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Santé Publique

Ecole doctorale Biologie Santé

présentée par

Kahina SLIMANI

Préparée dans l'unité Analyse de Résidus et Contaminants
ANSES – Laboratoire de Fougères
UFR Science de la Vie et de l'Environnement

**Produits biocides
désinfectants dans les
produits laitiers : méthodes
quantitatives d'analyse des
résidus et étude de l'impact
des procédés de
transformation du lait sur
l'apparition de produits
néoformés selon des
approches d'analyse ciblée et
non ciblée par spectrométrie
de masse**

**Thèse soutenue à Rennes
le 26 avril 2018**

devant le jury composé de :

Hélène BUDZINSKI

Directeur de Recherche CNRS, Université de
Bordeaux / *rapporteur*

Eric MARCHIONI

Professeur, Faculté de Pharmacie de Strasbourg /
rapporteur

Marion REY

Référent Scientifique DEPR, ANSES – Maisons-Alfort
/ *examineur*

Bruno LE BIZEC

Professeur, Oniris Laberca - Nantes / *examineur*

Jean-Pierre ABJEAN

Ingénieur de Recherche, ANSES – Laboratoire de
Fougères / *directeur de thèse*

Dominique PESSEL

Ingénieur de Recherche, ANSES – Laboratoire de
Fougères / *co-directeur de thèse*

Remerciements

Je ne saurai oublier que ce travail de thèse est le résultat de la collaboration de nombreuses têtes pensantes qui m'ont permis de mener à bien ce projet. Je vois surtout en ce travail une réussite commune.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Fougères de l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (ANSES). Je souhaite donc remercier en premier lieu Monsieur Pascal Sanders, directeur du laboratoire, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire afin d'y effectuer ma thèse.

Je tiens à remercier Monsieur Jean-Pierre Abjean et Madame Dominique Pessel.

Jean-Pierre, mon directeur de thèse, un peu papa poule qui a su me transmettre une partie de son savoir et me préserver autant que possible durant ces 3 années. Merci infiniment pour ton aide en tout temps, ta clairvoyance et tes bons conseils qui ont été des atouts précieux. Je me souviendrai de toutes ces anecdotes qui te caractérisent : têtue mais rigolo 😊 Tu peux maintenant profiter pleinement de ta nouvelle vie de jeune retraité, ta petite Kahina tant attendu te remercie !

Dominique, ma co-encadrante, merci à toi de m'avoir accueillie au sein de ton unité, ou devrais-je dire au sein d'une famille parmi laquelle on se sent bien. Merci pour la confiance que tu m'as témoignée durant ces années, pour ton aide précieuse, ta disponibilité et ta gentillesse. J'ai pris plaisir à travailler avec toi et à apprendre à tes côtés.

Je tiens également à remercier Pierre Maris, ancien directeur adjoint et « super » expert biocide au sein du laboratoire, qui m'a permis de réaliser ce projet, notamment par cette collaboration avec l'interprofession laitière sous le projet Resbiolact. Je ne saurai te remercier suffisamment pour tes précieux conseils et les informations transmises sur les biocides au cours de ces trois années.

Merci à toutes les flèches de l'unité ARC qui réalisent avec brio toutes les analyses ciblées et non ciblées en spectrométrie de masse au laboratoire. Yvette, Méline, Sophie G., Marie-Pierre F. Pierre, Marie-Pierre CS., Jean-Michel, Pierrick, Estelle, Murielle et Sophie M., je ne saurai vous remercier pour votre soutien, votre disponibilité, et les fous rires qui ont été nombreux. Un grand merci pour m'avoir fait une place parmi vous au sein de l'unité.

Yvette, je tiens à te remercier particulièrement, sans toi, je n'y serai pas arrivée. Ta devise « ça va le faire » a bien fonctionné sur moi, merci. Je n'oublierai pas les journées et soirées à râper du fromage et à en goûter un peu, on peut le dire maintenant 😊. Initiatrice de la marche du Lundi, tu as fait ressortir en moi le goût bien enfoui du sport. J'ai trouvé en toi une grande sœur, une cousine, une amie, je suis honorée d'avoir fait ta connaissance. Tu es l'une de mes plus belles rencontres au laboratoire, MERCI !

Sophie M., je te suis reconnaissante pour ton soutien, ta disponibilité et ta pédagogie. Surtout merci pour ta patience et ton implication ces derniers mois. Ça n'a pas toujours été simple, surtout avec les analyses stats ! Tes précieux conseils m'ont aidée à me surpasser, merci. Et voilà, ma seconde plus belle rencontre !

Pierre, Peter, ou Joyeux, tu as tellement de surnom que je ne sais lequel choisir. Merci pour ta joie de vivre et les parties de franche rigolade.

Yvette, Pierre, Sophie M., l'équipe Tramadol, merci pour ces fous rires et moments passés hiver comme été. C'est sûr avec Tramadol, la fête est plus folle 😊 !

Je remercie chaleureusement mes acolytes de la Team des 4 Fantastiques : Jimmy Jimmy alias Franklin, Alexis petit cochonou, Pegah Copine. Merci pour ces merveilleux moments partagés. Jimmy tes blagues et les tapettes dans le dos, m'ont manquée en cette fin de thèse. On pourra toujours rire du paquet de Maltesers dans la poubelle ! Votre soutien a été au rendez-vous jusqu'à la dernière heure, et ce malgré la distance, MERCI.

A mes deux collègues de bureau, Océane et Benjamin, pas d'inquiétude votre tour arrive. Merci pour les parties de rigolade et les longues, très longues conversations qui ont permis de faire de bons break. Océane, soit dit en passant, je ne comprends toujours pas toutes tes blagues.

Je tiens à remercier l'ensemble de mes collègues du laboratoire avec lesquelles j'ai pu partager d'agréables moments et surtout beaucoup de pauses goûters qui caractérisent si bien ce laboratoire.

Plus particulièrement, Merci à toi Rachele, miss Parfaite Bis d'avoir fait de ta maison un lieu de décompression où la joie et la bonne humeur étaient toujours au rendez-vous. Nous avons partagé 3 belles années ensemble, et espèrent que plein d'autres suivront. Lisa, la petite dernière mais la première quand il s'agit de faire des bêtises. Merci pour ta bonne humeur communicative.

Marion, miss Tea, merci pour tes précieux conseils en cette fin de thèse et surtout pour ces pauses thé qui ont contribué à faire relâcher la pression.

Merci à vous, Helene et Marie-Pierre L. pour votre aide notamment ces derniers jours à essayer de résoudre les mystères de Word.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Hélène Budzinski, Monsieur Eric Marchioni, Madame Marion Rey et Monsieur Bruno Le Bizec qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner et de juger ce travail.

Je suis également reconnaissante envers Annick Delaby et Nicolas Rossi, coordinateurs du projet Resbiolact avec qui j'ai pris plaisir à échanger. Merci aux membres de l'interprofession laitière sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour.

Un grand merci également à Madame Barbara Le Bot et Monsieur Xavier Sarda d'avoir accepté de faire partie de mes différents comités de thèse. Merci à toi, David Rondeau, mon ancien professeur et actuel tuteur de thèse, pour ta disponibilité et les connaissances en spectrométrie de masse que tu m'as transmis avant et pendant cette thèse.

Merci à mes amies, Amall, Sabrina et Siham, un peu loin mais toujours là pour moi. Je sais que je peux compter sur vous et cette expérience de thèse en a été une preuve.

Merci à toi Fabien, mon meilleur ami, pour ton soutien et ta présence toutes ces années. Merci d'avoir été un booster quand mon moteur voulait caler, surtout ces derniers mois. De nouvelles aventures nous attendent !

A mes cousines et cousin, Daouya, Zaia, Nora, Dahbia et Tahar, merci pour votre soutien dans les bons et les plus durs moments de la vie. Ça y est Thermomix, a rempli sa mission ! A Amti, merci d'avoir contribué à mon éducation et à avoir fait de moi qui je suis.

J'ai gardé le meilleur pour la fin. Merci à ma grande et belle famille ! A mes parents, pour tous leurs sacrifices et sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Merci d'avoir tout fait pour je réussisse. Le mérite vous revient : Sahit ! A ma grande fratrie, frères, sœurs, beaux-frères et belles-sœurs, merci pour votre soutien sans faille. Merci d'être toujours là pour moi et de comprendre mes besoins sans devoir dire un mot. Merci à vous tous de m'avoir soutenue durant toutes ces longues années d'études. Promis j'arrête ☺ Un grand merci à mes loulous ; Mélina, Marwan, Naim, Elias, Alycia, Amélia, Alanna alias babychou et Eden. Merci d'avoir redonné le sourire à votre tata Nanou dans les moments de doute, sans même le savoir. Si vous vous engagez dans la voie du doctorat, je saurai vous conseiller ! Je suis fière et heureuse de vous avoir TOUS dans ma vie.

Avec votre soutien à tous, j'y suis arrivée : MERCI !

Comme le dirai mon ange gardien, « T'es l'meilleure !! », et cela est en grande partie grâce à vous tous !

MERCI

A Madjid,
A Dada Bachir,

FORCE ET HONNEUR



Table des matières

Remerciements	i
Table des matières.....	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Introduction générale.....	1
Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art.....	5
1. LA PROBLEMATIQUE DES RESIDUS DE BIOCIDES DESINFECTANTS DANS LES PRODUITS LAITIERS	5
1.1 Présentation générale des biocides	5
1.1.1 Définition et réglementation	5
1.1.2 Classification et usage	6
1.1.3 Hygiène alimentaire et réglementation	9
1.1.4 Plans de nettoyage-désinfection des surfaces alimentaires	11
1.1.4.1 Procédures de ND.....	11
1.1.4.2 Biocides désinfectants : réglementation et risques chimiques.....	13
1.1.4.3 Méthodes d'autocontrôle	24
1.2 Procédés de transformation du lait et composition des produits laitiers : impact sur le devenir des résidus de biocides	26
1.2.1 La fabrication et la composition des produits laitiers	27
1.2.2 Impact sur les résidus de biocides	31
2. TECHNIQUES ET METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE DE RESIDUS DE BIOCIDES DESINFECTANTS DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES	32
2.1 Détermination des biocides désinfectants.....	33
2.1.1 Techniques de séparation	33
2.1.1.1 Les Ammoniums Quaternaires	33
2.1.1.2 L'Aminopropyldodécylpropane diamine	34
2.1.2 Techniques de détection	36
2.1.2.1 Les détecteurs Ultraviolet et fluorimétrie.....	36
2.1.2.2 La détection par spectrométrie de masse.....	36
2.2 Techniques de préparation d'échantillons alimentaires.....	38
2.3 Evaluation des performances et validation de la méthode	44

2.3.1	Vocabulaire de la validation.....	45
2.3.2	Démarche de validation	45
2.3.3	L'approche globale : le profil d'exactitude	48
2.3.3.1	Principe général.....	48
2.3.3.2	Plan de validation	49
2.3.3.3	Détermination de la fonction de réponse	50
2.3.3.4	Construction et interprétation du PE	51
3.	L'APPROCHE METABOLOMIQUE EN ANALYSE NON CIBLEE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE A HAUTE RESOLUTION	51
3.1	Introduction et objectifs.....	51
3.2	L'approche d'analyse globale, ou non ciblée	52
3.2.1	Principe général	52
3.2.2	Préparation des échantillons	56
3.2.3	Acquisition des données.....	56
3.2.4	Traitement des données.....	58
3.2.5	Analyses statistiques	60
3.2.6	Identification des composés d'intérêts.....	62
	Objectifs du travail de thèse et stratégie de recherche	65
	Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers	67
1	INTRODUCTION GÉNÉRALE	67
2	RESIDUS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES : DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE QUANTITATIVE.....	69
3	AMINOPROPYLDODECYLPROPANE DIAMINE : APPROCHES ET STRATEGIE DE DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE	87
3.1	Introduction générale	87
3.2	Dérivation de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et chromatographie liquide en phase inverse : Phase exploratoire	89
3.2.1.	Méthodologie et résultats préliminaires	89
3.2.1.1	Solutions et réaction de réaction	89
3.2.1.2	Infusion directe en spectrométrie de masse.....	91
3.2.2	Conclusions	94
3.3	Chromatographie liquide par appariement d'ions couplée à la spectrométrie de masse : Développement et validation de méthode	94

4	CONCLUSIONS GENERALES	137
	Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation	139
1.	INTRODUCTION	139
2.	STRATEGIE GLOBALE DE L'ETUDE	140
3.	ANALYSES CIBLEES	143
3.1	Matériels et méthodes d'analyses ciblées	143
3.1.1	Matrices et standards pour l'analyse	143
3.1.2	Appareillage de chromatographie et de détection par spectrométrie de masse en tandem 143	
3.1.3	Préparation des échantillons et gamme matrice	144
3.2	Résultats d'analyses ciblées	145
3.2.1	Les Ammoniums Quaternaires : Cas du DDAC-C₁₀	145
3.2.2	L'Aminopropyldodécylpropane diamine	147
3.3	Conclusions sur les analyses ciblées	149
4.	ANALYSES NON CIBLEES	150
4.1	Matériels et méthodes d'analyses non ciblées	150
4.1.1	Les échantillons	150
4.1.2	Standards, réactifs et consommables pour l'extraction et l'analyse non ciblée	150
4.1.3	Appareillage de chromatographie et de détection par spectrométrie de masse à haute résolution	151
4.1.4	Préparation des solutions	152
4.1.5	Préparation des échantillons	152
4.1.6	Préparation des contrôles qualité (QC)	153
4.1.7	Conditions d'analyse par LC-HRMS	153
4.1.8	Traitement des données pour l'analyse non ciblée	155
4.1.9	Analyses statistiques	156
4.1.10	Identification	156
4.2	Résultats des analyses non ciblées sur les fromages et discussion	157
4.2.1	Le Fromage Fondu	157
4.2.2	Le Fromage à pâte pressée cuite (PPC)	172
4.3	Conclusions préliminaires	177
4.4	Essai complémentaire sur le lait	178

4.4.1	Résultats d'analyse ciblée pour le lait et discussions	180
4.4.2	Résultats d'analyse non ciblée pour le lait et discussions.....	181
5	CONCLUSION ET DISCUSSIONS	188
	Conclusions générales et perspectives	191
	Références Bibliographiques	196
	Annexe 1	207
	Annexe 2	215
	Annexe 3	218

Liste des figures

Figure 1 : Structure générale des ammoniums quaternaires	17
Figure 2 : Structure générale des chlorures de benzalkonium (BACs) et des chlorures de diméthylaldialkylammonium (DDACs) étudiés	19
Figure 3 : Structure chimique de l'Aminopropyldodécylpropane diamine.....	20
Figure 4 : Diagramme de prédominance des formes structurales de l'Aminopropyldodécylpropane diamine en fonction du pH [22]	21
Figure 5 : Représentation graphique du coefficient de partage en fonction du pH [22]	22
Figure 6 : Evolution réglementaires des LMRs concernant les BACs et DDAC-C ₁₀	24
Figure 7 : Méthodes d'autocontrôle utilisées en Industrie Agroalimentaire (IAA) pour valider les procédures de nettoyage-désinfection.....	25
Figure 8 : Procédure détaillée de fabrication des fromages à pâtes pressées cuites.....	28
Figure 9 : Procédure détaillée de fabrication des fromages fondus.....	28
Figure 10 : Procédure détaillée de la fabrication de la poudre de lait [29]	28
Figure 11 : Réaction d'hydrolyse du lactose en glucose et galactose.....	30
Figure 12 : Principales étapes d'une procédure analytique employée pour la détermination de contaminants dans des matrices alimentaires	33
Figure 13 : Schéma de présentation général d'un système analytique de spectromètre de masse	37
Figure 14 : Types de supports adaptés à la préparation d'échantillons par SPE pour l'analyse des biocides désinfectants étudiés.....	40
Figure 15 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse [106]	44
Figure 16 : Illustration de la méthodologie de caractérisation d'une méthode analytique selon une approche « critères par critère » [106].....	47
Figure 17 : Illustration de la méthodologie de caractérisation d'une méthode analytique selon une approche globale [106]	47
Figure 18 : Représentation schématique des termes de validation (justesse, fidélité et exactitude).....	48
Figure 19 : Illustration d'un profil d'exactitude	49
Figure 20 : Plan de validation global	50
Figure 21 : Représentation schématique de l'échelle des différentes approches omiques.....	53
Figure 22 : Représentation schématique des différentes approches analytiques en métabolomique [127, 128].....	54
Figure 23 : Processus d'une analyse non ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution (adapté de la thèse de Roux 2011 [145])	55
Figure 24 : Evolution des technologies spectrométriques en lien avec la résolution [135]	57

Figure 25 : Synoptique de la méthodologie d'acquisition et de traitement des données pour la recherche de composés inconnus en analyse non ciblée	60
Figure 26 : Représentation de la projection du jeu de données selon deux composantes principales [152].....	61
Figure 27 : Représentation du jeu de données en analyses statistiques multivariées sous la forme de carte factorielle des individus (Score plot).....	61
Figure 28 : Processus d'identification des molécules inconnues en approche non ciblée.....	63
Figure 29 : Représentation de la redondance du signal en ESI-MS [153].....	63
Figure 30 : Stratégie analytique pour l'analyse quantitative de l'Aminopropyldodécylpropane diamine.....	88
Figure 31 : Structures chimiques de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et de la fluorescamine.....	90
Figure 32 : Double réactions de dérivation entre l'Aminopropyldodécylpropane diamine et la fluorescamine.....	90
Figure 33 : Cinétique d'infusion de la solution d'Aminopropyldodécylpropane diamine dérivée à la fluorescamine	92
Figure 34 : Cinétique de la fluorescamine au cours de la réaction de dérivation	93
Figure 35 : Résultats des trois procédures de validation de la méthode quantitative d'Aminopropyldodécylpropane diamine	99
Figure 36 : Découpage des fabrications des PPC (Phase 1) et FF (Phase 2) relative à la phase (1 ou 2) du procédé de transformation.....	140
Figure 37 : Stratégie de fabrication des fromages PPC pour la série du DDAC-C10 et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine	141
Figure 38 : Stratégie de fabrication des fromages Fondus (FF) pour la série du DDAC-C10 et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine	142
Figure 39 : Synoptique de la méthodologie analytique adoptée pour l'analyse ciblée et non ciblée de résidus de biocides et de produits néoformés dans les produits laitiers.....	143
Figure 40 : Synoptique de la méthodologie d'extraction pour l'analyse ciblée et non ciblée	144
Figure 41 : Teneurs en DDAC-C10 dans les fromages PPC « traités » et « non traités ».....	146
Figure 42 : Teneurs en DDAC-C10 dans les fromages PPC J0 « traités » et « non traités » permettant de mettre en évidence sa rémanence sur les surfaces alimentaires	147
Figure 43 : Synoptique de la méthodologie d'extraction mise en œuvre pour l'analyse non ciblée	153
Figure 44 : Exemple de séquence d'analyse appliquée en approche non ciblée HRMS	155
Figure 45 : Représentation « score plot » de l'ACP sur les échantillons de fromages fondus	157
Figure 46 : PLS-DA sur les échantillons de fromages fondus	158
Figure 47 : Représentation de la validation du modèle PLS-DA pour les échantillons de FF par des tests de permutations (k=1000).....	159

Figure 48 : Boxplot et EIC des quatre variables parmi les plus significatives de la PLS-DA pour les échantillons de fromages fondus	161
Figure 49 : Chromatogramme des quatre variables parmi les plus significatives de la PLS-DA pour les échantillons de fromages fondus.....	162
Figure 50 : Spectre de masses exactes de l'Aminopropyldodécylpropane diamine M300T527 .	163
Figure 51 : Spectre de masses exactes de la variable M388T313.....	164
Figure 52 : Spectre de masses exactes de la variable M431T350.....	165
Figure 53 : Spectre de masses exactes de la variable M476T375.....	166
Figure 54 : Spectre de masses exactes de la variable M564T411.....	167
Figure 55 : Représentation schématique des similitudes d'écart de masse entre les 4 features	168
Figure 56 : Sites de coupures potentiels de l'Aminopropyldodécylpropane diamine.....	168
Figure 57 : Propositions de formules brutes pour les 4 features et leurs variables corrélées	169
Figure 58 : Spectre de masses bruts faisant apparaître les ions similaires entre les 4 features .	170
Figure 59 : Spectres de masses faisant apparaître les ions communs aux 4 features.....	171
Figure 60 : Représentation « score plot » de l'ACP sur les échantillons de fromages PPC	173
Figure 61 : PLS-DA sur les échantillons de fromages à pâte pressée cuite.....	174
Figure 62 : Représentation de la validation du modèle PLS-DA pour les échantillons PPC par des tests de permutations (k=1000).....	174
Figure 63 : EIC et bloxplot des variables M176T115 et M427T877 discriminantes en PLS-DA pour les fromages PPC.....	176
Figure 64 : Suivie de l'intensité de la variable M175T340 dans les fromages PPC (J0 et J50) mettant en évidence un « effet-cuve ».....	177
Figure 65 : Démarche expérimentale mise en œuvre pour la recherche de produits néoformés dans le lait UHT.....	179
Figure 66 : Distribution quantitative des échantillons traités à l'Aminopropyldodécylpropane diamine selon le niveau de prélèvement (avant ou après traitement thermique)	180
Figure 67 : Score plot de l'ACP sur les échantillons de lait soumis à un traitement thermique..	181
Figure 68 : PLS-DA sur les échantillons de laits soumis à un traitement thermique (90°C pendant 3h).....	182
Figure 69 : Représentation des résultats des tests de permutations (k=1000) effectués et significativité des paramètres R2Y et Q2Y	182
Figure 70 : EIC des variables [M343T618] et [M172T618].....	184
Figure 71 : Représentation de l'intensité des ions m/z 172 et m/z 343 dans les échantillons de laits	185
Figure 72 : Chromatographe et spectre de masses exactes des variables M172T618 et M343T618	186

Figure 73 : Comparaison des spectres de masses exactes d'échantillons de lait traité et non traité au temps de rétention 10.3 minutes.....	187
Figure 74 : Spectres de masses exactes des ions corrélés m/ 172.17 et m/z 343.34	187
Figure 75 : Propositions de formules brutes pour l'ion m/z 343.34 discriminant à la présence de l'AMDP dans le lait chauffé	188

Liste des tableaux

Tableau 1 : Types de produits biocides et leur description (extrait et adapté de l'Annexe V du règlement (UE) No. 528/2012 [1])	7
Tableau 2 : Déclinaison des différentes étapes réalisées au cours des procédures de nettoyage et désinfection des surfaces alimentaires [13]	12
Tableau 3 : Liste positive des substances actives entrant dans la formulation des produits biocides utilisés en TP4 [8]	15
Tableau 4 : Cible et mode d'action des principales familles de biocides employées pour le traitement des surfaces en contact avec les aliments (TP4) [17]	17
Tableau 5 : Quantités de lait entier nécessaires à la fabrication de quelques produits laitiers [30]	29
Tableau 6 : Acides gras contenus dans le lait de vache	30
Tableau 7 : Déclinaison des sels et adsorbants proposés pour la méthode QuEChERS [104, 105]	39
Tableau 8 : Méthodes d'analyses pour le dosage des résidus de BACs et DDACs dans les matrices alimentaires.....	41
Tableau 9 : Définition du vocabulaire de la validation.....	45
Tableau 10 : Caractéristiques de performances à évaluer pour les méthodes qualitatives et quantitatives [106]	46
Tableau 11 : Paramètres optimisés pour la détection en spectrométrie en tandem de l'Aminopropyldodécylpropane diamine dérivée à la fluorescamine.....	91
Tableau 12 : Transitions MRM de l'AMDP-F di-dérivée.....	93
Tableau 13 : Domaine de validité et gamme appliquée pour l'analyse ciblée du DDAC-C10 et de l'AMDP dans les produits laitiers	145
Tableau 14 : Teneurs en Aminopropyldodécylpropane diamine dans les fromages PPC et FF « traités » et « non traités »	148
Tableau 15 : Plan d'expérience (nombre de lot et de réplicat) pour l'analyse non ciblée des échantillons de fromages PPC « traités » et « non traités »	150
Tableau 16 : Plan d'expérience (nombre de lot et de réplicat) pour l'analyse non ciblée des échantillons de fromages fondus « traités » et « non traités »	150
Tableau 17 : Paramètres de détection en spectrométrie de masse à haute résolution	154
Tableau 18 : Gradient d'élution binaire pour la séparation chromatographique en analyse non ciblée	154
Tableau 19 : Liste des variables d'intérêts sélectionnées par PLS-DA et analyse univariée (t-test) répondant aux critères de VIP (>2) et p-value (< 0.05).....	160
Tableau 20 : Liste des variables d'intérêts, pour les PPC, sélectionnées par PLS-DA et analyse univariée (t-test et Wilcoxon) répondant aux critères de VIP (>2,4) et p-value (< 0.05)	175

Tableau 21 : Liste des variables d'intérêts sélectionnées par PLS-DA répondant au critère de VIP (>2,2)183

Liste des abréviations

AAH	Amines Aromatiques Hétérocycliques
AcEt	Acétate d'Ethyle
AcF	Acide Formique
ACN	Acétonitrile
ACP	Analyse en Composante Principale
AMDP	Aminopropyldodécylpropane diamine
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AQs	Ammoniums Quaternaires
BAC	BenzAlkonium chloride
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (Institut fédéral allemand d'évaluation des risques)
CNIEL	Centre National Interprofessionnel de l'Economie Laitière
DDAC	DialkylDimethylAmmonium Chloride
D-SPE	Dispersive Solid Phase Extraction
ECHA	European Chemical Agency
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
EIC	Extracted Ion Chromatogram
EPA	Environmental Protection Agency
EtOH	Ethanol
ESI	ElectroSpray Ionization
FDA	Food and Drug Administration
FF	Fromage Fondu
Fluo	Fluorimétrie
FMOC	Chloroformiate de 9-fluorénylméthyle
GC	Gas Chromatography
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HFBA	HeptaFluoroButyric <i>Acid</i>
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IAA	Industrie AgroAlimentaire
IR	InfraRouge
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
LC	Liquid Chromatography
LLE	Liquid-Liquid Extraction
LMR	Limite Maximale de Résidus
LTQ	Linear Trap Quadrupole

MeOH	Méthanol
MgSO ₄	Sulfate de Magnésium
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
NaCl	Chlorure de Sodium
ND	Nettoyage-Désinfection
NQS	1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate
OPA	<i>o</i> -phthalaldehyde
PE	Profil d'Exactitude
PFFPA	PentaFluoroPropionic Acid
PHMB	PolyHexaMéthylène Biguanide
PLS-DA	Partial Least Squares regression – Discriminant Analysis
PMP	Polyméthylènepentène
PP	Polypropylène
ppb	Partie par milliard (de l'anglais <i>part per billion</i>)
PPC	Fromages à Pâte Pressée Cuite
PSA	Amine primaire et secondaire (de l'anglais <i>Primary and Secondary Amine</i>)
PT	Procédés de Transformation
QC	Quality Control
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPB	Règlement sur les Produits Biocides
RPLC	Reverse Phase Liquid Chromatography
SCoFAH	Standing Committee on the Food Chain and Animal Health
SCX	Strong Cation eXchange
SE	Standard d'Étalonnage
SFSTP	Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques
SLE	Solod-Liquid Extraction
SPE	Solid Phase Extraction
SV	Standard de Validation
TFA	Trifluoroacetic acid
TOF	Time Of Flight
TP	Type de Produit
tQ	Triple Quadripôle
Tr	Temps de rétention
UE	Union Européenne
UV	Ultraviolet
WCX	Weak Cation eXchange
	acronyme de diverses formes (X) de la chromatographie (C) couplée à la
XCMS	spectrométrie de masse (MS)

Introduction générale

Les produits biocides sont des substances ou des préparations destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre, par une action chimique ou biologique (règlement biocide (UE) No. 528/2012) [1]. Ils sont composés de préparations de substances actives à usages domestiques ou industriels. La substance active présente dans le produit biocide peut être un composé chimique ou être issue d'un micro-organisme exerçant son action biocide sur ou contre les organismes nuisibles. Ces produits sont classés en 22 types de produits (TP) rassemblés en quatre groupes dont celui des désinfectants, et parmi ces TP, le TP4 regroupe les produits de traitement des surfaces entrant en contact avec les aliments.

Au quotidien, l'hygiène des surfaces est et doit être une préoccupation majeure pour les industriels du secteur agro-alimentaire (IAA). Dans ce cadre, une réglementation européenne, entrée en vigueur au 1^{er} janvier 2006, appelée « paquet Hygiène » (ou « Food Law ») encadre la mise en place d'une politique unique et transparente en matière d'hygiène et de sécurité alimentaire applicable aux opérateurs de la chaîne alimentaire. Cette réglementation se présente sous la forme d'un ensemble de six textes réglementaires dont le règlement (UE) No. 852/2004 [2] relatif aux dispositions à prendre en matière d'hygiène des denrées alimentaires. Ce dernier fait état d'une obligation de mettre en place des plans de Nettoyage-Désinfection (ND) que les entreprises de la filière agroalimentaire se doivent de décrire précisément, tout en ayant une obligation de maîtrise des risques de contaminations chimiques et biologiques (bactéries). La mise en place de bonnes pratiques de ND ordonnée par la réglementation européenne doit donc être appliquée dans le but d'éviter une contamination microbiologique de la surface des équipements utilisés en IAA et minimiser le risque de contamination des aliments par les microorganismes qui pourraient entraîner des problèmes de santé publique et économique. L'usage de produits biocides désinfectants est donc nécessaire pour tuer ou éliminer les microorganismes et/ou inactiver les virus portés par des milieux inertes contaminés. Suite à ces usages, des résidus de biocides peuvent persister sur les surfaces qui seront en contact avec les aliments si ces résidus ne sont pas totalement éliminés lors des opérations de rinçage. En effet, parmi la diversité des produits désinfectants, certains majoritairement employés en IAA comme les ammoniums quaternaires (AQs), du fait de leurs propriétés physico-chimiques présentent plus de difficultés à être désorbés lors du rinçage final. Cette persistance sur les surfaces alimentaires peut être due à une mauvaise maîtrise des opérations de rinçage et/ou à l'absence de moyens d'autocontrôle adaptés ou performants. Le transfert de ces résidus de la surface vers les aliments est donc probable et constitue donc une source potentielle de la présence de ces biocides dans les aliments.

L'évaluation du risque alimentaire si des résidus sont attendus dans l'alimentation peut conduire en cas de besoin, à la fixation de limite maximale de résidus (LMR) garantissant pour le

consommateur la sécurité alimentaire sous ce seuil de tolérance. A l'heure actuelle, l'estimation de l'exposition permettant d'évaluer ce risque est mal établie faute de données qualitatives et quantitatives fiables pour un grand nombre de biocides désinfectants.

L'enjeu majeur est donc de pouvoir disposer de méthodes fiables d'analyse pour la quantification des résidus issus de l'usage de biocides désinfectants à de très faibles teneurs dans les denrées alimentaires. Les techniques de chromatographie liquide et gazeuse couplées à la spectrométrie de masse en tandem s'imposent depuis des années comme les outils analytiques de choix dans l'analyse multirésidus de contaminants environnementaux et alimentaires. En effet, la spectrométrie de masse de par sa spécificité couplée à une méthode de préparation d'échantillon rigoureusement élaborée permet d'atteindre des seuils de quantification compatibles avec la réglementation en vigueur.

Le 2^{ème} questionnement qui se pose ensuite concerne l'impact des procédés de transformation (PT) appliqués en IAA sur les résidus des biocides présents dans l'aliment, en s'intéressant au devenir du composé. Dans l'optique de rechercher de potentiels composés inconnus, appelés produits néoformés, qui peuvent être générés par une réaction ou une dégradation des résidus de biocides en présence des différents constituants alimentaire, et/ou de leur transformation à l'issue des procédés de fabrication, une approche d'analyse non ciblée semble une stratégie prometteuse. La comparaison d'empreintes chimiques globales acquises par spectrométrie de masse à haute résolution (HR-MS) peut se révéler pertinente pour détecter des composés inconnus d'intérêt. Le traitement statistique des empreintes chimiques globales à l'aide d'outils chimiométriques maîtrisés est une voie pour mettre en évidence des modifications chimiques induites sur la molécule étudiée mais aussi pour détecter d'autres différences significatives non attendues.

Dans ce contexte, l'objectif du travail de thèse « Bioconta » est de contribuer au développement analytique de méthodes fiables pour la détermination de résidus de biocides dans les produits laitiers par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Plus particulièrement, il s'agit de développer des méthodes quantitatives et d'en évaluer les caractéristiques de performances au cours d'une procédure de validation. Le second objectif est de répondre, dans la mesure du possible, au questionnement de l'impact des procédés de transformation du lait sur les résidus de biocides en étudiant l'évolution des teneurs des composés et leur devenir dans les diverses matrices issues du lait.

Le projet Bioconta a une portée plus large au sein du laboratoire puisqu'il est intégré au projet « Resbiolact » en partenariat avec l'interprofession laitière (CNIEL). Le lait et autres produits laitiers constituent un groupe de produits alimentaires d'intérêt majeur. Suite à une alerte allemande en 2012, la commission européenne a mis en place une enquête européenne gérée par l'EFSA (European Food Safety Authority ou Autorité européenne de Sécurité des aliments)

où une diversité d'aliments (ex. fruits, légumes, céréales, produits laitiers) a été analysée, avec pour cible les ammoniums quaternaires de type chlorure de Didécylidiméthylammonium (DDAC-C₁₀) et chlorure de Benzalkonium (BACs) afin de fournir des données en vue d'une analyse du risque [3]. Les données d'occurrence ont révélé qu'une quantité non négligeable d'aliments, majoritairement des produits laitiers, présentait une teneur supérieure au seuil réglementaire temporairement en vigueur à cette époque, fixé à 500 µg/kg par le comité permanent de la chaîne alimentaire et de la sécurité animale (SCoFCAH, « Standing Committee on the Food Chain and Animal Health) [4, 5]. La contamination du lait et de ses produits laitiers a amené à une réflexion plus approfondie qui a conduit au projet Resbiolact entre l'Anses et le CNIEL.

Les travaux de cette thèse sont présentés en trois parties :

- ⇒ **La première partie** a pour but de replacer ce travail de thèse dans le contexte actuel. Un premier volet présentera les biocides et leurs usages, les moyens d'encadrements réglementaires et les risques liés à leur présence sur la santé. Les produits laitiers y seront abordés tant du point de vue de leur fabrication que de leur composition. Un second volet sera consacré à présenter l'état de l'art en matière de techniques et méthodes usuellement employées pour l'analyse ciblée de résidus de biocides désinfectants et autres contaminants à structure proche dans les matrices alimentaires. Un dernier volet abordera l'apport de l'approche par analyse non ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution pour la détermination et l'identification de composés inconnus.
- ⇒ **La seconde partie** porte sur le développement et la validation de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers, suite à leur transfert de la surface vers les aliments. Les résultats des travaux, ayant conduit au développement de deux méthodes d'analyse de famille de biocides distincte à savoir les ammoniums quaternaires d'une part et l'Aminopropyldodécylpropane diamine d'autre part, seront présentés dans cette partie. L'applicabilité de chacune des méthodes a été démontrée par l'analyse d'échantillons issus du commerce. Chacune des méthodes fait l'objet d'un article scientifique, l'une publiée dans le Journal of Chromatography A en 2017 et l'autre, en cours de révision, soumise au journal Food Chemistry en 2017.
- ⇒ **La troisième partie** aborde l'étude du devenir des résidus dans les aliments et l'impact que peuvent avoir les procédés de transformation du lait sur les teneurs en résidus de biocides. L'objectif principal est de rechercher la présence éventuelle de substances indésirables, ou produits néoformés, résultant de réaction entre un biocide et les constituants de la matière première alimentaire. Ces produits néoformés peuvent être favorisés par l'application de différentes technologies de fabrication et de transformation des produits laitiers (poudre de lait, fromages) mettant en œuvre par

exemple un traitement thermique. Ce travail a été réalisé en partenariat avec la Halle Technologique d'Actalia qui a été mandatée dans le cadre du projet Resbiolact pour la fabrication de produits finis. Dans cette troisième partie du manuscrit, la stratégie globale de l'étude pilote et la démarche expérimentale de l'étude seront décrites. Le devenir des résidus en lien avec l'impact des procédés de transformation du lait sera étudié par des approches d'une analyse ciblée et non ciblée. Les résultats obtenus et les interprétations qui ont pu être faites seront exposés.

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

1. LA PROBLEMATIQUE DES RESIDUS DE BIOCIDES DESINFECTANTS DANS LES PRODUITS LAITIERS

1.1 Présentation générale des biocides

1.1.1 Définition et réglementation

Une définition détaillée des biocides est proposée dans l'article 3 du Règlement sur les Produits Biocides (RPB) (UE) No. 528/2012 [1]. Un produit biocide est défini comme « toute substance ou tout mélange, sous la forme dans laquelle il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant, qui est destiné à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique ». De manière plus concise, les biocides sont représentés par des substances ayant des propriétés physico-chimiques capables de combattre les organismes vivants nuisibles, contribuant ainsi à la protection de l'Homme, des animaux, des plantes et de l'environnement. A titre d'exemple, les désinfectants, les insecticides et les produits de protection du bois sont répertoriés en tant que biocides. Ces produits sont généralement utilisés sous forme de formulations contenant une ou plusieurs substances actives d'origine minérale ou organique, associées à un ou plusieurs co-formulants. La substance active exerce une action sur ou contre les organismes nuisibles tandis que les co-formulants, dépourvus d'activité biologique, apporteront des propriétés supplémentaires, telles qu'une amélioration de la formulation et une facilité d'utilisation, à la ou les substance(s) active(s) composants les produits.

Puisque les biocides sont définis comme des produits permettant de détruire des nuisibles, un cadre législatif s'impose pour gérer ces substances.

⇒ [Le règlement sur les produits biocides \[RPB, règlement \(UE\) No. 528/2012\]](#)

La mise en place par la Commission Européenne du Règlement sur les Produits Biocides (RPB) (UE) No. 528/2012 [1] vise à encadrer la mise sur le marché des produits biocides et à harmoniser leurs utilisations en Europe. Le présent RPB impose de fournir une évaluation approfondie des risques pour l'Homme, l'animal ou l'environnement, et une preuve de l'efficacité de toutes substances actives définies comme produits biocides avant de faire l'objet d'une autorisation de mise sur le marché, délivrée au niveau national ou européen [6, 7]. En France, le ministère en charge de l'environnement associé à l'Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) délivre les autorisations de

mise sur le marché (AMM) de produits biocides qui découlent d'une évaluation préalable des substances actives et des produits biocides. Le RPB prévoit également une reconnaissance mutuelle des produits biocides entre tous les états membres si les fabricants souhaitent les commercialiser sur tout ou une partie du territoire européen.

⇒ [Le règlement délégué \(UE\) No. 698/2017](#)

Le règlement (UE) No. 698/2017 [8] correspond au programme d'examen des substances actives existantes contenues dans des produits biocides visé dans le RPB. Bien qu'il permette de fournir la liste positive des substances actives présentes dans les produits biocides selon les usages (ex. désinfectants pour le traitement des surfaces alimentaires), ce règlement a un intérêt moindre pour l'objectif de la thèse.

1.1.2 Classification et usage

La classification des produits biocides contenant les substances actives figure en Annexe V du RPB (UE) No. 528/2012 [1] . Ils sont classés en quatre grands groupes répartissant 22 types de produits différents détaillés dans le tableau 1. On y retrouve :

- GROUPE 1 : Les **désinfectants** : Types de Produits 1 à 5 (ex. : utilisation dans le domaine privé et en santé publique, en hygiène humaine ou vétérinaire, pour la désinfection des surfaces ou des eaux de boisson)
- GROUPE 2 : Les **produits de protection** : Types de Produits 6 à 13 (ex. : produits de protection du bois contre les insectes ou les champignons, produits de protection du cuir, produits de protection des fluides utilisés dans la transformation des métaux)
- GROUPE 3 : Les **produits de lutte contre les nuisibles** : Types de Produits 14 à 20 (ex. : rodenticides, insecticides)
- GROUPE 4 : Les **autres produits biocides** : Types de Produits 21 et 22 (ex. : peintures antisalissure appliquées sur les bateaux, fluides utilisés dans la taxidermie et la thanatopraxie).

Tableau 1 : Types de produits biocides et leur description (extrait et adapté de l'Annexe V du règlement (UE) No. 528/2012 [1])

GROUPE 1 : Désinfectants Ces types de produits ne comprennent pas les produits nettoyants qui ne sont pas destinés à avoir un effet biocide, notamment la lessive liquide, la lessive en poudre et les produits similaires.		
Numéro	Types de produits	Description
TP1	Hygiène humaine	Les produits de cette catégorie sont des produits biocides utilisés pour l'hygiène humaine, appliqués sur la peau humaine ou le cuir chevelu ou en contact avec celle-ci ou celui-ci, dans le but principal de désinfecter la peau ou le cuir chevelu.
TP2	Désinfectants et produits algicides non destinés à l'application directe sur des êtres humains ou des animaux	<p>Produits utilisés pour désinfecter les surfaces, les matériaux, les équipements et le mobilier qui ne sont pas utilisés en contact direct avec les denrées alimentaires ou les aliments pour animaux. Les lieux d'utilisation incluent notamment les piscines, les aquariums, les eaux de bassin et les autres eaux, les systèmes de climatisation, ainsi que les murs et sols dans les lieux privés, publics et industriels et dans d'autres lieux d'activités professionnelles.</p> <p>Produits utilisés pour désinfecter l'air, les eaux non utilisées pour la consommation humaine ou animale, les toilettes chimiques, les eaux usées, les déchets d'hôpitaux et le sol.</p> <p>Produits utilisés comme produits algicides pour le traitement des piscines, des aquariums et des autres eaux, ainsi que pour le traitement curatif des matériaux de construction.</p> <p>Produits utilisés pour être incorporés dans les textiles, les tissus, les masques, les peintures et d'autres articles ou matériaux, afin de produire des articles traités possédant des propriétés désinfectantes.</p>
TP3	Hygiène vétérinaire	<p>Produits utilisés pour l'hygiène vétérinaire, tels que désinfectants, savons désinfectants, produits d'hygiène buccale ou corporelle ou ayant une fonction antimicrobienne.</p> <p>Produits utilisés pour désinfecter les matériaux et surfaces associés à l'hébergement ou au transport des animaux.</p>
TP4	Surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux	<p>Produits utilisés pour désinfecter le matériel, les conteneurs, les ustensiles de consommation, les surfaces ou conduits utilisés pour la production, le transport, le stockage ou la consommation de denrées alimentaires ou d'aliments pour animaux (y compris l'eau potable) destinés aux hommes ou aux animaux.</p> <p>Produits utilisés pour l'imprégnation des matériaux susceptibles d'entrer en contact avec des denrées alimentaires.</p>
TP5	Eau potable	Produits utilisés pour désinfecter l'eau potable destinée aux hommes et aux animaux.

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

GROUPE 2 : Produits de protection Sauf indication contraire, ces types de produits ne concernent que des produits visant à prévenir le développement microbien et le développement des algues.		
Numéro	Types de produits	Description
TP6	Protection des produits pendant le stockage	<p>Produits utilisés pour protéger les produits manufacturés, autres que les denrées alimentaires, les aliments pour animaux, les produits cosmétiques, les médicaments ou les dispositifs médicaux, par la maîtrise des altérations microbiennes afin de garantir leur durée de conservation.</p> <p>Produits utilisés comme produits de protection pour le stockage ou l'utilisation d'appâts rodenticides, insecticides ou autres.</p>
TP7	Produits de protection pour les pellicules	Produits utilisés pour protéger les pellicules ou les revêtements par la maîtrise des altérations microbiennes ou de la croissance des algues afin de sauvegarder les propriétés initiales de la surface des matériaux ou objets tels que les peintures, les plastiques, les enduits étanches, les adhésifs muraux, les liants, les papiers et les œuvres d'art.
TP8	Produits de protection du bois	<p>Produits utilisés pour protéger le bois provenant de scieries, y compris pendant la phase de transformation dans la scierie, ou les produits du bois par la maîtrise des organismes qui détruisent ou déforment le bois, y compris les insectes.</p> <p>Ce type de produits comprend à la fois les produits de traitement préventifs et curatifs.</p>
TP9	Produits de protection des fibres, du cuir, du caoutchouc et des matériaux polymérisés	<p>Produits utilisés pour protéger les matières fibreuses ou polymérisées telles que le cuir, le caoutchouc, le papier ou les produits textiles par la maîtrise des altérations microbiologiques.</p> <p>Ce type de produits comprend les produits biocides qui empêchent l'accumulation de microorganismes sur la surface des matériaux et qui préviennent ou empêchent la formation d'odeurs et/ou qui présentent d'autres types d'avantages.</p>
TP10	Produits de protection des matériaux de construction	Produits utilisés pour protéger les ouvrages de maçonnerie, les matériaux composites ou les matériaux de construction autres que le bois par la lutte contre les attaques microbiologiques et les algues.
TP11	Produits de protection des liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication	<p>Produits utilisés pour protéger l'eau ou les autres liquides utilisés dans les systèmes de refroidissement et de fabrication par la lutte contre les organismes nuisibles tels que les microbes, les algues et les moules.</p> <p>Les produits utilisés pour désinfecter l'eau potable ou l'eau des piscines ne sont pas compris dans ce type de produits.</p>
TP12	Produits anti-biofilm	Produits utilisés pour prévenir ou lutter contre la formation d'un biofilm sur les matériaux, équipements et structures utilisés dans l'industrie, par exemple sur le bois et la pâte à papier ou les strates de sable poreuses dans l'industrie de l'extraction du pétrole.

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

TP13	Produits de protection des fluides de travail ou de coupe	Produits pour lutter contre les altérations microbiennes des fluides utilisés pour le travail ou la coupe du métal, du verre ou d'autres matériaux.
GROUPE 3 : Produits de lutte contre les nuisibles		
Numéro	Types de produits	Description
TP14	Rodenticides	Produits utilisés pour lutter contre les souris, les rats ou autres rongeurs, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP15	Avicides	Produits utilisés pour lutter contre les oiseaux, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP16	Molluscicides, vermicides et produits utilisés pour lutter contre les autres invertébrés	Produits utilisés pour lutter contre les mollusques, les vers et les invertébrés non couverts par d'autres types de produits, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP17	Piscicides	Produits utilisés pour lutter contre les poissons, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP18	Insecticides, acaricides et produits utilisés pour lutter contre les autres arthropodes	Produits utilisés pour lutter contre les arthropodes (tels que les insectes, les arachnides et les crustacés), par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
TP19	Répulsifs et appâts	Produits utilisés pour lutter contre les organismes nuisibles (qu'il s'agisse d'invertébrés comme les puces ou de vertébrés comme les oiseaux, les poissons ou les rongeurs), en les repoussant ou en les attirant, y compris les produits utilisés, pour l'hygiène humaine ou vétérinaire, directement sur la peau ou indirectement dans l'environnement de l'homme ou des animaux.
TP20	Lutte contre d'autres vertébrés	Produits utilisés pour lutter contre les vertébrés autres que ceux déjà couverts par les autres types de produits de ce groupe, par d'autres moyens qu'en les repoussant ou en les attirant.
GROUPE 4: Autres produits biocides		
Numéro	Types de produits	Description
TP21	Produits antisalissure	Produits utilisés pour lutter contre le développement et le dépôt d'organismes salissants (microbes et formes supérieures d'espèces végétales ou animales) sur les navires, le matériel d'aquaculture ou d'autres installations utilisées en milieu aquatique.
TP22	Fluides utilisés pour l'embaumement et la taxidermie	Produits utilisés pour désinfecter et préserver la totalité ou certaines parties de cadavres humains ou animaux.

1.1.3 Hygiène alimentaire et réglementation

La sécurité sanitaire des aliments passe par la maîtrise des risques microbiologiques et chimiques qui constituent une préoccupation mondiale de santé publique. En effet, tout au long de la chaîne alimentaire, les denrées peuvent être la cible de différents types de contaminants biologique et chimique. Les risques liés à ces contaminants vont principalement dépendre de l'agent impliqué et du niveau de contamination de l'aliment. Dans ce manuscrit, les principales

sources et voies de contamination dans le secteur de l'industrie laitière seront décrites, ainsi que les moyens mis en œuvre pour pallier à cette problématique.

⇒ Le risque biologique

D'un point biologique, le lait et les produits laitiers sont soumis à un risque bactérien continu pouvant être à l'origine d'intoxications alimentaires. En effet, ces denrées peuvent être contaminées par des bactéries pathogènes qui sont essentiellement des mycobactéries – *Brucella*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* – et des entérobactéries dont *Escherichia coli* (producteurs de toxines) et *Salmonella* [9, 10]. La consommation d'aliments contenant ces agents pathogènes peut conduire à des infections de type listériose, gastro-entérite ou des douleurs abdominales chez l'Homme. La crise sanitaire des laits infantiles contaminés à la salmonelle qui touche actuellement le pays en est un parfait exemple.

Au sein de la filière laitière, la provenance de ces bactéries ubiquitaires peut être liée à l'environnement de l'élevage, aux muqueuses de l'animal, et au matériel de traite, de collecte et de stockage de la matière première. Le risque bactérien principalement jugé critique à la ferme peut aisément être étendu à l'environnement industriel alimentaire en raison de l'acheminement des matières premières. La contamination bactérienne des aliments peut être liée à la présence de colonies sur des surfaces (persistance et/ou adhésion bactérienne, formation de biofilm) [10]. En IAA, une attention particulière doit être apportée pour minimiser ces risques bactériens.

⇒ Une réglementation comme premier moyen de prévention

Dans une démarche de réduction du risque bactérien, des moyens de prévention en IAA sont mis en place à la demande des états membres. Dans le but d'assurer la qualité sanitaire du lait et des produits laitiers, (i) des points de contrôle par prélèvements d'échantillons pour la recherche d'agents pathogènes ou d'antibiotiques pouvant gêner la fabrication des produits laitiers, et (ii) des traitements essentiellement thermiques (pasteurisation, stérilisation, réfrigération) permettant d'éliminer les organismes pathogènes sont instaurés tout au long de la chaîne de production et de distribution.

De plus, la Commission Européenne a instauré le « Paquet Hygiène », entré en vigueur le 1^{er} Janvier 2006, dans le but de mener une politique unique et transparente en matière d'hygiène et de sécurité alimentaire applicable à toutes les denrées [11]. Celui-ci vise à harmoniser le niveau de sécurité sanitaire des aliments en impliquant tous les acteurs de l'IAA, et à développer des instruments et outils efficaces pour contrôler les denrées et gérer les alertes à tous les maillons de la chaîne alimentaire. Pour ce faire, le « Paquet Hygiène » reprend un ensemble de textes législatifs au nombre de six adoptés par l'Union Européenne, dont le Règlement (CE) No. 178/2002 surnommé la « Food Law » [12], base de toute la réglementation

du secteur des denrées alimentaires et complété, entre autres, par le Règlement (CE) No. 852/2004 [2] relatif à l'hygiène des denrées alimentaires, le plus concerné par l'objectif de notre étude.

Selon le Règlement (CE) No. 852/2004 [2], les denrées alimentaires ne doivent présenter aucun risque sanitaire et être d'une qualité commerciale acceptable. Celui-ci impose la mise en place de plans de nettoyage et désinfection (ND) qui doivent être précisément décrits par toutes les entreprises de la filière agro-alimentaire, ainsi que la maîtrise des contaminations biologique et chimique.

1.1.4 Plans de nettoyage-désinfection des surfaces alimentaires

1.1.4.1 Procédures de ND

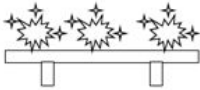
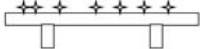


Les procédures de ND imposées aux acteurs du secteur agro-alimentaire par le règlement (CE) No. 852/2004 [2], ont pour objectif d'éliminer les salissures ainsi que les contaminations et infections d'origine microbiologique présentes sur les surfaces alimentaires, permettant de garantir la qualité microbiologique des produits et la sécurité alimentaire des consommateurs. La procédure est constituée de deux phases, le Nettoyage et la Désinfection, qui peuvent être déclinées en plusieurs étapes en fonction de l'environnement et des souillures, dont les principaux objectifs et actions des ND sont détaillés dans le tableau 2.

- Le **nettoyage** est l'action qui consiste à retirer les souillures des surfaces, les laissant visuellement propres et aptes à être désinfectées efficacement. Il permet d'éliminer à la fois les salissures organiques (graisses, sang, sucre, protéines, etc.) et inorganiques (sels minéraux, rouille, résidus de carbonisation). Les agents de nettoyage employés permettent d'éliminer un certain nombre de déchets et de réaliser un certain niveau d'élimination de microorganismes. Néanmoins, la seule action du nettoyage est rarement suffisante puisqu'elle ne garantit pas une décontamination totale des surfaces. Les produits de nettoyage sont constitués essentiellement de deux catégories de produits : les détergents alcalins (constitués de soude, potasse, tensio-actifs ...) et les détartrants acides.
- La **désinfection** est une opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de limiter à un niveau acceptable les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés sur des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. La désinfection peut être réalisée par une action physique (chaleur, rayonnement UV) ou par une action d'un produit chimique de désinfection. La désinfection ne peut être efficace qu'après un nettoyage rigoureux, et est limitée dans le temps et aux microorganismes présents au cours de l'opération. De ce fait, une contamination ultérieure est tout à fait possible ce qui nécessite le renouvellement de ces opérations autant de fois que nécessaire dans les zones jugées critiques. Au cours de l'opération de

désinfection, des formulations composées d'agents de nettoyage combinés simultanément avec un désinfectant sont couramment utilisées.

- Les **étapes de rinçage** (intermédiaire et final) ont pour but d'éliminer les souillures et d'augmenter l'efficacité des produits de nettoyage et désinfection et d'en éliminer les traces en vue d'un contact alimentaire.

Tableau 2 : Déclinaison des différentes étapes réalisées au cours des procédures de nettoyage et désinfection des surfaces alimentaires [13]

	Objectif	Action	Remarques	Souillure Microorganisme Désinfectant
RANGEMENT ET PRÉ-NETTOYAGE	Dégager la zone de travail Éliminer les plus grosses souillures, visibles et adhérentes	Evacuation des déchets Dégagement des supports: Raclage, ou prélavage à l'eau chaude (50-60°C) sous basse (4-5 bars) ou moyenne pression (20-30 bars), l'eau froide est totalement inefficace.	Le pré-nettoyage est important car l'élimination des souillures les plus grossières permet d'augmenter l'efficacité des produits de nettoyage et de désinfection qui seront appliqués ultérieurement. Le pré-nettoyage est réalisé au moment des pauses du personnel et en fin de journée.	Surface sale 
NETTOYAGE	éliminer les souillures visibles (déchets d'aliments ...).	Utilisation d'un détergent, qui facilite le décollement des souillures Les méthodes d'application du détergent peuvent être variées : <ul style="list-style-type: none"> • aspersion, • trempage, • lavette, éponge, balai, • canon à mousse. 	L'efficacité du détergent sera accrue si sa température, sa concentration et son temps d'action sont optimisés	Surface après nettoyage – physiquement propre 
RINÇAGE INTERMÉDIAIRE	éliminer les souillures résiduelles, éliminer les traces de détergent ou de mousse encore présentes et favoriser l'action du désinfectant appliqué à l'étape suivante.	Utilisation d'eau claire en aspersion, circulation par jet à basse pression.	La quantité d'eau résiduelle après rinçage doit être la plus faible possible, car elle risque de diluer le désinfectant, qui sera alors moins efficace : le rinçage intermédiaire favorise donc l'action du désinfectant qui est appliqué à l'étape suivante.	
DÉSINFECTION	réduire le nombre de micro-organismes restant sur les surfaces et les matériels, notamment les pathogènes.	par l'action d'un désinfectant. Le désinfectant peut être appliqué par pulvérisation, trempage, circulation ou par aspersion ou brumisation sur les surfaces et les matériels.	Son action ne sera efficace que si l'opérateur respecte le temps d'action	Surface après désinfection bactériologiquement propre 
RINÇAGE FINAL	éliminer les traces de solution désinfectante.	par utilisation d'eau l'eau potable (jet basse pression, aspersion ou circulation d'eau) après avoir laissé agir le désinfectant,	C'est une étape qui est souvent négligée, mais importante. Certains produits sont dit sans rinçage en conformité avec l'arrêté de	Surface après rinçage chimiquement propre 
SÉCHAGE	Eviter une nouvelle multiplication des micro-organismes ayant résisté aux opérations de nettoyage/désinfection Limiter la corrosion	éliminer l'eau de rinçage, à l'aide par exemple de raclettes en caoutchouc. Utilisation de papiers à usage unique afin d'éviter la dispersion des micro organismes		

Ainsi, l'emploi de biocides aux propriétés nettoyantes et désinfectantes est nécessaire pour assurer l'hygiène des surfaces alimentaires en éliminant les souillures organiques et inorganiques ainsi que les bactéries adhérentes et persistantes qui induisent la contamination biologique des surfaces alimentaires, et plus largement, des aliments.

1.1.4.2 Biocides désinfectants : réglementation et risques chimiques

⇒ Définition : résidus et LMR (limite maximale de résidus)

A la suite du traitement des surfaces alimentaires, il est possible que des résidus de produits biocides persistent sur les surfaces, notamment si ces résidus ne sont pas totalement éliminés lors des opérations de rinçage. De par leur persistance sur les surfaces alimentaires, un transfert de résidus est possible sur ou vers les aliments, ce qui constitue une source potentielle de contamination chimique des aliments. Au regard du RPB (UE) No. 528/2012 [1], on entend par résidu toute « substance présente dans ou sur des produits d'origine végétale ou animale, dans les ressources en eau, dans l'eau potable, dans les denrées alimentaires, dans les aliments pour animaux ou ailleurs dans l'environnement, qui résulte de l'utilisation d'un produit biocide, y compris les métabolites et les produits de dégradation ou de réaction d'une telle substance ». Les résidus désignent la présence de substances chimiques dans un milieu en quantité généralement très faible (par exemple 1 µg/kg). Au niveau européen, des limites maximales de résidus (LMR) sont fixées pour certaines substances actives si des résidus sont attendus dans les denrées alimentaires afin de protéger la santé animale et humaine. Ces seuils réglementaires correspondant aux concentrations ne devant être dépassées dans les denrées alimentaires sont définis en tenant compte de la toxicité de la substance et du scénario d'exposition du consommateur, pour en assurer la sécurité [14]. Certaines substances biocides ayant fait l'objet d'étude d'évaluation possèdent donc une LMR publiée dans un règlement européen amendement l'annexe III du règlement N° 396/2005 (ex. les BACs et DDACs [15]). Lorsqu'aucune LMR spécifique n'est définie, ces substances sont soumises à une LMR générale (« limite par défaut ») de 0.01 mg/kg définie par la réglementation pesticide (Règlement (UE) No. 396/2005) [16].

⇒ Les différentes familles de biocides désinfectants (TP4)

Les substances actives (SA) entrant dans la formulation des produits biocides désinfectants utilisés pour le traitement des surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (TP4) sont aujourd'hui listées en Annexe II du règlement (UE) No. 698/2017 [8] (Tableau 3). Parmi les principaux agents de nettoyage et/ou désinfection, on retrouve principalement :

- les métaux (ex. argent),
- les acides carboxyliques (ex. acide formique, acide salicylique),
- les alcools (ex. éthanol, propan-1-ol),
- les dérivés halogénés (ex. hypochlorite de sodium),
- les produits alcalins,
- les amines (ex. Aminopropyldodécylpropane diamine),
- les biguanides (ex. PHMB),

- les oxydants (peracides, peroxydes,)
- les ammoniums quaternaires (ex. chlorure de Diméthylodialkylammonium (DDACs) et chlorure de benzalkonium (BACs)).

Tableau 3 : Liste positive des substances actives entrant dans la formulation des produits biocides utilisés en TP4 [8]

Numéro d'entrée	Dénomination de la substance	État membre rapporteur	Numéro CE	Numéro CAS
36	Éthanol	EL	200-578-6	64-17-5
37	Acide formique	BE	200-579-1	64-18-6
43	Acide salicylique	NL	200-712-3	69-72-7
45	Propan-1-ol	DE	200-746-9	71-23-8
69	Acide glycolique	NL	201-180-5	79-14-1
71	Acide L-(+)-lactique	DE	201-196-2	79-33-4
85	Symclosène	UK	201-782-8	87-90-1
122	Glyoxal	FR	203-474-9	107-22-2
171	2-Phénoxyéthanol	UK	204-589-7	122-99-6
185	Tosylchloramide sodique (tosylchloramide sodique — chloramine T)	ES	204-854-7	127-65-1
195	2-Biphénylate de sodium	ES	205-055-6	132-27-4
330	<i>N</i> -(3-Aminopropyl)- <i>N</i> -dodécyl propane-1,3-diamine (diamine)	PT	219-145-8	2372-82-9
346	Dihydrate de dichloroisocyanurate de sodium	UK	220-767-7	51580-86-0
345	Troclosène sodique	UK	220-767-7	2893-78-9
397	Chlorure de didécyl diméthylammonium (DDAC)	IT	230-525-2	7173-51-5
401	Argent	SE	231-131-3	7440-22-4
1023	Argent en tant que nanomatériau	SE	231-131-3	7440-22-4
405	Dioxyde de soufre	DE	231-195-2	7446-09-5
432	Hypochlorite de sodium	IT	231-668-3	7681-52-9
453	Peroxodisulfate de disodium/ Persulfate de sodium	PT	231-892-1	7775-27-1
455	Hypochlorite de calcium	IT	231-908-7	7778-54-3
491	Dioxyde de chlore	PT	233-162-8	10049-04-4
494	2,2-Dibromo-2-cyanoacétamide (DBNPA)	DK	233-539-7	10222-01-2

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

Numéro d'entrée	Dénomination de la substance	État membre rapporteur	Numéro CE	Numéro CAS
667	Chlorure d'alkyl(C ₁₂ -C ₁₈)diméthylbenzylammonium [ADBAC (C ₁₂ -C ₁₈)]	IT	269-919-4	68391-01-5
671	Chlorure d'alkyl(C ₁₂ -C ₁₆)diméthylbenzylammonium [ADBAC/BKC (C ₁₂ -C ₁₆)]	IT	270-325-2	68424-85-1
673	Chlorure de didécyl diméthylammonium [DDAC (C ₈₋₁₀)]	IT	270-331-5	68424-95-3
690	Composés de l'ion ammonium quaternaire, benzylalkyl en C ₁₂₋₁₈ diméthyles, sels avec le 1,1-dioxyde de 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one (1:1) (ADBAS)	MT	273-545-7	68989-01-5
692	Amines, alkyl en C ₁₀₋₁₆ diméthyles, N-oxydes	PT	274-687-2	70592-80-2
693	bis(Péroxymonosulfate)bis(sulfate) de pentapotassium	SI	274-778-7	70693-62-8
724	Chlorure d'alkyl(C ₁₂ -C ₁₄)diméthylbenzylammonium [ADBAC (C ₁₂ -C ₁₄)]	IT	287-089-1	85409-22-9
725	Chlorure d'alkyl(C ₁₂ -C ₁₄)diméthyl(éthylbenzyl)ammonium [ADEBAC (C ₁₂ -C ₁₄)]	IT	287-090-7	85409-23-0
779	Produits de la réaction entre l'acide glutamique et la N-(C ₁₂ -C ₁₄ -alkyl)propylènediamine (glucoprotamine)	DE	403-950-8	164907-72-6
785	Acide 6-(phtalimido)péroxyhexanoïque (PAP)	IT	410-850-8	128275-31-0
792	Complexe de tétrachlorodécaoxyde (TCDO)	DE	420-970-2	92047-76-2
811	Phosphate d'argent, de sodium, d'hydrogène, de zirconium	SE	422-570-3	265647-11-8
939	Chlore actif produit in situ par mélange d'acide hypochloreux et d'hypochlorite de sodium	SK	Mélange	Sans objet
813	Acide peroxyoctanoïque	FR	Sans objet	33734-57-5
1014	Zéolite argentée	SE	Sans objet	Sans objet
824	Zéolite d'argent et de zinc	SE	Non disponible	130328-20-0
1013	Zéolite d'argent et de cuivre	SE	Non disponible	130328-19-7
868	Polyhexaméthylènebiguanide	FR	Polymère	91403-50-8
869	Propanoate de α-[2-(didécylméthylammonio)éthyl]-ω-hydroxy poly(oxy-1,2-éthanediyle (sel) (Bardap 26)	IT	Polymère	94667-33-1

Le choix du biocide dépend essentiellement de l'usage qui en est fait et de son spectre d'activité qui peut être bactéricide, sporicide, fongicide et/ou virucide. En industrie laitière, les produits biocides à base de substances actives de la famille des ammoniums quaternaires (AQs) sont parmi les plus utilisés pour agir contre les microorganismes. Lors des procédures de ND, les AQs auront pour cible les cellules bactériennes en se liant aux acides gras et aux groupements phosphate de leur membrane cellulaire qui conduit directement à la fuite des constituants cellulaire, à la lyse et donc à la mort cellulaire (Tableau 4).

Tableau 4 : Cible et mode d'action des principales familles de biocides employées pour le traitement des surfaces en contact avec les aliments (TP4) [17]

Familles	Exemples	Cible et mode d'action
ALCOOLS	Ethanol, Isopropanol	Dénaturation des protéines cytoplasmiques et membranaires, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
ALDEHYDES	Formaldehyde	Altération de la paroi cellulaire, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et des protéines
AMMONIUMS QUATERNAIRES	Benzalkonium	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire → fuite de constituants cellulaires et lyse de la cellule
BIGUANIDES	Chlorhexidine	Liaison aux acides gras et groupes phosphates de la membrane cellulaire → fuite de constituants cellulaires, coagulation du cytosol
HALOGENES CHLORES ET IODES	Hypochlorite de sodium (Javel, Dakin) PVP-iodé	Destruction des protéines membranaires et chromosomiques (halogénéation)
OXYDANTS	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)	Production de radicaux libres qui interagissent avec les lipides, protéines et ADN

Depuis la mise en évidence en 2012 de la présence d'ammoniums quaternaires dans les denrées alimentaires, les industriels formulateurs ont proposé aux professionnels de l'industrie laitière une substance active biocide de la famille des amines, l'Aminopropyldodécylpropane diamine en tant que substance de substitution aux AQs. D'utilisation plus récente, elle fait également partie de la liste positive des substances contenues dans des produits biocides figurant dans le règlement (UE) No. 698/2017 [8] (Tableau 3).

⇒ [Les désinfectants d'usage en industrie laitière](#)

1) Les Ammoniums quaternaires

Les AQs sont des substances tensio-actives cationiques, dérivées de l'ion ammonium de structure générale NR_4^+ (Figure 1).

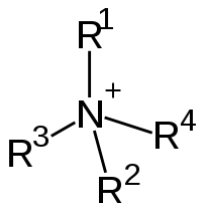


Figure 1 : Structure générale des ammoniums quaternaires

Ces composés sont des molécules amphiphiles compte tenu du fait que leur structure comprend au moins une chaîne aliphatique hydrophobe (R_1), de taille variable, liée à l'atome d'azote cationique. Les autres groupements (R_2 , R_3 et R_4) fixés à l'azote cationique peuvent être des substituants alkyles à longueur de chaîne variable (C_6 à C_{20}), des groupements méthyle ou benzyle. Leurs structures et propriétés auront tendance à différer selon la nature des radicaux attachés à l'atome d'azote.

Les composés d'AQs ont la propriété d'être chargés de façon permanente indépendamment du pH du milieu dans lequel ils se trouvent. Plus largement, ce sont des sels de cations ammonium quaternaires associés à un anion généralement bromure (Br^-), chlorure (Cl^-) ou iodure (I^-). Parmi ces AQs, les chlorures de benzalkonium (BACs, de l'anglais benzalkonium chloride) (Figure 2) et les chlorures de dimethyldialkylammonium (DDACs, de l'anglais dimethyldialkylammonium chloride) (Figure 2) sont les plus largement utilisés lors des procédures de ND en industrie laitière.

- Les **BACs**, sont constitués d'une chaîne aliphatique de 8 à 18 carbones, de deux groupements méthyles et d'un groupement benzyle. En formulation industrielle, les mélanges les plus fréquemment rencontrés contiennent le BAC- C_{12} , le BAC- C_{14} et le BAC- C_{16} , en proportions inégales. Le mélange de BACs présente un avantage puisque chacun des homologues possède une activité biocide propre. A titre d'exemple, les BAC- C_{12} , C_{14} et C_{16} auront respectivement une action plus spécifique sur les champignons et les levures, les bactéries de Gram+, et les bactéries de Gram-. Peu disponible en formulation de manière indépendante, ils sont couramment généralisés et désignés sous le nom de chlorures de benzalkonium.
- Les **DDACs** représentent une autre sous-famille importante d'AQs, très souvent associée à celle des BACs. Les DDACs sont quant à eux composés de deux chaînes aliphatiques de longueur identique et variable selon la molécule, et de deux groupements méthyles. Du point de vue réglementaire, les DDACs sont définis, sous la forme d'un mélange principalement composés de DDAC- C_8 , DDAC- C_{10} et DDAC- C_{12} . Il est à noter que le chlorure de diméthyl-didecylammonium (DDAC- C_{10}) est présent à 90% dans les formulations industrielles [18], ce qui explique qu'il soit le plus fréquemment rencontré en industrie laitière.

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'étude porte sur les BACs C_8 à C_{16} et les DDACs C_{10} à C_{18} dans le but de couvrir la totalité des molécules de ces classes pouvant être utilisées, de manière autorisée ou frauduleuse car non notifiées en tant que SA biocides (ex. DDAC- C_{12-18}), en industrie laitière.

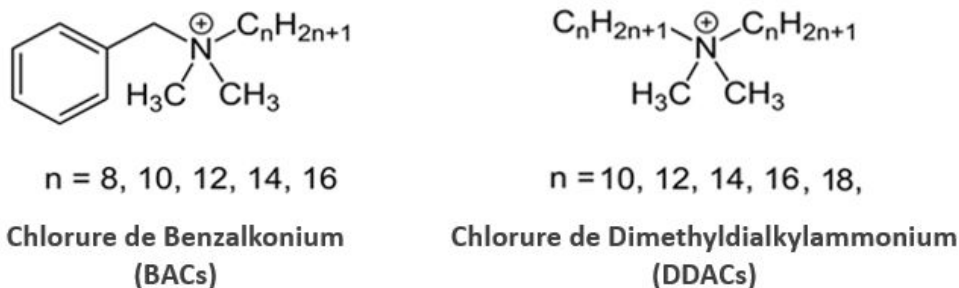


Figure 2 : Structure générale des chlorures de benzalkonium (BACs) et des chlorures de diméthyldialkylammonium (DDACs) étudiés

Les BACs et DDACs retenus dans cette étude sont des composés de masse molaire comprise entre 248 et 550 g/mol et sont constitués de deux parties distinctes : une partie hydrophobe représentée par les groupements alkyles et une partie hydrophile. Cette dernière est caractérisée par l'atome d'azote chargé positivement et qui conserve son caractère cationique à toutes les valeurs de pH. Les BACs et DDACs sont facilement solubles dans l'eau et les solvants organiques polaires. A titre d'exemple, la solubilité du DDAC-C₁₀ est estimée à environ 800 g/L dans l'isopropanol, à 250 g/L dans le n-octanol et proche de 0 g/L dans l'hexane [19, 20]. La notion de solubilité peut s'exprimer par le coefficient de partage octanol-eau (log P ou log K_{ow}) qui est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants à polarité quasi extrême (Equation 1).

Équation 1 : Coefficient de partage octanol-eau

$$\text{Log } P = \frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{eau}}}$$

Pour le DDAC-C₁₀, le coefficient de partage Log K_{ow}, est estimé à 2.59 à 20°C et à pH 7, ce qui signifie, par sa valeur positive du Log K_{ow}, une tendance à être bien plus soluble dans l'octanol que dans l'eau, lui conférant un caractère plutôt lipophile. Ce dernier sera d'autant plus accentué que la ou les chaîne(s) aliphatique(s) seront longues. D'après les données fournies dans le dossier d'enregistrement du DDAC-C₁₀ disponible sur le site de l'ECHA, il aborde un pH de 6.8-6.9, proche de la neutralité en solution aqueuse à 29.5% [19].

2) L'Aminopropyldodécylpropane diamine

L'Aminopropyldodécylpropane diamine est une molécule représentant la famille des amines, parmi les désinfectants notifiés en TP4. Dans cet usage, elle est employée en formulation pour une activité bactéricide en tant qu'agent d'assainissement du matériel de transport, de stockage, de transformation industrielle et de commercialisation des denrées alimentaires d'origine animale et végétale. Elle entre donc dans la composition de nombreuses formulations

industrielles utilisées entre autres en industries laitière, brassicole ou de la viande [21]. Cependant, cette substance active est en cours d'évaluation au niveau européen pour le type d'usage revendiqué et les formulations commerciales la contenant sont à ce jour mis sur le marché sous autorisation transitoire.

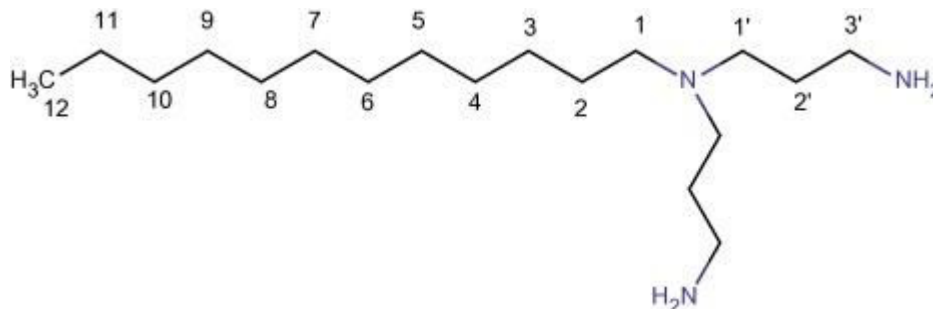


Figure 3 : Structure chimique de l'Aminopropyldodécylpropane diamine

D'un point de vue physico-chimique, l'Aminopropyldodécylpropane diamine est une molécule amphiphile, tout comme les ammoniums quaternaires, portant à la fois une partie hydrophobe et une partie hydrophile. La partie hydrophobe est composée d'une chaîne aliphatique à 12 carbones, tandis que la partie hydrophile contient des amines primaires et tertiaire ionisables. En raison des 3 fonctions amines qui la composent, trois pKa sont rapportés : pK_{a1} : 6.49 ; pK_{a2} : 9.33 ; et pK_{a3} : 10.43 [22]. L'attribution des pKa est relative au degré de substitution des amines composant la molécule. Les règles de basicité désignent les fonctions les plus substituées en groupements électrodonneurs +I comme étant les plus basiques, sauf pour les amines tertiaires qui du fait de leur encombrement sont par défaut moins basiques que les amines secondaire et primaire. Ainsi, le pK_{a1} étant le plus faible est attribué à l'amine tertiaire, tandis que les pK_{a2} et pK_{a3} , relativement proches, sont attribués aux deux amines primaires. Compte tenu de ces informations, l'Aminopropyldodécylpropane diamine se présentera sous différentes formes d'état de charge en fonction du pH du milieu dans lequel elle se trouve, ce qu'illustre parfaitement la Figure 4. Parmi les 6 formes possibles, il est constaté une prédominance de 3 formes :

- Une forme totalement protonée à $pH < 4.49$ ($pH < pK_a - 2$) (en bleu clair),
- Une forme doublement protonée sur les deux amines primaires pour un milieu dont le pH se situe entre 6.49 et 9.33 (en vert),
- et une forme non protonée au-dessus de $pH 12.43$ ($pH > pK_a + 2$) (en bleu foncé).

Ce sont ces différents états structuraux qui confèrent à la molécule des propriétés tensio-actives.

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

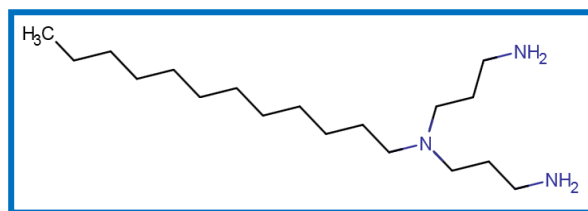
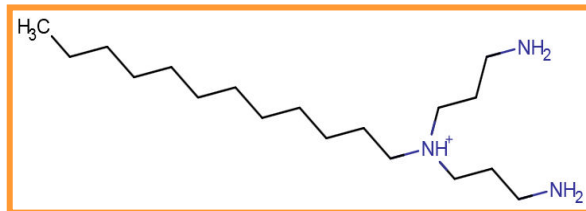
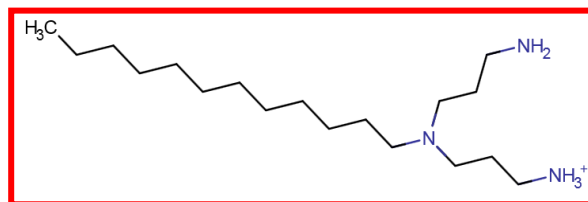
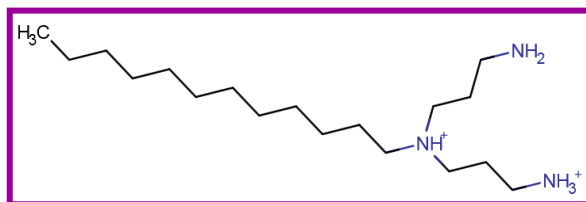
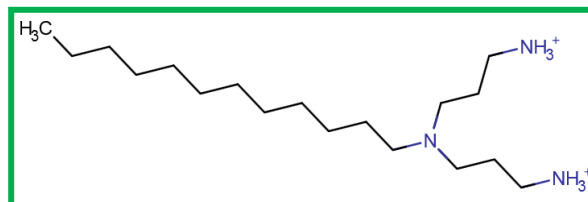
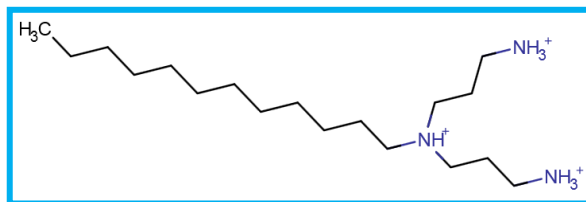
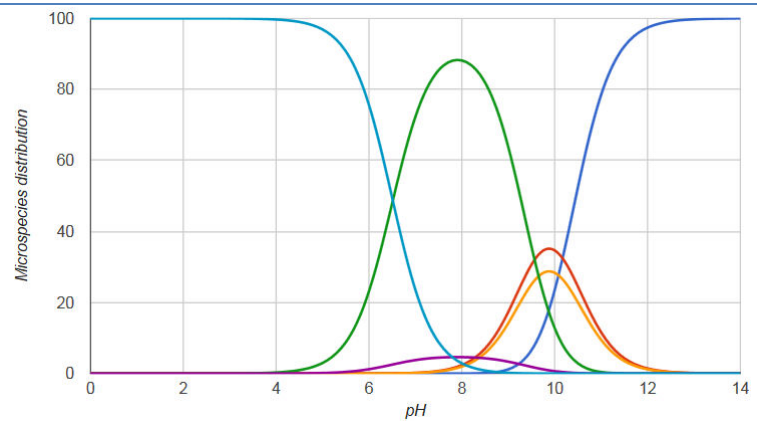
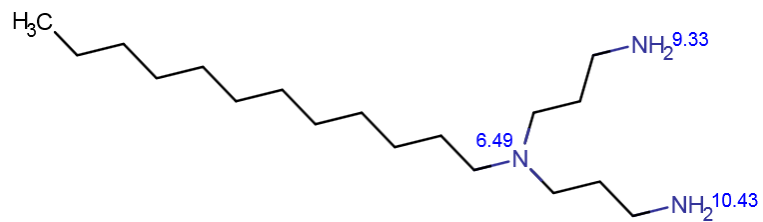


Figure 4 : Diagramme de prédominance des formes structurales de l'Aminopropyldodécylpropane diamine en fonction du pH [22]

L'état structural de la molécule en fonction du pH apporte une information quant à sa solubilité et son affinité pour des milieux polaire ou apolaire. En effet, il est facile de penser qu'elle sera soluble dans un milieu aqueux à pH faible. Pour confirmer ces dires, les constantes logP et logD permettent d'apporter une information de solubilité. Pour des molécules dont la forme varie selon le pH, ce qui est le cas pour l'Aminopropyldodécylpropane diamine, le coefficient logD est plus approprié puisqu'il tient compte du pH du milieu (Equation 2).

Équation 2 : Coefficient de partage octanol-eau en fonction du pH

$$\log D_{\text{acides}} = \log P + \log \left[\frac{1}{(1 + 10^{pH-pK_a})} \right]$$

$$\log D_{\text{bases}} = \log P + \log \left[\frac{1}{(1 + 10^{pK_a-pH})} \right]$$

D'après la figure 5, à des valeurs de pH supérieures à 8, le logD est supérieur à 0 ce qui signifie qu'en milieu alcalin, l'Aminopropyldodécylpropane diamine non protonée, a un caractère plutôt hydrophobe, et sera donc plus soluble dans l'octanol. Ceci se confirme en comparaison avec la distribution des formes selon le pH illustrée en Figure 5.

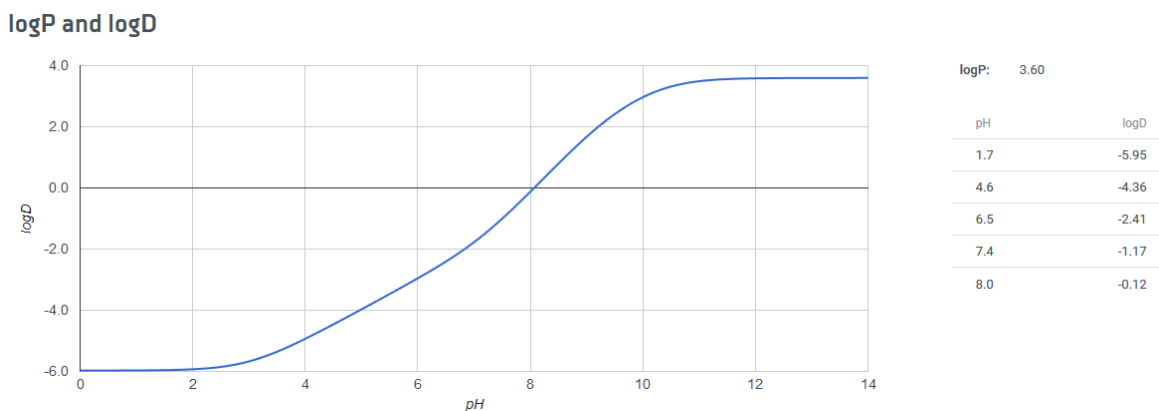


Figure 5 : Représentation graphique du coefficient de partage en fonction du pH [22]

⇒ **De la persistance des biocides désinfectants sur les surfaces à contact alimentaire vers une contamination des denrées et la fixation d'une LMR**

Dans l'UE, le système de réglementation des biocides couvre la fourniture et l'utilisation des BACs et DDAC, comme désinfectants. Toutefois, étant donné que ces produits peuvent également être utilisés pour protéger les plantes contre les maladies, les résidus laissés sur les denrées alimentaires sont couverts par les règles de l'UE sur les résidus de pesticides (produits phytopharmaceutiques). La fixation de la LMR pour les résidus de BACs et de DDACs a été marquée par différentes étapes retracées sur la Figure 6 et expliquée ci-après.

En 2012, lors d'autocontrôles menés dans les entreprises agroalimentaires et suite aux résultats des programmes de surveillance officielle des aliments menés dans certains pays d'Europe (Allemagne, Danemark, Pays-Bas et Belgique), il est apparu que les niveaux de résidus de BACs et de DDAC-C₁₀ dépassaient la LMR par défaut de 0.01 mg/kg en vigueur à cette date [16], dans les aliments tels que les agrumes, la banane, la mangue, l'avocat, le lait et la crème glacée. La teneur maximale détectée s'élève à 6.66 mg/kg dans le lait. A la suite de scénarios d'exposition, l'institut fédéral allemand d'évaluation des risques (BfR « Bundesinstitut für Risikobewertung ») a estimé l'apport alimentaire de résidus de DDAC-C₁₀ et BACs provenant d'aliments contaminés. Les teneurs détectées ne dépassant pas les doses de références établies, le BfR en a conclu l'absence de risque aigu et chronique pour les consommateurs [23, 24] à ce niveau de 0.01 mg/kg. Néanmoins, une réserve était émise pour les BACs pour lesquels un risque aigu ne peut être exclu lors de la consommation de lait et produits laitiers fortement contaminés.

Sur la base d'un modèle pour l'évaluation des risques proposé par l'EFSA (European Food Safety Authority ou Autorité européenne de Sécurité des aliments) et des critères toxicologiques établis par le BfR, un niveau de sécurité à 0.5 mg/kg dans tous les aliments d'origine animale et végétale qui serait sans danger pour les consommateurs est proposé, en Juillet 2012, dans les lignes directrices approuvées par le SCoFAH (de l'anglais « Standing Committee of the Food Chain and Animal Health », ou Comité permanent de la chaîne alimentaire et de la santé animale) [4, 5].

Par la suite, la commission européenne a mis en place une enquête européenne, entre Novembre 2012 et Avril 2013, gérée par l'EFSA où une diversité d'aliments (ex. fruits, légumes, céréales, produits laitiers) a été analysée, avec pour cible les ammoniums quaternaires de type chlorure de Didécylidiméthylammonium (DDAC-C₁₀) et chlorure de Benzalkonium (BACs) afin de fournir des données en vue d'une analyse du risque. Le plus grand nombre de résultats positifs est trouvé dans le lait et les produits laitiers, soit 12% de résultats positifs, avec des niveaux de contaminations pouvant atteindre, dans la crème glacée, des teneurs respectives de 3.64 mg/kg et 1.74 mg/kg pour le DDAC-C₁₀ et les BACs [3]. Compte tenu qu'aucune LMR spécifique n'a été fixée jusqu'alors pour les BACs et le DDAC-C₁₀ et en se fondant sur les données de surveillance de 2012 et 2013 disponibles, la Commission Européenne dans son Règlement (UE) No. 1119/2014 [15] a donc convenu de fixer des LMRs provisoires à 0.1 mg/kg dans les aliments, et qui seront réexaminées tous les cinq ans.

La figure 6 illustre l'évolution des LMRs relatives aux résidus de BACs et de DDACs.

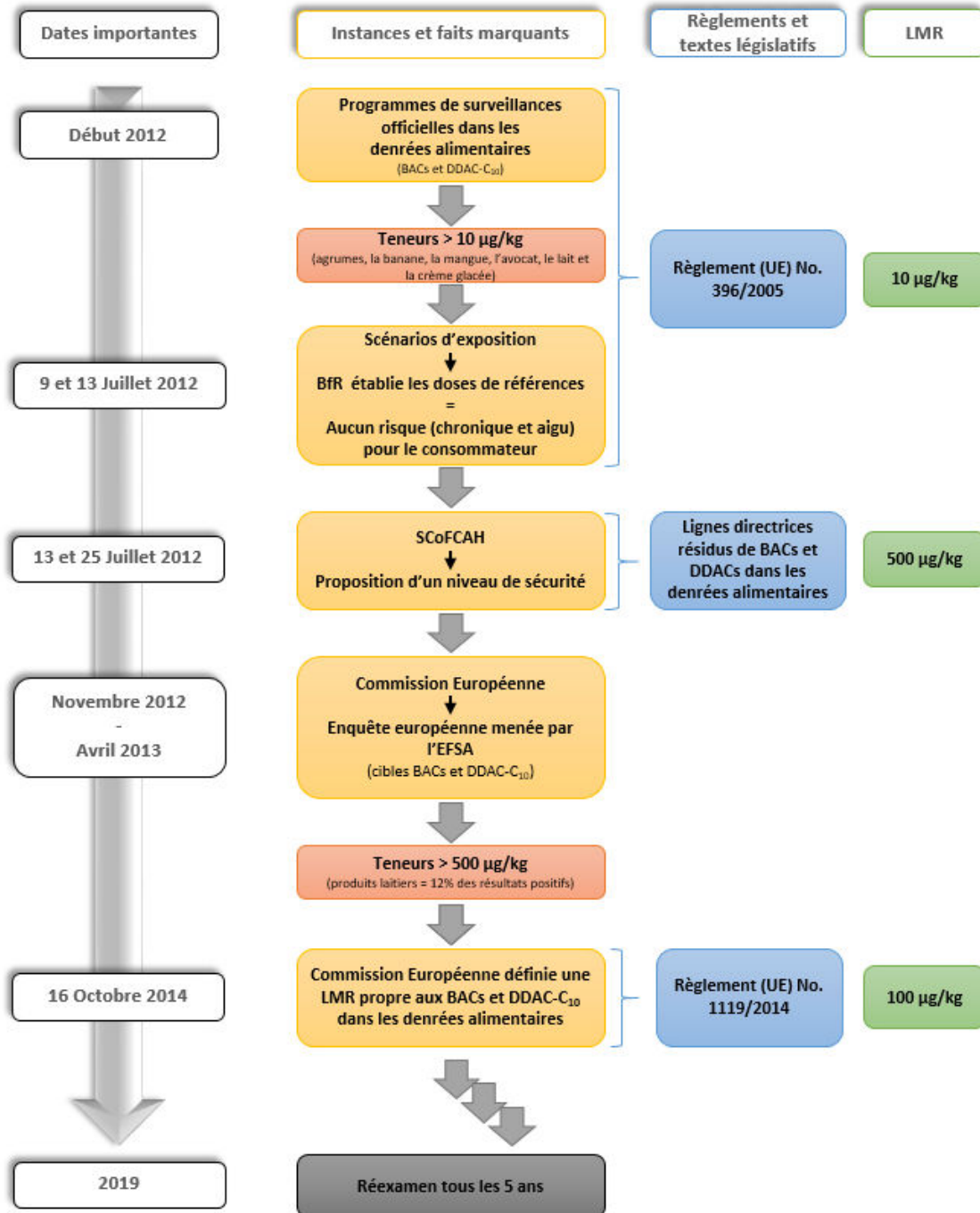


Figure 6 : Evolution réglementaires des LMRs concernant les BACs et DDAC-C₁₀

1.1.4.3 Méthodes d'autocontrôle

En IAA, les industriels mettent en place des contrôles permettant de s'assurer que les opérations de ND ont été réalisées correctement et en accord avec les lignes directrices établies dans les plans imposés par le règlement (UE) No. 852/2004 [2]. Il existe de nombreuses

méthodes d'autocontrôles adaptées d'une part aux risques biologiques et d'autre part aux risques chimiques (Figure 7) [25].

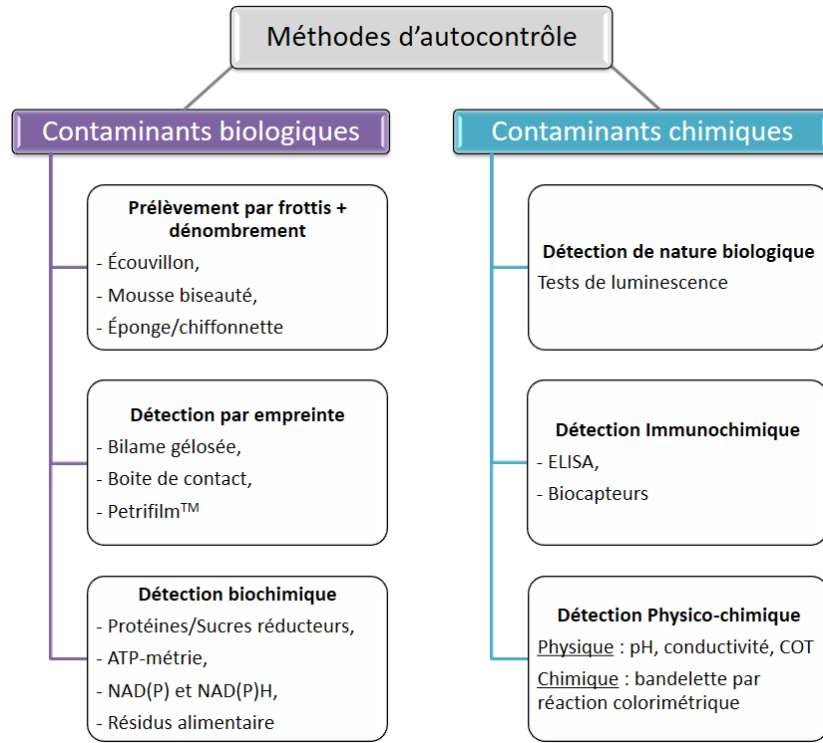


Figure 7 : Méthodes d'autocontrôle utilisées en Industrie Agroalimentaire (IAA) pour valider les procédures de nettoyage-désinfection

Les moyens d'autocontrôles biologiques utilisés en IAA reposent sur la détection de microorganismes adhérents. Ils sont basés sur des prélèvements par frottis, des prélèvements par empreinte ou sur des tests rapides mettant en œuvre une détection biochimique.

Les autocontrôles relatifs aux contaminations chimiques se déclinent selon différents types de méthodes permettant la détection de résidus de biocides dont les tests physico-chimiques qui sont les plus couramment utilisés en IAA. Ils proposent différents champs d'action tels que le contrôle des solutions initiales de désinfection, des surfaces et des eaux de rinçage, ou un suivi en ligne et continu des résidus de substances chimiques. Parmi celles-ci on distingue les méthodes chimiques, basées sur des tests de bandelettes, permettant par réaction colorimétrique de vérifier la présence de résidus de biocides (MQquant® - Merck, Quantofix® – Macherey Nagel). Ces tests à détection rapide présentent deux facteurs limitants : (i) les seuils de détection élevés annoncés (10 ppm) ne permettent pas d'apprécier de faibles concentrations en biocides dans les eaux de rinçage ou sur les surfaces et (ii) ces bandelettes manquent de spécificité en termes de distinction entre différentes familles de biocides (ex. BACs et DDACs).

Actuellement, les acteurs du secteur agroalimentaire disposent d'outils à réponse rapide mais qui manquent de performances, à savoir un manque de sensibilité et de spécificité. Hormis le contrôle des surfaces et des eaux de rinçages, aucune des méthodes pré-citées n'est capable de doser de manière précise ces résidus dans les aliments.

1.2 Procédés de transformation du lait et composition des produits laitiers : impact sur le devenir des résidus de biocides

Suite aux différents plans de surveillance européens ciblant les BACs et DDACs dans les aliments, des concentrations élevées (> 500 µg/kg) ont été détectées particulièrement dans les produits laitiers, et ceci avec une concentration tendant à augmenter dans les produits transformés tels que les fromages et les crèmes glacées (Annexe 1). Il est donc nécessaire de se pencher sur les procédés de transformation du lait et d'en déterminer l'impact sur les résidus de biocides. Deux aspects seront étudiés :

- La teneur en résidus de biocides dans les produits transformés impactée directement par les différents procédés de fabrication,
- La production d'éventuels produits néoformés qui résulterait d'une réaction des biocides avec les constituants de la matrice, ou de leur dégradation et/ou transformation suite aux procédés de fabrication.

Au-delà du choix des substances étudiées, les ammoniums quaternaires (BACs et DDACs) et l'Aminopropyldodécylpropane diamine, en fonction de leur prédominance en termes d'usage dans l'industrie laitière, il est tout aussi important de sélectionner des produits laitiers qui seraient les plus susceptibles d'être confrontés à cette problématique et de développer des méthodes à même d'y répondre. Le choix s'est donc fait à l'issue d'une concertation avec les membres du projet Resbiolact et l'interprofession laitière, de sorte à balayer au mieux la variété de produits laitiers. Naturellement, le lait cru a été sélectionné comme étant la matière première représentant la filière laitière. Cette matrice étant la moins impactée par les procédés de transformation. Deux types de fromages à affinage, le fromage à pâte pressée cuite (PPC) et le fromage fondu (FF), ainsi que la poudre de lait ont été retenus à l'étude en raison [26] :

- d'une consommation importante de fromages en France après le lait et les yaourts,
- d'une consommation quasi exclusive de poudre de lait pour les nourrissons et les enfants en bas âge,
- de procédures de fabrication conséquentes faisant appel à des traitements thermiques et mécaniques,

- d'une composition hétérogène de constituants pouvant réagir avec les biocides.

Afin de comprendre au mieux comment ceux-ci pourraient avoir un impact sur les résidus de biocides, il semble judicieux d'exposer brièvement les différents procédés de fabrication des produits laitiers retenus.

1.2.1 La fabrication et la composition des produits laitiers

⇒ **Les procédures de fabrication des produits laitiers**

A l'issue de la collecte, les laits mélangés (ou lait-mélange) sont directement conditionnés à froid. Le lait subit ensuite un traitement mécanique appelé écrémage qui conduira à la fabrication de laits à différentes teneurs en matière grasse (ex. lait entier, lait écrémé ou demi-écrémé), puis un traitement thermique tel que la pasteurisation qui consiste à chauffer le lait à 63°C pendant 30 secondes ou à 72°C pendant 15 secondes. Ces premières étapes sont nécessaires pour éviter le développement de bactéries et assurer une conservation dans les meilleures conditions [27].

Le traitement du lait en ses produits dérivés repose essentiellement sur des procédés de transformation physique (actions mécaniques, thermiques) et chimique (ajouts de sels et autres additifs alimentaires). Les produits ainsi fabriqués tels que le fromage et la poudre de lait se déclinent en variétés diverses selon la nature et l'origine du lait.

La fabrication d'un type de fromage suit un cahier des charges bien défini qui est propre à un procédé de transformation particulier [28]. Néanmoins, on retrouve de grandes étapes pour la plupart incontournables, telles que la traite et la collecte du lait, la pasteurisation, le caillage, le tranchage, le moulage et l'égouttage, le salage (ou saumurage) et l'affinage. Le caillage et le tranchage vont permettre de séparer le caillé du petit-lait (ou lactosérum). A l'issue du moulage et de l'égouttage, le lactosérum riche en protéines est récupéré. La pasteurisation et l'affinage sont optionnelles et fonctions du type de fromage souhaité. Au cours de la fabrication des fromages, des analyses sont réalisées pour assurer la qualité du produit.

Les fromages fondus (FF) ont la particularité d'être fabriqués à partir de fromage PPC peu affiné (Figure 8), et font intervenir un traitement thermique supplémentaire (pasteurisation à 72°C) après l'ajout de sels de fonte et de matière grasse (Figure 9).

La fabrication de la poudre de lait, adulte et infantile, repose essentiellement sur des procédés de déshydratation établis sur plusieurs étapes (Figure 10) incluant celles nécessaires au traitement du lait (collecte, dépotage et stockage en laiterie, écrémage et standardisation, et pasteurisation). Une fois le lait pasteurisé et exempté de microorganismes indésirables pour l'homme, la procédure propre à la fabrication de la poudre de lait, à savoir la concentration par évaporation sous vide, le séchage et la microfluidisation, peut avoir lieu (Figure 10).

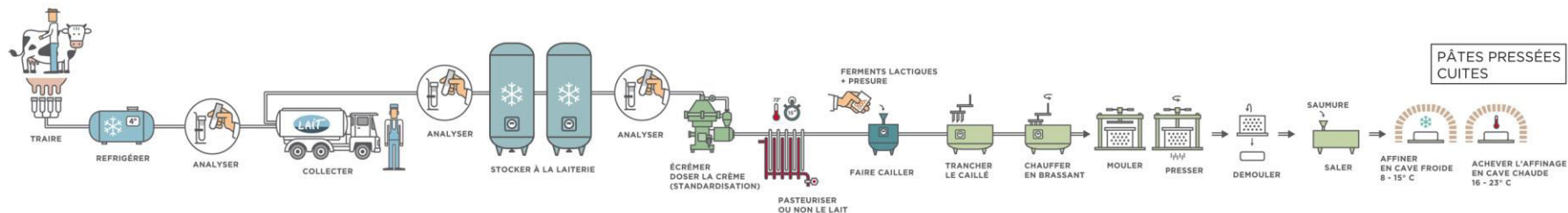


Figure 8 : Procédure détaillée de fabrication des fromages à pâtes pressées cuites

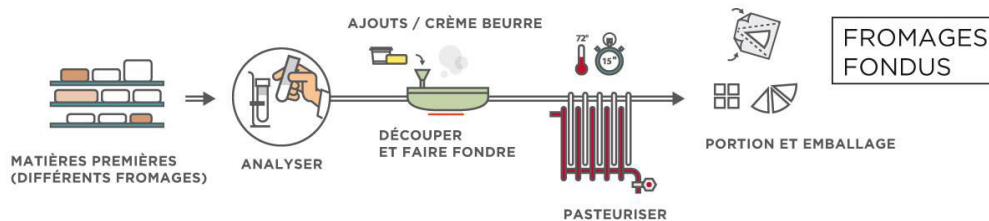


Figure 9 : Procédure détaillée de fabrication des fromages fondus

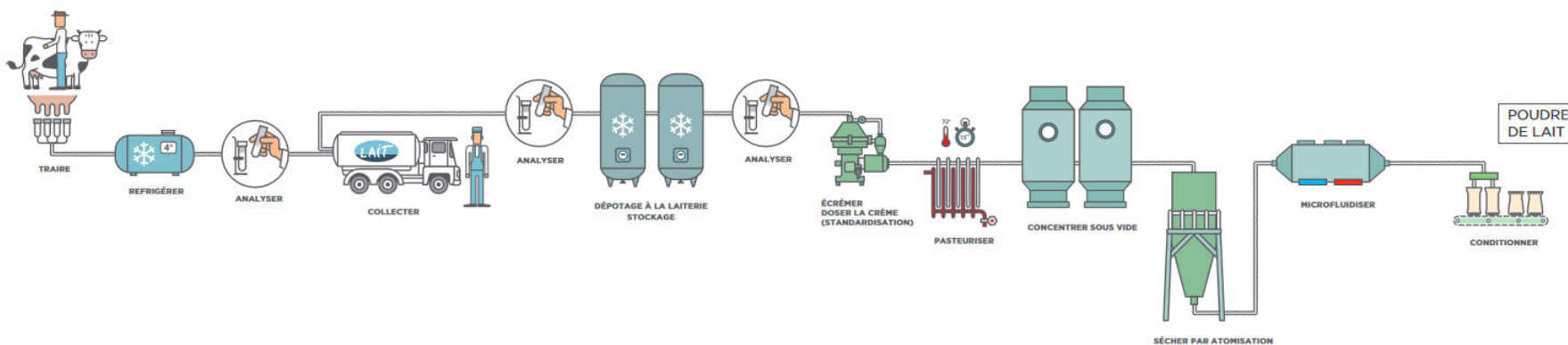


Figure 10 : Procédure détaillée de la fabrication de la poudre de lait [29]

La fabrication de fromages et de poudres de lait nécessite entre 8 et 12 litres de lait pour en obtenir 1 kilogramme (Tableau 5) [30]. Compte tenu de ces quantités, un facteur de concentration d'environ (x10) peut être considéré. Ainsi, les constituants du lait, détaillés ci-après, peuvent afficher des valeurs 10 fois supérieures que dans le lait.

Tableau 5 : Quantités de lait entier nécessaires à la fabrication de quelques produits laitiers [30]

Produits laitiers	Nombre de litres de lait entier	Coproduits
1 kg de beurre	22 litres	Lait écrémé, babeurre
1 kg d'emmental	12 litres	Lactosérum
1 litre de yaourt entier	1 litre	
4 camemberts de 250 g (soit 1 kg)	8 litres	Lactosérum
1 kg de lait en poudre	8,5 litres	
1 kg de lait écrémé en poudre	10,6 litres	Crème

⇒ **La composition des constituants des produits laitiers**

Le lait et les produits laitiers apparentés sont composés à près de 90% d'eau, les 10% restants étant répartis entre les protéines, les glucides, les lipides et les minéraux, dont les teneurs respectives varient en fonction du type de lait (entier, écrémé, demi-écrémé) et des traitements appliqués pour leur fabrication. Cette composition majoritairement aqueuse du lait lui confère des propriétés physico-chimiques très proches de celles de l'eau avec une densité moyenne de 1.03 g/mL et un pH de 6.6 avoisinant la neutralité [31]. La teneur en eau sera moindre dans les fromages (ex. PPC à 38%) et la poudre de lait (4%) en raison des procédés appliqués.

➤ Les protéines :

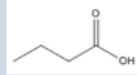
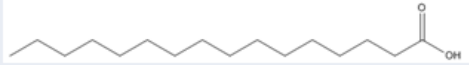
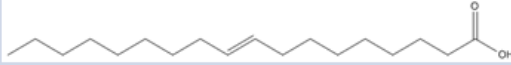
Les protéines dites solubles ou caséines entières sont les protéines majoritaires, à 80%, du lait de vache. Les caséines sont des polypeptides phosphorés qui par hydrolyse vont libérer les acides aminés (acide glutamique, proline, leucine, sérine) les constituant. Ces protéines sont connues pour être sensibles aux modifications chimiques du milieu. A titre d'exemple, lors de la fabrication du fromage, l'adjonction d'acide ou d'enzyme (ex. présure) induit leur précipitation qui conduit à la formation du caillé [32].

➤ Les lipides :

Les constituants lipidiques contenus dans les produits laitiers sont classés en quatre grands groupes : (i) les acides gras, (ii) les lipides simples (ex. glycérides), (iii) les lipides complexes (ex. phospholipides), et (iv) les lipides isopréniques (ex. Cholestérol et Vitamines). Les glycérides, constituant majoritaire du lait, sont le résultat d'une réaction d'estérification entre des acides gras et de glycérol présents dans le lait. On recense près de 400 acides gras dans le lait qui

diffèrent selon la longueur de la chaîne carbonée (C4 à C26), le nombre et la position des liaisons insaturées (Tableau 6) [33].

Tableau 6 : Acides gras contenus dans le lait de vache

Catégorie	Atomes de carbone	Teneur dans le lait	Exemple
Acides gras courts	4 à 11	10%	Acide butyrique (C4:0) 
Acides gras moyens	12 à 17	48%	Acide palmitique (C16:0) 
Acides gras longs	18 à 26	42%	Acide oléique (C18:1 n-9) 

➤ Les glucides :

Le lactose représente le seul glucide présent dans le lait avec une teneur de l'ordre de 50 g/L. D'un point de vue physico-chimique, le lactose peut s'hydrolyser, par l'action de bactéries lactiques, en glucose et galactose (Figure 11).

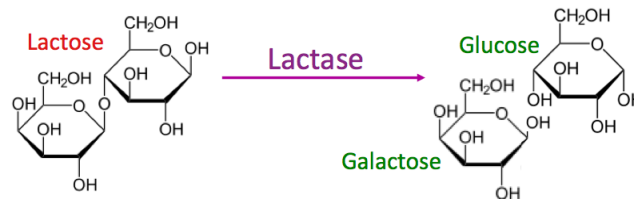


Figure 11 : Réaction d'hydrolyse du lactose en glucose et galactose

Dans les fromages, la proportion de glucides notamment de lactose est proche de zéro. Lors de la fabrication, le lactose sera éliminé dans le lactosérum tandis que la proportion restante, présente dans le fromage, sera impliquée dans un mécanisme de fermentation des bactéries lactiques qui produiront de l'acide lactique au cours de l'affinage. Ceci explique que les fromages soient connus comme une denrée plus acide que le lait. Cette information peut présenter un intérêt lors du développement de la méthode d'analyse, où le pH de la matrice peut avoir une influence sur les résultats notamment au cours de l'extraction. Néanmoins, les fromages fondus présentent une proportion maximale de 6% de glucides. Deux raisons sont à l'origine de cette teneur : (i) des fromages PPC peu affinés sont utilisés pour la fabrication des fondus ce qui implique qu'ils puissent contenir des traces de glucides et (ii) du sucre est ajouté au cours de leur fabrication. De même, les poudres de lait présentent une teneur en glucides d'environ 20%, expliqué par le facteur de concentration (x10) induit lors de leur fabrication.

De manière générale, les fortes teneurs en constituants (protéines et lipides) dans les produits transformés du lait sont directement liées à la déshydratation qui induit un phénomène de concentration lors du procédé de fabrication.

1.2.2 Impact sur les résidus de biocides

Les informations, mentionnées ci-dessus, relatives aux différentes étapes de la fabrication des produits laitiers ainsi que la composition de ces derniers permettent d'émettre des hypothèses quant au devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers.

➤ Concentration en résidus

Les procédés de transformation du lait peuvent avoir un impact sur la teneur en désinfectants dès lors qu'ils ont été transférés de la surface vers l'aliment. Ainsi mentionné précédemment, un facteur de concentration d'environ (x10) est induit par les différentes étapes de la fabrication des fromages et de la poudre de lait. De ce fait, un produit transformé dont le lait contient des résidus de biocides pourrait en contenir une teneur 10 fois supérieure à celle du lait. Le questionnement sur la teneur en résidus dans le fromage est donc d'intérêt.

Des études ont montré des concentrations en résidus d'AQs plus élevées dans les produits laitiers (fromage, crème glacée) [3, 34, 35] que dans le lait. Ces teneurs peuvent avoir deux origines : (i) une concentration des résidus de biocides initialement présents dans le lait et (ii) une rémanence et un transfert de résidus des surfaces alimentaires vers les aliments durant les procédés de transformation peuvent également impacter la teneur en biocides dans le fromage ou la poudre de lait.

La composition des produits laitiers à l'étude a montré que les produits intermédiaires et finis présentent majoritairement une teneur en lipides plus importante que le lait cru. Les propriétés physico-chimiques de ces désinfectants indiquent un caractère lipophile principalement dû à la présence de chaînes aliphatiques. Cette analyse permet d'émettre l'hypothèse que les résidus présents sur le matériel de fabrication seraient transférés dans les produits laitiers de par leur affinité avec la matière grasse. Dans ce cas, un excès de résidus de biocides dans ces produits laitiers pourrait être expliqué au-delà de la simple concentration. Les procédés de transformation ont donc un rôle important dans l'analyse des teneurs en biocides dans le lait et les produits laitiers.

➤ Production de produits néoformés

Au cours du processus de transformation des aliments, des réactions chimiques peuvent se produire et provoquer la formation de nouvelles substances qui peuvent, pour certaines, être indésirables [36-40]. Ces réactions sont parfois souhaitées, tel est le cas lors du processus de torréfaction où les composants des grains de café subissent des changements structurels qui

sont à l'origine de l'arôme du café [41]. Ces composés, qualifiés de produits néoformés, peuvent apparaître à la suite d'un traitement thermique, au cours de procédés de fermentation ou de conservation. Ce phénomène est relativement bien connu dans le domaine alimentaire. L'impact de la cuisson des aliments (ex. viandes, poissons) [38, 42-46] en est le principal exemple avec la formation d'acrylamide, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), d'amines aromatiques hétérocycliques (AAH), qui peuvent avoir un effet néfaste sur la santé du consommateur [47]. Ces substances chimiques sont généralement obtenues par réaction de Maillard qui se produit entre un sucre réducteur et une substance azotée et est influencée par la température. D'autres réactions peuvent également avoir lieu telles que l'oxydation des lipides dont les acides gras, les triglycérides et les phospholipides sont les cibles, ou des liaisons peptidiques pouvant être formées suite à une réaction des acides aminés ou des lipides avec des contaminants chimiques présents dans les aliments. Des études portant sur le devenir des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées alimentaires ont été menées [48-54]. La littérature ne révèle aucune étude portant sur les produits de transformation de biocides désinfectants.

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons aux produits néoformés liés à la présence de biocides désinfectants dans les produits laitiers qui seraient induits par les différents traitements réalisés lors de leur fabrication et/ou par réaction avec les constituants de la matrice, qui à ce jour ont fait l'objet d'aucune étude. Dans ce sens, on entendra par produits néoformés, toutes substances issues de la dégradation dans le lait ou de la réaction des résidus de biocides désinfectants avec les constituants du lait, et/ou obtenues suite aux différents traitements essentiellement thermiques réalisés lors de la fabrication des produits laitiers. Parmi les désinfectants à l'étude, l'Aminopropyldodécylpropane diamine présentant des fonctions amines primaires pourrait potentiellement réagir avec les constituants de la matrice.

2. TECHNIQUES ET METHODOLOGIE POUR L'ANALYSE DE RESIDUS DE BIOCIDES DESINFECTANTS DANS LES MATRICES ALIMENTAIRES

La détermination de résidus dans des matrices alimentaires complexes nécessitent de mettre en place une méthodologie analytique dont les aspects les plus importants relèvent de la préparation d'échantillon, la détection et l'identification des composés d'intérêts à de faibles niveaux de contamination. Une dernière étape consiste à évaluer les performances de la méthode afin de la valider pour l'usage attendu et d'en définir le domaine de validité (Figure 12). Dans cette partie, nous allons présenter d'après les données relevées dans la littérature les différentes méthodes disponibles pour l'analyse quantitative des résidus d'ammoniums quaternaires et d'Aminopropyldodécylpropane diamine recherchés dans les matrices alimentaires.

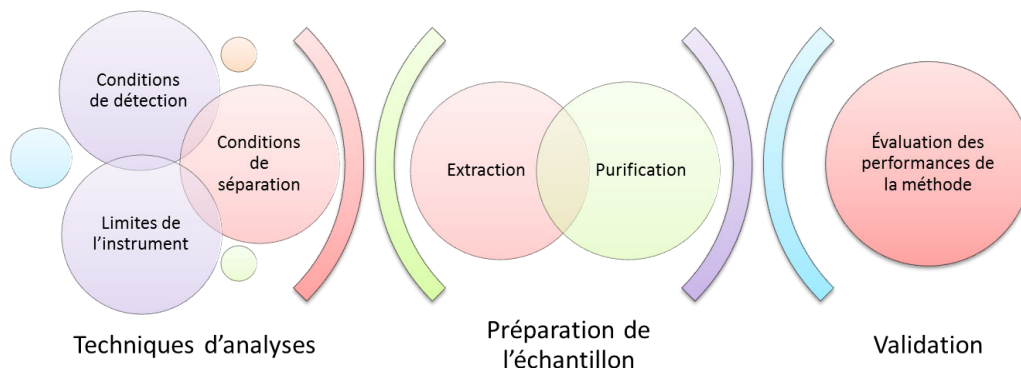


Figure 12 : Principales étapes d'une procédure analytique employée pour la détermination de contaminants dans des matrices alimentaires

2.1 Détermination des biocides désinfectants

2.1.1 Techniques de séparation

2.1.1.1 Les Ammoniums Quaternaires

La Chromatographie liquide à polarité de phase inverse (RPLC, de l'anglais « Reverse Phase Liquid Chromatography ») s'avère être la technique la plus largement employée pour l'analyse séparative des ammoniums quaternaires de type BACs et DDACs [34, 55-67]. Les auteurs expliquent ce choix par un apport accru en sélectivité et en sensibilité qui permet d'atteindre des limites de détection basses. Toutefois, la chromatographie en phase gazeuse (GC, de l'anglais « Gas Chromatography ») a été utilisée dans le cas d'une étude portant sur l'analyse du DDAC-C₁₂ dans les légumes [68]. Il s'agit d'un des rares cas, voire le seul, où la GC a été employée pour séparer les AQs présents dans les denrées alimentaires. Dans le cas de l'analyse en GC, une étape de déquaternisation est nécessaire et une perte d'information est une conséquence [69]. De ce fait, la LC paraît comme la technique de choix pour l'analyse des AQs.

En LC, trois paramètres principaux sont à prendre en considération lors du développement de la méthode, (i) la colonne analytique, (ii) le mode d'élution et (iii) la phase mobile.

Malgré la diversité des colonnes chromatographiques disponibles sur le marché, une prédominance de la phase stationnaire de type octadecyl (C18) est constatée pour l'analyse des BACs et DDACs [56, 61-63, 70]. Ce choix peut s'expliquer par la polarité de ces analytes qui présentent une ou deux chaîne(s) aliphatique(s) de longueur variable (C8 à C18) à affinité pour la phase stationnaire retenue. Toutefois, deux études montrent l'usage d'une colonne à interaction hydrophile (HILIC) pour la séparation chromatographique de certains AQs (BAC-C₁₀ à C₁₆ et le DDAC-C₁₀) dans le lait et la poudre de lait reconstituée [55, 60].

L'analyse de la littérature scientifique a révélé que l'élution en mode gradient est particulièrement employée pour l'analyse multirésidus d'ammoniums quaternaires. En effet, ce

mode est le plus adapté compte tenu du nombre et de la structure proche mais différente des analytes. Néanmoins, des études portant sur l'analyse des BACs et DDAC-C₁₀ dans le lait et la poudre de lait proposent une séparation en mode isocratique [55, 60].

La phase mobile présente une composition très variée selon les études, aboutissant dans tous les cas à une séparation nette des BACs et DDACs. Plusieurs méthodes ont été développées pour la séparation des BACs et DDACs en utilisant la LC au moyen d'un gradient binaire avec pour solvant d'élution les couples eau/méthanol [56, 62-64, 70] ou eau/acétonitrile [34, 55, 60, 64, 65, 71, 72]. L'ajout de tampon et d'acide dans les éluants est courant pour maintenir la stabilité du pH de la phase mobile. En effet, certains composés nécessitent des conditions de pH spécifique pour permettre aux molécules ionisables d'être sous leur forme la plus adaptée à l'analyse, raison qui ne peut être directement applicable aux sels d'AQs, ionisés quel que soit le pH de la solution. Pour la séparation des AQs, les auteurs acidifient la phase mobile par l'ajout d'un acide faible (acide acétique ou formique) dans les éluants [34, 55, 56, 60, 64, 72]. L'acidification de la phase mobile offre deux avantages, (i) elle permet la neutralisation des groupements silanols pour ainsi réduire les interactions secondaires, et (ii) elle permet de contrôler les états d'ionisation des analytes en RPLC. Certains auteurs ajoutent également une solution tampon, généralement de l'acétate ou du formiate d'ammonium, dont l'addition semble améliorer la séparation chromatographique [55, 60, 62, 63, 65, 70-72].

2.1.1.2 L'Aminopropyldodécylpropane diamine

L'analyse de la littérature scientifique n'a révélé aucune méthode d'analyse quantitative de résidus d'Aminopropyldodécylpropane diamine dans des matrices alimentaires ou même environnementales. De plus, très peu d'auteurs mentionnent l'Aminopropyldodécylpropane diamine dans le cas d'analyses qualitatives [73-75]. Une première étude de 1977 [73] révèle qualitativement la présence de l'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les crevettes. L'analyse a été réalisée par GC avec dérivation de cette polyamine par chauffage et en présence d'une solution d'acide trifluoroacétique. Des études plus récentes dont les seuls travaux ont été publiés concernent des méthodes de spectrométrie RMN, de titration acide-base et de séparation en LC [74], et une technique plus originale basée sur un dispositif composite hybride [75], pour cette substance active dans des formulations commerciales. L'étude de Mondin et al. [74] montre une séparation en chromatographie liquide en phase inverse avec pour conditions, une colonne C18, une phase mobile composée d'eau et d'acétonitrile tous deux acidifiés par un agent d'appariement d'ion perfluoré (PFPA, de l'anglais PentaFluoroPropionic Acid), et une élution en mode gradient. L'analyse de la littérature a été élargie aux méthodes d'analyses d'amines biogènes et de polyamines pouvant avoir une structure proche de celles de l'Aminopropyldodécylpropane diamine. Dans ce cas également, la RPLC s'avère être la technique la plus employée [76-91]. Deux approches analytiques, (i) la dérivation et (ii) la chromatographie d'appariement d'ions, susceptibles de convenir à

l'Aminopropyldodécylpropane diamine, sont toutes deux largement employées pour l'analyse de composés à groupement amine difficilement analysables en RPLC.

La dérivation est utilisée pour neutraliser les fonctions amines qui, sans cette réaction, induisent un état de charge de la molécule variable selon le pH, ce qui constitue une contrainte pour la rétention en phase inverse. Ainsi, par réaction avec un agent de dérivation spécifique, un composé dérivé ne présentant pas d'état de charge multiple sera obtenu, facilitant ainsi la séparation chromatographique. La dérivation est largement utilisée pour ajouter notamment un groupement chromophore permettant l'analyse des amines en Ultraviolet (UV) ou pour ajouter un groupement fluorescent pour une analyse par LC/fluor [81, 82, 85, 89-91]. Toutefois l'analyse en spectrométrie de masse n'est pas exclue [87, 92-94]. Les réactifs de dérivation tels que le chlorure de dansyl [78] ou de dansyl [78, 84, 85, 87, 88, 92, 93, 95, 96], l'*o*-phthalaldehyde (OPA) [97-99], la 1,2-Naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) [75], la fluoescamine [95], le chloroformiate de 9-fluorénylméthyle (FMOC) [98] sont les plus utilisées pour réagir avec les amines biogènes et les polyamines.

La chromatographie d'appariement d'ions dont le mécanisme de rétention repose sur la formation d'une paire d'ions entre l'analyte chargé et l'agent d'appariement d'ions de charge opposée représente la seconde approche analytique. La nature de l'agent d'appariement d'ions est choisie pour son affinité avec la phase stationnaire afin d'augmenter la rétention de la paire formée. L'analyse de littérature scientifique a révélé l'usage d'acides forts tels que l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) ou l'acide pentafluoropropionique (PFPA), comme agents d'appariement d'ions [74, 89-91, 97, 100]. Leur utilisation est généralement combinée à celle d'un acide faible (ex. acide propionique) pour limiter l'effet supprimeur d'ion largement mentionné lors de l'ionisation en electrospray de composés basiques [89, 91, 101, 102].

Concernant la colonne analytique utilisée pour la séparation des composés présentant un ou plusieurs groupements amines, la phase stationnaire de type C18 est privilégiée. Le niveau de pureté de la silice est un facteur pouvant avoir une influence sur la rétention et donc sur la capacité séparative de la colonne. Il est donc recommandé d'utiliser une phase stationnaire à silice ultrapure en raison de l'absence de métaux en son sein qui pourraient chélater les composés d'intérêt présentant des fonctions amines.

2.1.2 Techniques de détection

2.1.2.1 Les détecteurs Ultraviolet et fluorimétrique

Le couplage à des détecteurs Ultraviolet (UV) ou fluorimétrique (dit détection fluo) est une technique communément employée pour l'analyse d'AQs, et d'amines biogènes et polyamines ayant été dérivées. Plus particulièrement, ce mode de détection a été utilisé dans de nombreuses études portant exclusivement sur l'analyse des BACs dans des échantillons environnementaux et des formulations commerciales [65, 66, 69, 103]. Cette technique implique une spécificité structurale de la molécule, à savoir un groupement chromophore. De ce fait, ce mode de détection reste limité lors de l'analyse de composés à propriétés variées. Ceci est le cas lors d'analyse multi-résidus d'ammoniums quaternaires, faisant intervenir les BACs et les DDACs, sachant que ces derniers ne présentent aucun groupement chromophore et ne peuvent subir aucune réaction de dérivation. L'analyse exclusive de la littérature sur les matrices alimentaires ne révèle aucune méthode à détection UV, compte tenu du fait que les études portent sur l'analyse multirésidus de BACs et DDACs.

2.1.2.2 La détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS, de l'anglais « *Mass Spectrometry* ») (Figure 13) s'est imposée au fil du temps comme la technique de choix permettant une spécificité et une sensibilité accrue. De plus, la littérature fait état de l'usage de la spectrométrie de masse pour la quantification de résidus de biocides [34, 55-57, 59, 60, 68, 72], et d'amines biogènes et de polyamines [74, 87, 89-91, 93, 94, 96, 100] dans des matrices alimentaires.

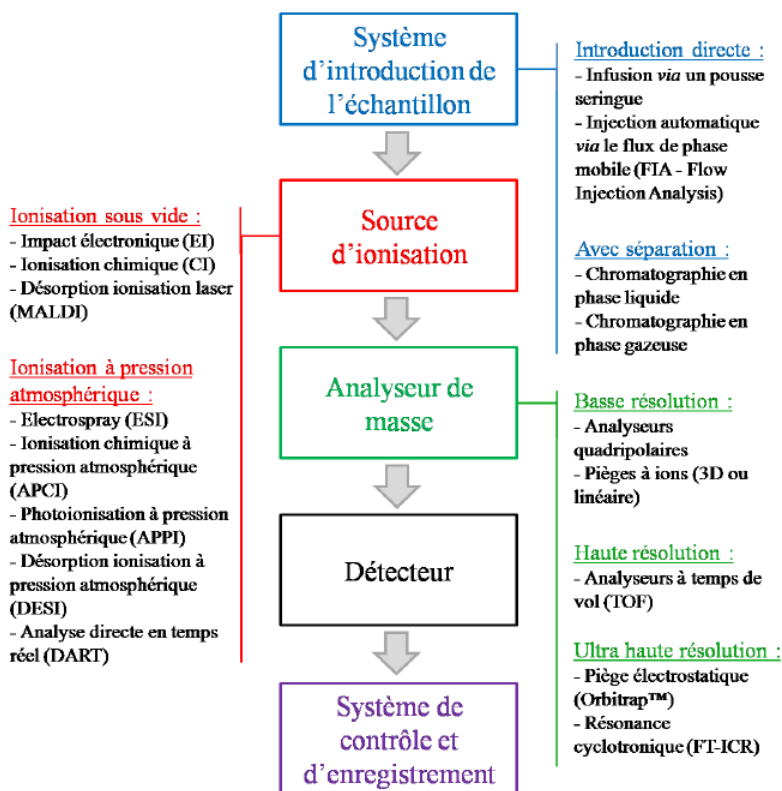


Figure 13 : Schéma de présentation général d'un système analytique de spectromètre de masse

Pour l'analyse de résidus de contaminants alimentaires après une séparation en LC, l'ionisation est généralement réalisée en mode electrospray (ESI, de l'anglais « *electrospray ionization* »). Le procédé d'ionisation ESI conduit à la formation d'ions mono- et multichargés positivement en mode positif ou d'ions chargés négativement en mode négatif. L'ESI est méthode d'ionisation dite « douce » puisqu'elle permet l'ionisation de molécules peu volatils et de polarité moyenne à forte sans fragmentation induite.

Les ions formés en ESI sont accélérés et focalisés jusqu'à l'analyseur en vue de les séparer selon leur rapport m/z . Il existe de nombreux analyseurs répondant à des usages divers. Pour l'analyse ciblée de résidus de biocides et d'autres contaminants dans les matrices alimentaires, l'analyse de la littérature scientifique montre la prédominance de l'usage de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) de type triple quadripôle (tQ). Pour l'analyse ciblée de résidus de contaminants alimentaires, le mode d'acquisition MRM (Multiple Reaction Monitoring) est généralement utilisé puisqu'il permet de disposer de transitions MRM pour chaque molécule afin d'apporter une spécificité d'analyse.

Néanmoins, quelques études font usage de la technologie à temps de vol (TOF, de l'anglais « Time of flight ») pour l'analyse des AQs et polyamines [59, 93, 94] [ref].

Compte tenu des informations extraites de cette partie relative à la détermination des résidus de biocides désinfectants, il s'avère que la LC-ESI-MS/MS constitue un outil analytique de choix pour des approches d'analyse ciblée. La spectrométrie de masse en tandem de type triple quadripôle offre une sensibilité et une spécificité appréciable dans un objectif de mesures quantitatives de contaminants. Néanmoins, la LC-ESI-MS/MS est sensible aux effets matrices notamment lors d'analyse de matrices complexes, ce qui implique la nécessité d'adopter au préalable une démarche de traitement d'échantillons adaptée à l'outil analytique et à la matrice d'intérêt.

2.2 Techniques de préparation d'échantillons alimentaires

La seconde étape du protocole analytique consiste en la préparation des échantillons. L'analyse de la littérature scientifique fait état de nombreuses méthodes d'analyses de résidus de biocides et de polyamines dans des matrices alimentaires, faisant appel à différentes techniques de préparation d'échantillons.

➤ Précautions d'usage

L'analyse des BACs et DDACs nécessite quelques précautions avant de procéder à leur isolement de la matrice. En raison de leur caractère amphiphile, les AQs sont connus pour leur forte capacité d'adsorption sur différents types de matériaux et particulièrement la verrerie et les surfaces en acier inoxydable [34, 56, 57, 59-61, 63]. En effet, par leur pôle hydrophile chargé positivement, les AQs s'adsorbent sur les surfaces négativement chargées tels que les surfaces en acier inoxydable [20]. Différents moyens sont mis en place pour tenter de réduire ce phénomène d'adsorption. L'usage de la verrerie est, dans la mesure du possible, évité au profit de matériels jetables en plastique (ex. polypropylène PP). L'usage de solvants organiques (ex. chloroforme, méthanol, acétonitrile) pour rincer les matériels de préparation d'échantillons est retrouvé dans de nombreuses études [34, 56, 60], pouvant être complété par un traitement thermique. Certains auteurs proposent de saturer les sites actifs en traitant la verrerie par un ammonium quaternaire non d'intérêt avant de procéder au rinçage par solvant [57].

➤ Préparation d'échantillon : extraction et/ou purification

La préparation de l'échantillon peut avoir plusieurs objectifs :

- Extraire les substances d'intérêts de la matrice de manière plus ou moins exhaustive
- Changer l'état physique (solide vers liquide) en vue de l'injection pour l'analyse
- Concentrer l'extrait en analytes d'intérêts afin d'augmenter la sensibilité de l'analyse et de répondre aux seuils réglementaires toujours en évolution
- Éliminer une partie de la matrice afin de rendre l'extrait compatible avec la technique analytique et de supprimer les interférents potentiels qui pourraient impacter l'analyse.

L'extraction par solvant regroupant les méthodes d'extraction liquide-liquide (LLE, de l'anglais « Liquid-Liquid Extraction ») et solide-liquide (SLE, de l'anglais « Solid-Liquid Extraction ») est la technique d'extraction la plus employée pour extraire les biocides et les polyamines, que l'on cherche à traiter des matrices alimentaires liquides ou solides. L'analyse de la littérature scientifique montre son usage pour le traitement de matrices alimentaires variées telles que des fruits et légumes, des céréales, de la viande [34, 55, 56, 61-64, 68, 78, 79, 83-85, 96, 97], et dont l'extraction des biocides et polyamines dans les aliments repose essentiellement sur l'usage de solvants organiques tels que l'acétonitrile (ACN) et le méthanol (MeOH). Les avantages de cette technique reposent sur sa simplicité et une relative rapidité d'application. De plus, elle permet l'extraction de composés à propriétés physico-chimiques pouvant être très variées, idéale pour des méthodes multirésidus.

Les denrées alimentaires sont des matrices complexes dont les principales substances endogènes telles que les sucres, les protéines, les lipides, pouvant interférer lors de l'analyse, doivent être autant que possible éliminées au cours de cette phase de préparation d'échantillons. La méthode dite QuEChERS (acronyme anglais de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) et l'extraction en phase solide (SPE, de l'anglais « Solid Phase Extraction ») sont les deux techniques les plus employées au cours du traitement des échantillons alimentaires tels que les fruits et légumes, le lait et fromages, la viande, les céréales et le sucre [55, 56, 60, 62, 63, 72], pouvant contenir des résidus de biocides, d'amines biogènes et de polyamines. L'avantage de la méthode QuEChERS est principalement de pouvoir l'ajuster en fonction des besoins (molécules et matrices étudiées) de par la variété de sels et adsorbants qu'elle propose (Tableau 7).

Tableau 7 : Déclinaison des sels et adsorbants proposés pour la méthode QuEChERS [104, 105]

Etapes	Constituants	Fonctions
Extraction	Sulfate de Magnésium (MgSO ₄)	Eliminer les traces d'eau pour une meilleure dispersion des composés de l'échantillon et facilite le traitement de la phase organique
	Chlorure de Sodium (NaCl)	Favoriser la séparation des phases et le transfert préférentiel des analytes vers la phase organique
	Tampon acétate Tampon citrate	
Purification	Sulfate de Magnésium (MgSO ₄)	Eliminer les traces d'eau
	Amines primaire et secondaire (PSA)	Retirer les composés acides, les pigments polaires, les sucres et acides gras de la matrice
	Phase C ₁₈	Purifier la matrice des lipides et stérols
	Noir de carbone graphitisé (GCB)	Eliminer les pigments comme la chlorophylle ainsi que les molécules à structures planaires et les caroténoïdes

En SPE, plusieurs types de phases adsorbantes (Figure 14) sont utilisés pour l'extraction et la purification des BACs et DDACs, ainsi que des polyamines. L'analyse de la littérature scientifique a montré une tendance majoritaire à l'usage de sorbants échangeurs de cations (faible ou fort) de type SCX (de l'anglais, « Strong Cation eXchange ») et WCX (de l'anglais « Weak Cation eXchange ») qui permettent une interaction entre les greffons, sulfonique ou acide carboxylique, échangeurs d'ions et l'azote des ammoniums quaternaires chargé positivement [60, 72, 85, 97]. La structure de l'Aminopropyldodécylpropane diamine laisse présager le même type d'interaction. Néanmoins, compte tenu du caractère amphiphile des ammoniums quaternaires et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine, d'autres phases telles la phase inverse greffée C18 [78, 84, 97] qui interagira avec la partie hydrophobe des molécules ou la phase polymérique universelle HLB® [97] à double interactions (hydrophile et lipophile) semblent donner satisfaction. D'après la littérature, la SPE en tant que technique d'extraction et/ou de purification semble être la plus adaptée à l'analyse des biocides quel que soit le type de matrices.

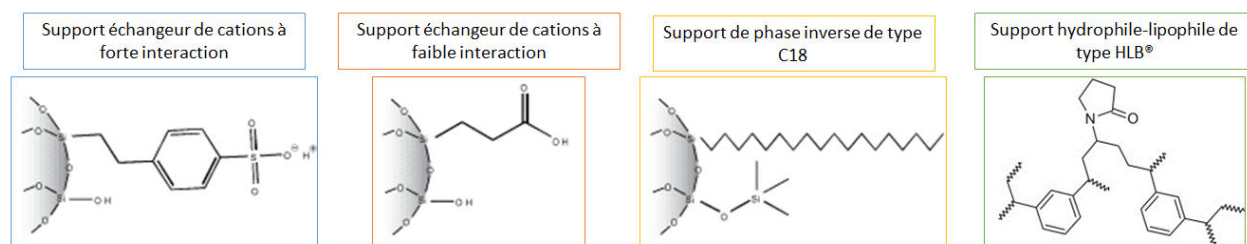


Figure 14 : Types de supports adaptés à la préparation d'échantillons par SPE pour l'analyse des biocides désinfectants étudiés

Le tableau 8 présente les différentes caractéristiques quelques méthodes d'analyses qui ont fait l'objet d'une communication par affiche ou de publications pour déterminer les résidus de BACs et DDACs dans les matrices alimentaires.

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

Tableau 8 : Méthodes d'analyses pour le dosage des résidus de BACs et DDACs dans les matrices alimentaires

Résidus analysés	Matrices	Extraction/Purification		Séparation/ Détection		Limites analytiques		Références
		Technique	Conditions	Technique	Conditions	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	
BAC C ₁₀ à C ₁₆ DDAC-C ₁₀	Concombre Raisin Citron Blé	QuEChERS	10 ± 0.1 g matrice (5 g matrice sèche, 13.5 g matrice congelée) 10 mL ACN 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl 0.5 g citrate d'hydrogène disodique 1 g citrate trisodique dihydraté	LC-MS/MS	Synergi Hydro RP C18 (150 × 2.1 mm id, 4 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau à 5 mM formate d'ammonium (éluant A) MeOH à 5 mM formate d'ammonium (éluant B) Mode Gradient	x	10.0	Hepperle et al., 2013
BAC C ₁₀ à C ₁₆ DDAC-C ₁₀	Orange Concombre	QuEChERS	10 g matrice 10 mL ACN à 1% acide acétique 4 g MgSO ₄ 1 g acetate de sodium	LC-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm id, 1.7 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau à 0.01% AcF (éluant A) MeOH (éluant B) Mode Gradient	0.4 - 1.0	1.0 - 4.0	Arrebola-Liebanas et al., 2014
BAC C ₁₂ à C ₁₆ DDAC-C ₁₀	Lait	LLE	20 mL matrice 20 mL ACN	LC-QTOF	PerkinElmer Brownlee™ C18 (50 mm x 2.1 id , 2.7 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau à 0.1% AcF (éluant A) ACN à 0.1% AcF (éluant B) Mode Gradient	x	x	Reuter et al., 2015
BAC C ₁₀ à C ₁₈ DDAC C ₁₀ à C ₁₈	Œuf Lait Poudre de lait Viande Céréales Huile	LLE	<u>Pauvre en matière grasse :</u> 1 g matrice 9 mL MeOH/Eau (8:2) 10 µL AcF <u>Riche en matière grasse :</u> 0.5-1 g matrice 12 mL ACN/Ether pétrole/Eau (1:1:1) 10 µL AcF Elimination phase Ether Injection ACN/Eau	LC-MS/MS	ACQUITY UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm id, 1.7 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau (éluant A) ACN/Eau (95:5), 0.2% AcF, 10 mM formate d'ammonium (éluant B) Mode Gradient	x	10	Drinda et al., 2013
BAC C ₈ à C ₁₈ DDAC C ₁₀	Fruits Légumes	QuEChERS	x	LC-MS/MS	Phenomenex Synergi 4u Hydro-RP; 150 x 2 mm <u>Phase mobile :</u> Eau à 5mmol formate d'ammonium (éluant A) MeOH à 5mmol formate d'ammonium (éluant B)	x	x	Schule et al., 2012

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

Résidus analysés	Matrices	Extraction/Purification		Séparation		Limites analytiques		Références
		Technique	Conditions	Technique	Conditions	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	
BAC C ₁₂ à C ₁₆ DDAC C ₁₀ (autres AQS)	Porc Pomme Epinard Riz Sucre	SLE puis SPE	<u>Double extraction :</u> 2g matrice 10 mL MeOH/EAU (90:10) puis 10 mL MeOH/EAU (80:20) <u>Purification :</u> Cartouche WCX	LC-MS/MS	CAPCELL PAK CR 1-4 (150 × 2 mm id, 5 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau à 0.1% AcF, 50 mmol Formate d'ammonium (éluant A) ACN (éluant B) Mode Gradient	3.0	10.0	Cao et al., 2014
BAC C ₁₀ à C ₁₆ DDAC C ₁₀	Lait	QuEChERS	<u>Extraction :</u> 10 g matrice 10 mL ACN Tampon citrate <u>Purification :</u> 4 mL extrait 100 mg PSA 600 mg MgSO ₄ 1 g acetate de sodium	LC-MS/MS	<u>Conditions A</u> Phenomenex Synergi Hydro-RP (150 × 2 mm id, 4 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau à 5 mM formate d'ammonium (éluant A) MeOH à 5 mM formate d'ammonium (éluant B) Mode Gradient <u>Conditions B</u> Phenomenex Aqua C18 (50 × 2 mm id, 5 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau à 5 mM formate d'ammonium, 0.01% AcF (éluant A) MeOH à 5 mM formate d'ammonium, 0.01% AcF (éluant B) Mode Gradient	x	BACs : 10.0 DDAC C ₁₀ : 20.0	EURL, 2014
BAC C ₁₀ à C ₁₈ DDAC C ₁₀ et C ₁₂ (autres AQS)	Crème glacée Milkshake Crème fouettée Viande hachée	LLE SLE	1 g matrice 1 mL d'eau saturée en NaCl 25 mL ACN-EAU (70 : 30) + 0.16 mL/L TFA (2 mmol/L)	LC-MS/MS	Xterra RP8 (100 × 2.1 mm id, 3.5 µm) <u>Phase mobile :</u> ACN/EAU (60:40) + 0.16 mL/L TFA	(CCα = 550)	x	Van Bruijnsvoordt et al, 2004
BAC C ₁₀ à C ₁₆ DDAC C ₁₀	Lait Poudre de lait	LLE SPE	<u>Poudre de lait :</u> (Extraction) 2.5 g matrice 25 mL MeOH à 5% AcF (Purification) 1 mL extrait + 3 mL Eau + 1 mL Eau 5% NH ₄ WCX <u>Lait :</u> (Extraction) 2 mL matrice 0.2 mL Eau 5% NH ₄ (Purification) WCX	LC-MS/MS	XBridge BEH HILIC (100 × 3.0 mm id, 2.5 µm) <u>Phase mobile :</u> ACN (éluant A) Eau 50 mM formate d'ammonium, pH 3.2 AcF (éluant B) (93:7) (v:v) Mode Isocratique	<u>Poudre</u> BAC C14-16 : 0.4 BAC C10 et DDAC C10 : 0.7 BAC C12 : 0.9 <u>Lait</u> BAC C14-16 : 0.02 BAC C10 et DDAC C10 : 0.04 BAC C12 : 0.06	<u>Poudre</u> BAC C14-16 : 1.2 BAC C10 et DDAC C10 : 2.0 BAC C12 : 2.7 <u>Lait</u> BAC C14-16 : 0.07 BAC C10 et DDAC C10 : 0.13 BAC C12 : 0.18	Bertuzzi et al., 2014

Partie 1 : Étude bibliographique et état de l'art

Résidus analysés	Matrices	Extraction/Purification		Séparation		Limites analytiques		Références
		Technique	Conditions	Technique	Conditions	LD (µg/kg)	LQ (µg/kg)	
BAC C ₁₂ à C ₁₈ DDAC C ₁₀	Lait Poudre de lait reconstituée	QuEChERS	Reconstitution Poudre de Lait/EAU (1:8) (Extraction) 1 g matrice 5 mL ACN (Purification) 600 µL extrait 400 mg PSA	LC-MS/MS	ACQUITY UPLC HILIC (50 × 2.1 mm id, 1.7 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau + 0.05 % AcF (éluant A) ACN 10 mmol/L acetate d'ammonium (éluant B) (95:5) (v:v) Mode Isocratique	Poudre BAC C ₁₂ à 16 : 3.6 DDAC C ₁₀ : 14.5 Lait BAC C ₁₂ à 16 : 0.4 DDAC C ₁₀ : 1.8	Poudre BAC C ₁₂ à 16 : 12 DDAC C ₁₀ : 48 Lait BAC C ₁₂ à 16 : 1.5 DDAC C ₁₀ : 6.0	Xian et al., 2016
DDAC C ₁₂ (Autres AQs)	Légumes	SLE Purification sur colonne	Extraction (x3) 1 g matrice lyophilisée 10 mL MeOH acidifié HCl Purification sur colonne Asorbant d'Oxyde d'Aluminium	GC-MS	DB-5MS (30 m × 0.25 mm, 0.1 µm) T° four : 100°C à 280°C mode gradient Volume d'injection : 1 µL Mode splitless Débit gaz : 1.0 mL/min T° injecteur : 280°C	DDAC C ₁₂ 0.7 à 4.0	DDAC C ₁₂ 2.3 à 13.5	Xiang et al., 2015
BAC C ₈ à C ₁₈ DDAC C ₁₀ et C ₁₂ (Autres)	Lait Poudre de lait	QuEChERS	Extraction à l'ACN (informations complémentaires non communiquées)	LC-MS/MS	Synergi Fusion-RP C18 (50 × 2 mm id, 4 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau + 0.1% AcF (éluant A) ACN + 0.1% AcF (éluant B) Mode Gradient	x	5.0	Czerwenka et al. (Poster)
BAC C ₁₀ à C ₁₈ DDAC C ₁₀	Fruits Légumes	SLE	25 g de matrice 100 mL d'ACN	LC-MS/MS LC-QTOF-MS	BEH C18 <u>Phase mobile :</u> EAU/MeOH/5mM acetate d'ammonium Mode Gradient	x	BACs : 100 DDAC C ₁₀ : 10	Melton et al., 2013 (Poster)
BAC C ₈ à C ₁₈ DDAC C ₁₀	Fruits Légumes (Orange, Salade, Avocat)	QuEChERS	15 g de matrice 15 mL ACN + 1% Acide acétique 6 g MgSO ₄ 1.5 g acétate de sodium	LC-MS/MS	Atlantis T3 (100 × 2.1 mm id, 3 µm) <u>Phase mobile :</u> Eau + 0.1 % AcF (éluant A) ACN + 0.1% AcF (éluant B) Mode Gradient	x	10.0	Diez et al. (Poster)

2.3 Evaluation des performances et validation de la méthode

La méthode d'analyse quantitative développée a pour but d'être appliquée en routine à tout échantillon à analyser. Cette méthode quantitative doit être sélective des molécules d'intérêts, idéalement simple et rapide, et surtout la plus performante possible. Ainsi, une fois la méthode développée, il est nécessaire de valider le processus analytique global par l'évaluation de ses caractéristiques de performances au regard de l'usage attendu ; ce qui constitue la 3^{ème} étape du cycle de vie d'une méthode analytique (Figure 15).

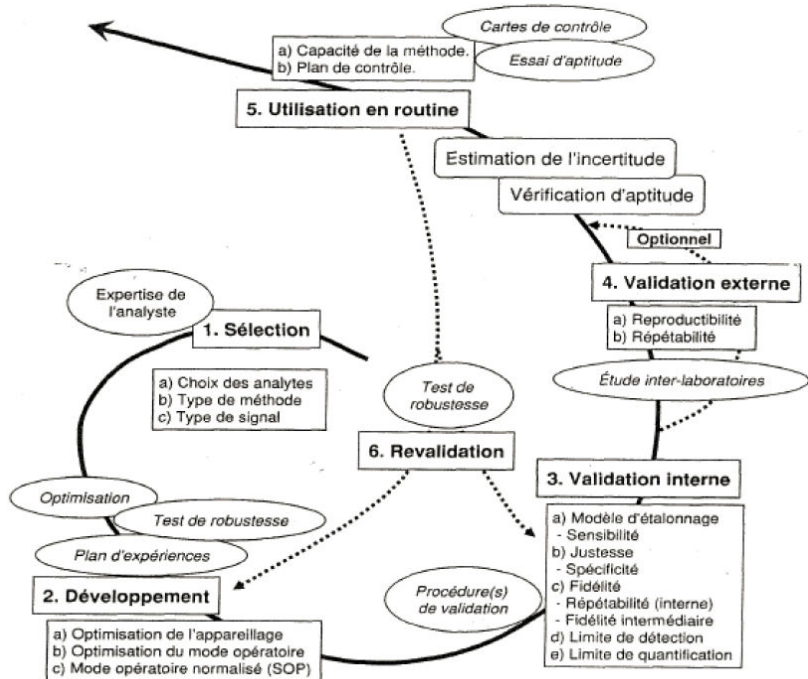


Figure 15 : Cycle de vie d'une méthode d'analyse [106]

L'évaluation des performances et la validation des méthodes analytiques sont décrites dans plusieurs normes, en particulier la norme ISO 17025 : 2017 qui exige des laboratoires travaillant sous accréditation que « les méthodes développées au laboratoire ou celles qui sont adaptées par le laboratoire peuvent être utilisées si elles sont validées ». La définition de la validation d'une méthode d'analyse dans cette norme est la suivante : « la validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves objectives du fait que les prescriptions particulières en vue d'une application prévue déterminée sont remplies ». Autrement dit, il s'agit d'apporter des preuves objectives que la méthode répond bien aux besoins initialement définis, à savoir, dans notre cas, une maîtrise de l'incertitude sur un domaine de validité.

2.3.1 Vocabulaire de la validation

Le terme « validation » et ceux des caractéristiques associées étant largement employés dans la littérature, les définitions se doivent d'être reprises ici :

Tableau 9 : Définition du vocabulaire de la validation

Caractéristiques	Définitions
Evaluation	NF-V03-110 : Procédure par laquelle un laboratoire compare les caractéristiques d'une méthode alternative à celles d'une ou plusieurs méthodes de référence
Validation	NF-V03-110 : Procédure par laquelle une tierce partie établit, à l'aide de l'évaluation de la méthode et d'un essai inter-laboratoire, que la méthode alternative donne, dans son domaine d'application, des résultats équivalents à ceux de la méthode de référence
	NF EN IEC ISO 17025:2017: Vérification ou les exigences spécifiées sont adéquates pour un usage déterminé FDA : Valider permet d'établir à l'évidence, avec un degré de confiance élevé et sous une forme documentée, qu'un procédé déterminé permet d'obtenir un produit (un service ou un résultat) qui atteint effectivement des spécifications définies à l'avance
Linéarité	Relation proportionnelle entre les concentrations théoriques et les concentrations calculées
Fonction de réponse (courbe d'étalonnage)	Relation entre la réponse et les concentrations théoriques
Exactitude (Justesse + Fidélité)	Etroitesse de l'accord entre le résultat d'essai et la valeur de référence acceptée
Justesse	Etroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée
Fidélité	Etroitesse de l'accord (degré de dispersion, CV) entre une série de mesures provenant de multiples prises d'un même échantillon homogène dans des conditions précises
Répétabilité	Variabilité dans un même jour, pour un même opérateur et un appareillage identique
Fidélité intermédiaire	Variabilité qui peut prendre en compte les effets jours, opérateur, équipements dans un même laboratoire
Limite de détection (LD)	Plus petite quantité pouvant être détectée mais non quantifiée comme valeur exacte
Limite de quantification (LQ)	Plus petite quantité quantifiable avec une exactitude définie c'est à dire une justesse et une fidélité connue (i.e. l'exactitude)
Intervalle de dosage	Région définie par une limite de quantification inférieure et parfois supérieure pour laquelle il est montré que la méthode analytique est appropriée quant à sa fidélité, sa justesse et sa linéarité
Sélectivité	Capacité à établir de manière univoque l'existence de la substance à analyser en présence d'autres composés potentiellement présents
Spécificité	Capacité à établir que le signal mesuré provient seulement de la substance à analyser

2.3.2 Démarche de validation

Dans le contexte de notre étude, il a été décidé d'adopter une approche d'analyse quantitative qui doit être évaluée et validée pour répondre au questionnement de la contamination des produits laitiers par les résidus de biocides désinfectants. La démarche de validation repose sur 3 grandes étapes [106] :

- La définition des critères de validation selon les attentes explicites et implicites du prescripteur du besoin de la méthode.
- La caractérisation de la méthode qui consiste en la détermination des caractéristiques de performances.

- La validation de la méthode qui repose sur une confrontation des valeurs des paramètres de performances obtenues (biais, écart-type, etc.) pour les caractéristiques étudiées (justesse, fidélité, etc.) et celles des critères dument définis conjointement avec le prescripteur.

L'étape de caractérisation de la méthode s'établit au niveau intra-laboratoire, et si possible, en inter-laboratoire. Dans le cadre de notre étude, nous nous en tiendrons à un usage dans notre seul laboratoire. Les caractéristiques de performances à évaluer sont dépendantes de l'étape du processus de validation (intra ou inter-laboratoires) ainsi que du type de méthode (qualitative ou quantitative). Les méthodes développées au cours du travail de thèse ont une visée quantitative dont les caractéristiques se doivent d'être évaluées (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractéristiques de performances à évaluer pour les méthodes qualitatives et quantitatives [106]

Étape du processus de validation	Caractéristique	Caractéristique de performance à déterminer en fonction du type de méthode		
		Qualitative	Quantitative	
Caractérisation Intra labo	Spécificité	X	X	
	Sensibilité	X	(X)	
	Fonction d'étalonnage/efficacité (PCR)		X	
	Fidélité	Répétabilité	(X)	X
		Fidélité intermédiaire	X	X
	Justesse	sans objet	X	
	Exactitude (justesse + fidélité) ^a	sans objet	X	
	Linéarité	sans objet	X	
	Limite de	quantification	sans objet	X
		détection	X	(X)
Domaine de validité	X	X		
Caractérisation interlaboratoires	Reproductibilité	X	X	
	Répétabilité	(X)	X	
	LOD	(X)	sans objet	
	LOQ	sans objet	(X)	
	Spécificité ^b	X	sans objet	
	Sensibilité ^c	X	sans objet	
	Autres caractéristiques non techniques à définir selon les points critiques et le cahier des charges (délai, rapidité, efficacité, coût)	X	X	

sans objet : caractéristique non pertinente (x) : les caractéristiques inscrites entre parenthèses sont recommandées.
a : pour les méthodes analytiques quantitatives, l'exactitude représente toujours la combinaison de la justesse et de la fidélité.
b : ou taux de faux positifs dans certains référentiels
c : ou taux de faux négatifs dans certains référentiels

La caractérisation de la méthode peut se faire par une approche « critère par critère » (Figure 16) ou par une approche dite « globale » (Figure 17). A titre d'exemple, la validation d'une méthode d'analyse de médicaments vétérinaires, dans le cadre du contrôle officiel des denrées alimentaires, est soumise à une approche de caractérisation « critère par critère » relative aux exigences normatives de la Décision (CE) No. 2002/657. Cette approche fournit des informations intéressantes bien qu'il est parfois difficile de statuer sur la validation globale de la méthode lorsque certaines caractéristiques sont valides tandis que d'autres ne le sont pas. A ce niveau, la

déclaration d'aptitude de la méthode par le responsable de sa mise au point, exigée par la norme 17015 :2017, prend tout son sens.

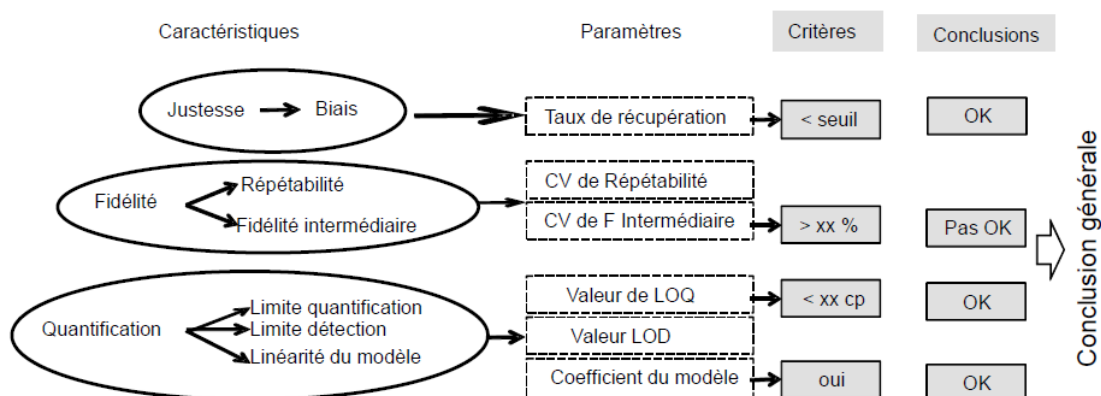


Figure 16 : Illustration de la méthodologie de caractérisation d'une méthode analytique selon une approche « critères par critère » [106]

Pour pallier à cet inconvénient majeur de contradiction des conclusions, une caractérisation globale basée sur l'évaluation d'une seule caractéristique de performance majeure, à savoir l'exactitude, est également possible. Ainsi, la validité de la méthode sera statuée par rapport à un intervalle d'acceptabilité (Figure 17).

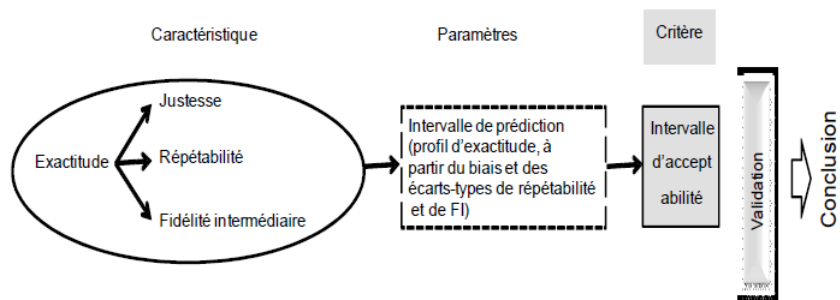


Figure 17 : Illustration de la méthodologie de caractérisation d'une méthode analytique selon une approche globale [106]

En ce qui concerne les méthodes d'analyses de résidus de biocides désinfectants dans les denrées alimentaires, aucun guide décrivant le processus de validation à adopter ainsi que les exigences à suivre pour confirmer la validité de la méthode n'est à ce jour proposé, comme cela est le cas pour les résidus de médicaments vétérinaires (Décision (UE) No. 2002/657) ou les pesticides (SANTE/11813/2017). A titre d'exemple, Van Bruijnsvoort et al. [34] ont utilisé cette approche pour la validation de leur méthode d'analyse de BACs et DDACs dans les denrées alimentaires. Pour notre étude, la validation des deux méthodes développées a été réalisée suivant l'approche globale basée sur l'exactitude tel que décrit dans la norme AFNOR NF V03-110 relatif à l'analyse des produits agricoles et alimentaires qui introduit la validation d'une

méthode quantitative par caractérisation selon l'approche globale basée sur le profil d'exactitude (PE).

2.3.3 L'approche globale : le profil d'exactitude

2.3.3.1 Principe général

L'approche globale est réalisée sur une seule caractéristique de performance (exactitude) et permettra de statuer sur la validité de la méthode selon un critère, l'intervalle d'acceptabilité. L'exactitude, caractéristique associée aux résultats, est une combinaison de la justesse (erreur systématique) et de la fidélité (erreurs aléatoires) qui sont des caractéristiques associées à la méthode (Figure 18).

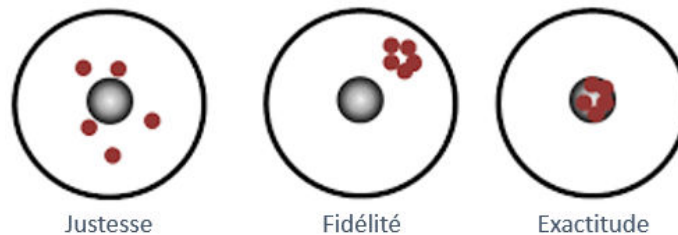


Figure 18 : Représentation schématique des termes de validation (justesse, fidélité et exactitude)

Ce concept de validation des méthodes quantitatives basé sur l'erreur totale (dénommé profil d'exactitude, PE) a été développé par une commission de la Société Française des Sciences Techniques et Pharmaceutiques (SFSTP) [107-110]. Il est utilisé dans de nombreux domaines (chimie, biologie dénombrement, PCR) [111-121] et recommandé notamment dans des lignes directrices américaines de la FDA (Food and Drug Administration) [122] et de l'EPA (Environmental Protection Agency) et dans de nombreuses normes (ex. NF V03-110). En utilisant les mesures de justesse et de fidélité (répétabilité et de fidélité intermédiaire), le profil d'exactitude est construit de façon à pouvoir estimer un intervalle de prédiction (appelé intervalle de tolérance) décrit par MEE (1984) où sera située une proportion connue de mesures et de vérifier qu'elles ne sortent pas des limites fixées par un intervalle d'acceptabilité ($\pm\lambda$). Cette approche de validation offre l'avantage de présenter graphiquement le pourcentage β des résultats qui se trouveront dans les limites d'acceptabilité ($\pm\lambda$). Ces limites sont définies réglementairement, par l'utilisateur ou par le client. Les limites de l'intervalle de tolérance β , aux différentes concentrations étudiées, est appelé profil d'exactitude. C'est un outil de décision pour statuer sur la validité de la méthode sur la gamme de concentration étudiée par confrontation avec la zone de validité définie par les limites $\pm\lambda$ (Figure 19).

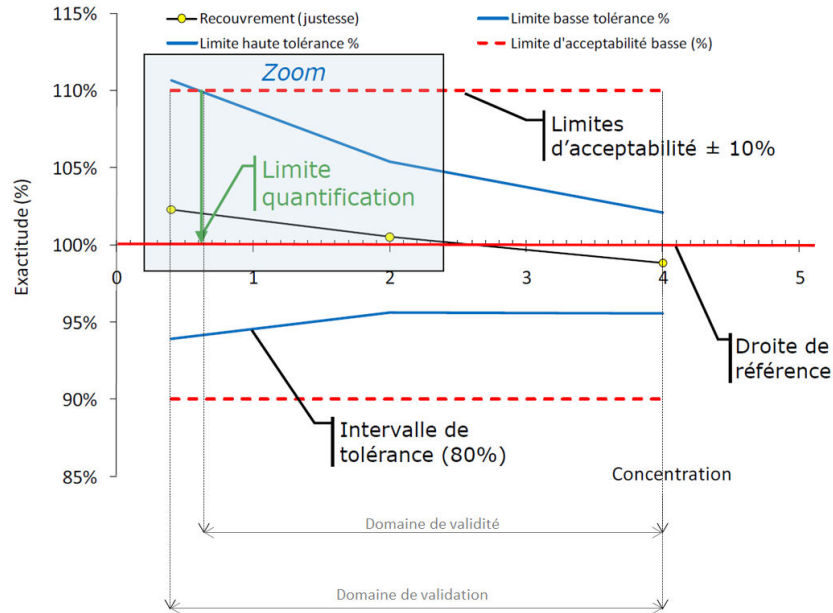


Figure 19 : Illustration d'un profil d'exactitude

2.3.3.2 Plan de validation

Afin d'évaluer les caractéristiques de performances pour statuer de la validité de la méthode pour l'usage attendu, il est nécessaire de préparer des échantillons supplémentés dans la matrice étudiée appelés standards d'étalonnage (SE) et standards de validation (SV) qui diffèrent par leur rôle. Pour réaliser le processus de validation, il convient de définir le nombre de jours ou séries (I), le nombre de répétitions par niveau et par jour (J et J'), et les niveaux de concentration (K et K'). Ces différents paramètres doivent être choisis de manière à s'approcher au maximum des conditions d'analyse de routine. De plus, le design du plan de validation doit permettre d'obtenir une puissance des résultats suffisant.

- Les SE permettent d'établir la courbe d'étalonnage de la méthode. Les paramètres de répétitions (J') et de niveau de concentrations (K') peuvent être différents de ceux utilisés pour les SV. Sur le plan statistique, il est préférable de travailler en bloc équilibré, c'est pourquoi le nombre de séries (I) est généralement identique pour les SE et les SV.
- Les SV permettent de déterminer les caractéristiques de performances de la méthode. Ils doivent représenter au moins 3 niveaux de concentration ($K \geq 3$) répartis sur le domaine de validation afin de vérifier que la justesse n'est pas biaisée c'est-à-dire que l'erreur systématique est négligeable. Les SV doivent être réalisés, autant que possible, en même temps et dans les mêmes conditions que les SE, afin d'utiliser les fonctions de réponses correspondantes.

Le choix des niveaux de concentration est établi de façon à atteindre la limite de quantification la plus basse possible tout en encadrant la LMR dans le cas où elle serait fixée, ceci pour répondre aux besoins d'usage en routine. Le plan de validation global est décrit sur la figure suivante :

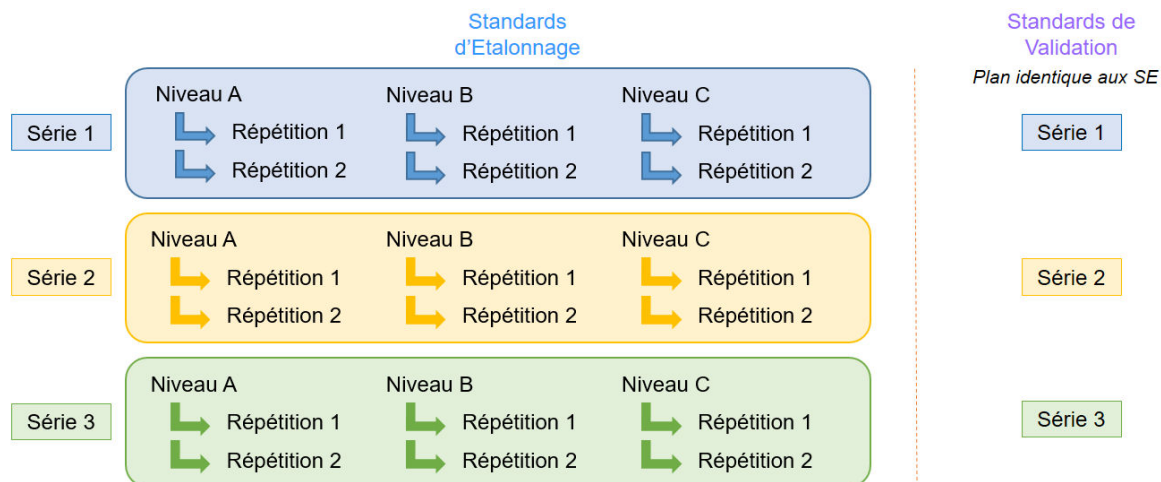


Figure 20 : Plan de validation global

2.3.3.3 Détermination de la fonction de réponse

La fonction de réponse doit être établie de façon à permettre la quantification des échantillons en analyse de routine. La fonction de réponse d'une méthode doit décrire au mieux la relation existante entre la réponse (signal) Y et la concentration « théorique » X. Les données brutes sont analysées avec le logiciel e.noval[®] de la société Arlanda qui permet de choisir la fonction d'étalonnage la plus appropriée et de construire le PE.

A partir des résultats obtenus, il est possible de tester plusieurs régressions (ex. linéaire, quadratique, avec ou sans pondération, avec ou sans transformations (ex. logarithme, racine carrée, inverse...)) et de construire différents profils d'exactitudes à partir du même jeu de données. Le choix du PE incluant le modèle d'étalonnage est réalisé à partir des indices suivants [123] : indice d'exactitude (accuracy) I_A et indice d'intervalle de dosage (dosing range) I_{DR} . Les autres indices à disposition, indice de fidélité (precision) I_P et indice de justesse (trueness) I_T , sont des indices de diagnostic. Le critère appliqué aux indices est le suivant : plus l'indice est proche de 1, plus le modèle est adapté pour cette caractéristique. Le modèle optimal retenu est généralement celui présentant les indices les plus élevés.

A partir des résultats obtenus avec le plan de validation, les concentrations en retour pour chaque série I sont calculées à partir du modèle d'étalonnage retenu.

2.3.3.4 Construction et interprétation du PE

Le profil d'exactitude, qui est une représentation graphique des concentrations théoriques ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en abscisse et de l'erreur relative (%) en ordonnée, est construit à partir de deux paramètres définissant les objectifs visés de la méthode (Figure 19 ci-dessus) :

- L'intervalle de tolérance lié à la proportion β , c'est-à-dire la proportion de futurs résultats attendus en routine, est déterminé en fonction du champ d'application de la méthode. A titre d'exemple, pour une valeur de β fixée à 80%, l'approche garantit que seules 20% des futures mesures d'échantillons inconnus seront en dehors de l'intervalle de tolérance calculé. Quand β diminue, il y aura plus de chances d'avoir des mesures à l'extérieur des intervalles de tolérance.
- Les limites d'acceptabilité ($\pm\lambda$) sont fixées en fonction de l'usage prévu de la méthode en routine. Ces limites permettent ainsi d'encadrer l'intervalle de dosage.

Ensuite, une estimation de la justesse et de la fidélité est réalisée à partir des concentrations en retour définies grâce au modèle d'étalonnage, ceci pour chaque niveau de concentration K.

La **justesse** permettant d'estimer l'erreur systématique de mesure est exprimée en termes de biais absolu ($\mu\text{g}/\text{kg}$), de biais relatif (%) ou de taux de recouvrement (%). La **fidélité** donne des informations sur l'erreur aléatoire et est évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. L'écart-type (SD) et le coefficient de variation (CV) peuvent exprimer la fidélité de manière absolue ou relative.

S'appuyant sur la représentation graphique du profil, une première interprétation visuelle des résultats peut être faite. Il est possible de déterminer le domaine de validité de la méthode, qui correspond au domaine où la majeure partie des intervalles de tolérance (supérieur et inférieur) sont compris dans l'intervalle d'acceptabilité. Le domaine de validité de la méthode correspond de ce fait à l'intervalle de dosage. Le profil d'exactitude fournit également une information visuelle relative aux limites de quantification (LQ), haute et basse, de la méthode qui correspondent aux intersections entre l'intervalle de tolérance et l'intervalle d'acceptabilité, ou à défaut d'intersection, aux concentrations extrêmes du domaine de validation, répondant ainsi à sa définition.

3. L'APPROCHE METABOLOMIQUE EN ANALYSE NON CIBLÉE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE À HAUTE RÉOLUTION

3.1 Introduction et objectifs

La présence de résidus de biocides dans le lait et les produits laitiers représente une problématique de santé publique à laquelle l'analyse par une approche ciblée pourrait répondre par la mise en œuvre de méthodes de mesure de l'exposition des consommateurs, ce pour

permettre une analyse du risque. Au-delà de la présence de résidus de biocides connus dans les produits laitiers, une question se pose quant à l'impact que peuvent avoir les procédés de transformation du lait sur les biocides présents dans les denrées alimentaires. En effet, les traitements mécanique et thermique appliqués tout au long de la filière laitière pourraient induire une modification par transformation ou dégradation, de l'état structural, des biocides présents sous forme résiduelle dans les aliments et ainsi, générer de nouveaux contaminants indésirables inconnus, nommés produits néoformés. Depuis quelques années, les avancées technologiques en analytique avec des détecteurs à haut pouvoir résolutif ont permis de développer de nouvelles approches sans a priori, ou non ciblée, généralisées sous le terme de « méthodes omiques ».

Dans le cadre de notre étude, ce type d'approche « non ciblée » permettra de repérer, sans a priori, toute modification induite par un facteur externe tel que les traitements chimiques, thermiques ou mécaniques. De plus, le recours à une approche non ciblée pourrait permettre d'apporter des éléments de réponse quant à l'occurrence de produits néoformés en relation avec la présence de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers et de déterminer leur identité chimique. Pour ce faire, une comparaison de l'empreinte chimique de groupes d'échantillons traités (ou contaminés) et non traités (ou témoins) par des biocides est réalisée afin de distinguer de potentiels marqueurs pertinents. L'approche « non ciblée » nécessite de disposer d'instruments analytiques de haute précision en mesure de fournir une information extrêmement précise de l'ensemble des molécules présentes. Les avancées techniques en spectrométrie de masse, notamment la haute résolution, offrent des perspectives nouvelles quant à la recherche et l'identification de composés néoformés, molécules non ciblées ou inconnues. Cette technologie, à haute résolution, assure une détection des ions avec une précision en masse permettant de distinguer des ions de rapport m/z proches et d'effectuer l'annotation des ions détectés, c'est à dire de formuler des hypothèses d'identité des molécules.

L'analyse non ciblée est une approche multidisciplinaire mettant en jeu des outils d'analyse chimique et chimiométrique qui seront présentés plus en détails dans cette partie.

3.2 L'approche d'analyse globale, ou non ciblée

3.2.1 Principe général

Par analogie au génome, transcriptome et protéome, le concept de métabolome, apparu à la fin des années 1990, fait référence à l'ensemble des métabolites contenus dans un système biologique donné : organisme, type cellulaire ou fluide biologique tel que l'urine ou le plasma (Figure 21).

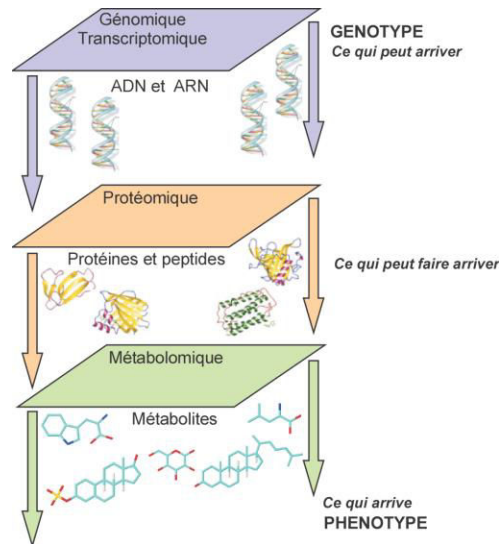


Figure 21 : Représentation schématique de l'échelle des différentes approches omiques

Le terme métabolite inclut, généralement, toutes les molécules de petites tailles dont la masse moléculaire est inférieure à 1500 Da. Il regroupe à la fois les métabolites endogènes dès lors qu'ils sont synthétisés à l'intérieur et par l'organisme lui-même (ex. les sucres, les acides gras, les acides aminés, certains peptides et vitamines) et les xénométabolites et leurs dérivés, apportés par des facteurs externes, qui sont des métabolites totalement étrangers à l'organisme étudié. Les biocides, les pesticides, les médicaments et les perturbateurs endocriniens constituent cette seconde catégorie.

Différentes approches métabolomiques (Figure 22), classées selon deux principaux niveaux d'analyse, se distinguent en fonction de ce que l'on cherche à étudier [124-126]. Les analyses dites ciblées, représentant le premier niveau, sont généralement utilisées lors de l'analyse de métabolites endogènes issus d'une famille particulière. Quant aux analyses dites globales, à caractère plus complexe, elles ont pour but l'analyse simultanée du plus grand nombre de métabolites connus et/ou inconnus. Ces approches métabolomiques pouvant être empruntées de manière indépendante ou pouvant être associées, selon la problématique de recherche.

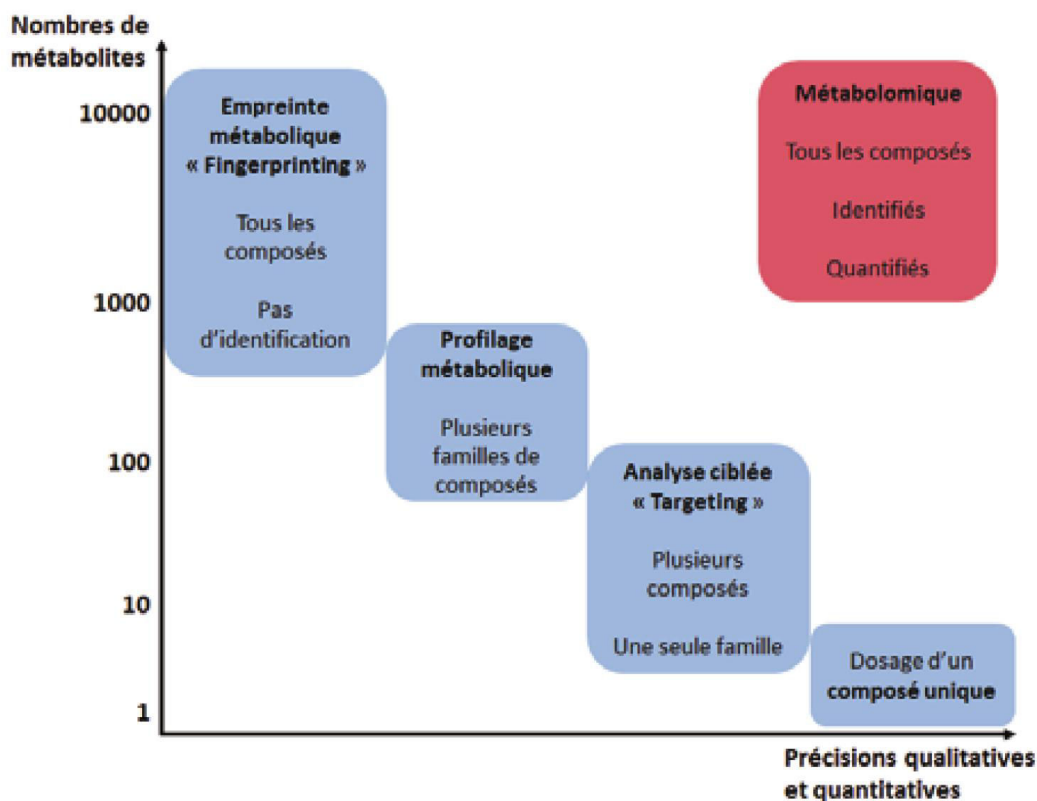


Figure 22 : Représentation schématique des différentes approches analytiques en métabolomique [127, 128]

L'analyse non ciblée basée sur l'approche « empreinte métabolique » basée sur la comparaison des empreintes chimiques des échantillons pour rechercher une discrimination entre les groupes est largement employée dans le domaine alimentaire dans un but de sécurité alimentaire [129-136]. A titre d'exemple, des études ont été menées pour rechercher les métabolites présents dans le lait de vache suite au traitement des bovins par antibiotiques (ex. Enrofloxacin, β -lactame) [137, 138]. Une étude similaire a été menée pour rechercher des sulfamides et leurs métabolites dans le saumon [139]. En sécurité alimentaire, la métabolomique est également appliquée pour le contrôle de substances interdites [135]. Ce type d'approche a également été utilisée pour observer les différences florales et géographiques d'échantillons de miels [140], ou encore les différences entre les différentes espèces de café [41]. Bergamaschi et al. ont appliqué l'approche d'analyse non ciblée pour observer l'évolution de l'empreinte aromatique de lait et des produits laitiers (crème, fromages) au cours de l'alpage d'été [141]. Quant à eux, Xi et al. ont été menée une étude métabolomique sur du lait chez les vaches laitières présentant une inflammation mammaire [142]. L'empreinte métabolique a également été utilisée pour mettre en évidence les différences fines dans le métabolome du fromage pendant l'affinage [131]. De nombreuses études ont également été menées pour observer des différences en lien avec la cuisson, et plus largement le traitement thermique, des aliments [43, 44, 46, 52, 54, 132, 143, 144]. Rubert et al. ont mis en application

cette approche par la mise en évidence de différences liées au traitement thermique, par comparaison des empreintes chimiques de laits de cajou frais et chauffé à haute température [132].

Dans le cadre de ce travail de thèse, l'approche « empreinte métabolique » a donc été retenue pour rechercher d'éventuels produits néoformés. Cette approche pourra, par l'observation de différence entre les groupes (traité et non traité), faire ressortir un ou des marqueur(s) pertinent(s) caractéristique(s) de la présence de biocides dans les produits laitiers ayant été impactés par les procédés de transformation. L'acquisition des empreintes chimiques en spectrométrie de masse à haute résolution fournira des données qui seront retraitées et exploitées au moyen d'outils d'analyses statistiques dans le but d'observer ces différences.

L'analyse non ciblée est une approche multidisciplinaire mettant en jeu des outils d'analyse chimique et chimiométrique ; plus précisément, la préparation des échantillons, la séparation chromatographique, le traitement du signal et l'analyse statistique des données (Figure 23).

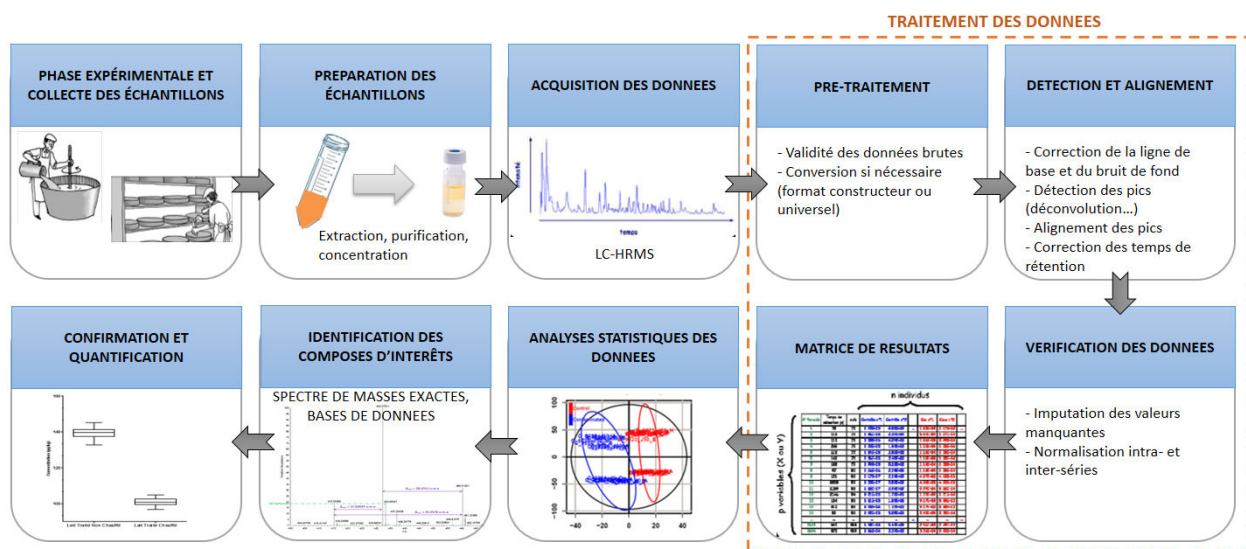


Figure 23 : Processus d'une analyse non ciblée par spectrométrie de masse à haute résolution (adapté de la thèse de Roux 2011 [145])

L'expérience commence par une phase expérimentale appropriée et construite de façon à fournir des données chimiquement interprétables, permettant ainsi de répondre à la problématique. Pour notre étude, celle-ci correspond à la fabrication des produits laitiers (PPC et FF) « non traités » et « traités » au biocide, selon des critères (nombre de lots, concentration de traitement) préalablement définis. Le traitement des échantillons le plus générique possible puis l'acquisition en spectrométrie de masse à haute résolution permet de recueillir les données brutes, appelées empreintes chimiques, pour chaque échantillon. Le traitement des données

ainsi obtenues est réalisé en plusieurs étapes grâce à des logiciels spécialisés dans la détection des signaux avant d'être analysés avec des outils statistiques en vue de l'obtention des variables marqueurs d'intérêts. L'identification de ces variables pourra être réalisée par une analyse spectrale et la consultation de bases de données. Une fois le métabolite identifié, la confirmation peut être obtenue par l'injection d'un standard pur du métabolite sous forme de standard pur. Dès lors que le métabolite est confirmé, une analyse quantitative peut être envisagée.

Notons qu'à chaque étape de l'expérience d'analyse non ciblée, il y existe un risque de perdre de l'information qui ne peut être recouvrée, en raison de la variabilité analytique et du choix des différentes méthodes de la préparation d'échantillon à l'analyse statistique des données.

3.2.2 Préparation des échantillons

Le choix de la technique de préparation des échantillons à adopter est un élément clé dont la qualité ne peut être négligée. Cette étape cruciale couvre plusieurs objectifs comme l'élimination des constituants de la matrice pouvant présenter une incompatibilité avec la technique analytique retenue. L'analyse non ciblée par comparaison d'empreinte chimique appliquée aux matrices agro-alimentaires a montré son efficacité dans la mise en évidence de métabolites générés dans le lait, les poissons, les viandes, à l'issue du traitement d'animaux par des antibiotiques.

Il va sans dire que ces matrices complexes présentent des constituants pouvant interférer dans l'analyse en spectrométrie de masse, d'où la nécessité de les éliminer. L'extraction par solvant est majoritairement employée pour la préparation des échantillons alimentaires, où le choix du solvant est dépendant de la matrice et des métabolites recherchés. Certains auteurs indiquent procéder à une extraction à l'eau pour réduire la perte de métabolites [41, 50, 137, 138, 140]. Néanmoins, les solvants organiques tels l'ACN, le MeOH et l'EtOH sont les plus utilisés pour une extraction la plus exhaustive de composés [132, 134, 139, 146]. A la suite de l'étape d'extraction, une purification est possible par SPE ou QuEChERS [50, 127, 130, 137, 138].

Ces exemples montrent le rôle majeur attribué à la préparation d'échantillons. Notons qu'à l'issue de ces étapes, une partie de l'information peut être perdue et ne pourrait être recouvrée qu'en combinant plusieurs techniques d'extraction afin de balayer une large gamme de polarité des substances extraites. Dès lors que l'extraction a été réalisée, il convient de reconstituer l'extrait dans un solvant compatible pour l'injection dans le système analytique retenu.

3.2.3 Acquisition des données

L'étude du métabolome est un travail complexe puisque les métabolites diffèrent selon leur taille, leur structure, leur composition et la nature des groupements fonctionnels les constituant, leurs propriétés physico-chimiques subséquentes (volatilité, polarité) et leur concentration dans le milieu étudié. De ce fait, l'ensemble des métabolites ne peuvent être

analysés par une seule et unique méthode. Quel que soit le protocole suivi, il subsistera une zone d'ombre, relative aux avantages et inconvénients de la méthode analytique, qui ne peut être qu'admise. Le choix de l'instrument pour l'acquisition des profils métaboliques repose sur ses performances en termes de sensibilité et de précision. De nombreuses méthodes d'analyses ont adopté la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) couplée à des techniques séparatives (LC et GC) pour l'analyse métabolomique [130]. Ces techniques, les plus utilisées actuellement, permettent l'analyse la plus exhaustive possible de la matrice étudiée. Par une approche chimométrique des résultats, elles sont capables de mesurer des masses avec exactitude (erreur inférieure à la dizaine de ppm) et/ou de fournir une information structurale fiable nécessaire à l'identification des métabolites. Parmi ces nombreuses techniques, la LC-HRMS apparaît la plus appropriée pour la recherche de composés issus de résidus de contaminants alimentaires permettant de fournir une information de masses exactes. Les technologies spectrométriques TOF (Time of Flight) et Orbitrap™ (Annexe 2) sont les plus utilisées. Néanmoins, le choix de l'instrument doit être en accord avec le besoin en résolution, en particulier pour la recherche de composés inconnus (Figure 24).

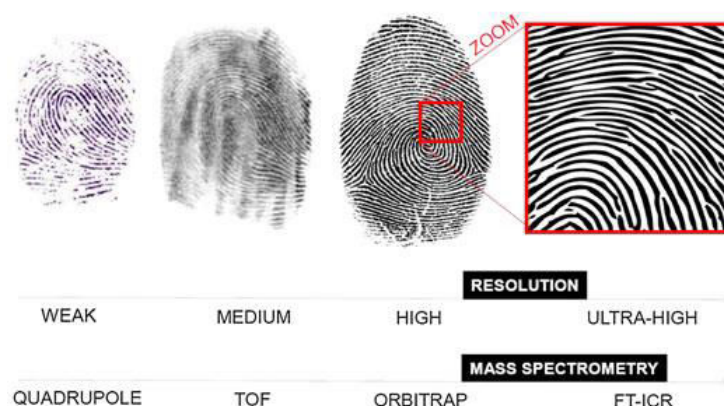


Figure 24 : Evolution des technologies spectrométriques en lien avec la résolution [135]

Des approches analytiques multidimensionnelles faisant appel à plusieurs modes de préparation d'échantillon et de techniques analytiques peuvent être envisagées afin de détecter un maximum de composés permettant ainsi de disposer d'un maximum d'information.

Dans le cadre de notre étude, la LC-HRMS est donc la méthode analytique retenue pour l'acquisition d'empreinte chimique globale des divers échantillons de fromages (PPC et FF) traités et non traités. La méthode LC-HRMS doit être la plus simple possible et convenir à un maximum de composés, tant pour la séparation que la détection ; à savoir, dans le choix de la colonne analytique, la phase mobile et le gradient d'éluion ainsi que les paramètres d'ionisation (température, pressions de gaz). Afin de maximiser la probabilité de dépister des

marqueurs pertinents, il est recommandé d'exploiter un maximum de ressources technologiques à disposition (ex. colonne analytique, sources et modes d'ionisation).

De plus, des facteurs confondants analytiques peuvent impacter les analyses statistiques. A titre d'exemple, en ESI, un encrassement de la source au fil des injections induit une variation du signal le plus couramment dans le sens de la diminution de son intensité. Il existe plusieurs façons de considérer ce facteur confondant analytique par : (i) l'ajout d'un étalon interne qui permettra d'opérer, si nécessaire, à une correction ultérieure du signal, (ii) un séquençage aléatoire des échantillons permet de pallier la variation de l'abondance des signaux, (iii) la réalisation d'échantillons de contrôle qualité dit « QC » qui seront introduit dans la séquence d'injection entre les échantillons à intervalle régulier. Une fois les optimisations réalisées et les facteurs limitants considérés, l'acquisition des données peut être réalisée par l'injection randomisée des échantillons.

3.2.4 Traitement des données

En métabolomique, le traitement des données est réalisé en plusieurs étapes par des logiciels dédiés au traitement de données en vue d'analyses statistiques. Ces logiciels disposent d'algorithmes mathématiques permettant d'assurer ces étapes de traitement par détection automatique et d'alignement des signaux dont les paramètres peuvent être optimisés au sein de la plateforme Galaxy « Work4metabolomics » [147-149] ou avec le package XCMS du logiciel RStudio.

- Le pré-traitement des informations chromatographiques (temps de rétention) et spectrales (rapport m/z et intensité). Le pré-traitement repose sur la vérification visuelle de la validité qualitative des données d'acquisition brutes LC-HRMS, suivie de leur conversion du format de fichier constructeur (.raw) vers un format universel (netCDF) exploitables sous XCMS.
- La détection automatique des pics qui consiste en la sélection des signaux analytiques pertinents présents dans les données brutes acquises correspondant à l'ensemble des métabolites détectés dans la totalité des échantillons et en l'utilisation de filtres de bruit (fonction « findpeaks »). Cette étape permet d'extraire les ions selon leur rapport masse sur charge m/z (avec une précision en masse de 5 ppm), de pointer chaque sommet de pics selon leur T_r et de supprimer les artéfacts électroniques par l'usage de filtres de bruit de fond tels que le ratio signal sur bruit ou une comparaison du niveau de la ligne de base.
- L'alignement (ou groupement) des empreintes inter-échantillons (fonction « group ») dont le principal objectif consiste à associer les signaux identiques provenant d'un même ion détecté dans les différents échantillons, par création de groupes d'ions selon le T_r et le rapport m/z , malgré de légers décalages possibles.
- La correction des temps de rétention (fonction « retcor »), étape complémentaire à la précédente, qui après alignement des signaux identiques permet de recalibrer les T_r

permettant de corriger une dérive éventuelle au cours de la séquence d'acquisition. Il est parfois nécessaire d'effectuer un processus itératif du cycle alignement/correction afin de mettre en évidence de nouveaux groupes non révélés la première fois.

- La recherche et complétion de données manquantes (fonction « fillpeaks »). Cette fonction permet d'intégrer du bruit dans les échantillons où aucun ion n'est détecté. Le bruit intégré est issu du jeu de données « brutes » de départ.
- La normalisation intra- et inter- séries est réalisée si nécessaire, selon la procédure décrite par Van derKloet [148]. La nécessité de normaliser est évaluée après observation de la dérive analytique sur les échantillons QC. Une régression) est appliquée à partir des intensités des échantillons QC. L'intensité médiane des QC est utilisée comme référence pour la mise à l'échelle des échantillons. Suite à cette normalisation, le coefficient de variation (CV) des réponses des métabolites dans les échantillons QC est calculé. Seuls les ions pour lesquels la valeur du CV est inférieure à un pourcentage défini au préalable par l'utilisateur sont conservés. Pour les autres, la variabilité analytique est considérée trop importante pour les conserver.

A l'issue de ces étapes de traitement des données, une matrice de données est générée via le package CAMERA [150]. L'analyse LC-HRMS fournit des données multidimensionnelles selon 3 variables compilées dans une matrice : le rapport m/z , le temps de rétention T_r et l'intensité des signaux (Figure 25). La matrice comprend en ligne l'ensemble des variables nommées « features » correspondant à un couple [m/z ; T_r] pour un ion détecté, et en colonne, la variable d'intensité relative aux variables [m/z ; T_r] pour chaque échantillon. A chaque variable (ou Feature) est associée un graphique des « extracted ion chromatograms » ou EIC, qui représente les chromatogrammes superposés de chaque échantillon. Une représentation par box-plot de la dispersion de la réponse métabolite dans les différents échantillons accompagne également chaque variable.

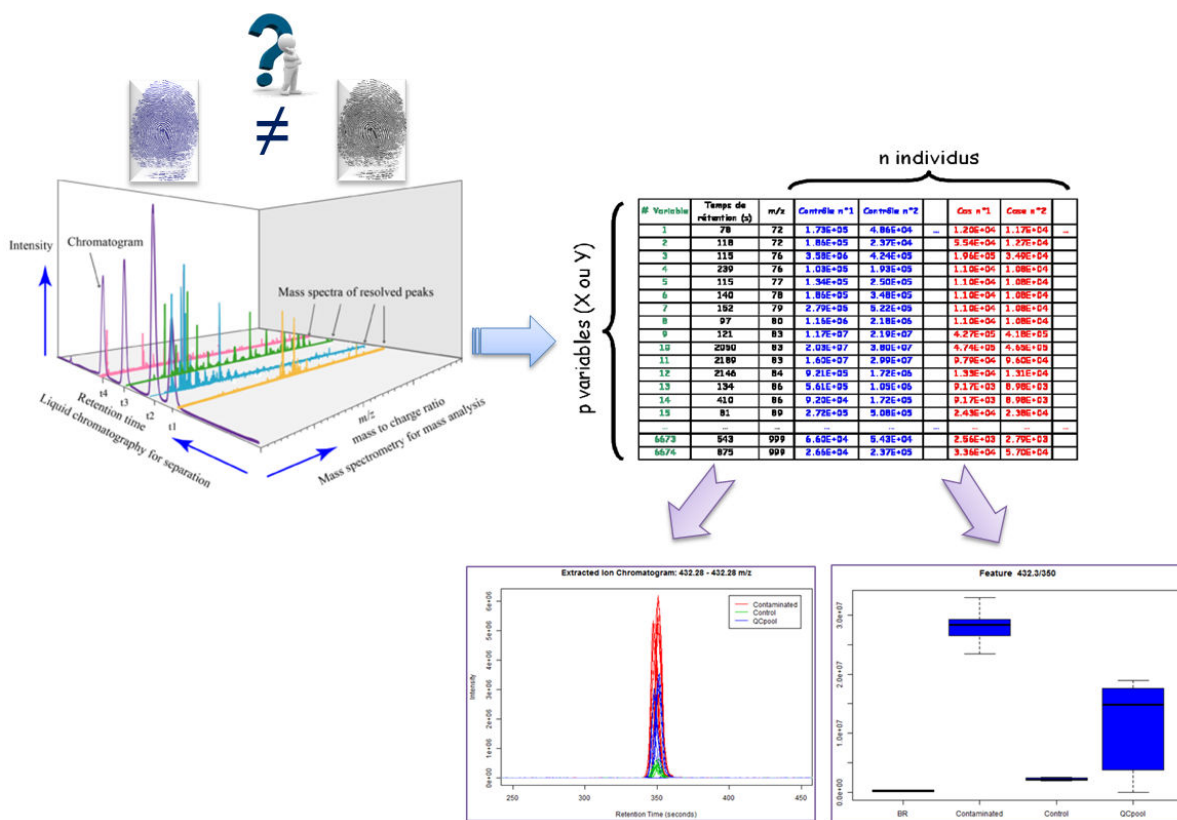


Figure 25 : Synoptique de la méthodologie d'acquisition et de traitement des données pour la recherche de composés inconnus en analyse non ciblée

3.2.5 Analyses statistiques

La comparaison d'empreintes chimiques globales est réalisée selon deux types d'analyses statistiques : les analyses univariées et multivariées [151].

L'analyse statistique des données permet donc de synthétiser et de structurer l'information contenue dans les données mesurées en spectrométrie de masse. Ceci permettra de sélectionner les ions marqueurs de la présence de biocides désinfectants dans les produits transformés du lait.

Préalablement à l'analyse statistique multivariée des données, une des opérations à effectuer est de « centrer » en déplaçant la distribution des valeurs autour de 0 en soustrayant la moyenne, puis de « réduire » les variables en utilisant l'écart-type (Unit Variance ou UV). Dans d'autres cas, une normalisation de type Pareto, en opérant par soustraction de la moyenne et une division par le carré de l'écart-type, est préférée ; ce qui permet d'attribuer peu d'importance aux faibles signaux tel que le bruit de fond.

Les analyses statistiques multivariées sont utilisées pour étudier et décrire un ensemble de données. Elles représentent un outil de synthèse et de visualisation d'un océan d'informations, par la représentation des données tridimensionnelles acquises en LC-HRMS dans un espace réduit à deux dimensions, facilitant ainsi l'observation de la variabilité du jeu de données tout

en prenant soin de limiter au maximum la perte d'information. Ainsi, la projection des données dans un espace à faibles dimensions facilitera l'analyse de données. De ce fait, un changement de coordonnées est effectué afin de définir de nouveaux axes, appelés composantes principales, qui concentreront le maximum de la variabilité du jeu de données (Figure 26). Ces composantes principales sont classées en fonction de la proportion de variabilité qu'elles expliquent. Ainsi, la première composante principale représente la plus grande source de variabilité extraite du jeu de données ; puis la seconde composante, orthogonale à la première, exprime la source de variance de seconde importance à expliquer. Au-delà de deux composantes principales, la variance restant à expliquer suit le même processus d'affectation de composantes, si bien que les dernières contiennent essentiellement du bruit de fond. Dans la majeure partie des cas, les deux à trois premières composantes principales permettent d'expliquer 90% de la variabilité du jeu de données étudiées.

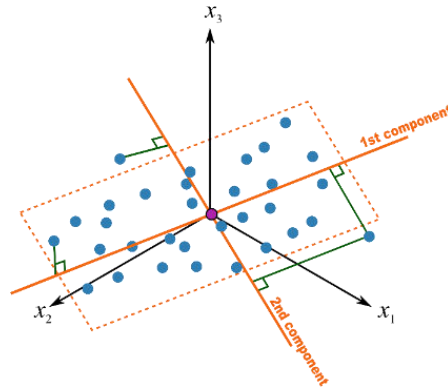


Figure 26 : Représentation de la projection du jeu de données selon deux composantes principales [152]

En pratique, le jeu de données peut être représenté sous la forme de carte factorielle des individus (ou « score plots ») selon leurs coordonnées dans l'espace réduits. Ainsi, les échantillons (ou individus) appartenant à un même groupe seront proches les uns des autres (Figure 27).

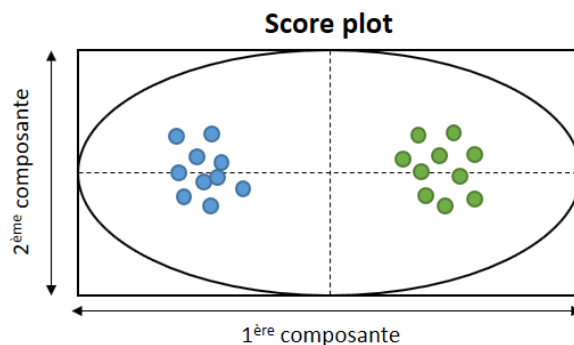


Figure 27 : Représentation du jeu de données en analyses statistiques multivariées sous la forme de carte factorielle des individus (Score plot)

Il existe deux types d'analyses multivariées :

- Les analyses statistiques descriptives qui ne nécessitent pas d'information « a priori » sur la nature des échantillons, et dont la plus connue est l'analyse en composante principale (ACP). Elle a pour objectif de visualiser le nuage d'échantillon en le projetant dans un plan selon deux composantes principales. Cette représentation permet d'observer graphiquement la variabilité du jeu de données et de fournir une première information d'appartenance à un groupe. Cette analyse est généralement suivie d'une analyse dite explicative et/ou prédictive qui permettra une interprétation qui facilitera la mise en évidence d'éventuels signaux discriminant les groupes d'intérêts.
- Les analyses statistiques explicatives et prédictives qui visent à expliquer une ou plusieurs réponses (Y) à partir des variables expérimentales (X) contenues dans la matrice de données. Pour ce type d'analyse, des informations sur la nature des échantillons sont nécessaires à la construction du modèle statistique. Parmi les analyses statistiques explicatives, on retrouve la régression des moindres carrés partiels dite PLS (de l'anglais « Partial Least Square ») et l'analyse discriminante PLS (PLS-DA, de l'anglais « Discriminant Analysis »). Ces régressions présentent deux avantages. Le premier est qu'elles sont insensibles à la présence de variables très corrélées. Ceci est relativement intéressant en spectrométrie de masse, puisque les ions de rapport m/z correspondant aux fragments générés dans la source et aux ions adduits peuvent présenter une forte corrélation entre eux et avec l'ion précurseur. De plus, elles ont l'avantage d'être robuste vis-à-vis des données manquantes, phénomène présent malgré une correction qui a été appliquée lors du traitement des données. En plus du caractère explicatif, ces méthodes d'analyses peuvent présenter un but prédictif. Ainsi, le modèle construit à partir des données initiales sera appliqué à d'autres jeux de données dans le but de prédire la classe d'appartenance des individus selon les groupes définis dans le modèle. De ce fait, lors de la construction du modèle, la faculté prédictive du modèle doit être évaluée.

Dans le cadre du travail de thèse, l'ACP et la PLS-DA ont été utilisées en tant qu'analyses statistiques descriptives et explicatives, pour décrire le jeu de données et repérer des signaux pertinents marqueurs de la présence de biocides désinfectants dans les produits laitiers.

3.2.6 Identification des composés d'intérêts

L'identification chimique des signaux discriminants est probablement l'étape la plus complexe et la plus longue. Pour contribuer à une identification exacte des signaux, la contribution de plusieurs techniques analytiques telles que la RMN, la MS, l'UV et l'IR est souvent nécessaire. En

effet, il est difficile voire impossible d'identifier avec certitude un composé inconnu avec une seule technique.

En approche LC-ESI-MS, l'identification se décline en cinq étapes et débute par l'analyse du spectre de masse et la détermination d'une formule brute qui représente un moyen simple et rapide d'interroger les bases de données existantes (Figure 28).

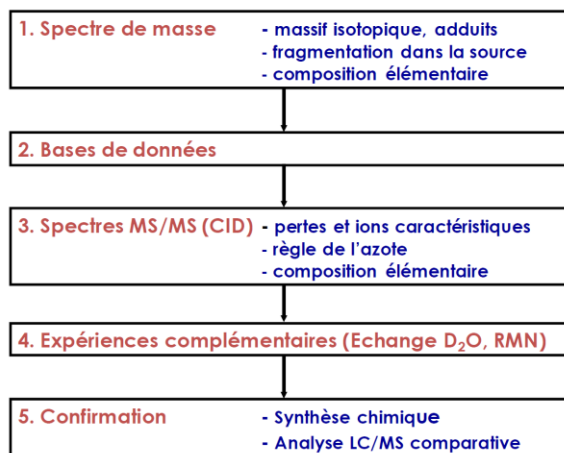


Figure 28 : Processus d'identification des molécules inconnues en approche non ciblée

L'analyse du spectre de masse est primordiale dans le cas de la détermination d'un métabolite. En effet, il est nécessaire de distinguer le signal correspondant à une espèce moléculaire, d'un pic d'un massif isotopique ou d'un ion adduit ou fragment ; ce qui relève de la gestion de la redondance du signal en ESI-MS (Figure 29). Cette redondance du signal se doit d'être prise en compte au risque de compliquer le traitement des données et de considérer à tort un ion fragment comme un ion mono-isotopique.

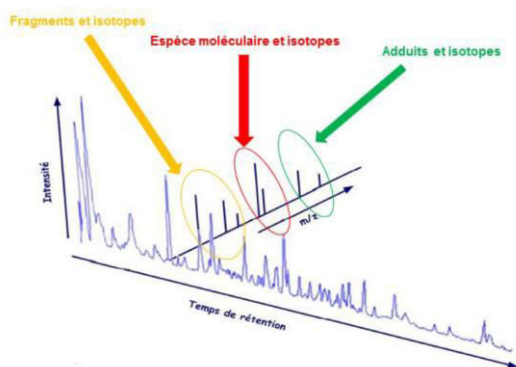


Figure 29 : Représentation de la redondance du signal en ESI-MS [153]

L'étape d'annotation repose également sur l'homologie qui est faite entre le rapport m/z détecté pour une variable et celui calculé pour un métabolite connu et figurant dans la liste des bases de données. Il existe différentes bases de données selon l'usage qui en est fait telles que : NIST05 (*National Institute of Standards and Technology*), HMDB (*Human Metabolom Database*),

Metlin, *LipidBank*, KEGG (*The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), Scifinder (CAS : *Chemical Abstract Service*), Chemspider ou encore Pubchem.

L'annotation peut également se faire au moyen de bases spectrales internes, développées au sein des laboratoires, qui répertorient des spectres de masse (MS, MS/MS et/ou MSⁿ) et les temps de rétention des métabolites. Des expériences MS/MS sont également nécessaires pour identifier les variables et discriminer les réponses obtenues sur la base d'ions produits, de perte de neutres ou de groupements chimiques caractéristiques.

Néanmoins, l'identification formelle du composé est obtenue par injection directe de standards de référence de haute pureté sur le même système analytique. Pour valider l'identification, le standard doit présenter un temps de rétention identique, la même masse exacte et le même profil de fragmentation que le composé inconnu. Cette dernière phase de l'identification est une étape critique qui fait actuellement l'objet d'un travail de concertation en vue d'harmoniser les démarches et l'échange de résultats.

Objectifs du travail de thèse et stratégie de recherche

Pour la protection du consommateur, la sécurité sanitaire des aliments est une préoccupation majeure des autorités et des professionnels, ce tout au long de la chaîne alimentaire. De ce fait, une réglementation européenne stricte (règlement UE No. 852/2004) [2] impose aux acteurs de la filière agroalimentaire la mise en place de plans de nettoyage et désinfection qu'ils se doivent de décrire précisément, et la maîtrise des risques biologiques et chimiques. Ces pratiques font intervenir l'usage de biocides désinfectants pour pallier notamment aux risques bactériens, qui ne sont pas sans risque puisque des résidus de biocides peuvent être à l'origine d'une contamination chimique des aliments. Ce chapitre introductif a permis de mettre en avant la problématique des résidus de biocides dans les produits laitiers. Parmi les désinfectants utilisés au sein de la filière laitière, on retrouve les ammoniums quaternaires de type chlorure de benzalkonium (BACs) et chlorure de dialkyldiméthylammonium (DDACs), ainsi que l'Aminopropyldodécylpropane diamine. Il est donc nécessaire de disposer d'outils de contrôle performants pour détecter les résidus de ces biocides et prévenir les risques pour le consommateur. D'autre part, il est nécessaire d'étudier le comportement des biocides dans les produits laitiers et l'impact des procédés de transformation du lait sur l'apparition de substances indésirables que l'on appellera produits néoformés.

Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail de thèse est de mettre en œuvre des outils analytiques performants pour pouvoir mettre en évidence l'occurrence des résidus de biocides dans les produits laitiers. Le choix d'étudier spécifiquement ces substances actives biocides (BACs et DDACs, et l'Aminopropyldodécylpropane diamine) a été concerté et validé par les membres du projet Resbiolact et l'interprofession laitière pour se rapprocher au plus près des préoccupations des industriels et des transformateurs de la filière laitière. Il est donc d'intérêt nécessaire de disposer de méthodes fiables pour pouvoir apporter aux autorités compétentes des données qualitatives et quantitatives de mesures réalisées dans des matrices laitières ou transformées. La seconde problématique à laquelle nous allons essayer de répondre au cours de ce travail de thèse est d'étudier le devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers, ainsi que l'impact que peuvent avoir les procédés de transformation sur ces résidus. En échange avec les industriels de la filière laitière, il s'agit d'aller plus loin que le développement d'outils analytiques ciblés et d'avoir ici une démarche prédictive pour qu'il soit possible d'évaluer le risque pour le consommateur en lien avec la présence de produits néoformés dans l'alimentation et d'assurer une qualité de produits pour répondre à une problématique de santé publique. Dans ce contexte prédictif, une approche d'analyse non ciblée serait la plus appropriée pour nous amener à essayer de répondre à cette seconde problématique.

Le travail de thèse s'articule donc en 2 parties :

DEVELOPPEMENT ET VALIDATION DE METHODES ANALYTIQUES POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE RESIDUS DE BIOCIDES DESINFECTANTS DANS LES PRODUITS LAITIERS

Dans la première partie de ce travail de thèse, une première méthode quantitative multirésidus d'analyse des ammoniums quaternaires et une seconde méthode d'analyse de l'Aminopropyldodécylpropane diamine, par LC-MS/MS ont été développées et validées dans les produits laitiers. Les produits laitiers retenus pour cette étude sont au nombre de quatre : le lait cru, la poudre de lait entier, les fromages à pâte pressée cuite et fondu. Nous décrivons la stratégie analytique adoptée lors du développement de chacune des méthodes en lien avec l'état de l'art réalisé. Les résultats d'optimisations de séparation chromatographique, de détection spectrométrique et d'extraction seront présentés. Les caractéristiques de performances pour chacune des méthodes évaluées au cours d'un processus de validation seront détaillées. Enfin, l'applicabilité des méthodes a été testée sur des échantillons issus du commerce.

ÉTUDE DU DEVENIR DES RESIDUS DE BIOCIDES ET IMPACT DES PROCÉDES DE TRANSFORMATION SUR L'APPARITION DE PRODUITS NEOFORMES

Pour cette seconde partie, deux études de preuve de concept mettant en œuvre des comparaisons d'empreintes chimiques globales acquises par HRMS seront présentées et concernent : (i) l'analyse de fromages fondus et (ii) de fromages à pâte pressée cuite. Pour réaliser ces études, des analyses ciblées et non ciblées d'échantillons de fromages traités et non traités aux produits biocides ont été réalisées. La fabrication des produits laitiers nécessaires à cette étude a été sous-traitée par la Halle technologique d'Actalia, partenaire du projet Resbiolact. L'utilisation de l'approche métabolomique par spectrométrie de masse à haute résolution a été un outil de choix pour permettre la comparaison d'empreinte chimique entre les échantillons traités et non traités afin de mettre en évidence des marqueurs pertinents à la présence de biocides dans les produits laitiers. La stratégie globale de l'étude, les moyens mis en œuvre pour la réaliser ainsi que les résultats obtenus seront présentés.

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers

1 INTRODUCTION GÉNÉRALE

Cette partie du manuscrit de thèse a pour objectif de répondre à la première problématique de l'étude, à savoir fournir une information d'occurrence de résidus de biocides désinfectants dans les denrées alimentaires, plus particulièrement les produits laitiers, dans un contexte de mesure de l'exposition et d'analyse du risque pour le consommateur. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer de méthodes fiables permettant l'analyse quantitative de ces résidus. Le but principal est d'élaborer une méthode simple et robuste en termes d'extraction des composés, de séparation chromatographique et de détection par spectrométrie de masse en tandem, puis d'en définir les performances analytiques au cours d'un processus de validation.

Les biocides désinfectants retenus dans notre étude, à savoir, les ammoniums quaternaires d'une part, et l'Aminopropyldodécylpropane diamine d'autre part, présentent des propriétés physico-chimiques très différentes, ce qui n'a pas permis de développer une méthode unique permettant l'extraction et l'analyse simultanée de tous les composés. De ce fait, deux méthodes distinctes ont été élaborées, soit une méthode multi-résidus pour les ammoniums quaternaires, et une méthode spécifique à l'Aminopropyldodécylpropane diamine. La méthodologie analytique adoptée dans le cadre de notre étude, est constituée de deux grandes étapes :

- La première étape consiste en une phase de développement et d'optimisations des paramètres de séparation et de détection en LC-MS/MS, et des conditions d'extraction des résidus de biocides contenus dans les produits laitiers, compatible avec la technique analytique retenue.
- La deuxième grande étape consiste en la détermination des caractéristiques de performances de la méthode. Les valeurs de ces caractéristiques de performances déterminées sont alors confrontées à des critères d'acceptabilité attendus pour l'usage de la méthode. Ce processus aboutit à la validation de la méthode. L'évaluation des caractéristiques de performances de la méthode peut être réalisée selon différentes approches. Dans notre étude, une caractérisation globale basée sur une seule caractéristique de performance qui est l'exactitude a été adoptée pour les 2 méthodes développées. En effet, l'exactitude est une combinaison de la justesse (erreur systématique) et de la fidélité (erreur aléatoire). Cette approche d'erreur totale est basée sur la construction d'un profil d'exactitude permettant de vérifier graphiquement

l'adéquation de l'exactitude des niveaux étudiés et l'intervalle d'acceptabilité. Sa construction repose sur la détermination classique des caractéristiques de performances analytiques des méthodes que sont la justesse et la fidélité, (répétabilité et précision intermédiaire). Les limites de détection et les limites de quantification, ainsi que la spécificité de la méthode sont également des caractéristiques évaluées. Cette phase de validation constitue une étape incontournable à l'usage préalable des méthodes dans le cadre d'analyse de routine.

Cette dernière étape a été réalisée de sorte à fournir la preuve de l'applicabilité des méthodes développées par dosage des résidus d'ammoniums quaternaires et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine pouvant être présents dans un panel d'échantillons de produits laitiers pris aléatoirement dans le commerce.

Le travail réalisé suivant la démarche précédemment décrite, est présenté sous la forme d'articles publiés ou soumis dans des journaux à comité de lecture internationale. Une synthèse de la méthodologie appliquée et des résultats obtenus accompagnent les articles. De plus, le travail sur l'Aminopropyldodécylpropane diamine s'est avéré être plus conséquent compte tenu de la possibilité de l'analyser selon deux approches : 1) une analyse directe en LC-MS/MS, ou 2) une analyse en LC-MS/MS ou LC-UV/Fluo avec une étape préalable de dérivation des fonctions amines. Bien que, faute de temps, seule la première approche ait permis de disposer d'une méthode fiable, les résultats expérimentaux obtenus pour cette double approche seront présentés.

**2 RESIDUS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES : DEVELOPPEMENT ET
VALIDATION D'UNE METHODE D'ANALYSE QUANTITATIVE**

ARTICLE 1

MÉTHODE POUR L'ANALYSE MULTI-RESIDUS DES COMPOSÉS D'AMMONIUMS QUATERNAIRES DANS LES FROMAGES ET LES PRODUITS LAITIERS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM : DÉVELOPPEMENT ET VALIDATION UTILISANT L'APPROCHE ERREUR TOTALE



Journal of Chromatography A, 1517 (2017) 86–96



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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



Full length article

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for the analysis of quaternary ammonium compounds in cheese and milk products: Development and validation using the total error approach



Kahina Slimani, Aurélie Féret, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel*

ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Fougères Laboratory, Residues and Contaminants Analysis Unit, France



Introduction/Contexte

Les chlorures de benzalkonium (BACs) et de dialkyldiméthylammonium (DDACs) sont très largement utilisés en industrie laitière dans le cadre des procédures de nettoyage-désinfection des surfaces en contact avec les aliments. Ainsi, des résidus d'AQs risquent d'être retrouvés dans le lait et les produits laitiers après désinfection des surfaces et équipements, et ce malgré un rinçage des surfaces alimentaires. Pour assurer la sécurité du consommateur, les autorités européennes ont fixé, à titre provisoire, à 100 µg/kg la Limite Maximale de Résidus (LMR) pour la somme de ces AQs dans les produits laitiers. Les méthodes de quantification doivent donc être capables de détecter cette catégorie de biocides dans les produits laitiers, à un seuil égal ou inférieur à la LMR en vigueur. L'analyse de la littérature, détaillée dans la section précédente, a montré qu'une extraction des BACs et DDACs par un solvant organique suivie d'une analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem se définit comme l'approche analytique de choix compte tenu des propriétés physico-chimiques des composés d'intérêts et de la nécessité de disposer d'une méthode spécifique.

Le but de ce travail a été de développer et de valider une méthode d'analyse permettant de quantifier dix ammoniums quaternaires dans les produits laitiers. La LMR somme étant fixée à 100 µg/kg, l'objectif a été de viser un seuil de détection de 10 µg/kg pour chacun des ammoniums quaternaires étudiés. Ce travail a été réalisé dans l'optique de mesurer le niveau de contamination des produits laitiers destinés à la consommation humaine et de disposer d'une méthode capable de fournir des données fiables. La gamme de concentration testée sera donc de 5 à 150 µg/kg, gamme sur laquelle il conviendra de maîtriser l'incertitude en l'évaluant lors du processus de validation.

Cette étude, dont les principaux résultats sont détaillés ci-après, a fait l'objet d'une publication intitulée « Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for the analysis of quaternary ammonium compounds in cheese and milk products : Development and validation using the total error approach » dans une revue internationale à comité de lecture, *le Journal of Chromatography A*.

Méthodologie et principaux résultats

Dans le cadre de ce travail de thèse, les produits laitiers retenus pour l'étude ont été le lait cru, la poudre de lait entier, et deux types de fromages : fromage à pâte pressée cuite (PPC) et fromage fondu (FF). Les ammoniums quaternaires analysés ont été les BACs (C₈ à C₁₆) et les DDACs (C₁₀ à C₁₈). Nous avons fait le choix de travailler avec des fioles en polyméthylpentène (PMP) pour la préparation des solutions de standards et avec des tubes jetables en polypropylène (PP) pour l'étape d'extraction.

1°) Optimisation des paramètres de séparation et de détection en LC-MS/MS

L'infusion individuelle de chaque standard d'ammoniums quaternaires dans la source electrospray (ESI) du spectromètre de masse a permis d'optimiser les paramètres de détection spectrométrique en mode MRM pour chaque composé. Les composés étant déjà chargés positivement, la détection a été naturellement effectuée en mode d'ionisation positive qui induit l'observation des ions $[M]^+$. Ainsi, les transitions MRM les plus spécifiques et leur énergie de collision ont pu être définies et retenues via l'optimisation du composé le moins sensible, dans notre cas, le DDAC-C₁₈. Aux dix composés ciblés, cinq standards internes deutérés (BAC-C₁₀-d₇, BAC-C₁₂-d₇, BAC-C₁₄-d₇, BAC-C₁₆-d₇ et DDAI-C₁₀-d₃) ont été rajoutés pour permettre une quantification par étalonnage interne afin de corriger les rendements d'extraction et les effets matrice. Un de ces standards internes, l'iodure de didecyldiméthylammonium-d₃ a été synthétisé à façon pour cette étude, puisqu'à notre connaissance il n'était pas disponible sur le marché.

Les optimisations de la séparation chromatographique nous a conduit à travailler avec une phase stationnaire C18 pour séparer les 5 BACs et les 5 DDACs, ainsi que les 5 standards internes deutérés associés. Un mélange ternaire de phase mobile constitué distinctement d'eau à 0,3% d'AcF, d'ACN à 0,3% d'AcF et de MeOH nous a permis d'obtenir une excellente séparation de tous les composés jusqu'au plus lipophiles (DDAC-C₁₆ et DDAC-C₁₈).

Dès cette phase du développement, nous avons observé une rémanence des ammoniums quaternaires, et plus particulièrement du DDAC-C₁₀, au sein du système analytique. La rémanence des AQs, et plus particulièrement du DDAC-C₁₀, a été déjà rapportée dans la littérature (Partie 1). Certaines expérimentations ont été réalisées durant la thèse afin de trouver la source de cette rémanence non résolue à ce jour. Les observations que nous avons pu faire lors de cette recherche d'origine nous ont conduit à émettre une hypothèse quant à une concentration d'ammoniums quaternaires en tête de colonne hypothétiquement présents en infime traces dans les flacons de solvants commerciaux.

2°) Optimisation des conditions d'extraction

Le lait cru de bovin a été choisi comme matrice de référence lors des nombreux essais réalisés. Le protocole repose sur une extraction liquide-liquide (ou solide-liquide pour les autres matrices) à partir d'une prise d'essai d'un gramme de matrice. La meilleure sensibilité de détection a été obtenue avec un mélange contenant de l'ACN et de l'acétate d'éthyle (AcEt) en proportion égale. L'AcEt nous a été nécessaire pour extraire les composés à longue chaîne aliphatique, plus particulièrement les DDAC-C₁₆ et C₁₈, puisqu'il est un solvant plus adapté que l'ACN à l'extraction des composés apolaires.

L'application aux autres matrices a néanmoins nécessité quelques optimisations. Pour la poudre de lait, l'ajout d'un millilitre d'eau a été jugé utile pour disposer d'un mélange homogène et a

permis d'augmenter considérablement le rendement d'extraction des BACs en réduisant celui de certains DDACs tels que les DDAC-C₁₆ et C₁₈.

A l'issue du processus d'extraction, un extrait sec résiduel est obtenu puis repris par du méthanol. En appliquant ce protocole à la poudre de lait et aux deux types de fromages, un résidu graisseux causé par l'extraction à l'AcEt est constaté après évaporation. Une injection de matière grasse n'étant pas envisageable en LC-MS/MS, une étape de dégraissage avant l'extraction a été envisagée. La comparaison des rendements d'extraction obtenus en employant différents solvants à fort pouvoir dégraissant tel que le dichlorométhane, l'hexane et l'octane a montré une perte d'ammoniums quaternaires quel que soit le solvant. La purification de l'extrait final a finalement été réalisée par une action thermique en positionnant les extraits à -18°C après une reprise au méthanol, sans nécessité d'étape de dégraissage.

Les rendements d'extractions estimés (Lait : 73–106%; Poudre de lait : 9–76%.; Fromage PPC : 43–74%; Fromage Fondu : 51–86%) se sont révélés acceptables. Au regard des résultats obtenus (80-109%), aucun effet matrice n'a été observé. Il n'a donc pas été jugé nécessaire de recourir à une étape de purification de type QuEChERS ou SPE.

3°) Evaluation des performance et validation de la méthode

Cette méthode a été validée selon une approche basée sur l'erreur totale et la construction d'un profil d'exactitude sur un domaine de validation allant de 5 à 150 µg/kg. Le profil d'exactitude a été construit dans le cadre de cette étude, à partir des limites d'acceptabilité fixées à ± 30-40%, et de la valeur de β fixée à 70-80%, qui correspond à un risque α pris de 20-30% que les futurs résultats ne soient pas compris dans l'intervalle de tolérance. Ces paramètres ont été fixés pour chaque molécule d'intérêt dans les 4 matrices étudiées. Les données de validation ont été analysées grâce au logiciel e.noval®, version 3.0. La régression linéaire pondérée $1/X^2$ a été majoritairement retenue quel que soit le couple molécule/matrice. La justesse a été globalement démontrée puisque la valeur du biais relatif (en %) n'excède pas le seuil usuel de 20% pour la plupart des composés d'intérêt. Néanmoins, la justesse est parfois insatisfaisante à de faibles concentrations (5 et 10 µg/kg) notamment pour le DDAC-C₁₀. Ceci s'explique par le phénomène de rémanence connu qui peut compromettre les performances à ces niveaux de concentrations. La fidélité, exprimée en termes de coefficient de variation (en %), a été évaluée à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire. Quel que soit le couple matrice/molécule et le niveau de concentration, les valeurs de répétabilité et de fidélité intermédiaire sont inférieures à 20%. Toutefois, comme pour la justesse, nous avons pu trouver des valeurs supérieures, à la plus faible concentration (5 µg/kg) pour certains analytes (BAC-C₈, DDAC-C₁₀ et DDAC-C₁₈). Ceci pourrait être expliqué par l'absence de standard interne deutéré analogue et/ou une rémanence élevée dans le cas du DDAC-C₁₀. La limite de quantification a été estimée à 5 µg/kg pour la plupart des molécules. Quelques exceptions sont à noter notamment

pour le DDAC-C₁₀ pour lequel les limites de quantifications sont plus élevées, 11 à 18 µg/kg selon la matrice, en raison du phénomène de rémanence. Bien que l'objectif initial de limite de quantification n'ait pu être atteint pour l'ensemble des combinaisons molécule/matrice, nous avons considéré que la méthode était satisfaisante et applicable en routine sur le domaine de validité défini.

4°) Applicabilité de la méthode

Afin de démontrer l'applicabilité de la méthode à des échantillons prélevés de manière aléatoire dans des points de vente commerciaux, 126 échantillons de produits laitiers dont des fromages et des poudres de lait infantiles ont été analysés.

12 des 126 produits laitiers analysés, soit 9% des échantillons, se sont révélés contenir des résidus d'AQs, dont 2 dépassaient la LMR provisoire fixée à 100 µg/kg. La valeur maximale quantifiée est de 287 µg/kg dans un fromage à pâte pressée cuite contenant le DDAC-C₁₀. De plus, 8% des échantillons dans lesquels une concentration inférieure à la LMR a été mesurée sont principalement des fromages PPC, et contiennent principalement le DDAC-C₁₀, et dans une moindre mesure un mélange de BAC-C₁₂ à C₁₆. Sur les 10 poudres analysées, 2 d'entre-elles ont présenté des résidus de DDAC-C₁₀ quantifiés à 50 µg/kg. Les autres produits laitiers analysés, notamment le lait, ne présentaient pas de traces quantifiables d'ammoniums quaternaires. Les quantités de résidus d'AQs, principalement de DDAC-C₁₀, retrouvées dans les produits laitiers et notamment dans les fromages peuvent s'expliquer par un facteur de concentration (x10) entre la matière première (le lait) et le produit fini (le fromage), et par une affinité des ammoniums quaternaires pour la matière grasse.

Conclusions/Perspectives

Ce travail a permis de développer une méthode LC-MS/MS fiable permettant l'analyse quantitative simultanée de 10 ammoniums quaternaires dans le lait, la poudre de lait, le fromage à pâte pressée cuite et le fromage fondu, méthode potentiellement applicable à toutes sortes de produits laitiers. Il a été démontré qu'une simple extraction par un mélange de solvant organique (ACN/AcEt, 50:50) est adaptée pour extraire les 10 ammoniums quaternaires de toutes les matrices, même celles présentant un taux de matière grasse élevé, en présentant des rendements d'extractions satisfaisants et démontrant l'absence d'effet matrice. La simplicité de cette méthode laisse à penser qu'elle serait facilement adaptable à de nombreuses matrices alimentaires. La méthode a été validée selon l'approche de l'erreur totale qui nous a permis de définir les caractéristiques de performances de la méthode pour chaque ammonium quaternaire étudié. La méthode s'est avérée exacte, avec des valeurs de justesse et de fidélité répondant à nos objectifs initiaux, sur un domaine de validité de 5 à 150 µg/kg pour la plupart des ammoniums quaternaires quel que soit la matrice étudiée. L'applicabilité de la méthode à

des échantillons commerciaux a également démontré sa fiabilité, ce qui confirme sa capacité à être utilisée en routine pour la détermination de traces de biocides désinfectants dans les produits transformés de l'industrie agroalimentaire. La versatilité de la méthode que nous avons revendiquée ci-avant a été démontrée lors de son usage dans un autre volet du projet Resbiolact confirmant son intérêt puisqu'elle a permis de doser des échantillons issus d'audits industriels et d'eaux de rinçage dans le cadre d'essais expérimentaux. Plus largement, cette méthode présente un grand intérêt puisqu'elle pourrait être utilisée pour la mise en place de plans de surveillance fournissant des données sur la présence d'AQs dans les denrées alimentaires, ouvrant ainsi la possibilité de réaliser ou d'affiner une évaluation du risque pour les consommateurs.



Full length article

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for the analysis of quaternary ammonium compounds in cheese and milk products: Development and validation using the total error approach



Kahina Slimani, Aurélie Féret, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel*

ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Fougères Laboratory, Residues and Contaminants Analysis Unit, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2017

Received in revised form 31 July 2017

Accepted 10 August 2017

Available online 14 August 2017

Keywords:

LC-MS/MS

Multiresidue biocide method

Quaternary ammoniums disinfectants

Cheese and milk products

Total error validation

Accuracy profile

ABSTRACT

Quaternary ammonium compounds (QACs) are both cationic surfactants and biocidal substances widely used as disinfectants in the food industry. A sensitive and reliable method for the analysis of benzalkonium chlorides (BACs) and dialkyldimethylammonium chlorides (DDACs) has been developed that enables the simultaneous quantitative determination of ten quaternary ammonium residues in dairy products below the provisional maximum residue level (MRL), set at 0.1 mg kg^{-1} . To the best of our knowledge, this method could be the one applicable to milk and to three major processed milk products selected, namely processed or hard pressed cheeses, and whole milk powder. The method comprises solvent extraction using a mixture of acetonitrile and ethyl acetate, without any further clean-up. Analyses were performed by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry detection (LC-ESI-MS/MS) operating in positive mode. A C18 analytical column was used for chromatographic separation, with a mobile phase composed of acetonitrile and water both containing 0.3% formic acid; and methanol in the gradient mode. Five deuterated internal standards were added to obtain the most accurate quantification. Extraction recoveries were satisfactory and no matrix effects were observed. The method was validated using the total error approach in accordance with the NF V03-110 standard in order to characterize the trueness, repeatability, intermediate precision and analytical limits within the range of $5\text{--}150 \mu\text{g kg}^{-1}$ for all matrices. These performance criteria, calculated by e.noval[®] 3.0 software, were satisfactory and in full accordance with the proposed provisional MRL and with the recommendations in the European Union SANTE/11945/2015 regulatory guidelines. The limit of detection (LOD) was low ($<1.9 \mu\text{g kg}^{-1}$) and the limit of quantification (LOQ) ranged from $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ to $35 \mu\text{g kg}^{-1}$ for all matrices depending on the analytes.

The validation results proved that the method is suitable for quantifying quaternary ammoniums in foodstuffs from dairy industries at residue levels, and could be used for biocide residues monitoring plans and to measure the exposition consumer to biocides products.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Quaternary ammonium compounds (QACs) are surfactant substances containing a quaternary cationic nitrogen atom. Their structure and properties differ according to the nature of the radicals attached to the nitrogen atom. QACs are widely used for

their biocidal properties as plant protection products [1,2] or wood preservatives [3], being both bactericidal and antimicrobial [4–7]. They are also commonly used as disinfectants and detergents in industrial and commercial formulations [8–10].

In the food industry, cleaning-disinfection (CD) processes are essential to eliminate microorganisms, and chemicals such as QACs are typically used. In the event of poor cleaning practices, especially in the event of insufficient rinsing with water, residues of these compounds can persist on food surfaces and thus become a potential source of contamination for food. The presence of biocide residues on surfaces and their subsequent transfer onto and

* Corresponding author at: 10 B rue Claude Bourgelat, Bioagropolis, Javené, F-35306, Fougères, France.

E-mail address: dominique.pessel@anses.fr (D. Hurtaud-Pessel).

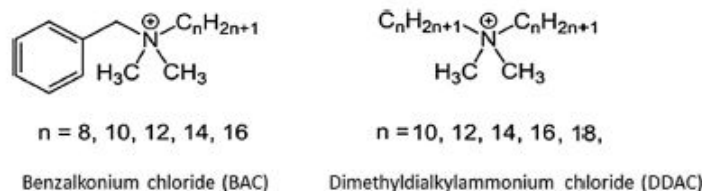


Fig. 1. Molecular structures of the BACs and DDACs analyzed.

into food could be potentially harmful to the consumer. It is therefore important to have a reliable analytical method with which to quantify the concentration level of residues in food. This study was thus designed to develop a sensitive, specific and accurate analytical method using LC-MS/MS to measure QACs in milk products, as these compounds are widely used to disinfect food contact surfaces in the dairy industry.

Among QACs, benzalkonium chloride (BAC) is one of the most commonly used in disinfectant products [7,11,12]. BAC is a mixture of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in which the alkyl group has a chain length from C8 to C16 (Fig. 1). In commercial formulations, the most commonly used homologues are BAC-C12, BAC-C14 and BAC-C16 in different proportions. The BAC mixture is advantageous since each homologue has its own biocidal properties [13], for example against fungi and yeast (BAC-C12), gram-positive bacteria (BAC-C14) and gram-negative bacteria (BAC-C16).

Another important class of QACs, very often mixed with BACs is dialkyldimethylammonium chloride compounds (DDACs). DDAC homologues vary in the two *n*-alkyl chain length, *n* representing an even number of carbons from C10 to C18. The most commonly encountered and used homologue, at more than 90%, is didecyldimethylammonium chloride (DDAC C10) [14]. Like BACs, DDACs are used in the food industry for disinfecting surfaces and equipment. Although regulation [15] defines BAC as a mixture of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides with alkyl chain lengths of C8 to C18, and DDAC in the form of a mixture of alkyl-quaternary ammonium salts with alkyl chain length of C8, C10 and C12; this study focuses on a multiresidue method including BAC C8 to C16 and DDAC C10 to C18 (Fig. 1) since the targeted analytes are those that can be found in commercial disinfectant formulations.

Knowing that QACs are used in various fields, it is legitimate to wonder whether they may affect human health. Occupational and domestic pathologies have been observed due to their use as disinfectants and detergents, which exposes users to their irritant and allergenic effects [16]. The harmful effects encountered are mainly dermatological (such as eczema), ocular (lacrimation, stinging) and/or respiratory (such as asthma) [17,18]. These cases are widespread among hospital, agricultural and maintenance staff.

Under current European legislation, these substances are currently covered by Biocidal Products Regulation (BPR) 528/2012/EU [19], which repeals Biocidal Products Directive 98/8/EC [20] concerning the placing on the market and use of biocidal products, designed to protect both the consumer and the environment. Given the frequent use of this chemical family in the food industry, a risk of contamination into food could not be ruled out, which led Germany to alert the European Commission. Accordingly, the results of a European survey led to the definition of a provisional MRL set at 0.1 mg kg^{-1} for application from August 2015 [14,15]. This provisional MRL is scheduled to be reviewed in December 2019.

Because of the broad use of QACs (mostly BACs and DDACs), and considering that there is a high probability of finding them in food following transfer from food surfaces, we considered it important to focus on the analytical measurement of these compounds in dairy products. Indeed, the application of QACs during the cleaning and disinfection of surfaces throughout the dairy production

chain, even if associated with rinsing steps, may lead to residues of these substances being left on industrial surfaces that may in turn contaminate dairy products. To address this issue, a reliable method needs to be developed in order to detect and quantify QACs at low concentration levels in cheese and milk products, in accordance with the provisional MRL (0.1 mg kg^{-1}). This one could allow to determine the contamination level in dairy products in the aim of risk assessment and to measure the consumer exposition to biocides products.

A review of the literature showed that various instrument techniques could be used to analyze QACs depending on the structure of the analytes studied.

Some authors used capillary electrophoresis to analyze QACs and more precisely the BACs [21–25]. A recent study [26] shows the interest of using potentiometric sensor technique for the determination of BACs used as preservatives in pharmaceutical formulations.

Gas chromatography (GC) is used to a lesser extent for the analysis of quaternary ammoniums [27,28]. In the case of analysis by GC, a dequaternization step is necessary and a loss of information is ensured [9].

Liquid chromatography with ultraviolet (UV) detection was commonly used to determine BACs in various fields [3,4,6,7,10]. LC-UV may be used to analyze BACs because they contain a benzene ring [6,9,10]. However, this technique cannot be used for multiresidue analysis of QACs, since DDACs do not contain any chromophore groups. Furthermore, LC-UV analysis lacks specificity and selectivity since interference linked to co-extracted components may affect the analysis of BACs, as noted by Miyauchi et al. [3]. More recently, mass spectrometry (MS) and tandem mass spectrometry (MS/MS) detection have been used for analyzing QACs in commodities as diverse as fruit, vegetables and milk [1,2,11,12,29–35] because of their high selectivity and specificity based on molecular ion information, which offers unequivocal identification of the compound in samples.

Concerning QACs separation, reverse phase chromatography was commonly used with a predominance of C18 phase [1–3,7,8,12,30–32,35]. However, cyano column [4–6,9] have been used mainly for the analysis of BACs, and more recently HILIC column was also used [33,34].

Several of instrumental methods have been developed for the separation of BACs and DDACs using liquid chromatography with binary gradient mode (e.g. Water/ACN or Water/MeOH) [1–6,10–12,29–35]. Most authors add acid solution (acetic or formic) in the eluents, and some add also buffer solution (acetate or formate) [1–3,29,31–34] whose the addition achieve to improve the separation.

The objective of our work was to develop and validate a multiresidue method for the simultaneous quantitative determination of five BACs and five DDACs in complex dairy product extracts, namely raw milk, milk powder, hard pressed cheese and processed cheese. Special attention was paid to the efficiency of the extraction method, i.e. minimizing the number of steps and interactions between the matrix and analytes. Validation was conducted with the concept of total error to determine the performance character-

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers

88

K. Slimani et al. / J. Chromatogr. A 1517 (2017) 86–96

Table 1
LC-MS/MS parameters for the determination of each substance.

Compound		Retention time (min)	Precursor m/z	Quantification ion		Qualification ion		Tube-Lens (V)	Ion ratio (%)	ISTD used
				Transition 1 m/z	E _{coll} (eV)	Transition 2 m/z	E _{coll} (eV)			
BAC	C8	6.37	248	156	20	91	30	73	46.1	BAC-C10-d ₇
	C10	6.59	276	184	20	91	36	79	59.1	BAC-C10-d ₇
	C10-d ₇ *		283	98	36	-	-	80	-	-
	C12	6.84	304	212	20	91	35	84	61.0	BAC-C12-d ₇
	C12-d ₇ *		311	98	35	-	-	84	-	-
	C14	7.14	332	240	25	91	35	82	55.8	BAC-C14-d ₇
	C14-d ₇ *		339	98	35	-	-	82	-	-
	C16	7.50	360	268	23	91	35	88	64.8	BAC-C16-d ₇
	C16-d ₇ *		367	98	35	-	-	88	-	-
DDAC	C10	7.20	326	186	30	57	30	118	5.3	DDAI-C10-d ₃
	C10-d ₃ *		329	189	30	-	-	118	-	-
	C12	7.90	382	214	30	57	35	139	18.1	DDAI-C10-d ₃
	C14	8.73	438	242	33	57	36	122	9.0	DDAI-C10-d ₃
	C16	9.32	494	270	37	57	43	188	9.8	DDAI-C10-d ₃
	C18	9.84	550	298	39	57	45	127	6.5	DDAI-C10-d ₃

* Deuterated internal standard.

istics of the method developed. These performance characteristics have been compared with the acceptance criteria laid down in European Union SANTE/11945/2015 regulatory guidelines [36].

To the best of our knowledge, no studies on the analysis of these QACs in a wide variety of dairy products, such as cheese, have been reported in the literature. Dairy products of different varieties were studied and several samples were purchased from local markets and analyzed, to determine the applicability of the developed method on real samples.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, reagents and solutions

2.1.1. Analytical reference standards and standard solutions

The selected quaternary ammonium standards: benzyltrimethylammonium chloride (>96%), benzyltrimethyldecylammonium chloride (99%), benzyltrimethyltetradecylammonium chloride (99%), benzyltrimethylhexadecylammonium chloride (99%), didodecyltrimethylammonium bromide (98%), didodecyltrimethylammonium bromide (98%), dimethylditetradecylammonium bromide (>97%), dihexadecyltrimethylammonium bromide (97%), and dimethyloctadecylammonium bromide (>98%) were obtained from Sigma-Aldrich (Switzerland). The deuterated internal standards benzyltrimethyldecylammonium-d₇ chloride, benzyltrimethyldecylammonium-d₇ chloride, benzyltrimethyltetradecylammonium-d₇ chloride, and benzyltrimethylhexadecylammonium-d₇ chloride were obtained from HPC Standards GmbH (Cunnersdorf, Germany) and didodecyltrimethylammonium-d₃ iodide from AtlanChim Pharma (Saint Herblain, France).

Stock solutions of each standard were individually prepared at a concentration of 0.5 mg mL⁻¹ in HPLC-grade acetonitrile and ultra-pure water (70:30 ratio V/V) with 0.16 mL L⁻¹ of TFA (2 mmol L⁻¹). For internal standards, stock solutions were prepared under the same conditions at 500 mg L⁻¹ for DDAC C10-d₃ and at about 800 mg L⁻¹ according to the different BAC-d₇ internal standards. The different working solutions were prepared by serial dilution of a mixture of standards stock solutions in methanol. A mixed internal standards solution at 500–800 µg L⁻¹ was prepared from stock solutions for addition prior to extraction. All the solutions were stored at 4 °C in plastic vials to prevent adsorption. The stability of

stock solutions for each standard was determined as satisfactory for at least one year (data not shown).

2.1.2. Chemicals and reagents

All the reagents and solvents used were of analytical grade or HPLC grade. Acetonitrile, methanol, water, dichloromethane and iso-hexane were supplied by Fisher Scientific (Loughborough, England). Iso-octane, trifluoroacetic anhydride acid (>99%) and formic acid (98–100%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). N-hexane 99% was supplied by Biosolve (Dieuze, France). Magnesium sulfate anhydrous was obtained from VWR International (Leuven, Belgium).

2.2. Dairy products samples

For this study, four matrices purchased from different local stores were selected to represent the diversity of dairy products. Samples included raw milk (3.2% w/w fat; 3.6% w/w protein, Declaration of Manufacturer (DM)), whole milk powder (26% w/w fat; 26% w/w protein, DM) and various cheeses. The cheese samples studied were classified into two groups: the first one included processed cheese (18.5% w/w fat; 11.5% w/w protein, DM) and the second included hard pressed cheese (35% w/w fat; 27% w/w protein, DM) as representatives of milk products.

All samples, raw milk and cheeses were kept frozen (T° < -18 °C), while the whole milk powder was kept at room temperature until analysis.

2.3. Sample preparation

Frozen cheese samples were first grated using a household cheese grater. Raw milk did not require special preparation. The following extraction protocol applies to all the dairy matrices. To extract the targeted substances, 1 g of matrix sample was weighed in a polypropylene (PP) centrifuge tube. Whole milk powder was rehydrated (ratio 1:2) to improve the extraction homogeneity. Then, 100 µL of the deuterated internal standards (IS) solution was added. Samples were vortexed and allowed to stand for 10 min before adding 20 µL of formic acid solution (98–100%). The samples were vortexed again. The extraction solvent, 9 mL of acetonitrile/ethyl acetate (ACN/EtAc – 50:50), was added and samples were vortexed once more to homogenize the mixture. For the milk and milk powder samples, 2 g of MgSO₄ was added to dry the aqueous phase. All the sample tubes were then placed on a mechanical

rotary shaker for 10 min at about 100 rpm in order to promote exchanges between the sample and the extraction solvent. After stirring, samples were centrifuged for 10 min at 4200 g at 4 °C. All the supernatant was transferred into a 10 mL PP centrifuge tube and evaporated to dryness under a nitrogen flow at 50 °C. The dry extract was recovered in 400 µL of methanol (MeOH). After stirring, all but the milk sample extracts were placed in a freezer (<−18 °C) for 30 min in order to freeze the extracted fats. Finally, the MeOH upper layer was filtered through a 0.45 µm PVDF filter prior to LC-MS/MS analysis.

2.4. Liquid chromatography – mass spectrometry analysis conditions

Liquid chromatography was performed with a Thermo Fisher Surveyor instrument (San Jose, CA, USA) using a Phenomenex® Synergi Fusion-RP 80A column (75 mm × 2.00 mm, 4 µm) protected by a Phenomenex® C18 guard column (4 × 2 mm AJO-4286). The mobile phase consisted of 0.3% formic acid in ultrapure water (A) – methanol (B) – 0.3% formic acid in acetonitrile (C). A ternary gradient elution program was used and was as follows: A was held at 95% and C at 5% for the first 0.5 min; with a linear gradient to 100% of C and to 0% of A from 0.5 to 3.0 min; B was held to 0% during the first three minutes. Then a linear gradient to 60% of B and 40% of C, and A was held at 0% from 3.0 to 7.0 min. To return to initial conditions a linear gradient was applied from 7.0 to 11.0 min, and held at 95:5 (A:C) from 11.0 to 14.0 min for re-equilibration time. Flow rate of 400 µL min^{−1} was used to separate the QACs. The injection volume was 10 µL and the column was maintained at room temperature. A switch valve was used upstream of the mass spectrometer to divert the flow to waste for 1.5 min at the beginning of the chromatography.

Mass spectrometry analysis was carried out using a Thermo Fisher TSQ Quantum Ultra tandem quadrupole mass spectrometer (San Jose, CA, USA) controlled by the Xcalibur® software operating in positive ion electrospray (ESI) mode. MS-MS parameters were optimized through acquisitions via the direct infusion of each analyte standard solution at 5 µg mL^{−1} when the [M⁺] molecular ion was detected. The optimizations of mass spectrometer source conditions were applied to the least sensitive ion, i.e. DDAC-C18. Analytes were detected through a multiple reaction monitoring (MRM) mode monitoring two precursor-product ion transitions for each compound and one for each deuterated internal standard. The first transition was used for quantification, and the second for confirmation. Table 1 summarizes the MRM acquisition parameters. The following ESI interface and optimized MS/MS conditions were used: spray voltage – 4500 V; capillary temperature – 350 °C; sheath gas pressure – 40 psi; ion sweep gas pressure – 10 psi; auxiliary gas pressure – 5 psi; CID pressure (argon) – 1 mTorr; resolution Q1 and Q3 – 0.7; scan width – 0.01 m/z.

2.5. Validation design

2.5.1. Total error approach

The validation concept applied to the LC-MS/MS method is based on the total error approach and the accuracy profile developed by the French Society of Pharmaceutical Science and Technology (SFSTP) [37–40]. This approach is based on the construction of an accuracy profile from trueness and precision values and may thus be used to assess the method's performance. The accuracy profile is used as a decision-making tool to determine the model's range of validity through two parameters: the acceptance limit (λ), which defines an interval around the reference value, and the β -expectation tolerance limit, which represents the proportion of measurements inside the acceptance limits. In our study, the value for λ was set at 30–40% which gives 15%–20% true-

ness and 15%–20% precision, and the β value was set at 70–80%, which corresponds to a risk of 20–30% according to the different molecules analyzed. The accuracy profile is a tool to verify the adequacy of the accuracy of the studied levels and the acceptability interval. Its construction is made on the classical determination of the performance parameters but which are combined to conclude on the validity of the method. Moreover, this approach makes it possible to control the measurement uncertainty on the entire range of validity of the method. For a critical analysis of the validation results, data obtained will be evaluated according to European Union SANTE/11945/2015 [36].

The experiment validation design consisted in preparing two kinds of samples in unrelated ways: matrix-fortified calibration standards (CS) are used to determine the appropriate response function by plotting a calibration curve for reliable quantification, whereas matrix-fortified validation standards (VS) are intended to assess the analytical method's precision and trueness. For all matrices, samples of each series (CS and VS) were analyzed on the same day, each series being repeated on three different days.

Blank raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese samples that we checked were free of QACs were used for the validation step. Although quaternary ammoniums are widely used as disinfectants in industry, it has been fairly simple to obtain blank milk samples since they come from local producer. For cheese from local supermarket, an extensive preliminary analysis was necessary to ensure the absence of QACs or their presence at trace levels below our objective of limit of quantification set at 5 µg kg^{−1}.

2.5.2. calibration standards (CS)

Calibration standards were prepared by adding standards to a blank matrix prior to extraction, and were only used to draw the calibration curve. Two independent series of calibration standards with six concentration levels were performed for milk, whole milk powder and cheeses per day. The concentration levels of BACs and DDACs were 5, 10, 20, 50, 100 and 150 µg kg^{−1} for all matrices. For calibration purposes, the response area ratio (peak area analyte/internal standard peak area) was considered over the whole range of concentration.

Calibration standards are used to determine the detection and quantification limits for each analyte in all the matrices.

2.5.3. Validation standards (VS)

Validation standards were prepared by adding standards to a blank matrix prior to extraction, as for CS, and were considered as unknown samples to be quantified through a routine analytical procedure. The concentration levels selected for the validation standards were the same as those for the calibration standards, corresponding to low concentrations around the estimated limit of quantification, four intermediate concentrations, and finally high concentration levels. The analyses were performed in duplicate on three separate days.

2.6. Assessment of matrix effects and extraction recoveries

The approach described by Matuszewski et al. [41] and Krueve et al. [42] for assessing the matrix effect (ME) and recoveries from the extraction procedure (RE) was applied. Experiments were carried out to assess ME and RE for different dairy products, i.e. raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese. In both cases, experiments were performed on six replicates for each matrix.

2.6.1. Matrix effects

Matrix effects, which can lead to signal suppression or enhancement, were evaluated using a post-extraction method. Blank matrix

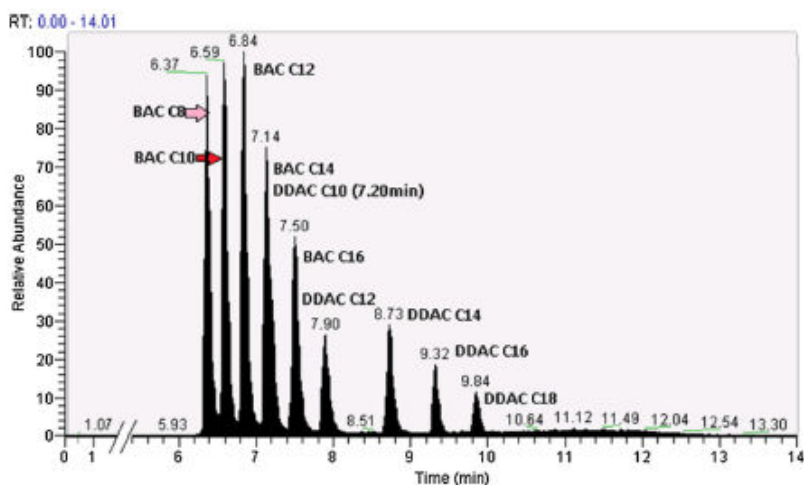


Fig. 2. LC-MS/MS chromatogram of BACs and DDACs homologues in standard solution at $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

samples were prepared without adding standards and internal standards in the early step of the extraction protocol. After evaporation, the residue was reconstituted with a solution containing $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of each compound and a deuterated internal standard solution. This extract solution was injected into the LC-MS/MS system. Standard solutions prepared under the same conditions without any matrix were also analyzed. The matrix effect (%ME) was calculated as follows:

$$\text{ME (\%)} = \frac{\text{Peak area ratio of analytes spiked after extraction}}{\text{Peak area ratio of analytes in standard solution}} \times 100$$

Depending of the result of this calculation, three conclusions can be drawn up: a) when %ME equals 100%, no matrix effect is observed, b) values of %ME greater than 100% indicate ionization enhancement whereas c) values lower than 100% indicate ionization suppression.

2.6.2. Extraction recoveries

Like for the matrix effects, recoveries from the extraction procedure were evaluated by spiking pre- and post-extraction analytes. In the first case, standards were added to a blank matrix prior to extraction. The internal standards were added at the end after the evaporation step to reconstitute the extract. The second case corresponds to a process used to calculate matrix effects by spiking the analyte samples post-extraction. Extraction recoveries (%RE) were calculated as follows:

$$\text{RE (\%)} = \frac{\text{Peak area ratio of analytes spiked before extraction}}{\text{Peak area ratio of analytes spiked after extraction}} \times 100$$

Values close to 100% mean that all the analytes were fully extracted from the matrix.

3. Results and discussion

3.1. Method development

3.1.1. Optimization of LC-MS/MS conditions

In the literature, several types of analytical column were referenced for the separation of QACs when C18 [1,2,8,30–32] is predominant. Methods using a CN [4–7] and a HILIC column were also proposed [33,34]. In this study, two C18 columns – Luna C18 ($150 \times 2 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$) and Synergi Fusion 80A ($75 \times 2 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$) – were trialed for the separation of ten QACs. Although both gave satisfactory results, plotting a well-defined peak, the Synergi Fusion column offered a gain in peak intensity. This increase of the intensity for the Synergi Fusion column compared to Luna column may

have several origins: the increase of particle size, a shorter column and a decrease of carbon load (12% for Synergi versus 17.5% for Luna). These parameters can allow a decrease of retention power and the peak width which leads to a better sensitivity with the increase of the peak intensity. Also, the chemistry of the Synergi Fusion stationary phase which use a polar embedded and a hydrophobic ligand can contribute to improve the retention and the selectivity of hydrophobic and polar compound as QACs. Indeed, a satisfactory chromatographic separation was achieved in less than 14 min for the ten compounds.

A ternary elution gradient program using water, ACN and MeOH was necessary in order to elute all the analytes, unlike some authors [12,30,31] who simplified their elution gradient. Although ternary gradient are rarely used for QACs analysis, it has not been possible to efficiently separate and obtain a satisfactory sensitivity for all compounds with binary gradient (e.g. Water/ACN or Water/MeOH combination). The difference in polarity of ACN and MeOH, and their combination in the gradient, allowed us to separate the more hydrophobic molecules with a long carbon chain, in particular the DDACs.

Some authors add buffer such as ammonium acetate and formate [5,8,29] in the mobile phase to obtain a better separation and good repeatability. In our case, the addition of formic acid offered an improvement. The results show that when acidified with formic acid (0.3%), both water and ACN provide a Gaussian peak shape and a satisfactory peak intensity. The addition of a buffer solution was not therefore considered necessary since the results with formic acid meet the separation and repeatability criteria.

Setting the flow rate at 0.4 mL min^{-1} gave retention times of between 6 and 10 min, and satisfactory response intensities. The efficient separation of the ten analytes obtained after these optimizations is illustrated in Fig. 2.

With regard to MS/MS parameters, the fragmentation of molecular ions was optimized in terms of collision energy and tube lens for each QAC homologue. It should be noted that the infused compounds contained a chloride or bromide counter ion, which do not impact the mass chromatogram, as only the ammonium ion $[\text{NR}_4]^+$ was detected. The fragmentation pattern was in complete accordance with information reported in the literature [6,8,13,33,34]. For BAC homologues, the ions used for quantification were formed by the loss of toluene and corresponded to the $[\text{NR}_3]^+$ fragments. The other, less abundant, fragment (m/z 91) used for definitive

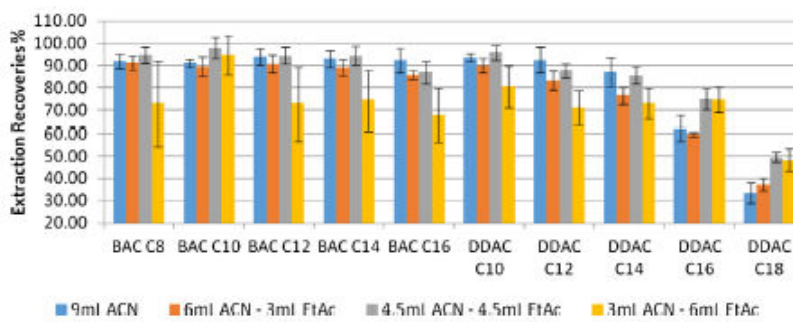


Fig. 3. Extraction recoveries depending to the nature of the extraction solvent for all analytes in raw milk.

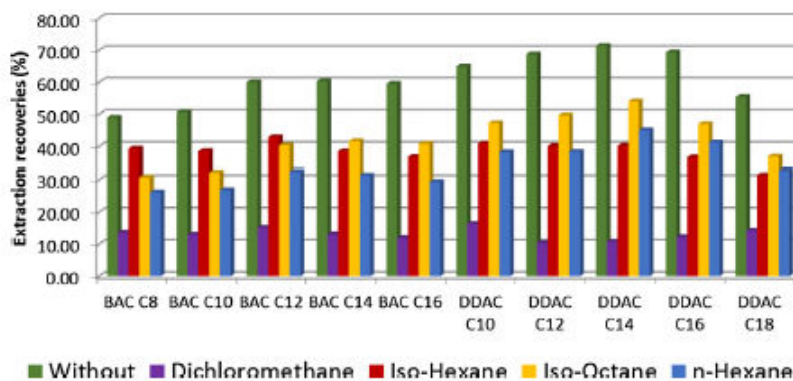


Fig. 4. Extraction recoveries (%) at 50 µg kg⁻¹ for all analytes in hard pressed cheese depending on the defatting solvent.

identification is common to all homologues and corresponds to the tropylium ion.

For DDAC homologues, the specificity of ion quantification was represented by the loss of an alkyl chain. Here too, a common fragment (the m/z 57 ion) was observed. In contrast to the m/z 91 fragment for BACs, the determination of m/z 57 is less intuitive, and results from successive fragmentations of the alkyl chain [6,34]. In the literature, only DDAC C10 and DDAC C12 have been studied, but by extrapolation and by studying the other homologues, we confirm that m/z 57 is common to all DDAC homologues. In accordance with international requirements on the identification of residues using mass spectrometry [36], a parent ion and two characteristic fragments were selected for the quantification and confirmation ion (Table 1).

3.1.2. Analysts precautions

It is important to point out that the analysis of QACs requires some precautions to be taken in the laboratory. Indeed, their analysis is reported to be problematic mainly due to their adsorption on labware and analytical instruments. We thus decided to work with disposable PP materials for the analysis of BACs and DDACs.

Indeed, a remanence of analytes – especially for DDAC C10 – was observed during injections of pure MeOH, a phenomenon that persisted after numerous successive MeOH injections. According to information from the literature [31,35,43] and from our experiments, the source of QACs carryover has been exhaustively sought. This instrument carryover could come from mobile phases since, an increased time between MeOH injections led to a bigger analyte signal. This suggests an accumulation of QACs, potentially contained in the mobile phases, at the top of the column. Whatever the case,

despite the numerous tests carried out, it was impossible to obtain a chromatogram without a signal for DDAC C10 which it could lead to an increase in its analytical limits.

3.1.3. Optimization of the sample extraction procedure

The literature reports several different types of preparation for extracting benzalkonium and dimethyldialkylammonium chlorides from foodstuffs. QuEChERS methods have been used for milk [2,34] or fruit and vegetables [12,31]. Other solvent extractions have been applied to dairy products, meat, eggs, and cereals [11,30,32,35]. A solid phase extraction (SPE) clean-up step with weak cation exchange (WCX) has sometimes been added to the extraction protocol [29,33].

As reference matrix, raw milk was chosen for the first optimization of extraction procedure. The aim was to develop an extraction procedure that is not only as simple as possible but necessarily applicable to all the other dairy products studied, namely milk powder, hard pressed cheese and processed cheese.

The type of extraction solvent was selected by comparing the extraction recoveries for BACs and DDACs from spiked milk samples. Four mixtures of ACN and ethyl acetate (EtAc) in different proportions for a total volume of 9 mL were tested for milk matrix (Fig. 3). The best sensitivity was obtained using a 50:50 (v/v) proportion of ACN/EtAc. Increasing the proportion of EtAc improves the extraction of long-chain alkyl substances (especially DDAC C16 and C18), as ACN is known to be a poor solvent for apolar compounds. The solvent mixture of ACN/EtAc (50:50, v/v) which gave satisfactory results for the extraction of AQs in raw milk has been applied to the other matrices. This choice was the most appropriate since MeOH is not the best solvent for the extraction in milk due

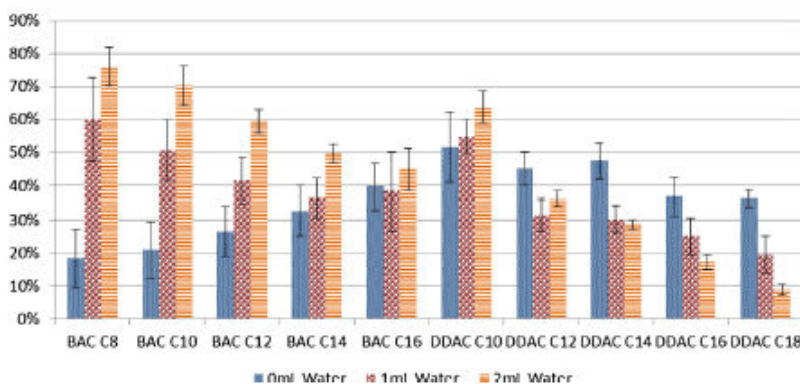


Fig. 5. Extraction recoveries (%) of all analytes in whole milk powder depending on the volume of water added before extraction.

to the miscibility of this organic solvent with the aqueous phase contained in milk.

The aim being to have a method capable of extracting QACs from any dairy products, the application of the generic extraction protocol to cheese was a critical step because of the high percentage of fat it contains compared to milk and the analytes lipophilic nature. The challenge in using the liquid extraction solvent previously selected (50:50 ACN/EtAc) to extract the QACs from cheese lay in discarding the fat remaining at the bottom of the tube after dry evaporation. An analysis of the literature revealed little information for the extraction in fatty matrices; so to the best of our knowledge, no studies have investigated the analysis of QACs in cheese. It was decided to add an additional step, before extraction by ACN/EtAc where several apolar organic solvents known as degreasing agents (namely dichloromethane, n- and iso-hexane, and iso-octane) were tested. The results showed a significant loss of QACs when any organic defatting solvents were added (Fig. 4). This can be explained by the lipophilic character of QACs, whose long carbon chain has an affinity for the apolar solvents used. Finally, we found that it was possible to remove fat by simply freezing the extract recovered with MeOH, offering at the same time satisfactory recovery of QACs.

All of these optimizations allowed us to obtain a simple and fast protocol, common to all dairy products for preparing samples and extracting QACs, and requiring no purification step.

Before validation, extraction recoveries and matrix effects were estimated using the method described in sections 2.6.1 and 2.6.2. For each experiment, 6 replicates of each matrix spiking with all analytes at $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ were used. The extraction recoveries were satisfactory for all matrices depending of the analytes of interest (Raw milk: 73–106%; Powder milk: 9–76%; Hard Pressed Cheese: 43–74%; Processed Cheese: 51–86%) (Table 2). Nevertheless, we observed a decrease in recovery values for cheese matrices (which contain more fat) in particular hard pressed cheese and the decrease was more pronounced for long carbon chain molecules. For milk powder, the recoveries are lower for some analytes because of the addition of water before extraction (Fig. 5). This addition which must improve sampling homogeneity brought out the fat of the matrix. This can be explained by the amphiphilic character of QACs, whose long carbon chain has an affinity for fat; this is especially true for DDAC C16 and DDAC C18. We observed satisfactory repeatability of retention times and signal intensities for the chromatography separation, without saturation or interference peaks due to the matrix. In view of the results obtained (80–109%), no matrix effect was observed whatever the matrix studied. In the literature, Xian et al. [34] observed signal suppression effect for

Table 2

Extraction recoveries (%) for all analytes in raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese.

		Raw milk	Whole milk powder	Hard pressed cheese	Processed cheese
BAC	C8	86%	76%	61%	85%
	C10	89%	70%	64%	85%
	C12	78%	59%	65%	86%
	C14	82%	50%	64%	84%
	C16	94%	45%	62%	84%
DDAC	C10	106%	64%	74%	86%
	C12	92%	36%	67%	79%
	C14	88%	29%	66%	75%
	C16	77%	17%	60%	69%
	C18	73%	9%	43%	51%

milk and reconstituted milk powder due to the presence of impurities such as organic acids and nutrients that suppress ionization despite deproteinizing the sample with ACN. They therefore considered it necessary to add a purification step. In our case, no matrix effect at all was observed, whether suppression or enhancement, so neither QuEChERS nor SPE purification were tested.

In view of the extraction recoveries, good repeatability of the method and absence of a matrix effect, liquid-liquid extraction including concentration of the extract by evaporation under a nitrogen flow was considered as sufficient.

3.2. Method validation

Our objective was to develop an LC-MS/MS method for quantifying quaternary ammoniums in cheese and milk products at concentration levels in full accordance with the provisional MRL, currently set at $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. The method was validated during this study in full accordance with the NF V03-110 standard relating to the validation of analysis methods for agri-foodstuffs by construction of an accuracy profile.

The results were processed by e.noval® 3.0 software. The performance criteria [44,45] assessed to ensure the reliability of the developed method in dairy products are as follows: specificity (identification criterion), response function (calibration curve), trueness, precision (repeatability and intermediate precision), accuracy, limit of detection and limit of quantification.

3.2.1. Specificity (identification criterion)

The specificity of the method was demonstrated by analyzing standard solutions, blank samples for each matrix, and spiked

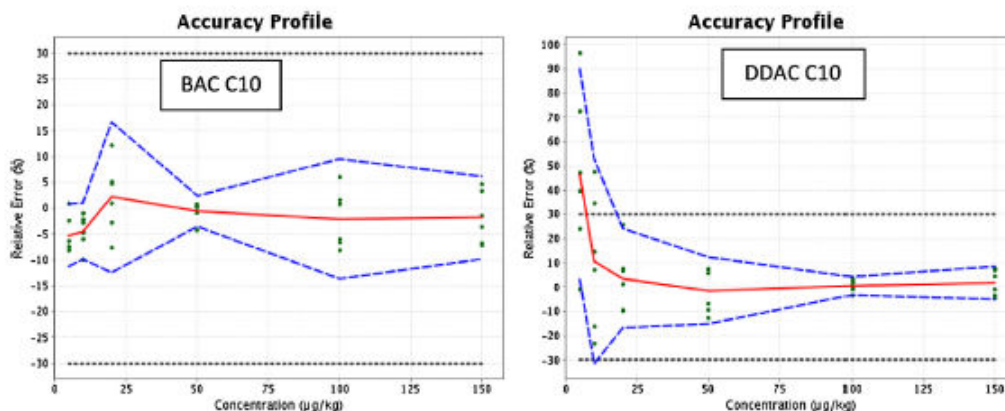


Fig. 6. Accuracy profiles from the validation of BAC C10 (left) and DDAC C10 (right) in hard pressed cheese.

Table 3

Calibration Regression of all analytes for raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese.

	Matrix	Analytes	Calibration model
	Raw Milk Whole Milk Powder Hard Pressed Cheese Melted Cheese	All	Weighted $1/X^2$ Linear
Exceptions	Raw Milk Hard Pressed Cheese Melted Cheese	DDAC C18 DDAC C18 BAC C16	OUT OF SCOPE Weighted $1/X$ Linear Weighted $1/X$ Linear

Table 4

Synthesis of method's performances results for all analytes in all matrices.

		λ (%)	β (%)	Relative bias (%)	Repeatability (R.S.D., %)	Intermediate precision (R.S.D., %)	Risk (%)
BAC	C8	[30]	[70–80]	[−8.861; 8.604]	[0.8989–52.10]	[0.8989–77.31]	[0.0001260–76.06]
	C10	[30–35]	[80]	[−5.230; 9.573]	[0.8403–8.907]	[0.9200–12.59]	[0.0001164–10.21]
	C12	[30]	[80]	[−7.336; 9.096]	[0.8915–10.59]	[1.540–11.49]	[0.001394–12.11]
	C14	[30]	[80]	[−5.289; 10.25]	[1.388–7.882]	[2.132–9.510]	[0.006616–10.14]
	C16	[30–40]	[70–80]	[−4.545; 8.399]	[0.5317–6.107]	[2.331–13.71]	[0.009747–13.50]
DDAC	C10	[30]	[70]	[−52.27; 46.49]	[0.8746–120.2]	[2.485–120.4]	[0.01311–84.24]
	C12	[30]	[70–80]	[−7.478; 20.39]	[1.746–9.319]	[3.921–15.20]	[0.3289–35.87]
	C14	[30]	[70–80]	[−13.11; 10.82]	[0.7825–9.365]	[3.262–16.30]	[0.04841–24.97]
	C16	[30]	[70]	[−6.976; 39.01]	[0.8052–15.36]	[4.739–20.13]	[0.2833–66.68]
	C18	[30]	[70]	[−28.61; 11.62]	[5.030–21.06]	[9.594–68.21]	[7.487–75.75]

matrix samples then comparing each chromatogram. Two MRM transitions were monitored for each analyte, and none of the analytes share the same transitions. In blank samples, no interference was observed at the expected retention time for each of the ten QACs and their internal standards except for DDAC C10 (see Section 3.1.2). This does not, however, affect the specificity of the method for this analyte.

3.2.2. Response function

The response function of an analytical procedure is the relationship between the response (signal) and the concentration (quantity) of the analyte sample. To determine the best response function, the calibration curve plotted from calibration standard samples (CS) was constructed for each matrix, and the following regression models tested: linear, linear through 0, weighted linear, linear with logarithm transformation, linear regression with square root transformation, quadratic and weighted quadratic regressions. The regression model showing the best indices for accuracy, dosing range, trueness, precision and quantification limits calculated using validation standards (VS) was chosen as the regression model.

The calibration model selected for almost all analytes and all matrices is weighted ($1/X^2$) linear regression. For some compounds, weighted ($1/X$) linear regression was more appropriate, thus selected (Table 3). The total error approach allowed us to choose appropriate regressions for the molecule of interest in the matrices studied, which would not have been the case following other validation guidelines which imposes linear model probably less appropriate relative to weighted regression for the analysis at low concentrations.

3.2.3. Trueness

Trueness provides information on the analytical method's systematic error. It refers to the closeness of agreement between an accepted reference value and a mean experimental one. As can be seen from the results in Table 4 and Table S1–S2–S3–S4 (supplementary material) for all analytes in each matrix, trueness is expressed in terms of relative bias (%). It was assessed for each compound from the measurement of validation standards (VS) in the matrix at each concentration level. Trueness was globally demonstrated, as relative bias did not exceed the threshold of 15%–20% for almost all target substances. However, trueness may be unsatisfactory for the

Table 5
Detection and quantification limits.

Matrices	Analytes	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Lower LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Lower LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
		total error approach		SANTE/11945/2015	
Raw Milk Powder Milk Hard Cheese Melted Cheese	All	[0.1–1.9]	5.0	5.0	
Exceptions	Raw Milk	BAC C8	0.4	17.2	20
		DDAC C10	0.5	17.6	20
		DDAC C18	ND		
	Powder Milk	DDAC C10	0.6	11.0	10
		DDAC C12	0.5	8.4	10
		DDAC C14	0.5	5.6	5
		DDAC C16	2.0	9.0	10
		DDAC C18	ND		
	Hard Cheese	DDAC C10	0.3	18.0	20
		DDAC C18	1.9	12.2	10
	Melted Cheese	DDAC C10	0.4	6.7	10
		DDAC C18	0.5	34.9	50

lowest concentration level of certain analytes as DDAC C10 whatever the matrix studied. This is explained by its remanence in the instrument (see section 3.1.2). These results conclusions on trueness are in accordance with the European SANTE 11945/2015 [36] which recommends recoveries in the range of 70–120% with RSD values below 20%.

3.2.4. Precision

Precision gives information on the random error of an analytical method. It was evaluated at two levels: repeatability and intermediate precision expressed as a relative standard deviation (RSD%) at each concentration level in all matrices. The estimations are shown in Table 4 and Table S1–S2–S3–S4 (supplementary material). Whatever the matrix, for most analytes and most concentration levels, RSD% values for repeatability and intermediate precision were below 15–20%. As for trueness, we could find upper values at the lowest concentration level ($5 \mu\text{g kg}^{-1}$) for some analytes such as BAC C8, DDAC C10 and DDAC C18. This lack of precision may be explained by the use of a non-analogous deuterated internal standard for the quantification as analogous deuterated are used for all other molecules, or a high remanence in the case of DDAC C10 (see section 3.1.2). These general results illustrated the proposed method's good precision. Furthermore, no significant difference was observed between matrices. An in-depth review of the values calculated for repeatability and intermediate precision shows that the latter have higher RSD% values, so the main component expressing the method's variability is due to inter-day analysis. According to SANTE/11945/2015 [36], same conclusions can be made since RSD values lower than 20% were obtained for almost all analytes at both spiking levels, in repeatability and inter-day studies, also confirming the precision of the method.

3.2.5. Accuracy

Accuracy takes into account the test results' total error, i.e. systematic and random errors [46]. It is assessed from the accuracy profile of which an example for BAC C10 is given in Fig. 6.

The analytical method was considered valid within the defined dosing range for which the accuracy profile was within the acceptance limits, set in our case at 30–40% ($\pm\lambda$).

According to the accuracy profile example displayed in Fig. 6, and as can be seen from the results, the β -expectation tolerance intervals set between 70% and 80% (blue dashed curves) were inside the $\pm 30\%$ to $\pm 40\%$ acceptance limits (black dotted lines) for almost all concentration levels tested.

3.2.6. Limit of detection and limit of quantification

The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were determined from the matrix curve calibration according to the total error approach. LOD is estimated using the mean intercept of the selected calibration model and the residual variance of the regression obtained by ANOVA. LOQs are obtained by calculating the smallest and highest amount beyond which the accuracy limits or β -expectation limits (i.e. 70–80% in the present study according to the analytes) go beyond the acceptance limits. The dosing range is thus defined as the interval between the lower and upper limits within which the procedure is sufficiently accurate. The LODs and LOQs are summarized in Table 5. The LODs of the developed method are lower than $1.9 \mu\text{g kg}^{-1}$ for all the analytes and matrices studied. The method is therefore broadly valid from $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (i.e. the lower LOQ) to $150 \mu\text{g kg}^{-1}$ (i.e. the upper LOQ) for dosing BACs and DDACs in raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese. For DDAC C10, the LOQs obtained are slightly higher than those of the other analytes due to its remanence in the whole analytical procedure, previously discussed in section 3.1.2. DDAC C18 also has an LOQ above $5 \mu\text{g kg}^{-1}$, which is a minor inconvenience as it is a hardly used compound, almost never found in common commercial cleaning solutions. In comparison with the SANTE/11945/2015 [36], LOQs obtained for the two approaches are very closed although the accuracy profile approach gives more accurate values of quantification limit (Table 5). Anyway, these limits of quantification are fully in accordance with the provisional MRL set at 0.1 mg kg^{-1} . Since this is the first method of analysis of the QACs in cheese, a comparison of the analytical limits cannot be carried out. However, as regards to milk products samples, the LODs and LOQs assessed in our method are in the same range of concentrations (i.e. $1\text{--}50 \mu\text{g kg}^{-1}$) than the other reported analytical methods dosing QACs in milk [2,33,34]. In addition, an LOQ or a reported limit of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ is often announced by other authors [2,29–35] for a test sample up to 10 g, whereas this method needs only 1 g of sample matrix.

The above results suggest that the method presented in this study is able to detect BACs and DDACs at low concentration levels in these particular dairy products but could be considered for an extension to others.

4. Applicability to real samples

In order to demonstrate the applicability of the LC–MS/MS method to real samples randomly collected from several local retail outlets, the proposed method has been applied to the quantifica-

tion of quaternary ammonium compounds in milk, milk powder, cream and various cheese, including some infant products (16, 10, 4 and 96, respectively).

12 out of 126 dairy products (9.5%) were found to contain trace residues of QACs, there of 2 samples with amounts exceeding the default MRL of $100 \mu\text{g kg}^{-1}$. The maximum amount detected was $287 \mu\text{g kg}^{-1}$ DDAC C10 in a hard pressed cheese sample. Samples found positive but at concentrations below the MRL are mainly hard pressed cheese. DDAC C10 was the mostly found (10 cheese samples) and in 4 cheese samples, residues below the MRL were found for BAC mixture of C12, C14 and C16. In milk powder, residues at concentration level of $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ for DDAC C10 were found in 2 samples. Concerning the other matrices, little or none has proved positive which means above the quantification limits. Of the 126 samples analyzed, no babyfood products contain QACs at quantifiable level.

5. Conclusion

This study describes a simple and reliable LC–MS/MS method suitable for the simultaneous quantitative determination of ten quaternary ammonium biocides applicable to a wide variety of dairy products: milk, milk powder, hard pressed cheese and processed cheese. The LC–MS/MS parameters and extraction procedure were optimized in order to improve the method's sensitivity. Ten QACs were successfully extracted from all the matrices (even the fattiest one) using an extraction solvent of acetonitrile and ethyl acetate. As it has been proved that there is no matrix effect and the extraction recoveries are satisfactory, a simple liquid–liquid extraction is sufficient. Due to the simplicity of this extraction, it can be assumed that other matrices could be analyzed with this method. The method was validated using the total error approach, which allowed us to define appropriate validation parameters for each analyte and provided a comprehensive knowledge of the method's performances. The method was shown to be reliable over a range of $5\text{--}150 \mu\text{g kg}^{-1}$, and it can thus be used for the routine determination of these analytes in real samples. This method is able to measure traces of disinfectant biocides in processed products within the agri-food industry. It is therefore of great interest since it could be used to implement a monitoring plan and provide data on the occurrence of QACs in food, thus opening up the possibility of carrying out risk analyses on these substances.

Conflict of interest

Kahina Slimani and all the other authors declare that they have no conflict of interest. This article does not contain any studies using human or animal subjects.

Acknowledgments

This work was financially supported by the French Dairy Inter-branch Organization (CNIEL, Resbioact Project) and the Regional Council of Brittany. The authors would also like to thank Mr. Michel Laurentie for his scientific support concerning the e-nova software and Ms Sophie Mompelat for her advice and review of this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.034>.

References

- [1] E. Schüle, S. Schöler, D. Kolberg, M. Wieland, N. Bauer, A. Wolheim, E. Scherbaum, Residues of Quaternary Ammonium Compounds (QAC) in Fruits and Vegetables, 2012 <http://www.cvuas.de>.
- [2] E.U.R.L.P.R.S.R. f, Methods, Analysis of BACs and DDAC in Milk Using QuEChERS Method and LC-MS/MS, 2014 www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/eurlstrm_meth_qac_milk.pdf.
- [3] T. Miyauchi, M. Mori, K. Ito, Quantitative determination of benzalkonium chloride in treated wood by solid-phase extraction followed by liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. A* 1095 (2005) 74–80.
- [4] A. Gomez-Gomar, M.M. Gonzalez-Aubert, J. Garces-Torrents, J. Costa-Segarra, Determination of benzalkonium chloride in aqueous ophthalmic preparations by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8 (1990) 871–876.
- [5] J. Dudkiewicz-Wilczynska, J. Tautt, I. Roman, Application of the HPLC method for benzalkonium chloride determination in aerosol preparations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 909–920.
- [6] M.J. Ford, L.W. Tetler, J. White, D. Rimmer, Determination of alkyl benzyl and dialkyl dimethyl quaternary ammonium biocides in occupational hygiene and environmental media by liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometry and tandem spectrometry, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 165–172.
- [7] L.P. Labranche, S.N. Dumont, S. Levesque, A. Carrier, Rapid determination of total benzalkonium chloride content in ophthalmic formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 989–993.
- [8] P. Bassarab, D. Williams, J.R. Dean, E. Ludkin, J.J. Perry, Determination of quaternary ammonium compounds in seawater samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 673–677.
- [9] K. Kümmerer, A. Eitel, U. Braun, P. Hubner, F. Daschner, G. Mascart, M. Milandri, F. Reinthaler, J. Verhoef, Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 281–286.
- [10] G. Vincent, M.C. Kopferschmitt-Kubler, P. Mirabel, G. Pauli, M. Millet, Sampling and analysis of quaternary ammonium compounds (QACs) traces in indoor atmosphere, *Environ. Monit. Assess.* 133 (2007) 25–30.
- [11] M.V. Bruijnsvoort, J. Rooselaar, A.G. Stern, K.M. Jonker, Determination of residues of quaternary ammonium disinfectants in food products by liquid chromatography-Tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 87 (2004) 1016–1020.
- [12] F.J. Arrebola-Liébanas, M.A.H. Abdo, J.L.F. Moreno, J.L. Martinez-Vidal, A.G. Frenich, Determination of quaternary ammonium compounds in oranges and cucumbers using QuEChERS extraction and ultra-Performance liquid Chromatography/Tandem mass spectrometry, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 1021–1026.
- [13] O. Nunez, E. Moyano, M.T. Galceran, Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 89–95.
- [14] EFSA, Evaluation of monitoring data on residues of didecylidimethylammonium chloride (DDAC) and benzalkonium chloride (BAC), EFSA supporting publication, EN-483 (2013) 30pp.
- [15] EFSA, Reasoned opinion on the dietary risk assessment for proposed temporary maximum residue levels (MRLs) of didecylidimethylammonium chloride (DDAC) and benzalkonium chloride (BAC), *EFSA J.* 12 (2014) 3675–3698.
- [16] INRS, Fiche Toxicologique Chlorures d'alkyldiméthylbenzylammonium, INRS Base de données, 2005, pp. 1–8.
- [17] D. Tennstedt, Pathologies induites par les ammoniums quaternaires: de la maison au travail, *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 48 (2008) 246–248.
- [18] M.L. Hemery, Ammoniums quaternaires et pathologies professionnelles, *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 48 (2008) 249–251.
- [19] E. Commission Regulation (EU), No 528/2012 Of The European Parliament And of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, *Off. J. Eur. Union L167* (2012) 1–123.
- [20] E. Commission, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market, *Off. J. Eur. Communities* (1998) 1–63 (L123).
- [21] X. Ding, S. Mou, S. Zhao, Analysis of benzylidimethyldodecylammonium bromide in chemical disinfectants by liquid chromatography and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1039 (2004) 209–213.
- [22] T.S.K. So, C.W. Huie, Salting-out solvent extraction for the off-line preconcentration of benzalkonium chloride in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 22 (2001) 2143–2149.
- [23] S.J. Prince, H.-J. McLaury, L.V. Allen, P. McLaury, Analysis of benzalkonium chloride and its homologs: HPLC versus HPCE, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19 (1999) 877–882.
- [24] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, Determination of cationic surfactants by capillary electrophoresis with indirect photometric detection, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 17–22.

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers

- [25] H.-Y. Liu, W.-H. Ding, Determination of homologues of quaternary ammonium surfactants by capillary electrophoresis using indirect UV detection, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 303–312.
- [26] M. Gaber, H.M.A. Shawish, A.M. Khedr, K.I. Abed-Almonem, Determination of benzalkonium chloride preservative in pharmaceutical formulation of eye and ear drops using new potentiometric sensors, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 2299–2305.
- [27] L. Xiang, X.K. Wang, Y.W. Li, X.P. Huang, X.L. Wu, H.M. Zhao, H. Li, Q.Y. Cai, C.H. Mo, Analysis of trace quaternary ammonium compounds (QACs) in vegetables using ultrasonic-Assisted extraction and gas chromatography–Mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 6689–6697.
- [28] W.-H. Ding, Y.-H. Liao, Determination of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in river water and sewage effluent by solid-Phase extraction and gas Chromatography/Mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 36–40.
- [29] H. Cao, M. Kang, Z. Chen, L. Li, M. Cui, M. Chen, H. Zhang, Y. Wang, Determination of five quaternary ammonium compounds in foodstuffs using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 6 (2014) 4790.
- [30] A. Friedle, A. Nitsopoulos, G. Lach, S. Bruns, Determination of Quaternary Ammonium Compounds (QAC) in Food Products, 2017 http://iib.org.tr/files/downloads/PageFiles/x786089aa41-ac9f-4d71-8fe9-8621a6851e4d%7D/Files/4_Notice%20Labor.pdf.
- [31] J. Hepperle, E. Schüle, D. Kolberg, E. Scherbaum, Determination of Quaternary Ammonium Compound Residues in Fruits and Vegetables by QuEChERS Following LC-MS/MS Analysis, 2014 www.analytik-news.de.
- [32] H. Drinda, A. Romanotto, D. Wojciechowski, Quaternary ammonium compounds (QACs) in foodstuffs – current situation and analytic method, in: 6th International Symposium on Recent advances in Food Analysis, Eurofins, 2013.
- [33] T. Bertuzzi, A. Pietri, Determination of benzalkonium homologues and didecyltrimethylammonium in powdered and liquid milk for infants by hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry, *Food Anal. Methods* 7 (2014) 1278–1284.
- [34] Y. Xian, H. Dong, Y. Wu, X. Guo, X. Hou, B. Wang, QuEChERS-based purification method coupled to ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC–MS/MS) to determine six quaternary ammonium compounds (QACs) in dairy products, *Food Chem.* 212 (2016) 96–103.
- [35] W.M. Reuter, in: P. Elmer (Ed.), Analysis of Quaternary Ammonium Compounds (QACs) as Possible Disinfectant Residues in Milk by LC-TOF, 2015, pp. 1–6.
- [36] European Commission, Directorate, General, For, Health, And, Food, Safety, Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed, 2016 https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_11945.pdf.
- [37] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal–Part I, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2004) 579–586.
- [38] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal–part II, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 70–81.
- [39] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal–part III, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 82–96.
- [40] Ph. Hubert, P. Chiap, J. Crommen, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Mercier, S. Bervoas-Martin, P. Chevalier, D. Grandjean, P. Lagorce, M. Lallier, M.C. Laparra, M. Laurentie, J.C. Nivet, The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from Washington Conference to the laboratory, *Anal. Chim. Acta* 391 (1999) 135–148.
- [41] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [42] A. Krueve, A. Kunnappas, K. Herodes, I. Leito, Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 58–66.
- [43] Albrecht Friedle, Jörg Thumulla, K. Snepvangers, Quaternary Ammonium Compounds (QUAT) in House Dust, 2008 www.anbus-analytik.de/urberuns/quaternary_ammonium_compounds.pdf.
- [44] A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravió, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: part I, *Anal. Chim. Acta* 870 (2015) 29–44.
- [45] A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M.L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravió, I. Leito, Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: part II, *Anal. Chim. Acta* 870 (2015) 8–28.
- [46] M. Laurentie, J. Delmas, The accuracy profile: a tool for choosing an analytical method and evaluating its validity, *Euroref. J. Ref.* (2010) 9–11.

3 AMINOPROPYLDODECYLPROPANE DIAMINE : APPROCHES ET STRATEGIE DE DEVELOPPEMENT ANALYTIQUE

Ce chapitre a pour but de présenter les différentes approches permettant l'analyse de la N(-3-Aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (ou Aminopropyldodécylpropane diamine), ainsi que la stratégie de développement analytique retenue pour l'élaboration d'une méthode de dosage de ce composé dans les produits laitiers. La méthode a été développée et validée dans le but de quantifier à l'état de traces ce biocide désinfectant dans le lait et ses produits transformés, permettant ainsi de suivre l'impact des transformations sur la teneur en biocide.

3.1 Introduction générale

En IAA, l'étape de ND des équipements est fondamentale pour assurer la sécurité des produits alimentaires. Le choix des produits biocides utilisés est donc un des éléments essentiels de ces procédures. Parmi les biocides aux propriétés désinfectantes, les ammoniums quaternaires ont longtemps constitué la classe la plus utilisée, particulièrement en industrie laitière. Compte tenu de leur comportement sur les surfaces alimentaires, leur usage n'est pas sans risque puisqu'il a été observé un phénomène de rémanence sur les surfaces alimentaires conduisant ainsi à la contamination résiduelle des denrées. Pour pallier à ce phénomène et à la demande des industriels de la filière laitière, l'Aminopropyldodécylpropane diamine leur a été proposée, par les formulateurs, comme une alternative aux ammoniums quaternaires comme agent de désinfection.

L'Aminopropyldodécylpropane diamine (dénommée N(-3-Aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine dans le règlement EU 1062/2014) est une molécule présentant trois fonctions amines dont deux amines primaires et une tertiaire, ainsi qu'une longue chaîne aliphatique composée de 12 carbones, conférant un caractère amphiphile à la molécule. La structure de cette molécule laisse présager un risque de rémanence de cette substance sur les surfaces alimentaires, et notamment celles en acier inoxydable, comme cela est le cas avec les ammoniums quaternaires.

L'analyse de la littérature scientifique n'a fourni aucune méthode d'analyse quantitative de résidus d'Aminopropyldodécylpropane diamine (AMDP) dans des matrices alimentaires ou environnementales. Les seuls travaux publiés concernent des méthodes de titration de la substance active dans des formulations commerciales [74, 75]. Cet état de l'art nous laisse donc penser qu'à ce stade aucune mesure d'occurrence des résidus de l'AMDP n'a été menée dans les denrées alimentaires qui aurait pu permettre de contribuer à l'évaluation du risque pour le consommateur.

Un regard sur les approches analytiques susceptibles de convenir à l'analyse de l'Aminopropyldodécylpropane diamine a été réalisé. La faible volatilité de la molécule ($1,49.10^6$ mmHg) [22] exclut l'usage de la chromatographie en phase gazeuse, ce qui implique une séparation par chromatographie liquide. La molécule présentant 3 fonctions amine, elle a donc un état de charge variable en fonction des conditions de pH du milieu dans lequel elle est. Il est connu que pour la séparation en phase inverse, un seul état de charge simplifie la rétention due aux interactions entre la phase stationnaire et le composé. Compte tenu ce fait, dans le but de n'avoir qu'un seul état pour l'Aminopropyldodécylpropane diamine deux stratégies ont été retenues pour permettre l'analyse par HPLC en phase inverse (Figure 30): l'une en neutralisant les fonctions amines par dérivation avec un agent de dérivation spécifique pour conduire à un composé dérivé ne présentant pas de multiple état de charge possible, l'autre en appliquant la chromatographie de paires d'ions. Cette analyse est applicable aux composés ionisés sur colonne de phase inverse.

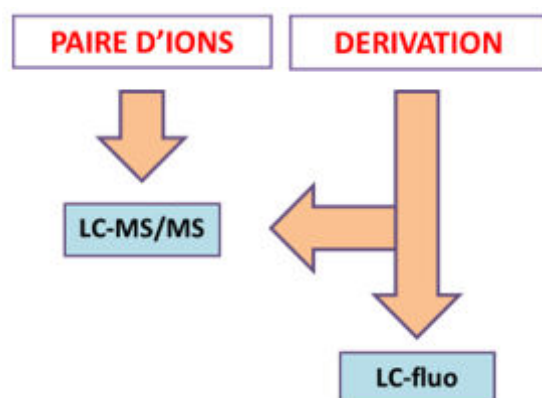


Figure 30 : Stratégie analytique pour l'analyse quantitative de l'Aminopropyldodécylpropane diamine

- **Chromatographie appariement d'ions**

Nous avons vu qu'à $\text{pH} < 4$, l'Aminopropyldodécylpropane diamine est présent exclusivement sous une seule forme positivement chargée. Dans notre cas, l'usage d'un acide fort tel qu'un acide perfluoré (HFBA ou PFPA) permet de former une paire d'ions avec les groupements amines de notre composé positivement chargés à $\text{pH} < 4$, ce qui permet sa rétention chromatographique.

- **Dérivation**

La présence de deux fonctions amines primaires permet d'envisager une réaction de dérivation modifiant la structure chimique de la molécule, améliorant ainsi son analyse en chromatographie liquide en phase inverse. Dans notre cas, le bénéfice d'une dérivation est

double puisqu'outre la possibilité de favoriser la rétention de notre composé sur phase inverse en substituant les fonctions amines par des fonctions plus apolaires, la dérivation peut aussi nous permettre d'envisager une détection non plus seulement par spectrométrie de masse mais aussi par des détections UV ou fluorimétrique en fonction de l'agent de dérivation choisi. De plus, l'usage de matériels beaucoup moins onéreux tels que les détecteurs UV/Fluo peuvent présenter un potentiel intérêt pour les laboratoires appliquant les méthodes routine.

La mise en place de ces deux approches peut donc permettre de disposer de 3 stratégies analytiques pour doser de manière quantitative la triamine et dont les performances pourraient être comparées. Ce chapitre expose l'exploration réalisée avec l'approche faisant intervenir une réaction de dérivation, puis le travail effectué en appariement d'ions qui a conduit au développement et à la validation d'une méthode exacte pour l'analyse quantitative de résidus d'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les produits laitiers.

3.2 Dérivation de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et chromatographie liquide en phase inverse : Phase exploratoire

Cette partie de chapitre est dédiée à la description du travail réalisé de manière exploratoire faisant intervenir une réaction de dérivation sur l'Aminopropyldodécylpropane diamine (AMDP). Une connaissance et savoir-faire au laboratoire de la réaction de dérivation par la fluorescamine sur des composés aminés nous a amené à explorer cette voie avec ce réactif pour l'analyse de cette molécule. Cette approche n'étant qu'exploratoire, d'autres réactifs initialement ciblés n'ont finalement pu, faute de temps, être testés. L'objectif premier était de détecter deux transitions spécifiques de l'AMDP-dérivée par infusion du mélange réactionnel dans la source electrospray du spectromètre de masse. Puis, la séparation en chromatographie liquide en phase inverse a été optimisée.

3.2.1. Méthodologie et résultats préliminaires

3.2.1.1 Solutions et réaction de réaction

Ces essais mettant en œuvre une réaction de dérivation ont été réalisés avec des solutions de standards de fluorescamine et d'Aminopropyldodécylpropane diamine. La réaction de dérivation (Figure 31), quasi-instantanée, entre la fluorescamine et l'AMDP nécessite la préparation extemporanée des solutions.

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides dans les produits laitiers

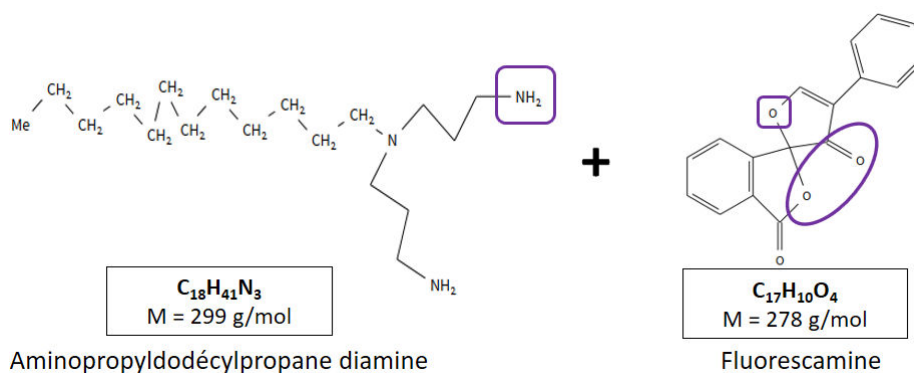


Figure 31 : Structures chimiques de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et de la fluorescamine
(les sites de la réaction de dérivation sont encadrés en violet)

Sur la base des travaux réalisés au laboratoire sur l'analyse de médicaments vétérinaires, la solution de fluorescamine est préparée par la dissolution du réactif dans l'acétone. Compte tenu qu'un excès de fluorescamine est préférable pour dériver les deux amines primaires, une solution à 100 µg/mL de fluorescamine a été préparée. Celle-ci peut être conservée plus de 18 mois au congélateur. La solution d'AMDP à une concentration de 10 µg/mL a été préparée dans l'acétonitrile. Un volume équivalent de solution a été prélevé pour la mise en réaction, obtenant une concentration théorique de 5 µg/mL de l'AMDP-dérivée. D'un point de vue réactionnel, la fonction éther de la fluorescamine réagit directement sur l'amine primaire, cyclisant l'amine par réaction avec le réactif et ouvrant l'ester cyclique de la fluorescamine. La molécule d'intérêt présentant deux amines primaires, une double dérivation est potentiellement envisageable (Figure 32).

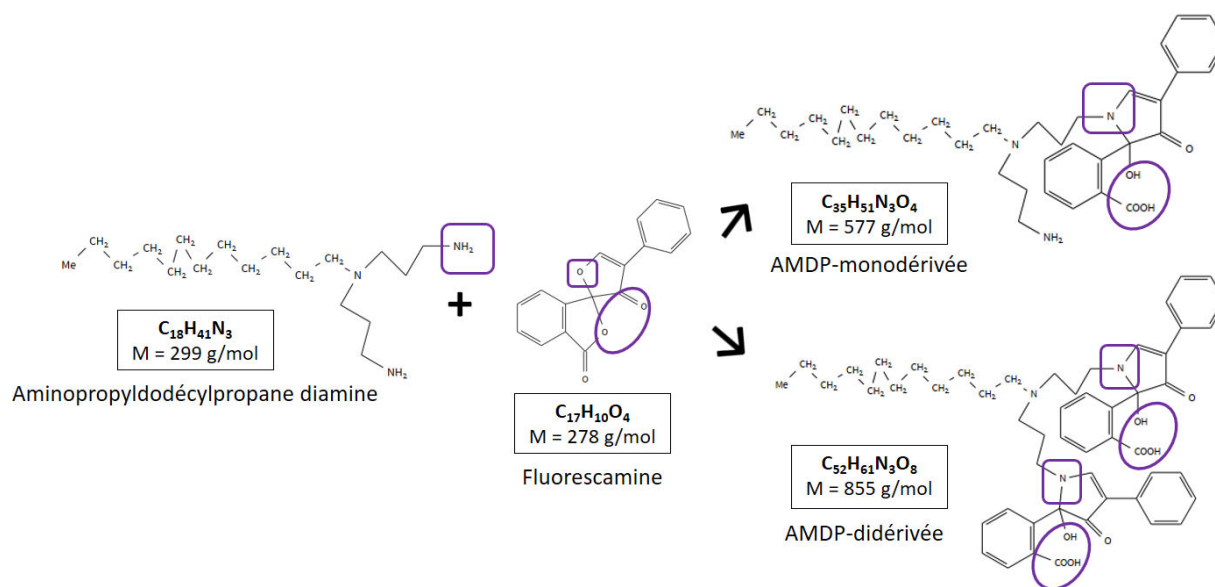


Figure 32 : Double réactions de dérivation entre l'Aminopropyldodécylpropane diamine et la fluorescamine

3.2.1.2 Infusion directe en spectrométrie de masse

3.2.1.2.1 Instrumentation et méthodologie

Les conditions de détection ont été optimisées sur un spectromètre de masse de type TSQ Quantum (Thermo) équipé d'une source electrospray (ESI), ceci avant de procéder à l'optimisation des conditions chromatographiques. Ces optimisations ont été réalisées par infusion directe du composé via un pousse-seringue. L'infusion est réalisée par apport de la phase mobile à l'aide d'un « T ». En première approche, les essais ont été réalisés en condition légèrement acide pour améliorer l'ionisation, à savoir avec une phase mobile composée d'eau ultra pure (EUP) et d'acétonitrile (ACN) acidifiés à 0,3% d'acide formique (AcF). Les conditions opératoires optimisées sont données dans le tableau 11.

Tableau 11 : Paramètres optimisés pour la détection en spectrométrie en tandem de l'Aminopropyldodécylpropane diamine dérivée à la fluorescamine

Phase mobile		Voie A : EUP + 0.3% AcF Voie B : ACN + 0.3% AcF
Débit ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Phase mobile	200
	pousse seringue	10
Source et mode d'ionisation		ESI+
Spray Voltage (V)		4500
Gaz nébuliseur (u.a.)		30
Gaz rideau (u.a.)		1
Gaz auxiliaire (u.a.)		55
Température Capillaire ($^{\circ}\text{C}$)		250

3.2.1.2.2 Résultats et discussions

L'ionisation en mode positif donnera des ions sous forme protonée $[\text{M}+\text{H}]^+$ qui dans le cas de l'AMDP dérivée par la fluorescamine (AMDP-F) conduira aux ions m/z 578 pour une simple dérivation et m/z 856 en cas de double dérivation. L'infusion de la solution d'AMDP-F à $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ a montré une prédominance de la fluorescamine libre, réactif en excès, et la présence des ions recherchés malgré un bruit de fond conséquent. Une acidification à 50% de la solution d'AMDP-F a permis de mieux observer les ions précurseurs en réduisant le bruit de fond (Figure 33). Un suivi toutes les 30 minutes puis toutes les heures a montré une simple ou double perte d'eau (m/z 18) pour les deux molécules mono et di-dérivées, soit une tendance aux ions m/z 560, m/z 820 et m/z 838 au lieu des ions m/z 578 et m/z 856. Entre 3 et 24h, nous avons observé une perte de la forme mono-dérivée représentée par l'ion m/z 560, ainsi qu'une prédominance de la forme di-dérivée estérifiée avec l'ion m/z 820. Au-delà de 24 heures, l'ion m/z 820 prédomine. Le mélange semble toujours être en réaction tant que les deux fonctions amines primaires de l'Aminopropyldodécylpropane diamine n'ont pas été totalement dérivées.

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides dans les produits laitiers

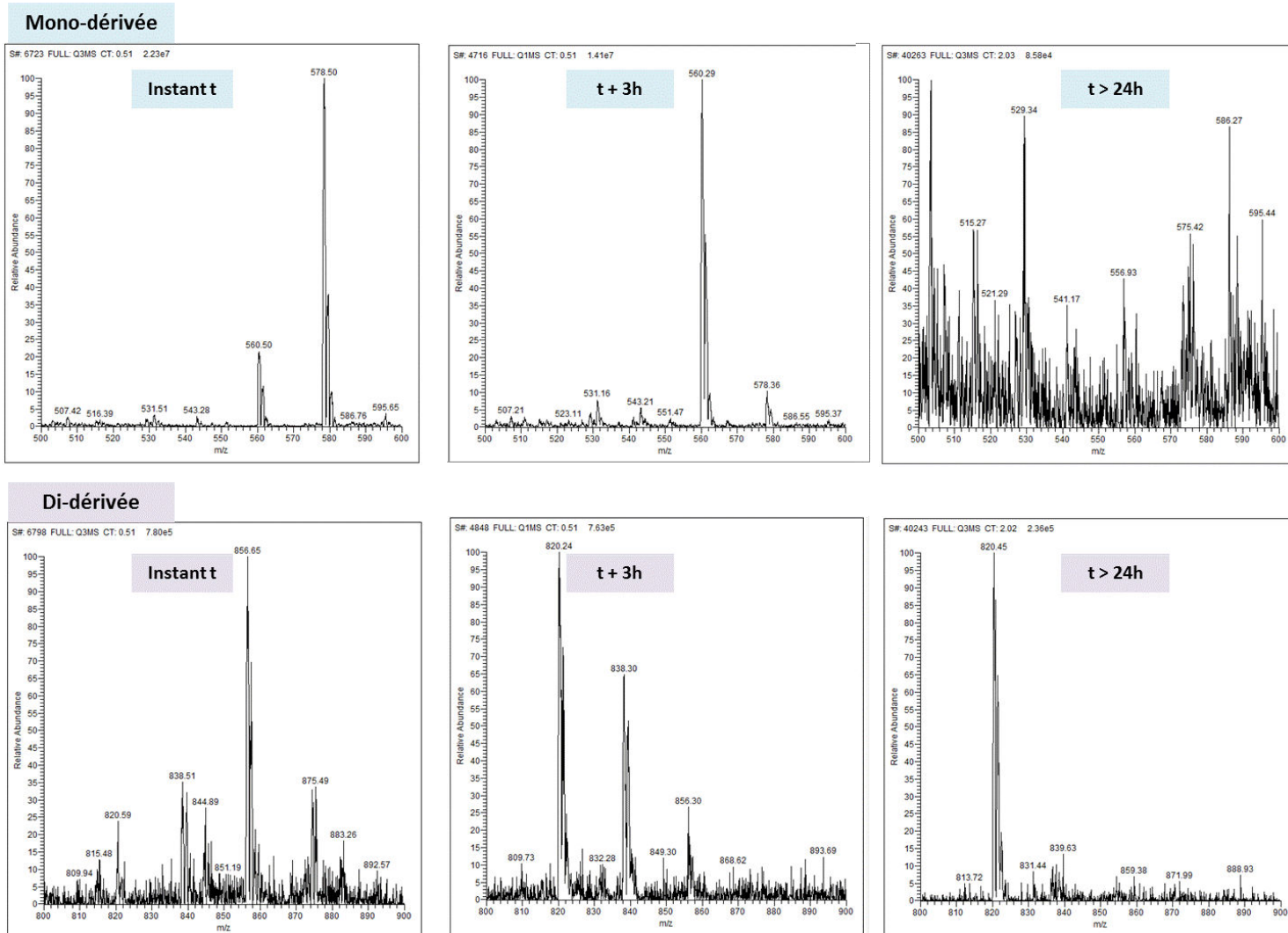


Figure 33 : Cinétique d'infusion de la solution d'Aminopropyldodécylpropane diamine dérivée à la fluorescamine

Notons que la fluorescamine m/z 279 se voit acquérir une molécule d'eau au fil du temps, déduction faite par la présence de l'ion m/z 297, signe d'une saponification (Figure 34). Ces essais ont été réalisés dans les mêmes conditions sur plusieurs jours afin de confirmer les résultats obtenus. A notre connaissance, ce phénomène de saponification de la fluorescamine et d'estérification des composés dérivés par ce réactif n'ont pas été reporté dans la littérature. Les réactions de dérivation sont généralement utilisées pour une analyse en LC- /Fluo. Cette perte d'eau (- m/z 18) a probablement une influence minime sur le temps de rétention, ce qui ne permet pas de les distinguer avec ce type de détection. Seule la spécificité liée à la spectrométrie de masse permet de différencier ces formes très proches.

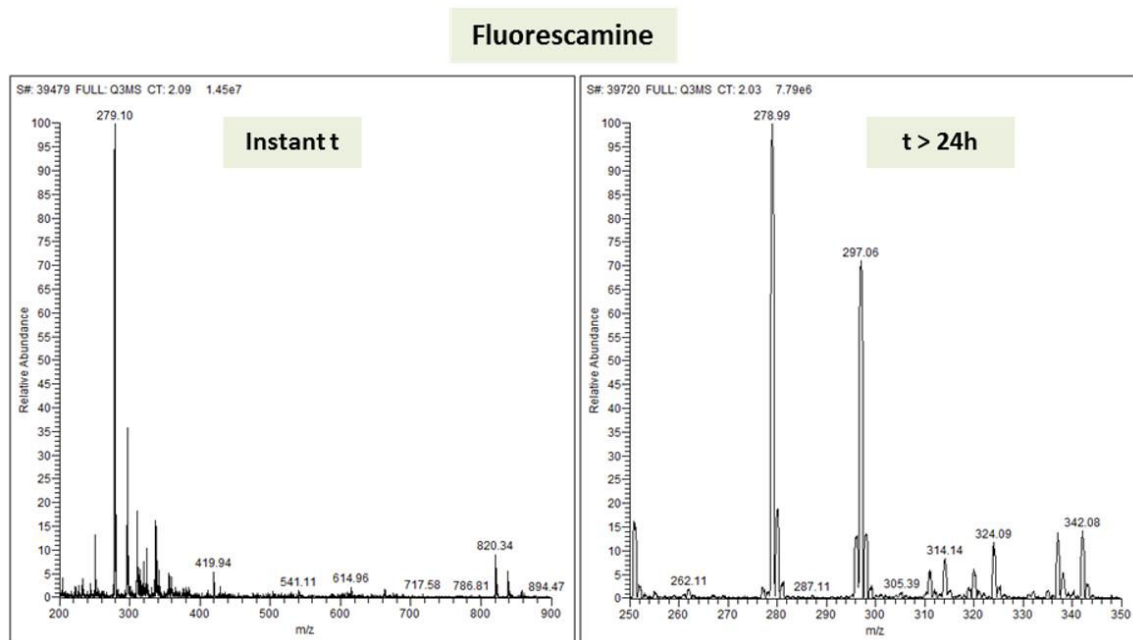


Figure 34 : Cinétique de la fluorescamine au cours de la réaction de dérivation

3.2.1.2.3 Détermination de transitions

Compte tenu des résultats obtenus lors de l'infusion de l'AMDP dérivée à la fluorescamine (AMDP-F), la détermination des transitions, ion précurseur-ion produit, spécifiques à l'AMDP-F a été réalisée sur l'ion m/z 820, majoritairement présent dans le temps. L'optimisation des paramètres spectrométriques ont permis de retenir quatre transitions (Tableau 12).

Tableau 12 : Transitions MRM de l'AMDP-F di-dérivée

Molécule	Mode ESI	Ion précurseur [M+H] ⁺	Tube-Lens (V)	Ion produits							
				primaire		secondaire		tertiaire		quaternaire	
				m/z	E _{col} (V)	m/z	E _{col} (V)	m/z	E _{col} (V)	m/z	E _{col} (V)
AMDP-F di-dérivée	+	820	169	541	24	238	38	212	34	262	41

Les paramètres de détection ayant été optimisés en mode MRM, la séparation chromatographique a pu être investiguée. Le but recherché est de séparer, en phase inverse, l'AMDP dérivée à la fluorescamine en un temps raisonnable tout en permettant d'atteindre un seuil de détection de l'ordre de la dizaine de $\mu\text{g}/\text{kg}$. Malgré les nombreux essais (colonnes, gradient et débit d'élution, composition initiale de la phase mobile), les résultats n'ont pas été satisfaisants en termes de sensibilité et d'allure de pic chromatographique. -F reste non connue. Il aurait été intéressant de continuer le développement en testant d'autres réactifs de dérivation dans l'hypothèse où la fluorescamine ne soit pas la plus adaptée à la triamine. Bien que l'approche soit intéressante, un choix raisonné a dû être fait et nous avons pris la décision de ne pas poursuivre dans cette voie par manque de temps.

3.2.2 Conclusions

Le but de ce premier travail a été de mettre en lumière une approche de dérivation de l'Aminopropyldodécylpropane diamine en spectrométrie de masse dans le but de pallier aux problématiques rencontrées lors de l'analyse de composés aminés en chromatographie liquide en phase inverse. Une réaction de dérivation par la fluoescamine en solution standard a montré une réaction quasi-instantanée associée à une instabilité des composés dérivés qui n'ont pas été décrite dans la littérature pour des réactions faisant intervenir la fluoescamine. La spectrométrie de masse a pu mettre en évidence des phénomènes de simple et double réactions de dérivation, ainsi qu'un phénomène d'estérification suivi dans le temps. Bien que la réaction de dérivation soit rapide, le mélange réactionnel a nécessité au moins 24 heures pour aboutir à une certaine stabilité du composé di-dérivé majoritairement produit. Néanmoins, il a été constaté qu'une séparation chromatographique répondant aux exigences de temps d'analyse raisonnable et de seuil de détection relativement faible était difficile à mettre en œuvre avec ce type de réactif.

Cette idée, intéressante d'un point de vue de l'approche et de la mise en œuvre, mériterait d'être amenée à son terme, par des essais avec d'autres réactifs de dérivation. Dans le cadre de la thèse, l'approche par appariement d'ions a donc été investiguée puisqu'elle implique moins de points critiques (ex. une dérivation pré ou post-extraction).

3.3 Chromatographie liquide par appariement d'ions couplée à la spectrométrie de masse : Développement et validation de méthode

Cette partie de chapitre est consacrée à la description de la méthodologie adoptée pour mettre en œuvre une méthode d'analyse quantitative par LC-MS/MS de l'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les produits laitiers. La méthode est développée et optimisée selon des facteurs usuels tels que les paramètres de détection, de séparation et d'extraction. La méthode est ensuite validée pour caractériser ses performances au regard de l'usage attendu. Le détail des étapes liées au processus de développement et de validation sera exposé.

ARTICLE 2

MÉTHODE D'ANALYSE DE LA N-(3-AMINOPROPYL)-N-DODECYLPROPANE-1,3-DIAMINE, UN BIOCIDÉ DESINFECTANT, DANS LES PRODUITS LAITIERS PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM



Chemistry

Elsevier Editorial System(tm) for Food

Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODCHEM-D-17-06377

Title: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products

Article Type: Analytical Methods Article

Keywords: LC-MS/MS method; N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine biocidal disinfectant; Cheese and milk products; Accuracy profile

Corresponding Author: Dr. dominique hurtaud pessel, Ph.D

Corresponding Author's Institution: anses

First Author: Kahina Slimani

Order of Authors: Kahina Slimani; Yvette Pirotais; Pierre Maris; Jean-Pierre Abjean; dominique hurtaud pessel, Ph.D



Introduction/Contexte

La N-(3-Aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, ou Aminopropyldodécylpropane diamine, peut potentiellement se retrouver à l'état résiduel dans les denrées alimentaires suite à son usage dans les procédures de ND des surfaces en industrie laitière. Ce composé chimique entrant dans la composition de nombreuses formulations industrielles à usage désinfectant ne possède à ce jour aucune LMR propre. De ce fait, nous nous sommes tenus à la réglementation relative aux pesticides qui fixe une LMR par défaut à 10 µg/kg, à toutes substances ne présentant pas leur propre LMR.

D'un point de vue analytique, très peu d'études ont été réalisées sur la N-(3-Aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine et aucune à ce jour en termes de développement de méthode quantitative. Le travail réalisé durant la thèse a été conduit sur la base d'informations extraites des propriétés physico-chimiques de l'Aminopropyldodécylpropane diamine, ainsi que des méthodes d'analyses d'amines biogènes et de polyamines pouvant avoir une structure proche de celle du biocide. Une approche par ajout d'agents d'appariement d'ions en chromatographie liquide en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été retenue.

Le but de ce travail a été de développer et valider une méthode, qui à notre connaissance sera la première publiée, permettant de déterminer de manière quantitative les résidus d'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les produits laitiers, à savoir le lait cru, la poudre de lait entier, le fromage à pâte pressée cuite et le fromage fondu, en répondant à l'exigence de LMR par défaut (10 µg/kg). La méthode une fois validée a démontré son applicabilité pour le dosage d'échantillons terrains dans le but de pouvoir fournir aux autorités compétentes des données d'occurrence sur la présence de résidus d'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les aliments, nécessaires pour évaluer le risque d'exposition des consommateurs.

Le travail de développement et de validation de la méthode d'analyse quantitative de résidus d'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les produits laitiers a fait l'objet d'une publication intitulée « Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products », soumis au journal Food Chemistry (acceptée et en cours de révision). Certains résultats de développement absents dans l'article seront détaillés dans le présent manuscrit.

Méthodologie/Principaux résultats

1°) Optimisation des paramètres de séparation et de détection en LC-MS/MS

L'optimisation des paramètres de détection, principalement les pressions de gaz, les tensions et les températures appliquées ainsi que les énergies de collision, ont permis de retenir deux transitions MRM, jugées les plus spécifiques de la molécule, qui ont servi à l'identification et la confirmation lors de l'analyse de l'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les produits laitiers. A cela, le choix d'un standard interne (SI), le plus adapté, a fait l'objet d'une étude poussée :

- La dodécylamine et la spermidine ont été testées comme standard interne compte tenu de la similarité de leur structure chimique avec l'Aminopropyldodécylpropane diamine.
- Un composé analogue à chaîne aliphatique C₁₀ puis l'analogue deutéré C₁₂ d'Aminopropyldodécylpropane diamine ont été synthétisés à la demande dans le but d'améliorer la quantification en MS/MS.

Du point de vue de la séparation chromatographique, les acides testés en tant qu'agents d'appariement d'ions ont été au nombre de deux : l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) et l'acide pentafluoropropionique (PFPA). L'HFBA a permis d'obtenir une meilleure sensibilité avec un optimum à 25mM. L'ajout d'acide formique à 1% en combinaison à l'HFBA a induit un gain en sensibilité, limitant ainsi l'effet suppresseur d'ionisation en electrospray dû à la présence d'agent d'appariement d'ions. La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne Hypersil Gold C18. L'avantage de cette colonne repose dans la composition de sa phase stationnaire constituée de silice ultrapure, exempte de toutes traces de métaux qui pourraient chélater les fonctions amines de l'analyte d'intérêt. Celle-ci a apporté une meilleure définition de pics et un gain en sensibilité.

2°) Optimisation des paramètres d'extraction

Pour l'Aminopropyldodécylpropane diamine, les défis analytiques relèvent de l'étape d'extraction et de purification. Sur ce point, le pH du milieu d'extraction a joué un rôle crucial. Comme vu précédemment, l'AMDP possède 3 pKa (pKa1 : 6.49 ; pKa2 : 9.33 ; et pKa3 : 10.43) qui confère à la molécule une forme différente selon la valeur du pH du milieu dans lequel elle se trouve. De ce fait, deux approches de préparation d'échantillons, en milieu acide suivie d'une purification par SPE d'une part, et en milieu organique alcalin suivie d'une purification par la méthode QuEChERS ont été testées. Les essais ont été réalisés sur le lait cru comme matrice de référence et le fromage PPC pour sa forte teneur en matière grasse.

L'extraction en milieu acide a fait l'objet de plusieurs essais d'acides (acide chlorhydrique, acide perchlorique, acide trichloroacétique, acide sulfosalicylique et acide acétique) et de phase stationnaire SPE (C18, StrataX® et HLB®). Il s'est avéré qu'une extraction par 5 mL d'Acide

Sulfosalicylique à 12% suivie d'une purification sur cartouche HLB donne les meilleurs résultats. Néanmoins, ce type d'extraction semble peu convenir au fromage PPC.

En milieu organique alcalin, le pH (8 à 12), le solvant d'extraction (ACN, MeOH, EtOH), l'ajout de sels et/ou d'adsorbants ($MgSO_4$, NaCl, PSA, C18) ont fait l'objet de nombreux tests comparatifs. La présence de sels et additifs empêche une récupération optimale de l'AMDP. Les meilleurs résultats ont été obtenus à pH 12 par l'ajout d'une solution d'ammoniaque à 25%, par une extraction à l'ACN en présence de NaCl.

Les résultats obtenus sous les deux approches ont été jugés, à ce stade du développement, peu satisfaisants pour prétendre à atteindre un seuil de quantification de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Cette réflexion nous a amené à augmenter la quantité d'échantillons, soit 5g, pour atteindre l'objectif de seuil. Dans ces conditions, l'extraction en milieu alcalin offre de meilleurs résultats pour le lait et le fromage PPC. Ainsi, cette approche simple et rapide a été retenue et appliquée à toutes les matrices étudiées.

3°) Evaluation des performances et validation de la méthode

Le processus de validation de la méthode selon l'approche de l'erreur totale a été appliquée, de façon indépendante aux quatre produits laitiers à l'étude, à savoir, le lait cru, la poudre de lait entier, les fromages à pâte pressée cuite (PPC) et fondus (FF).

La phase de validation a été conséquente car la méthode s'est vue suivre trois procédures de validation où à chaque procédure 3 séries ont été réalisées pour chacune des matrices. Ceci en raison d'un effet matrice significatif, qui n'a été identifié qu'à ce stade. Celui-ci ne permettait pas d'obtenir une fidélité et une justesse suffisante pour valider la méthode. La figure 35 reprend les résultats successifs de validation obtenus, les hypothèses émises pour palier à la problématique rencontrée et les optimisations réalisées dans le but d'atteindre les performances analytiques visées.

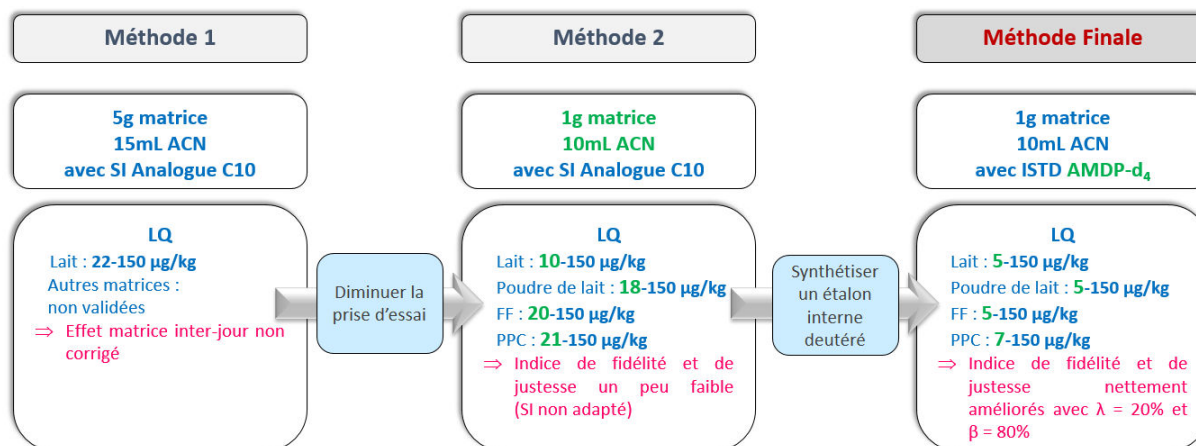


Figure 35 : Résultats des trois procédures de validation de la méthode quantitative d'Aminopropyldodécylpropane diamine

Cet important travail de validation a permis de mettre en évidence un effet matrice révélé par l'usage de lots différents pour chaque matrice au cours de la procédure de validation. Une diminution de la prise d'essai a fortement contribué à réduire l'effet matrice permettant de valider la méthode sur une gamme acceptable, bien que n'atteignant pas parfaitement l'objectif initial (10 µg/kg). L'étalon interne, de structure proche de l'AMDP, n'était pas adapté pour corriger totalement l'effet matrice et fournir des performances analytiques satisfaisantes. De ce fait, un étalon interne analogue marqué a été utilisé pour corriger l'effet matrice et améliorer significativement les performances de la méthode jugées satisfaisantes puisque l'objectif est atteint.

4°) Applicabilité de la méthode

A l'issue de cette étape, l'applicabilité de la méthode a été démontrée sur 146 produits laitiers collectés en supermarché. Parmi les échantillons révélés positifs, 3 poudres de lait entier, 19 fromages fondus et 11 fromages PPC ont été quantifiés en Aminopropyldodécylpropane diamine à des teneurs supérieures à 5 µg/kg pouvant atteindre 200 µg/kg. Tout comme les ammoniums quaternaires, aucune trace d'AMDP n'a pu être détectée dans le lait. La contamination des denrées transformées pourrait donc être liée soit au transfert de résidus depuis les surfaces alimentaires ou au facteur de concentration intervenant lors de la transformation du lait.

Conclusions

Le travail réalisé dans le cadre de ce projet a permis de développer la première méthode d'analyse quantitative de l'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les denrées alimentaires qui sera publiée. Cette méthode par LC-MS/MS fait usage d'HFBA en tant qu'agent d'appariement d'ions à une concentration de 25 mM et de 1% d'AcF pour faciliter la séparation chromatographique de l'AMDP, permettant de s'affranchir d'une étape de dérivation. Une méthode simple et rapide est proposée pour extraire l'AMDP contenue dans les produits laitiers puisqu'elle repose sur une extraction à l'ACN à pH 12 par l'ajout d'une solution d'ammoniaque à 25% en présence de chlorure de sodium. La méthode a été validée sur quatre matrices, les plus représentatives de la diversité des produits, à savoir : le lait cru, la poudre de lait entier, les fromages à pâte pressée cuite (PPC) et fondus (FF). Pour ce faire, l'approche erreur totale basée sur la construction d'un profil d'exactitude a été appliquée. Dans le but d'améliorer les performances analytiques de la méthode et la précision sur les résultats de quantification, un étalon interne analogue deutéré synthétisé à la demande a été utilisé. La méthode, validée sur

un intervalle de 5 à 150 µg/kg, a montré une fidélité et une justesse satisfaisante (< 20%). Enfin, la méthode a montré son applicabilité par le dosage d'un échantillonnage de produits laitiers pris aléatoirement dans le commerce.

Cette méthode d'analyse ciblée présente un premier intérêt à l'échelle de ce projet puisqu'il a été indispensable d'en disposer dans le cadre de la recherche de produits néoformés. À l'échelle nationale et européenne, cette méthode présente un intérêt dans le cadre de la mise en place de plans de surveillance permettant de mesurer l'exposition des consommateurs et aux services idoines de faire l'évaluation du risque pour ces derniers.

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products

Kahina Slimani, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean and Dominique Hurtaud-Pessel*

ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Fougères Laboratory, Residues and Contaminants Analysis Unit

Address: 10B rue Claude Bourgelat, Bioagropolis, Javené, F-35306, Fougères, France

**Corresponding author: dominique.pessel@anses.fr or kahina.slimani@anses.fr*

Highlights

LC-MS/MS method to quantify N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in food

Quick and reliable extraction was applied to raw milk, milk powder and cheese

Accuracy profile approach was used for the validation of the method

Recoveries were in the range 70-120%, RSD \leq 20% and LOQs in the range 5-7 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Keywords

LC-MS/MS method; N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine biocidal disinfectant;

Cheese and milk products; Accuracy profile

Abstract

A novel and reliable method to quantify residual levels of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products using ion-pairing reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed and fully validated. Sample extraction was done with salting-out technique using acetonitrile and sodium chloride. For LC-MS/MS, the analyte was detected using positive electrospray ionization (ESI+) and two selected reaction monitoring (SRM) transitions were monitored. The method was validated in the 5 to 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ range using total error approach along with the construction of an accuracy profile. Performance criteria of the method were evaluated. Trueness never exceeded the set threshold of 10-15%, the means relative standard deviations for precision were lower than 10%; with the exception of hard pressed cheese at 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The limit of quantification (LOQ) was around 5 to 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ depending on the matrix of interest. The method was successfully applied to accurately quantify N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products.

1. Introduction

Biocidal products are chemicals intended for use against organisms that are harmful to humans and their activities. They are classified into 22 biocidal product types according to their use, and are arranged into four main groups. Disinfectants constitute one of these four groups. This classification is given in Annex V to the Biocidal Products Regulation (BPR) 528/2012/EU ("Regulation (EU) N° 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products," 2012) which concerns the placing on the market and use of biocidal products. Among disinfectants, quaternary ammoniums (QAs), including dialkyldimethylammonium chloride (DDAC) and Benzalkonium chloride (BAC), and N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine are widely used in medical devices and as cleaning-disinfection agents in industries and hospitals. N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (TA) is a basic nitrogenous compound composed of two primary and one tertiary amine groups in addition to a C12 aliphatic chain formed by the catalytic hydrogenation of N-alkylbis(cyanoethyl)amines (Denton, Joyce, & Kiely, 2007). This active substance can be found in an admixture with quaternary ammoniums (QAs), or as an alternative to them for use as disinfectants/cleaning agents.

In the dairy industry, N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine is a biocidal active substance used in the cleaning and disinfection of surfaces in contact with food and feed. Even if the use of this biocidal product is not intended to expose food or feed directly, its use in the manufacture of dairy products may lead to the presence of residues. Like QAs which showed remanence on surface, the chemical structure of TA suggests a similar behavior on surface that would be an unintentional source of contamination of dairy processed food. While analytical methods exist to quantify QAs, there is few method of measuring TA in industrial formulations and none to our knowledge in food.

Like any biocidal substance, the triamine of interest in this study, TA, is covered by the Biocidal Products Regulation (BPR) 528/2012/EU ("Regulation (EU) N° 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products," 2012) and is under review for approval on European Union list of active substances. This evaluation could led to the establishment of maximal residue limit (MRL) as to date no MRL is established for TA residues in food. For our study, we considered the default threshold of $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ specified in Article 18 of pesticides regulation 396/2005/EU ("Regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC," 2005) for those products for which no MRL has been set could be applied.

Given this context and in order to provide the competent authorities with data on occurrence of TA residues in food necessary to assess the exposure of consumers, it is necessary to develop a robust method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in food and particularly in dairy products.

A review of the literature revealed that few authors mention N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in their studies (Argente-Garcia, Munoz-Ortuno, Molins-Legua, Moliner-Martinez, & Campins-Falco, 2016; Mondin, Bogialli, Venzo, Favaro, Badocco, & Pastore, 2014; Stillway & Walle, 1977). An initial study in 1977 (Stillway & Walle, 1977) qualitatively reveals the unintended presence of TA in shrimp. The analysis was performed by gas chromatography-mass spectrometry with derivatization of polyamines through heating in the presence of a trifluoroacetic solution. More recent studies on N-(3-aminopropyl)-N-

dodecylpropane-1,3-diamine in industrial chemical formulations, using NMR spectrometry, liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry and acid-base titration (Mondin, Bogialli, Venzo, Favaro, Badocco, & Pastore, 2014), and an original technique based on a hybrid composite device (Argente-Garcia, Munoz-Ortuno, Molins-Legua, Moliner-Martinez, & Campins-Falco, 2016) have investigated. To the best of our knowledge, no authors have investigated residues of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in foodstuffs.

Given similarity of its chemical structure with amine functions, we investigated the literature to examine analytical methods (Bedia Erim, 2013; Dadáková, Krížek, & Pelikánová, 2009; De Mey, Drabik-Markiewicz, De Maere, Peeters, Derdelinckx, Paelinck, et al., 2012; Ducros, Ruffieux, Belva-Besnet, de Fraipont, Berger, & Favier, 2009; Fiechter, Sivec, & Mayer, 2013; Gaboriau, Havouis, Moulinoux, & Delcros, 2003; Geuns, Orriach, Swennen, Zhu, Panis, Compernelle, et al., 2006; Hakkinen, Keinanen, Vepsalainen, Khomutov, Alhonen, Janne, et al., 2007, 2008; Loizzo, Menichini, Picci, Puoci, Gianfranco Spizzirri, & Restuccia, 2013; Onal, 2007; Onal, Tekkeli, & Onal, 2013; Redruello, Ladero, Cuesta, Alvarez-Buylla, Martin, Fernandez, et al., 2013; Restuccia, Spizzirri, Puoci, Cirillo, Curcio, Parisi, et al., 2011; Sanchez-Lopez, Camanes, Flors, Vicent, Pastor, Vicedo, et al., 2009) applied to biogenic amines and compounds with primary amine groups in food to establish the analytical approach and to propose several strategies for our development. Several analytical methods have already been developed using thin-layer chromatography, gas chromatography, capillary electrophoresis or liquid chromatography (Bedia Erim, 2013; Khuhawar & Qureshi, 2001; Loizzo, Menichini, Picci, Puoci, Gianfranco Spizzirri, & Restuccia, 2013; Onal, 2007; Onal, Tekkeli, & Onal, 2013). This analysis of the literature revealed mainly one analytical approach, implementing liquid chromatography with derivatization techniques. The chemical modification engendered by amine derivatization is necessary to increase the sensitivity when using UV or fluorescence detection for amine compounds with no native fluorescence. Numerous studies of aliphatic amines were reported in the literature using LC-UV/visible or fluorescence detection with a derivatization step due to the lack of chromophore groups and their low volatility (Hakkinen, et al., 2007, 2008; Onal, 2007; Onal, Tekkeli, & Onal, 2013; Sagratini, Fernandez-Franzon, De Berardinis, Font, Vittori, & Manes, 2012; Sanchez-Lopez, et al., 2009). The most common reagents used for target compound derivatization are dabsyl (De Mey, et al., 2012) or dansyl (Cesur, Idil Apak, Aboul-

Enein, & Ozkirimli, 2002; Dadáková, Krížek, & Pelikánová, 2009; De Mey, et al., 2012; Ducros, Ruffieux, Belva-Besnet, de Fraipont, Berger, & Favier, 2009; Gaboriau, Havouis, Moulinoux, & Delcros, 2003; Geuns, et al., 2006; Gosetti, Mazzucco, Gianotti, Polati, & Gennaro, 2007; S. Jia, Kang, Park, Lee, & Kwon, 2011; S. Jia, Kang, Park, Lee, & Kwon, 2012; Moret, Smela, Populin, & Conte, 2005; Restuccia, et al., 2011) chloride, *o*-phthalaldehyde (OPA) (Custodio, Tavares, & Abreu Gloria, 2007; Koros, Varga, & Molnar-Perl, 2008; Moret, Smela, Populin, & Conte, 2005), 1,2-Naphtoquinone-4-sulfonic acid sodium salt (NQS) (Argente-Garcia, Munoz-Ortuno, Molins-Legua, Moliner-Martinez, & Campins-Falco, 2016), fluorescamine (Cesur, Idil Apak, Aboul-Enein, & Ozkirimli, 2002), 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC) (Koros, Varga, & Molnar-Perl, 2008) and others (Fiechter, Sivec, & Mayer, 2013; Redruello, et al., 2013). Some reagents, such as dansyl chloride, have the advantage of reacting with both primary and secondary amines, while OPA is more specific to primary amines. According to Sanchez et al. (Sanchez-Lopez, et al., 2009), some derivative agents (including dansyl chloride) are unstable, so the derivatization reaction has to be carried out very quickly. In addition, it is reported that the derivative compounds obtained by OPA reaction would be less stable than those obtained with other reagents (Onal, 2007; Onal, Tekkeli, & Onal, 2013; Sagratini, Fernandez-Franzon, De Berardinis, Font, Vittori, & Manes, 2012). Although derivatization can increase sensitivity when UV or fluorescence is used, the literature highlights certain problems, the consensus among authors being that it is time-consuming, has a poor recovery rate, and lacks precision due to unstable or interfering reactions (Bedia Erim, 2013; Sagratini, Fernandez-Franzon, De Berardinis, Font, Vittori, & Manes, 2012; Sanchez-Lopez, et al., 2009).

In order to avoid these disadvantages, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) seems to be the technique of choice since it usually requires no technical derivatization. In addition, it allows an unequivocal determination of the target compound based on the detection of its molecular ion and its *m/z* product ions, thus improving the method's sensitivity and specificity along with a good chromatographic separation. Methods using mass spectrometry detection applying (Ducros, Ruffieux, Belva-Besnet, de Fraipont, Berger, & Favier, 2009; Gaboriau, Havouis, Moulinoux, & Delcros, 2003; S. Jia, Kang, Park, Lee, & Kwon, 2011; S. Jia, Kang, Park, Lee, & Kwon, 2012) or not a derivatization step (Calbiani, Careri, Elviri, Mangia, Pistara, & Zagnoni, 2005; Gianotti, Chiuminatto, Mazzucco,

Gosetti, Bottaro, Frascarolo, et al., 2008; Gosetti, Mazzucco, Gianotti, Polati, & Gennaro, 2007; Hakkinen, et al., 2007, 2008; Millan, Sampedro, Unceta, Goicolea, & Barrio, 2007; Sagratini, Fernandez-Franzon, De Berardinis, Font, Vittori, & Manes, 2012; Sanchez-Lopez, et al., 2009) have been developed for the analysis of biogenic amines and of primary and secondary amines. To analyze biogenic amines in cheese by direct mass spectrometry detection, Gosetti et al. (Gosetti, Mazzucco, Gianotti, Polati, & Gennaro, 2007) demonstrated the method's specificity and the reliability of results obtained at significantly different concentration levels. Some authors compared the performances of methods developed to analyze biogenic amines using fluorescence and mass spectrometry detection (Gosetti, Mazzucco, Gianotti, Polati, & Gennaro, 2007; Restuccia, et al., 2011) ; they found that mass spectrometry gives better sensitivity results. In mass spectrometry, electrospray ionization was performed in positive mode since—as explained by Sanchez et al. (Sanchez-Lopez, et al., 2009)—the presence of several amine functions induced high pKa values, leading to a positive charge over a wide pH range.

To improve the chromatographic separation of polar compounds known for their poor retention in the reversed phase, a widely-used technique solution is to add ion-pairing agents in the mobile phase (Custodio, Tavares, & Abreu Gloria, 2007; Hakkinen, et al., 2007, 2008; Millan, Sampedro, Unceta, Goicolea, & Barrio, 2007; Mondin, Bogialli, Venzo, Favaro, Badocco, & Pastore, 2014; Sanchez-Lopez, et al., 2009). This is all the more necessary for polar compounds such as polyamines, including N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, whose amine functions are not or are only partially derivatized when a method including a derivatization step is applied. In LC-MS, the use and choice of ion-pairing agents remains a crucial step. Indeed, some ion-pairing agents—such as alkylsulfonates—are not suitable for electrospray ionization in mass spectrometry detection due to their low volatility (Hakkinen, et al., 2007, 2008; Khuhawar & Qureshi, 2001). Strong, volatile acids like trifluoroacetic acid (TFA), heptafluorobutyric acid (HFBA) or pentafluoropropionic acid (PFPA) are advised for use as ion-pairing agents (Hakkinen, et al., 2007, 2008; Millan, Sampedro, Unceta, Goicolea, & Barrio, 2007; Mondin, Bogialli, Venzo, Favaro, Badocco, & Pastore, 2014; Sanchez-Lopez, et al., 2009), although an ionization suppressing effect has been mentioned in electrospray for basic compounds (Apffel, Fischer, Goldberg, Goodley, & Kuhlmann, 1995; Hakkinen, et al., 2007; Kuhlmann, Apffel, Fischer, Goldberg, & Goodley, 1995; Sanchez-Lopez, et al., 2009). Some

authors (Apffel, Fischer, Goldberg, Goodley, & Kuhlmann, 1995; Hakkinen, et al., 2007; Kuhlmann, Apffel, Fischer, Goldberg, & Goodley, 1995) demonstrated a much more intense signal when a weak acid like propionic acid is added to the mobile phase. This addition minimizes the ion suppression effect and improves chromatographic separation in the presence of ion-pairing agents.

The use of TA during cleaning-disinfection procedures in dairy industry is likely to leave residues on food surfaces that can be transferred into dairy products. The aim of this study was to develop and validate what is to our knowledge the first quantitative method for determining N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in cheese and milk products. This innovative method without a derivatization step is based on UPLC-MS/MS using volatile HFBA as an ion-pairing reagent. The proposed method was validated within the 5 to 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ range in keeping with accuracy profile approach and European Union SANTE/11945/2015 regulatory guidelines ("Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015)," 2016), which are specifically used to validate analytical methods using mass spectrometry for the analysis of pesticide residues. Its application to the quantification of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in commercial dairy product samples is demonstrated herein.

2. Experiment

2.1 Chemical, reagents and solutions

2.1.1 Analytical reference standards and standard solutions

N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (referred to as "TA") was obtained from BOC Sciences (USA). An isotopically labeled internal standard (referred to as "TA-d₄") was synthesized on request by AtlanChim Pharma (Saint Herblain, France).

Stock solutions of TA and triamine-d₄ were individually prepared at a concentration of 1 mg.mL⁻¹ in HPLC grade acetonitrile. Intermediate and working standard solutions were obtained by successive dilution from standard stock solution using a mixture of ACN/Water (50:50 v/v) with 1% formic acid. For the internal standard, a diluted solution at 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ was prepared from the stock solution in the same solvent mixture and added prior to extraction. All the prepared

solutions were stored at 4°C. The standard stock solution's stability was determined as satisfactory for at least one year.

2.1.2 Chemical and reagents

All the reagents and solvents used were HPLC or analytical grade. Acetonitrile, methanol and sodium chloride salt were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, England). Analytical reagent grade heptafluorobutyric acid (HFBA) was obtained from Fluka (St. Quentin Fallavier, France). A 25% ammonia solution and 98-100% formic acid were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). HPLC-grade purified water was prepared using a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France). The filters used for final filtration of the extracts before chromatographic injection were purchased from Millipore (Millex GV, 0.45 µm).

2.2 Sample preparation

2.2.1 Milk product matrices

Four dairy matrices were selected and purchased from different local stores in order to represent the diverse range of milk products in terms of texture and fat percentage. Raw milk (3.2%, w/w fat; 3.6%, w/w protein, Declaration of Manufacturer, DM) represented liquid and low-fat matrices, while whole milk powder (26%, w/w fat; 26%, w/w protein, DM) represented dry matrices. To represent high-fat matrices, two groups of cheese were studied: the first one includes processed cheese (18.5%, w/w fat; 11.5%, w/w protein, DM) and the second includes hard pressed cheese (35%, w/w fat; 27%, w/w protein, DM).

Raw milk and cheese samples were kept frozen ($T^{\circ} < -18^{\circ}\text{C}$) and whole milk powder kept at ambient temperature until analysis.

2.2.2 Extraction procedure

To avoid any loss or cross-contamination, disposable polypropylene (PP) materials were used during the solution preparation and extraction procedure.

Before extraction, the frozen cheeses were grated using a household cheese grater to facilitate sampling. The following generic protocol is applicable to all dairy matrices. To isolate the target analyte, the sample ($1\text{g} \pm 0.04\text{g}$) was weighed in a PP centrifuge tube. Particular care was taken

with the whole milk powder which was rehydrated (ratio 1:1) after weighing, by adding 1 g of water, in order to improve extraction homogeneity. The sample was then fortified with 100 μL of the internal standard solution so as to obtain a final concentration of 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The sample was vortex-mixed and allowed to stand for 10 min before extraction. To facilitate extraction of TA, the sample was adjusted to pH 12 by adding 25% NH_4OH solution and the sample was first vortex-mixed and then allowed to stand for 30 min. Next, 10 mL of acetonitrile (ACN) and 1 g of sodium chloride (NaCl) were added. The sample tube was again vortex-mixed vigorously then shaken for 10 min with a rotary shaker at 100 rpm. Then, the tube was centrifuged at 4,200 g for 10 min in refrigerated conditions at $+4^\circ\text{C}$. The supernatant was all transferred to a new, clean disposable PP tube and evaporated to dryness at 60°C under a gentle stream of nitrogen. The residual extract was then dissolved with 400 μL of ACN/Water (50:50 v/v) with 1% formic acid. The concentrated sample was vortex-mixed and filtered through a 0.45 μm PVDF filter into an HPLC vial prior to LC-MS/MS analysis.

This simple salting-out liquid-liquid extraction (SALLE) tested on four representative dairy product matrices (i.e. raw milk, whole milk powder, hard pressed and processed cheese) could be applied to various other dairy products.

2.3 LC-MS/MS conditions

Chromatographic separation was performed using a Dionex Ultimate 3000 ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) system (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA) fitted with an autosampler regulated at $+10^\circ\text{C}$ and a column oven kept at $+25^\circ\text{C}$. N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine was separated at a flow rate of 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ using a Hypersil™ GOLD™ column (50 mm x 2.1 mm ID, 1.9 μm particle size) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). The sample extract (10 μL) was injected into the column and TA was eluted using a binary gradient with a 6 min run. The mobile phase consisted of water (A) and ACN (B), with 25 mM HFBA and 1% formic acid for both. The gradient conditions were as follows: from 0 to 3 min linear ramp from 20% to 80% of eluent B; then rapid linear ramp over 0.5 min to return to 20% of eluent B; hold for 2.5 min to re-equilibrate the system before moving to the next injection.

The UHPLC system was coupled to a TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) equipped with a heated electrospray ionization (HESI) source operating in positive mode. The HESI source parameters were optimized by the direct infusion of TA in solution ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in acidified ACN/water) where the protonated ($[\text{M}+\text{H}^+]$) molecular ion was detected and selected as the precursor ion. The position of the source was adjusted, then the cone voltage and collision energy were tuned to optimize the precursor's transition to the most abundant product ions monitored in the selected reaction monitoring (SRM) mode. In accordance with SANTE/11945/2015 guidelines ("Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015)," 2016), two transitions were monitored, the most intense (m/z 300 \rightarrow 283) was used for quantification and the second one (m/z 300 \rightarrow 226) as qualifier ion for confirmation. For internal standard (IS), only one SRM transition as m/z 304 \rightarrow 287 was used. Analyses were performed at an ion spray voltage of +2000 V (positive mode); a capillary tube temperature of 395°C and a vaporizer temperature of 270°C , scan time of 0.1 sec and a scan width of 1 m/z . Nitrogen was used as the sheath gas (50 psi), the auxiliary gas (30 psi) and the ion sweep gas (2 psi), while argon was used as the collision gas (1.5 mTorr). The tube lens and collision energy parameters applied to the transitions from precursor to product ions are shown in Table 1. Figure 1 shows the chromatogram for N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine standard at $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ in ACN/Water (50:50, v/v) with 1% formic acid.

Table 1: LC-MS/MS parameters for the determination of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine

Compound	Retention time (min)	Precursor m/z	Quantification ion		Qualification ion		Tube-Lens (V)	Ion ratio (%)
			Transition 1 m/z	E_{col} (eV)	Transition 2 m/z	E_{col} (eV)		
N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine ("TA")	2.57	300	283	19	226	23	82	95
TA- d_4	2.57	304	287	19			95	

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides dans les produits laitiers

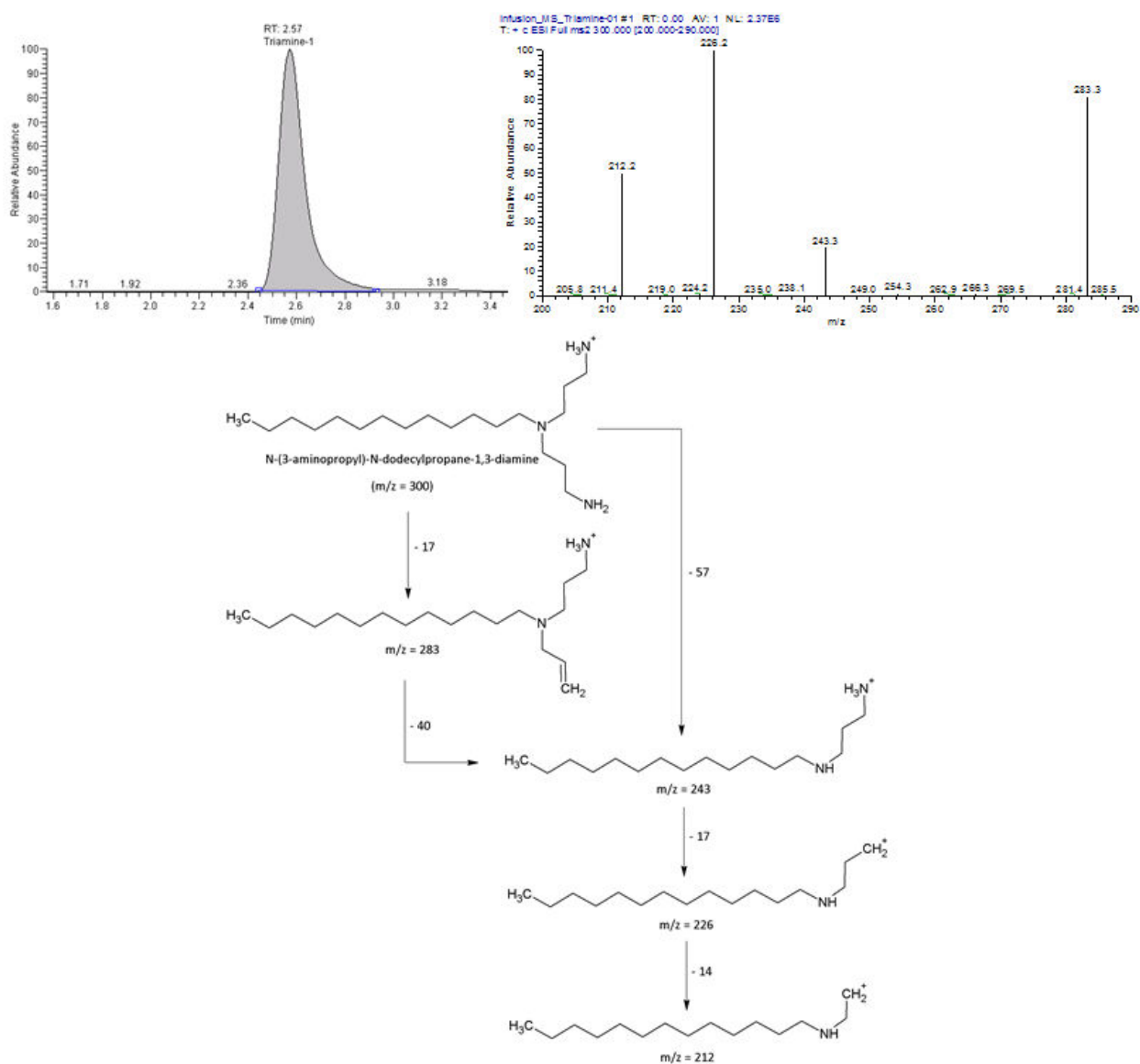


Fig. 1: LC-MS/MS chromatogram and ESI fragmentation mass spectra with a proposed fragmentation pathway of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine

2.4 Method validation

The LC-MS/MS method for the quantitative determination of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products was validated using the total error approach described in the harmonization guidelines issued by the French Society of Pharmaceutical Science and Technology (SFSTP) in accordance with the NF V03-110 standard. The method's performance and reliability were assessed by constructing an accuracy profile based on the

estimation of trueness and precision. The total error concept with an accuracy profile was used as a decision-making tool for the validation process and to determine the method's range of validity through two parameters: the acceptance limit (λ) and the β -expectation limit. The acceptance limit (λ) defines an interval around the reference value and the β -expectation limit represents the proportion of further measurements of unknown samples included within the acceptance limits. In order to validate the analytical method, two sets of experimental matrix standards (EMS) named "calibration standard (CS)" and "validation standard (VS)" were prepared independently. These EMS are matrix-fortified samples prepared by addition of standards to blank matrix prior to the extraction. The first one "CS" was used as matrix calibration curve and the second "VS" was designed to evaluate the performance characteristics of the analytical method (including trueness and precision). The method was validated for all the matrices over three experiment days ($n=3$). Samples from each series (CS and VS) of experiments (n) were analyzed on the same day. All the dairy products used as validation matrices (i.e. raw milk, whole milk powder, hard pressed or processed cheese) and not containing any detectable amount of TA were used as matrix-matched CS and VS.

2.4.1 Calibration Standards (CS)

Six calibration standards were prepared by adding appropriate volume of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine standard solution in blank milk product samples to obtain concentration levels at 5, 10, 25, 50, 100, and 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, for all the matrices studied. They were prepared according to the protocol described in section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, intended for application in routine controls. Two independent series of calibration standards were performed for raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese. For calibration purposes, the response area ratio (analyte peak area/internal standard peak area) was considered over the whole range of concentration. Calibration standards are used to allow drawing the calibration curve.

2.4.2 Validation Standards (VS)

Validation standards are prepared in the same way as the CS, with known concentrations of TA and are used to validate the analytical procedure. In the validation study, they were considered as unknown samples and actually represent the real-life samples that the analytical

procedure will be required to quantify in the future. Different batches of blank samples from various origins were selected in order to give representative VS and to include any matrix effects in the quantitative results. To cover the method's entire range of validity, all the calibration standard concentration levels were also selected for the validation standards. For each matrix, duplicate runs were performed at each concentration level (5, 10, 25, 50, 100, and 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$) on three separate days, amounting to six VS per concentration level.

2.4.3 Qualitative and quantitative criteria

The method's performance with respect to this triamine was evaluated according to the NF V03-110 standard and European Union SANTE/11945/2015 ("Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015)," 2016) through qualitative parameters such as retention time, relative ion intensities and specificity. The quantitative criteria assessed in the validation procedure were, accuracy in terms of trueness and precision (repeatability and intermediate precision), measurement uncertainty, detection and quantification limits. Data relative to the area ratio response based on the peak area response of the most intense SRM transition divided by the peak area response of the deuterated internal standard were used for the quantification process. Specificity was tested by analyzing at least 30 samples of various dairy products (milk, milk powder, cream and cheese) in order to verify the absence of potential interfering compounds at the TA's retention time.

2.4.4 Statistical validation data processing: accuracy profile

Based on the calibration standard results, the response functions corresponding to the relationships between the area ratio and N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine concentration were evaluated using different regression models (linear, linear through 0, weighted linear, linear with logarithm transformation, quadratic, and weighted quadratic) and the most appropriate calibration curve for the analyte/matrix combination was selected. For each response function tested, an accuracy profile was built up from the back-calculated concentration of the validation standards. An accuracy profile was constructed from the β -expectation tolerance limits representing the proportion of measurements that must be included with $\beta\%$ set within the acceptance limits ($\pm\lambda$). For each concentration level of the validation standards considered as

unknown samples, the upper and lower β -expectation tolerance limits were plotted for $\beta = 70\%$ to 80% (α -risk of 20-30%) depending on the studied matrix. In other words, it was accepted that 20% to 30% of the results obtained could deviate from the acceptance interval within the range of validation. The acceptance limits ($\pm\lambda$) represented on the accuracy profile were set at $\pm 20\%$ to $\pm 30\%$ depending on the studied matrix, meaning a maximum bias for trueness of 10% to 15% and a maximum relative standard deviation of 10% to 15% for precision. For each concentration level, trueness through bias values was represented on the accuracy profile. These parameters were considered necessary for the analysis and quantification of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products.

2.5 Assessment of matrix effects and extraction recoveries

Matrix effects (ME) and extraction recoveries (ER) were assessed by applying the approach described by Matuszewski et al. (Matuszewski, Constanzer, & Chavez-Eng, 2003). ME and ER were estimated for all four dairy products, i.e. raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese, and processed cheese. For each matrix, experiments were calculated at two concentrations (5 and $50 \mu\text{g kg}^{-1}$) and performed on six replicates with six different batches ($n=1/\text{batch}$).

2.5.1 Matrix effects

To evaluate a matrix effect, which expresses either the suppression or the signal enhancement of the target analyte relative to other matrix components that could interfere during ESI ionization process with the compound of interest, a post-extraction approach was applied. Blank samples of dairy products were prepared according to the procedure described earlier without adding any standards (internal or other) early on. After evaporation, the residue was reconstituted with a solution containing 50 or $500 \mu\text{g L}^{-1}$ of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (i.e. TA under investigation) and $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ of its deuterated internal standard (TA- d_4). This extract was directly injected into the LC-MS/MS system and the ratio (ME%) between the area ratio obtained for blank samples and the solution prepared in the same conditions was calculated.

2.5.2 Extraction recoveries

Extraction recoveries (ER) were studied by comparing the response area ratio of the target analyte using pre- and post-extraction procedures. In the pre-extraction procedure, N-(3-

aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine standard was added to a blank matrix prior to extraction. In the case of post-extraction, the process was the same as that used to calculate matrix effects. In both cases, deuterated internal standard, triamine-d₄, was added at the end of the extraction procedure. Extraction recoveries were assessed by calculating the ratio in %: RE = (peak area ratio obtained by a blank matrix sample spiked *before* extraction/peak area ratio obtained by a blank matrix sample spiked *after* extraction) x 100. To conclude that the analyte of interest was fully extracted from the matrix, RE values should be close to 100%.

3. Results and Discussion

3.1 Optimization of MS conditions

The LC-MS/MS method for the determination of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (TA) was first investigated and MS conditions consequently optimized as follows. A mass characterization study was carried out by direct infusion (5 $\mu\text{L min}^{-1}$) of a solution of each compound (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) into the MS detector using electrospray ionization in positive mode. Parameters such as spray voltage, vaporizer temperature, capillary temperature, and pressure of gases (N₂ and argon) were optimally tuned to obtain the best response signal for the molecular ion of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine.

TA and its deuterated internal standard give an intense signal at m/z 300 and m/z 304 respectively, corresponding to the protonated molecular ion $[\text{M}+\text{H}]^+$. Four significant product ions at m/z 212, m/z 226, m/z 243, and m/z 283 were obtained from MS/MS fragmentation of precursor ion m/z 300 (Fig. 1). The m/z 283 fragment, $[\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{N}_2]^+$, was obtained following the loss of a neutral fragment corresponding to one of the ammonia functions present in the terminal position of the TA's structure. The m/z 226 fragment comes from the successive loss of ammonia and the amino alkyl chain corresponding to the species $[\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{N}]^+$. These explanations about the ion products obtained and the proposed fragmentation pathway illustrated in Fig. 1, were confirmed by fragmentation of the deuterated internal standard (TA-d₄).

3.2 LC optimization

In order to obtain a selective and sensitive method able to accurately quantify traces of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products, LC separation was optimized following an analysis of the literature.

Starting from the bibliographic review of biogenic amines which present similar chemical structure (number of amines, aliphatic chain) as N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, the LC separation turned to a reversed-phase chromatographic separation (Dadáková, Krížek, & Pelikánová, 2009; Fiechter, Sivec, & Mayer, 2013; Hakkinen, et al., 2007, 2008; Mondin, Bogialli, Venzo, Favaro, Badocco, & Pastore, 2014). The Hypersil Gold C18 column (50 mm x 2.1 mm i.d., 1.9 μm particle size) with end-capped ultrapure silica was chosen given the absence of metals in the stationary phase, which could chelate with the amine functions of the analyzed compound. Considering the physicochemical properties of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine with three amine function groups and a C12 alkyl chain, its analysis proved to be critical in reversed-phase LC due to its amphiphilic nature. Ion-pairing chromatography appears to be the best solution for retaining polar compounds in reversed-phase chromatography using a C18 column. The most frequently used volatile ion-pairing agents were trifluoroacetic acid (TFA), pentafluoropropionic acid (PFPA) and heptafluorobutyric acid (HFBA) (Hakkinen, et al., 2007, 2008; Millan, Sampedro, Unceta, Goicolea, & Barrio, 2007; Mondin, Bogialli, Venzo, Favaro, Badocco, & Pastore, 2014; Sanchez-Lopez, et al., 2009). The first attempt at chromatographic separation of TA was made with $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in an acidified aqueous solution (1% formic acid), using as mobile phase ACN/Water with the addition of formic acid or HFBA in different proportions. This experiment showed that the addition of HFBA at a concentration of 10 mM in both ACN and water phases improves the analyte's sensitivity during chromatographic separation. Based on this result, other optimization paths were investigated, including the concentration of HFBA, the nature of the ion-pairing agent and the addition of a weak acid such as formic acid. The latter was added to counter the known ionization suppression effect of ion-pairing agents in the mass spectrometer (Apffel, Fischer, Goldberg, Goodley, & Kuhlmann, 1995; Hakkinen, et al., 2007; Kuhlmann, Apffel, Fischer, Goldberg, & Goodley, 1995; Sanchez-Lopez, et al., 2009). All the tested conditions were applied to TA at $100 \mu\text{g L}^{-1}$ in different injection solvents, summarized in Fig. 2a. As can be seen, whatever the composition of the mobile phase in the ion-pairing agent, the best area response result is obtained

with an injection of a solvent mixture containing ACN/Water (50:50, v/v) + 1% formic acid. This is particularly true when the mobile phase is composed of water and ACN both acidified with 25mM HFBA and 1% formic acid. These injection solvent and mobile phase conditions were used as input for further developments. To complete these observations, the ion suppression effect related to the presence of HFBA and its attenuation by the addition of formic acid is clearly illustrated in Fig. 2b.

These optimizations lead to an excellent chromatographic separation of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in 6 min using HFBA as the ion-pairing agent.

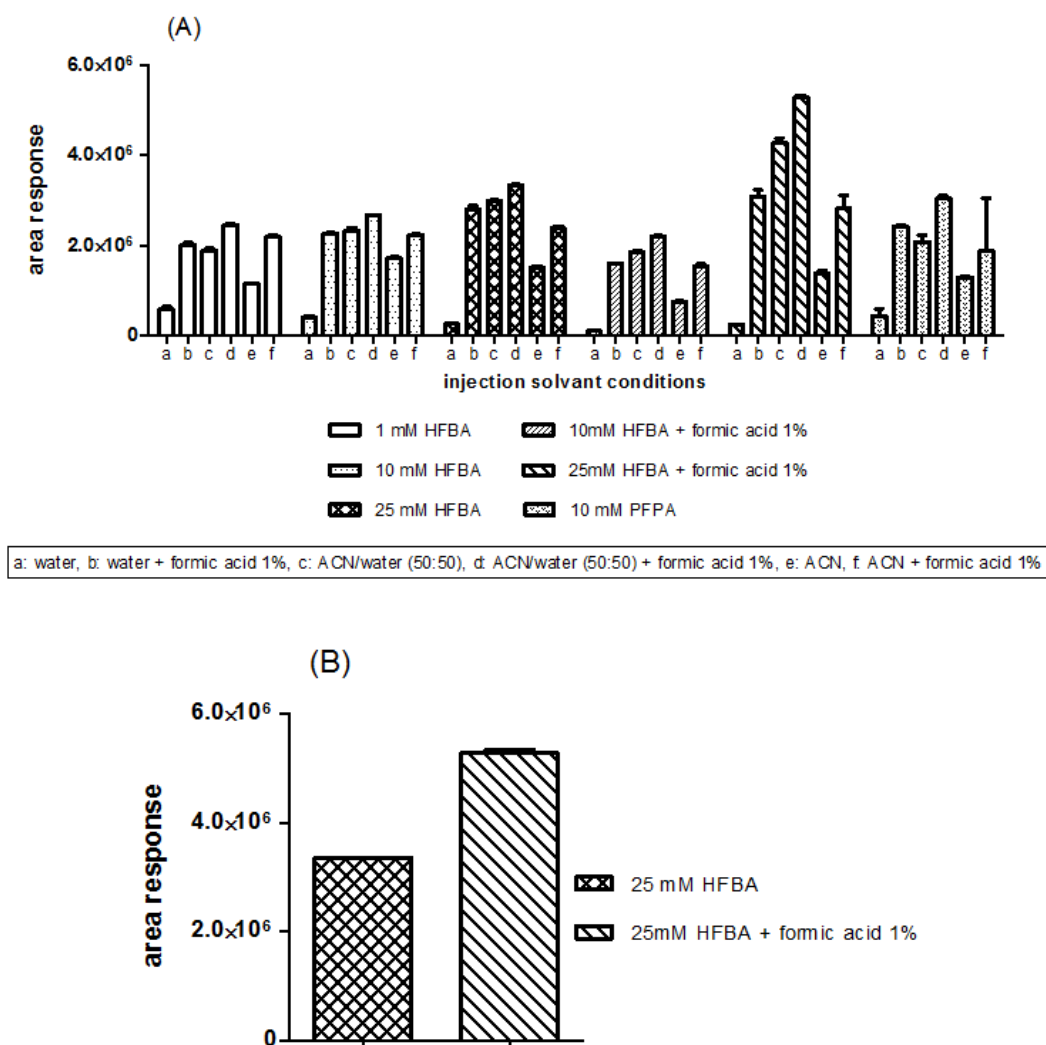


Fig. 2: Optimization of chromatographic separation: (A) Effect of the injection solvent composition and the ion-pairing agents added on the N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine area response, (B) Electrospray ionization suppressor effect caused by ion-pairing agents (i.e. HFBA) in the mobile phase and enhancement of signal response with the addition of weak acid (i.e. formic acid)

3.3 Study of extraction conditions

Given the physicochemical properties of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (polar groups, aliphatic chain) and the complexity of the studied matrices—characterized by a high percentage of fat and protein—it is not easy to extract the target analyte. Indeed, a Log Pow value of 4.46 confirms the TA's lipophilicity (i.e. its affinity with fat matrices). With its three pKa (pKa₁ 6.49, pKa₂ 9.33, pKa₃ 10.43), the pH of the extraction medium was critical during this step. This is why TA was extracted in both acidic (pH 3 – formic acid) and basic (pH 11 – sodium hydroxide) conditions and with two different organic solvents (i.e. acetonitrile and ethyl acetate) using raw milk as the reference matrix. The best results were obtained for extraction with acetonitrile in a basic medium (Fig. 3a).

The effects of the organic extraction medium's pH (from pH 6.5 to 12) were further optimized to attain the best conditions for extracting TA (Fig. 3b). Results indicated that extraction was better when the pH was higher than 9, and optimal with 25% ammonia (NH₄OH). Therefore, the dairy samples' pH was increased to 12 by adding 25% ammonia to all four matrices.

In a further optimization step, additive (MgSO₄) and salt (NaCl) were added to raw milk to remove the aqueous phase and maximize the TA's transfer in the organic phase. The results obtained (Fig. 3c) show that the area response for TA increased with the addition of NaCl (i.e. the salting-out technique). For this SALLE procedure, sodium chloride was selected as salt and this choice was also applied to the other three matrices.

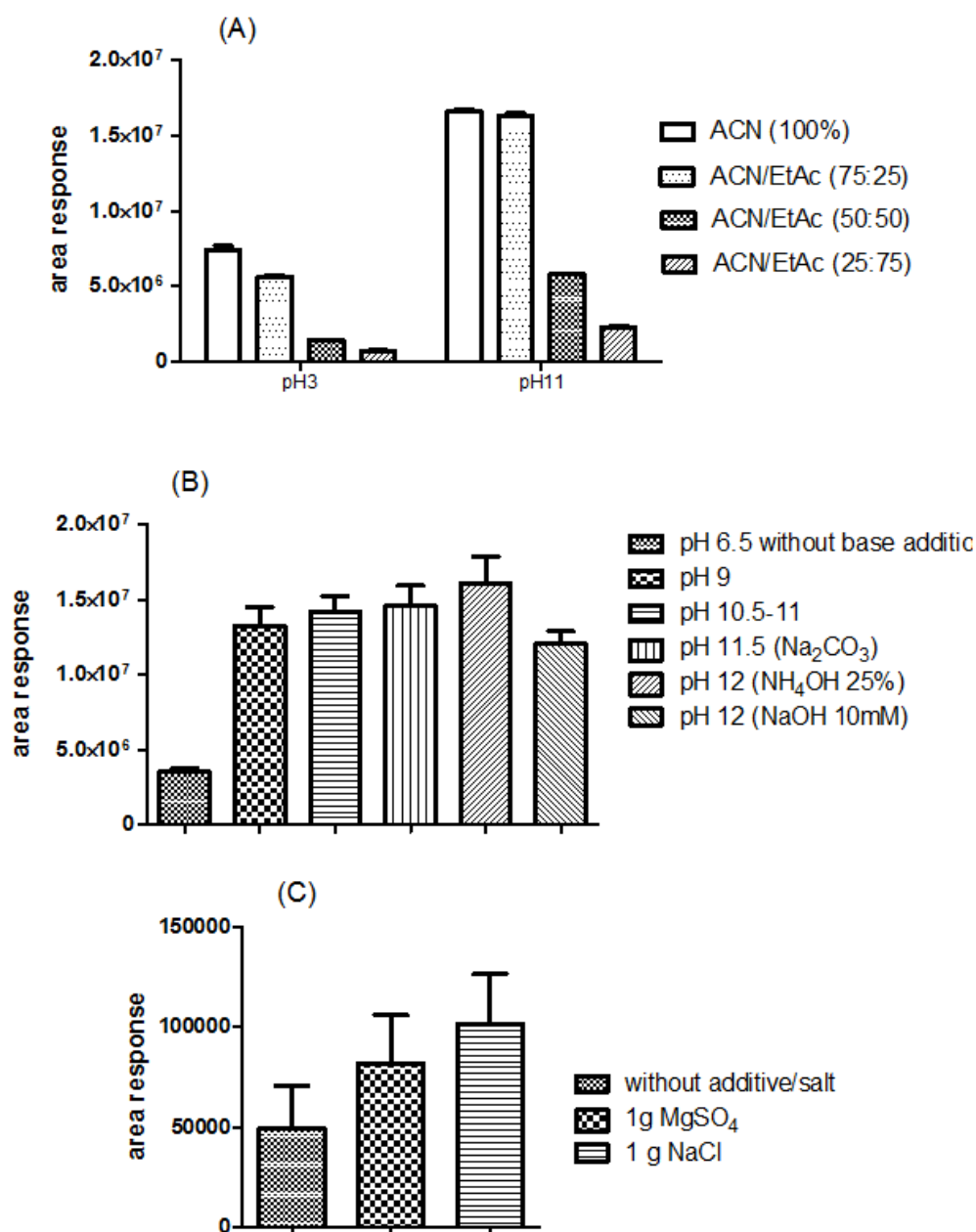


Fig. 3: N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine area response in the optimization of the following steps of SALLE method : (A) pH extraction medium and composition of extraction solvent, (B) basic pH extraction medium, and (C) partitioning salts.

The goal being to apply the most appropriate extraction method, further extraction protocols derived from the ones described in the literature (Custodio, Tavares, & Abreu Gloria, 2007; De

Mey, et al., 2012; Fiechter, Sivec, & Mayer, 2013; Gosetti, Mazzucco, Gianotti, Polati, & Gennaro, 2007; Redruello, et al., 2013; Restuccia, et al., 2011; Sagratini, Fernandez-Franzon, De Berardinis, Font, Vittori, & Manes, 2012) for biogenic amines in foodstuffs were tested. An aqueous acidic extraction followed by a solid phase extraction (SPE) for purification purposes (De Mey, et al., 2012; Restuccia, et al., 2011; Sagratini, Fernandez-Franzon, De Berardinis, Font, Vittori, & Manes, 2012) was widely used, sometimes complemented by a derivatization step (De Mey, et al., 2012; Restuccia, et al., 2011). For our experiments, with no derivatization step, raw milk and hard pressed cheese were selected as matrices because they represent extreme dairy products in terms of fat percentage. Several parameters were tested, including the nature and concentration of the acid used for extraction (hydrochloric acid, trichloroacetic acid, perchloric acid, acetic acid, and sulfosalicylic acid) (Custodio, Tavares, & Abreu Gloria, 2007), the type of SPE cartridge used (apolar, i.e. C18; universal, i.e. HLB; or cation exchange, i.e. Strata-X®) and the composition of SPE solvents (conditioning and elution) (Sagratini, Fernandez-Franzon, De Berardinis, Font, Vittori, & Manes, 2012). As the results were not satisfactory compared to the SALLE procedure, it was not considered useful to show them here. Hard pressed cheese was the matrix that produced the poorest results, and two hypotheses could explain these results. One relates to extraction in an acid medium in light of the matrix's high-fat nature, and the other to possibly inappropriate SPE conditions (cartridges or elution solvent).

The final extraction protocol applicable for all four matrices (raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese, and processed cheese), consisting of a SALLE procedure using acetonitrile and sodium chloride as the extraction solvent and salt respectively, was evaluated in terms of extraction recoveries. Fig. S1a shows the recoveries obtained for two concentration levels (5 and 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The recovery percentages ranged from 52.5% to 75% at 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 54.6% to 74% at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$. These satisfactory results demonstrate that the extraction is not concentration-dependent. The lower RE values for high-fat (about 18-30%) processed dairy products demonstrate that extraction is more critical due to the TA's affinity with fat.

3.4 Validation of the analytical method

3.4.1 Selectivity and Specificity (matrix effect)

Selectivity was tested by comparing the chromatograms for different blank samples, milk and cheese samples and the standard solution. No source of interference was observed at the retention time of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine on the two MRM transitions. The retention times observed for calibration standards and spiked matrices were similar. These observations are also valid for the deuterated internal standard. The ion ratios of TA were calculated on the CS and VS and the relative deviations of the ion ratios were satisfactory. For each sample, the specificity of the method—expressed by assessment of the matrix effect—was evaluated by injecting six different samples spiked with TA after the SALLE procedure and TA in a solution at the same concentration. The results, illustrated in Fig. S1b, show that no significant matrix effect was observed. Moreover, it has been shown that the matrix effect is not concentration-dependent for the analyte/matrix combination studied.

3.4.2 Response function

An accuracy profile was built for each matrix and all the regressions tested as described in section **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** were calculated. The aim was to obtain the same calibration model for each matrix. By building up an accuracy profile from validation standards, each response function was evaluated and the selected regression model obtained with calibration standards may be validated according to the λ and β -expectation parameters and applied to real samples on a routine basis.

To meet all these criteria, the $1/X^2$ weighted linear response function was chosen. Furthermore, for raw milk, whole milk powder and processed cheese, the selected regression allows to be quantified N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine over the entire dosing range while, 98% of the dosing range was covered for hard pressed cheese. In any event, N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine may be accurately quantified in dairy products using the $1/X^2$ weighted linear regression model chosen.

3.4.3 Trueness

The method's trueness refers to the closeness of agreement between the mean value obtained from a series of measurements during the validation experiment and an accepted reference value. This parameter corresponds to the analytical method's systematic error. Trueness, expressed in terms of relative bias (%), was obtained from the mean of back calculated concentrations of

validation standards in the matrix at each concentration level ranging from 5 to 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Table S1 shows that for all concentration levels in each matrix, the relative bias for trueness (< 7%) was satisfactory since it did not exceed the set threshold of 10-15%, and results are in full accordance with the European SANTE 11945/2015 recommendations ("Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015)," 2016) with RSD% values for trueness in the range of 70-120%. Even for hard pressed cheese, the results were all the more satisfactory since relative bias values were lower than the 15% set, although the dosage range was not completely covered. Furthermore, the proposed method's trueness was demonstrated in cheese and milk products.

3.4.4 Precision

The method's precision was evaluated through the two components representing the random error of an analytical method: repeatability and intermediate precision expressed as a relative standard deviation (RSD%). The repeatability (intra-day) and intermediate precision (inter-day) are estimated at each concentration level considered for the validation standards (n=6), and this for all four matrices. Their respective estimates are reported in Table S1. RSD% repeatability values are lower than 8% whatever the concentration level or matrix studied. Throughout the whole dosing range (5-150 $\mu\text{g kg}^{-1}$), RSD% values for intermediate precision are lower than 3% for raw milk, 9% for whole milk powder and 6% for processed cheese. For hard pressed cheese, the highest RSD% obtained for intermediate precision was 20.7% at level 1 (5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), which was above the threshold of 15% and at the limit of European SANTE 11945/2015 recommendations, which accept an $\text{RSD}\% \leq 20\%$ for repeatability within the scope of a method. Of the four studied matrices, hard pressed cheese was considered the most complex matrix given its higher fat content (about 35%). This could explain a higher random error, particularly at low concentration levels. RSD% values for repeatability and intermediate precision were almost all lower than 15%, illustrating the proposed method's high precision.

3.4.5 Accuracy profile

Accuracy—assessed through the accuracy profile—takes into account the total error, so it is the expression of the sum of the systematic (trueness) and random (precision) error. The accuracy profile for each matrix (raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese)

is illustrated in Fig. S2. Trueness and precision are represented by the relative bias (%) in plain red line, and the lower and upper tolerance limits (black dotted lines) respectively. Precision, based on intermediate precision results, illustrate the β -expectation (70-80%) (blue dashed curves) defined.

The analytical method was considered valid within the defined dosing range when the β -expectation interval tolerance (dash lines) was inside the acceptance interval (dotted lines), i.e. provided the β -expectation limits did not cross the acceptance limits ($\pm\lambda$), that were set at $\pm 20\%$ (raw milk, processed cheese) up to 30% (whole milk powder, hard pressed cheese).

As can be seen from these profiles, the method was considered accurate and valid for the quantification of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in raw milk, whole milk powder and processed cheese, since all the tolerance intervals lie within the acceptance limits. One exception is the hard pressed cheese matrix, for which the upper tolerance limit crosses the upper acceptance limit at low concentrations. This means that the method is not accurate throughout the dosing range. However, these results are satisfactory given that there is currently no method that can accurately quantify N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in foodstuffs.

3.4.6 Limits of detection and of quantification (LOD and LOQ)

The limit of detection (LOD) was estimated using the mean intercept of the calibration model and the residual variance of the regression. Applying this method of calculation, the LODs for the developed method were between 0.09 and $0.19 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 2). The limits of quantification (LOQ) correspond to the smallest and highest amount of the analyte of interest beyond which the β -expectation tolerance limits lie outside the acceptance limits. The estimated LOQs of the developed method were defined as $5.0 \mu\text{g kg}^{-1}$ in raw milk, whole milk powder and processed cheese, and $7.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ in hard pressed cheese (Table 2). These results are in accordance with accuracy profiles as shown. Compared to the recommendations of European SANTE 11945/2015, LOQs with the accuracy profile approach are more accurate.

This first reported method for quantifying N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products gives very satisfactory LOQs below the default threshold ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) set by

pesticide regulations ("Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015)," 2016).

Table 2: Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) in raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese, and processed cheese obtained applying total error approach and pesticides recommendations (SANTE/11945/2015).

Matrices	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Lower LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Lower LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	total error approach		SANTE/11945/2015
Raw Milk	0.13	5.0	5.0
Whole Milk Powder	0.14	5.0	5.0
Hard Cheese	0.19	7.3	10
Melted Cheese	0.09	5.0	5.0

4. Quantitative analysis of real samples

The LC-MS/MS method developed was applied to accurately quantify N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products collected from different local markets. Sampling was carried out randomly, taking care to diversify the products (texture, % fat, and brand). Thirty-one samples of raw milk, 15 samples of milk powder, 4 of cream and 96 different cheeses were analyzed. TA being sought was quantifiable in 3 samples of milk powder, 19 of processed cheese and 11 of hard pressed cheese. Fig. 4 shows the distribution of concentrations of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine (expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$ of matrix) found in each contaminated matrix. Detectable but unquantifiable traces of TA were found as illustrated in Fig. 4 related to the quantification limits (5-7.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The results show that TA levels in 22 dairy product samples were higher than the default MRL for pesticides, which is set at 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. However, the amount of TA remains reasonable since only two cheese samples exceeded 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The hypothesis outlined in the introduction concerning the transfer of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine residues in dairy products following cleaning-disinfection procedures of food surfaces is now confirmed.

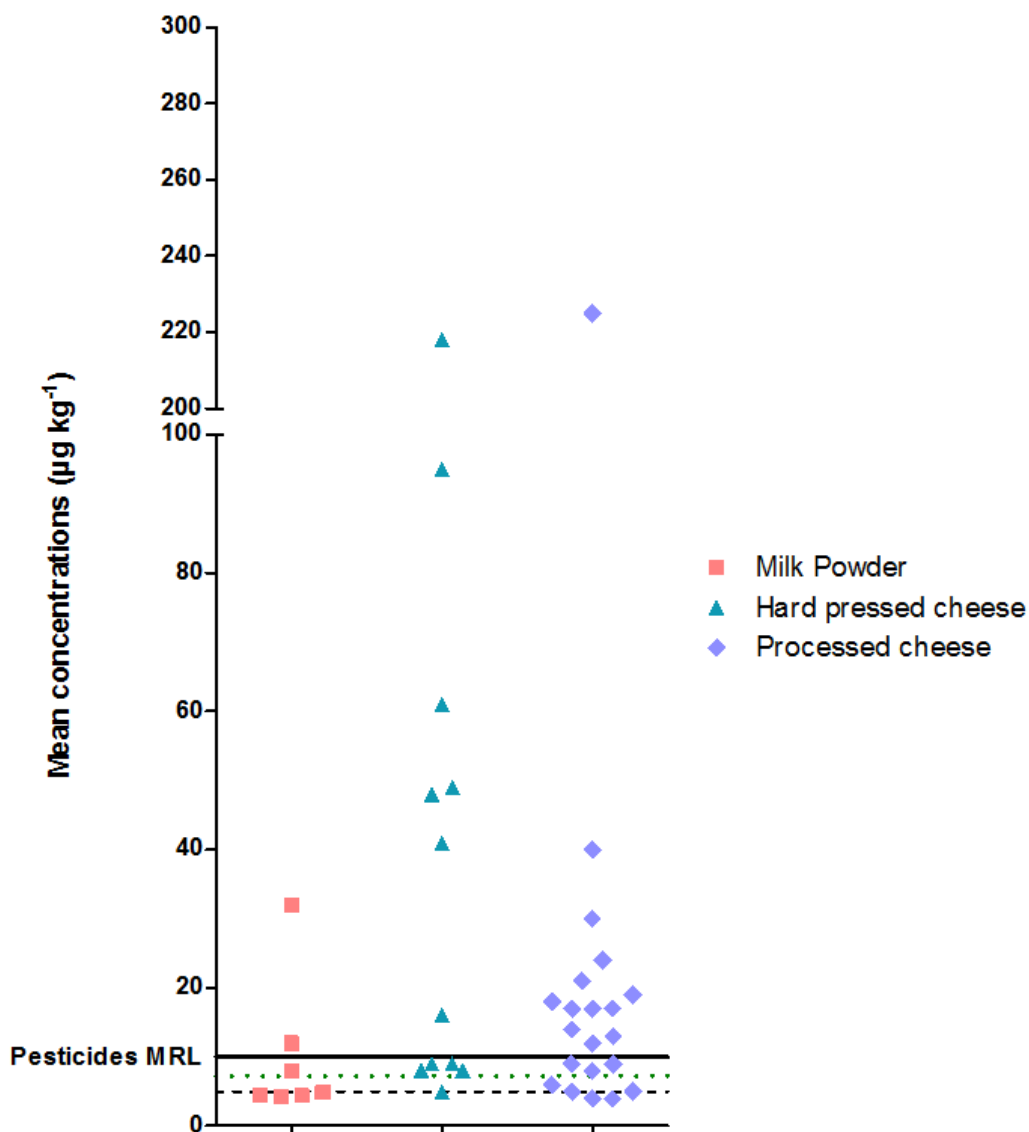


Fig.4 : Graphical representation of real dairy samples detected and quantified with N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine

Since no trace of TA was detected in raw milk ($LD=0.14 \mu\text{g kg}^{-1}$), the concentration levels found in cheese may have two origins. Knowing that an average of 10 liters of milk are needed to produce 1 kg of cheese or 1 kg of milk powder, the concentration of a contaminant from milk would be 10 times greater in transformed products like cheese. Undetectable traces in milk could therefore be quantifiable in processed products. On the other hand, following cleaning-disinfection procedures, residues of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine might remain on any food surfaces used when processing the raw material and could be transferred into

the processed food. This hypothesis is plausible in view of the compound's chemical structure. Indeed, such a transfer from the food surface to a fatty matrix such as milk or cheese may be envisaged via the interaction of the C12 aliphatic chain. The number of milk powder samples containing a quantifiable concentration of TA is reasonable. Nevertheless, five milk powder samples found positive for TA are intended for infants. Of these, two were quantified as 12 and 32 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and a further three samples contain detectable concentrations of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, not far below the quantification limit of 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. These results should encourage authorities to be particularly vigilant for residues in baby food.

5. Conclusion

This is the first reported method developed to analyze N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products. The method is based on UPLC-MS/MS detection using an ion-pairing technique to improve chromatographic separation of the polar compound and prevent the unwanted interaction of basic amine functions which may free silanol groups in the analysis column. The proposed method, based on a rapid and simple salting-out extraction with acetonitrile and chloride sodium reagents, may be used to separate and quantify N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in dairy products in less than six minutes without any derivatization. A stable deuterated TA (TA-d₄) was included as an internal standard to improve quantification accuracy. The analytical method was successfully validated for raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese and processed cheese using the total error approach based on the construction of an accuracy profile. The assessment of the performance for each matrix demonstrates the method's accuracy, with RSD values below 20% for precision (i.e. repeatability) and an intermediate precision within the method's range of validity. This novel method is reliable and can be recommended for quantitative analysis over a range of 5-150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for raw milk, whole milk powder and processed cheese, or of 7.3-150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for hard pressed cheese. Moreover, this newly-developed method was successfully applied in our study to quantify N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in various dairy products bought from local retail outlets. The residues of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine quantified by this new method in cheese and milk products could inspire authorities to take a

greater interest in this compound. It would be beneficial from a public health viewpoint to assess the potential risk for consumers and set up a plan to monitor the situation.

Conflict of interest

Kahina Slimani and all the other authors declare that they have no conflict of interest. This article does not contain any studies using human or animal subjects.

Acknowledgments

This work was financially supported by the French Dairy Interbranch Organization (CNIEL, Resbiolact Project) and the Regional Council of Brittany.

References

- Apffel, A., Fischer, S., Goldberg, G., Goodley, P. C., & Kuhlmann, F. E. (1995). Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases. *Journal of Chromatography A*, *712*, 177-190.
- Argente-Garcia, A., Munoz-Ortuno, M., Molins-Legua, C., Moliner-Martinez, Y., & Campins-Falco, P. (2016). A solid device based on doped hybrid composites for controlling the dosage of the biocide N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine in industrial formulations. *Talanta*, *147*, 147-154.
- Bedia Erim, F. (2013). Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, *52*, 239-247.
- Calbiani, F., Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Pistara, L., & Zagnoni, I. (2005). Rapid Assay for Analyzing Biogenic Amines in Cheese: Matrix Solid-Phase Dispersion Followed by Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 3779-3783.
- Cesur, N., Idil Apak, T., Aboul-Enein, H. Y., & Ozkirimli, S. (2002). LC determination of aminoglutethimide enantiomers as dansyl and fluorescamine derivatives in tablet formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *28*, 487-492.
- Custodio, F. B., Tavares, E., & Abreu Gloria, M. B. (2007). Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, *20*, 280-288.
- Dadáková, E., Krížek, M., & Pelikánová, T. (2009). Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry*, *116*, 365-370.
- De Mey, E., Drabik-Markiewicz, G., De Maere, H., Peeters, M. C., Derdelinckx, G., Paelinck, H., & Kowalska, T. (2012). Dansyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, *130*, 1017-1023.

- Denton, T. T., Joyce, A. S., & Kiely, D. E. (2007). Preparation of N-Alkylbis(3-aminopropyl)amines by the Catalytic Hydrogenation of N-Alkylbis(cyanoethyl)amines. *The Journal of Organic Chemistry*, 72, 4997-5000.
- Ducros, V., Ruffieux, D., Belva-Besnet, H., de Fraipont, F., Berger, F., & Favier, A. (2009). Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 390, 46-51.
- Fiechter, G., Sivec, G., & Mayer, H. K. (2013). Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 927, 191-200.
- Gaboriau, F., Havouis, R., Moulinoux, J.-P., & Delcros, J.-G. (2003). Atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry method to improve the determination of dansylated polyamines. *Analytical Biochemistry*, 318, 212-220.
- Geuns, J. M., Orriach, M. L., Swennen, R., Zhu, G., Panis, B., Compernelle, F., & Van der Auweraer, M. (2006). Simultaneous liquid chromatography determination of polyamines and arylalkyl monoamines. *Anal Biochem*, 354(1), 127-131.
- Gianotti, V., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Gosetti, F., Bottaro, M., Frascarolo, P., & Gennaro, M. C. (2008). A new hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of seven biogenic amines in cheese. *J Chromatogr A*, 1185(2), 296-300.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Gianotti, V., Polati, S., & Gennaro, M. C. (2007). High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses. *J Chromatogr A*, 1149(2), 151-157.
- European Commission Directorate General for Health and Food Safety, (2016), Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed (SANTE/11945/2015), *Safety of the Food Chain Pesticides and Biocides*, Rev0, 1-46.
- Hakkinen, M. R., Keinanen, T. A., Vepsalainen, J., Khomutov, A. R., Alhonen, L., Janne, J., & Auriola, S. (2007). Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 45(4), 625-634.
- Hakkinen, M. R., Keinanen, T. A., Vepsalainen, J., Khomutov, A. R., Alhonen, L., Janne, J., & Auriola, S. (2008). Quantitative determination of underivatized polyamines by using isotope dilution RP-LC-ESI-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 48(2), 414-421.
- Jia, S., Kang, Y. P., Park, J. H., Lee, J., & Kwon, S. W. (2011). Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1218(51), 9174-9182.
- Jia, S., Kang, Y. P., Park, J. H., Lee, J., & Kwon, S. W. (2012). Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132, 1185-1190.
- Khuhawar, M. Y., & Qureshi, G. A. (2001). Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *Journal of Chromatography B*, 764, 385-407.

- Koros, A., Varga, Z., & Molnar-Perl, I. (2008). Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1203(2), 146-152.
- Kuhlmann, F. E., Apffel, A., Fischer, S. M., Goldberg, G., & Goodley, P. C. (1995). Signal Enhancement for Gradient Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry with Trifluoroacetic and Other Strong Acid Modifiers by Postcolumn Addition of Propionic Acid and Isopropanol. *Journal of the american society for mass spectrometry*, 6, 1221-1225.
- Loizzo, M. R., Menichini, F., Picci, N., Puoci, F., Gianfranco Spizzirri, U., & Restuccia, D. (2013). Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 38-55.
- Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75, 3019-3030.
- Millan, S., Sampedro, M. C., Unceta, N., Goicolea, M. A., & Barrio, R. J. (2007). Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 584(1), 145-152.
- Mondin, A., Bogialli, S., Venzo, A., Favaro, G., Badocco, D., & Pastore, P. (2014). Characterization and quantification of N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine biocide by NMR, HPLC/MS and titration techniques. *Chemosphere*, 95, 379-386.
- Moret, S., Smela, D., Populin, T., & Conte, L. S. (2005). A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry*, 89, 355-361.
- Onal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, 103, 1475-1486.
- Onal, A., Tekkeli, S. E., & Onal, C. (2013). A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem*, 138(1), 509-515.
- Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Alvarez-Buylla, J. R., Martin, M. C., Fernandez, M., & Alvarez, M. A. (2013). A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chem*, 139(1-4), 1029-1035.
- European Commission, (2005), Regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, *Official Journal of the European Union*, L70, 1-16.
- European Commission, (2012), Regulation (EU) N° 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, *Official Journal of the European Union*, L167, 1-123.
- Restuccia, D., Spizzirri, U. G., Puoci, F., Cirillo, G., Curcio, M., Parisi, O. I., Iemma, F., & Picci, N. (2011). A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector. *Talanta*, 85(1), 363-369.
- Sagrattini, G., Fernandez-Franzon, M., De Berardinis, F., Font, G., Vittori, S., & Manes, J. (2012). Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase

- extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem*, 132(1), 537-543.
- Sanchez-Lopez, J., Camanes, G., Flors, V., Vicent, C., Pastor, V., Vicedo, B., Cerezo, M., & Garcia-Agustin, P. (2009). Underivatized polyamine analysis in plant samples by ion pair LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *Plant Physiol Biochem*, 47(7), 592-598.
- Stillway, L. W., & Walle, T. (1977). Identification of the unusual Polyamines 3,3'Diaminodipropylamine and N,N'-BIS(3-Aminopropyl)1,3-Propanediamine in the white shrimp *Penaeus Setiferus*. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS*, 77(3), 1103-1107.

Supplementary materials

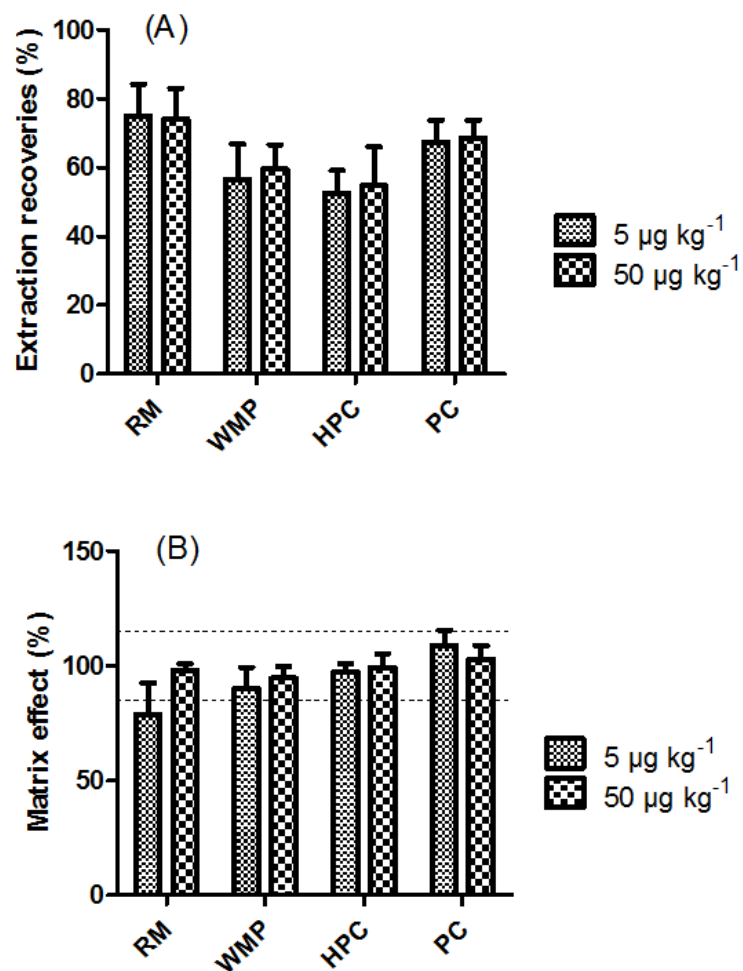


Fig.S1 : Extraction recoveries (A) and matrix effect results (B) obtained at 5 and 50 µg kg⁻¹ spiking level for Raw Milk (RM), Whole Milk Powder (WMP), Hard Pressed Cheese (HPC), and Processed Cheese (PC)

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides dans les produits laitiers

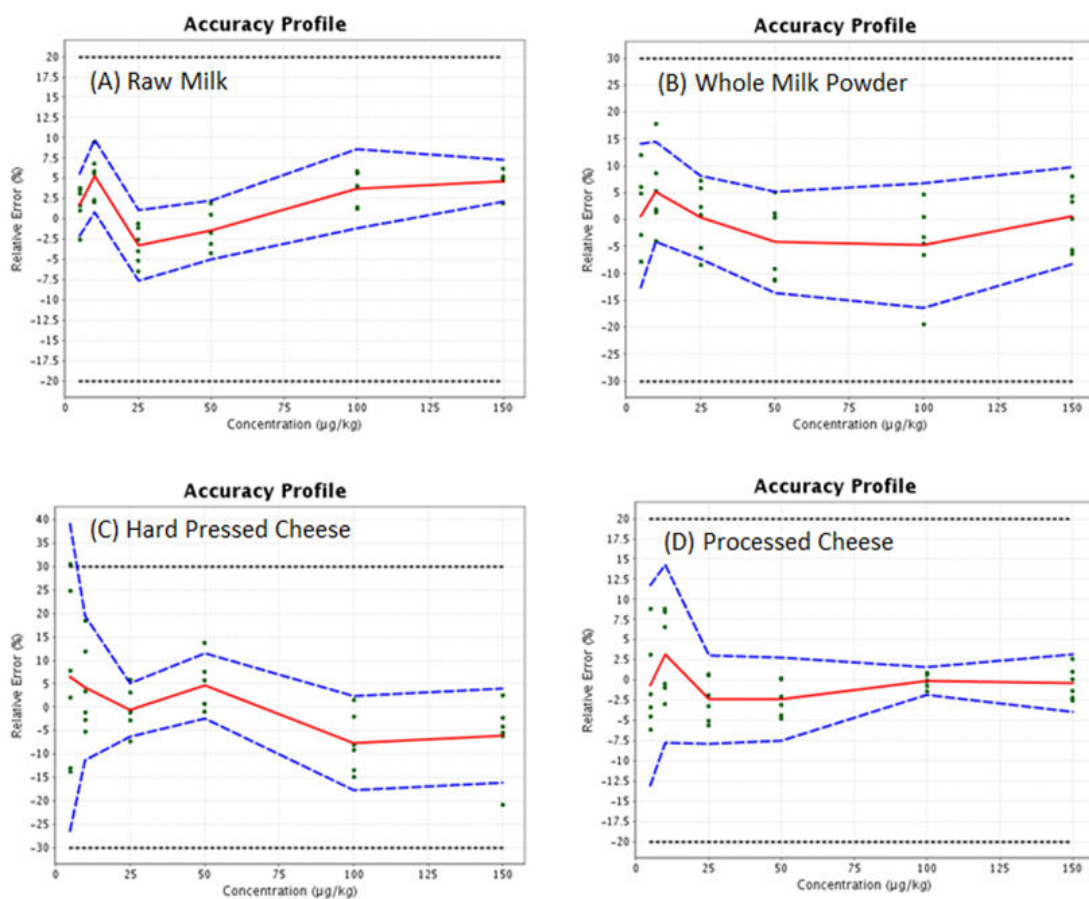


Fig.S2 : Accuracy profile from the validation of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in raw milk (A), whole milk powder (B), hard pressed cheese (C), and processed cheese (D).

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides dans les produits laitiers

Table S1: Validation results of the method applying on raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese, and processed cheese samples: acceptance (λ) and β -expectation tolerance limit, trueness, precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy (risk).

Analytes	λ (%)	β (%)	Concentration levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Trueness ($k=3; n=6$)	Precision ($k=3; n=6$)		Risk (%)
				Relative bias (%)	Repeatability (R.S.D., %)	Intermediate precision (R.S.D., %)	
Raw milk	20	80	5	1.76	2.388	2.388	0.07514
			10	5.333	2.814	2.814	0.2906
			25	-3.309	1.673	2.431	0.4782
			50	-1.371	2.275	2.275	0.05833
			100	3.697	0.1372	2.226	1.758
			150	4.652	1.196	1.493	0.0578
Whole milk powder	30	70	5	0.7143	3.952	8.893	7.698
			10	5.161	7.475	7.475	1.858
			25	0.4261	6.165	6.165	0.7038
			50	-4.16	6.674	7.302	1.909
			100	-4.776	6.458	8.557	4.586
			150	0.6712	3.229	6.19	3.047
Hard pressed cheese	30	70	5	6.412	3.338	20.69	34.39
			10	4.076	4.001	10.15	10.92
			25	-0.5699	4.604	4.604	0.2083
			50	4.583	5.563	5.563	0.5781
			100	-7.697	3.56	6.91	5.005
			150	-6.082	7.785	7.921	2.523
Processed cheese	20	80	5	-0.6312	2.509	6.161	8.676
			10	3.239	2.992	5.71	6.899
			25	-2.417	1.719	2.918	1.12
			50	-2.309	0.4394	2.397	1.759
			100	-0.1344	0.5847	0.9124	0.02764
			150	-0.3579	1.682	2.08	0.1197

k, number of series; n, number of replicates per series

Supplementary materials

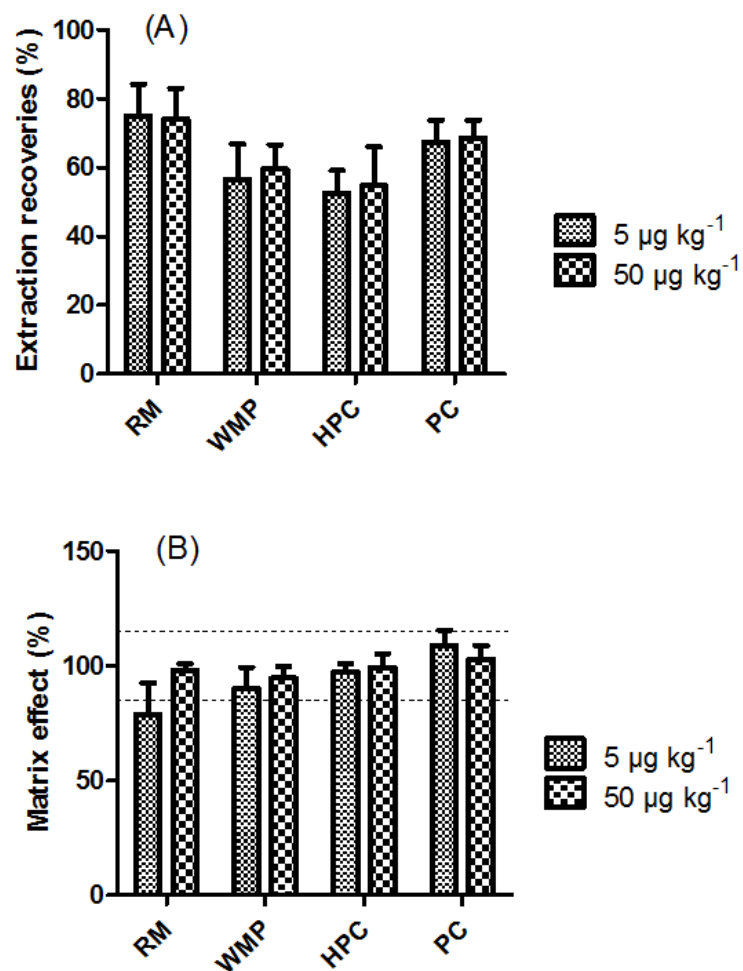


Fig.S1 : Extraction recoveries (A) and matrix effect results (B) obtained at 5 and 50 µg kg⁻¹ spiking level for Raw Milk (RM), Whole Milk Powder (WMP), Hard Pressed Cheese (HPC), and Processed Cheese (PC)

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides dans les produits laitiers

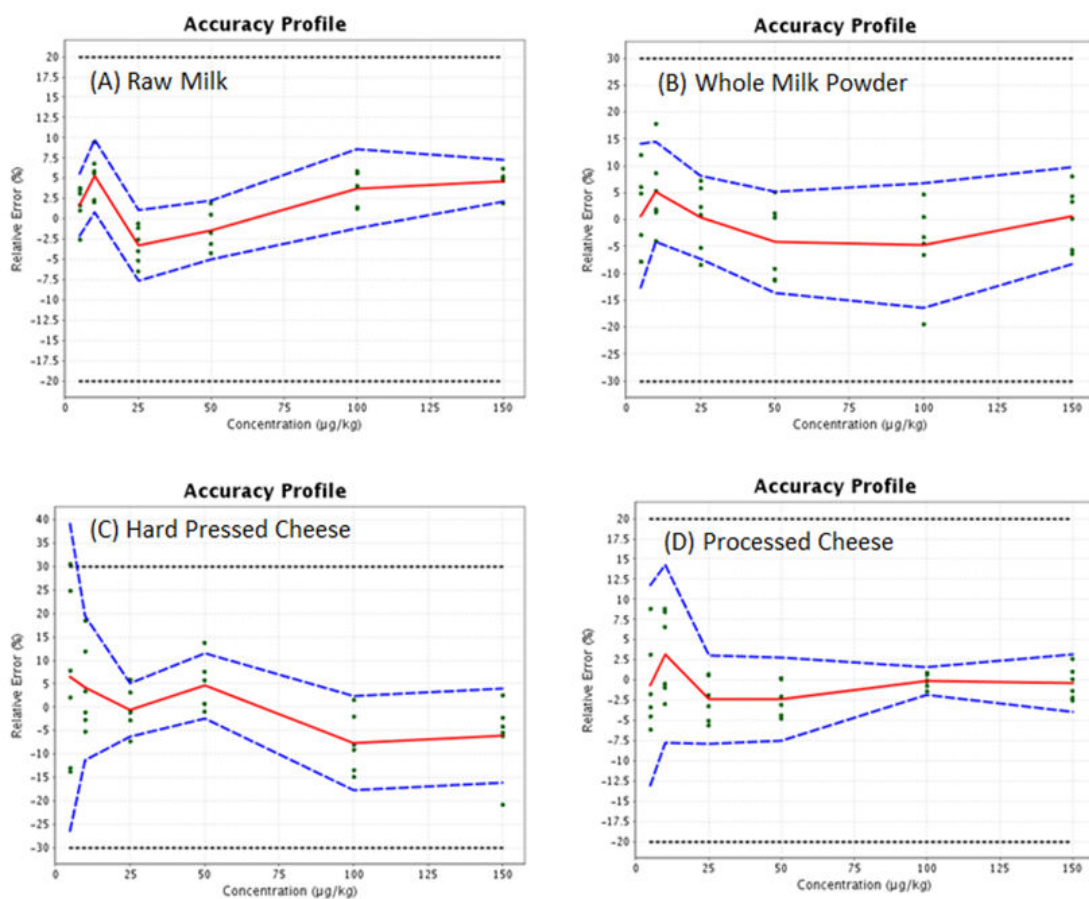


Fig.S2 : Accuracy profile from the validation of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine in raw milk (A), whole milk powder (B), hard pressed cheese (C), and processed cheese (D).

Partie 2 : Développement de méthodes fiables pour l'analyse de résidus de biocides dans les produits laitiers

Table S1: Validation results of the method applying on raw milk, whole milk powder, hard pressed cheese, and processed cheese samples: acceptance (λ) and β -expectation tolerance limit, trueness, precision (repeatability and intermediate precision) and accuracy (risk).

Analytes	λ (%)	β (%)	Concentration levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Trueness ($k=3; n=6$)	Precision ($k=3; n=6$)		Risk (%)
				Relative bias (%)	Repeatability (R.S.D., %)	Intermediate precision (R.S.D., %)	
Raw milk	20	80	5	1.76	2.388	2.388	0.07514
			10	5.333	2.814	2.814	0.2906
			25	-3.309	1.673	2.431	0.4782
			50	-1.371	2.275	2.275	0.05833
			100	3.697	0.1372	2.226	1.758
			150	4.652	1.196	1.493	0.0578
Whole milk powder	30	70	5	0.7143	3.952	8.893	7.698
			10	5.161	7.475	7.475	1.858
			25	0.4261	6.165	6.165	0.7038
			50	-4.16	6.674	7.302	1.909
			100	-4.776	6.458	8.557	4.586
			150	0.6712	3.229	6.19	3.047
Hard pressed cheese	30	70	5	6.412	3.338	20.69	34.39
			10	4.076	4.001	10.15	10.92
			25	-0.5699	4.604	4.604	0.2083
			50	4.583	5.563	5.563	0.5781
			100	-7.697	3.56	6.91	5.005
			150	-6.082	7.785	7.921	2.523
Processed cheese	20	80	5	-0.6312	2.509	6.161	8.676
			10	3.239	2.992	5.71	6.899
			25	-2.417	1.719	2.918	1.12
			50	-2.309	0.4394	2.397	1.759
			100	-0.1344	0.5847	0.9124	0.02764
			150	-0.3579	1.682	2.08	0.1197

k, number of series; n, number of replicates per series

4 CONCLUSIONS GENERALES

En première partie de thèse, deux méthodes d'analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem ont été développées et validées pour quantifier avec une exactitude maîtrisée deux catégories de biocides désinfectants, les ammoniums quaternaires et l'Aminopropyldodécylpropane diamine, potentiellement présents sous forme de résidus dans les produits laitiers. Les protocoles analytiques reposent sur une extraction avec des solvants organiques dont le pH d'extraction a été optimisé selon la méthode et les biocides étudiés. Les méthodes ont été validées selon l'approche erreur totale basée sur la construction d'un profil d'exactitude permettant ainsi l'évaluation des performances analytiques de chacune. Les molécules à LMR, (i.e. les ammoniums quaternaires) et sans LMR spécifique (i.e. l'Aminopropyldodécylpropane diamine) répondent pour la plupart à l'objectif initial de limite de quantification visée à 10 µg/kg.

Ces méthodes pourront être mises en application à l'initiative des autorités compétentes, pour fournir des données d'occurrence quant à la présence de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers, ceci dans un but de mesure de l'exposition et d'analyse du risque pour le consommateur. De plus, nos partenaires de l'interprofession laitière, dans le cadre du projet Resbiolact, ont montré un grand intérêt quant à nos résultats, ce en vue du contrôle de leurs produits. L'usage de telles méthodes permettant d'analyser les produits laitiers va concourir à une analyse critique bénéfique/risque (microbiologique versus chimique) quant à l'usage de tels composés.

Dans le cadre de cette thèse, au vue des résultats de l'alerte communautaire concernant le présence d'AQs à des teneurs excédant même la LMR de l'époque (500 µg/kg) ainsi que ceux obtenus lors de plans de contrôle, il nous était nécessaire de fournir à nos tutelles une méthode d'analyse permettant de mesurer l'exposition des consommateurs à cette classe de composés.

Les produits laitiers étant avérés comme à risque, d'une part et la signature du projet Resbiolact d'autre part, nous ont amené à développer une méthode potentiellement applicable au lait et à l'ensemble de ses dérivés. La procédure de validation démontrant la maîtrise de la robustesse et de l'incertitude de mesure en fait une méthode candidate possible à l'accréditation. Cette même méthode, si elle devait être utilisée à des fins de contrôle du respect de la LMR, mériterait peut-être d'être revalidée par exemple via une approche de détermination de concentration critique.

La connaissance du risque avéré liée aux ammoniums quaternaires a fait que les industriels laitiers ont cherché une alternative à ces substances et se sont vu proposer

Conclusions

l'Aminopropyldodécylpropane diamine. En conséquence, il est apparu nécessaire de développer une méthode répondant à tous les critères d'applicabilité et de performances que pour les ammoniums quaternaires.

Cependant, à la genèse de ce projet, le questionnement d'apparition de produits néoformés liés à la présence de résidus n'avait pas été posé. Depuis, ce sujet a été abordé en particulier dans le cadre de résidus de médicaments vétérinaires.

C'est ce questionnement du devenir des résidus de biocides, en particulier lors des processus de transformation du lait qui va être présenté dans la troisième partie de ce manuscrit.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

1. INTRODUCTION

Cette partie de la thèse est axée sur l'étude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers en explorant l'impact que peuvent avoir les procédés de transformation du lait sur ces résidus. L'objectif principal de ce travail est donc (i) de mieux connaître l'évolution des teneurs en biocides dans les produits laitiers le long de la chaîne de transformation et (ii) de rechercher d'éventuelles substances chimiques indésirables, que nous appellerons produits néoformés, qui pourraient être le résultat d'une réaction entre les résidus de biocides et les composants faisant naturellement partie du lait et des produits laitiers. Ceux-ci pourraient être favorisés par l'application de différentes technologies de fabrication et de transformation de produits laitiers faisant essentiellement intervenir des traitements mécanique et thermique. A notre connaissance, aucune étude n'a été menée pour étudier ce phénomène pour des résidus de biocides désinfectants. A titre d'exemple, des études ont été menées pour étudier le devenir des résidus de médicaments vétérinaires en lien avec la cuisson de la viande [43, 48, 52, 53]. Afin d'apporter des éléments de réponse et de permettre d'avoir une démarche prédictive pour permettre d'évaluer le risque lié à ces produits néoformés, une étude pilote a été réalisée en collaboration avec le centre d'expertise agroalimentaire Actalia, partenaire du projet Resbiolact. Ce centre intervient dans la fabrication des produits laitiers (fromage PPC et FF). La stratégie d'étude a été de disposer de lait de ferme et d'en contaminer volontairement une partie, puis d'appliquer les procédés de transformation habituels pour fabriquer les fromages (PPC et FF).

Pour atteindre notre objectif, le devenir du DDAC-C₁₀ et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les fromages PPC et FF a été étudié. De manière indépendante, pour chaque combinaison substance active/fromage, l'étude est réalisée sur 2 groupes : un groupe témoin dit « non traité » et un groupe dit « traité » par un biocide. Deux approches complémentaires d'analyse ciblée et non ciblée ont été employées ; pour suivre quantitativement les résidus de biocides dans les différents produits laitiers (traités et non traités), et d'autre part pour comparer les empreintes chimiques des échantillons témoins et traités pour tenter de mettre en évidence des marqueurs pertinents de contamination des fromages.

La stratégie globale adoptée ainsi que la méthodologie appliquée pour réaliser cette étude seront détaillées dans cette partie. Les résultats de d'analyse ciblée et non ciblée pour les deux types de fabrications seront présentés et discutés.

2. STRATEGIE GLOBALE DE L'ETUDE

La stratégie globale consiste à réaliser une étude pilote, à petite échelle industrielle, pour étudier le devenir des biocides dans les produits laitiers et l'impact des procédés de transformation du lait. Cette étude pilote a été menée en collaboration avec la Halle Technologique d'Actalia qui a permis la fabrication des produits laitiers (fromages PPC et FF). La production de la matière première fromagère a pu être réalisée à partir d'un lait témoin sélectionné issu d'une ferme productrice de lait garantissant le non usage des biocides étudiés. De plus, un autocontrôle des installations au sein de la halle technologique, effectué à l'aide de bandelettes à révélation immédiate comme utilisées en IAA, a été réalisé, garantissant l'absence de biocides dans les installations utilisées. Pour étudier le devenir des biocides et observer au mieux l'impact des procédés de transformation, la fabrication des fromages PPC et FF a été réalisée en deux temps (Figure36).

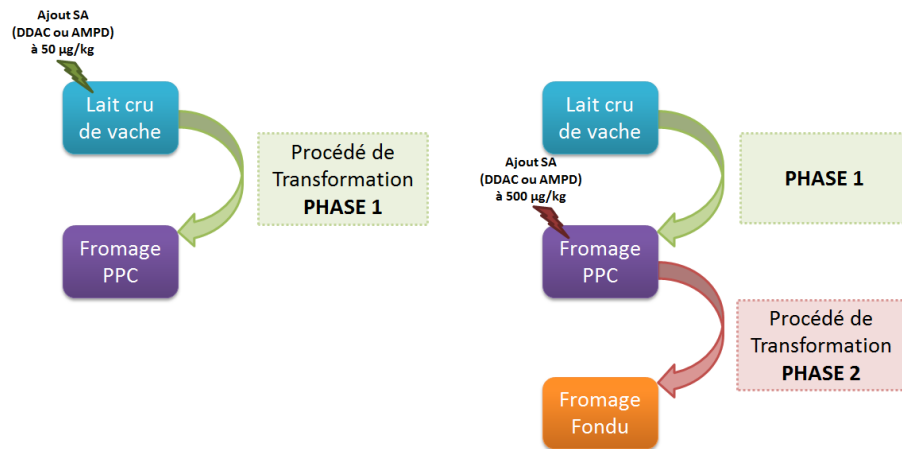


Figure 36 : Découpage des fabrications des PPC (Phase 1) et FF (Phase 2) relative à la phase (1 ou 2) du procédé de transformation

(L'ajout de la substance active (SA) biocide, le DDAC-C10 ou l'Aminopropyldodécypropane diamine (AMPD) est effectué à différents niveaux de la fabrication)

Ainsi, pour observer l'impact des traitements appliqués lors de la Phase 1 (= fabrication de fromage PPC), les groupes de lait dits « traités » ont été contaminés par chaque SA biocide, de manière indépendante, à une teneur de 50 µg/kg (50 ppb). Cette concentration tend à se rapprocher des teneurs pouvant être retrouvées dans les échantillons terrains. La fabrication des PPC a été réalisée dans 3 cuves réutilisées sur 2 jours, le premier étant consacré à l'étude du DDAC-C₁₀ et le second à celle de l'Aminopropyldodécypropane diamine, et ce en raison des contraintes de la halle technologique à savoir les trois cuves réutilisables. Les étapes clés de la fabrication de chacun des fromages PPC ainsi que les points de prélèvements pour les différentes analyses sont présentés sur la figure 37.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

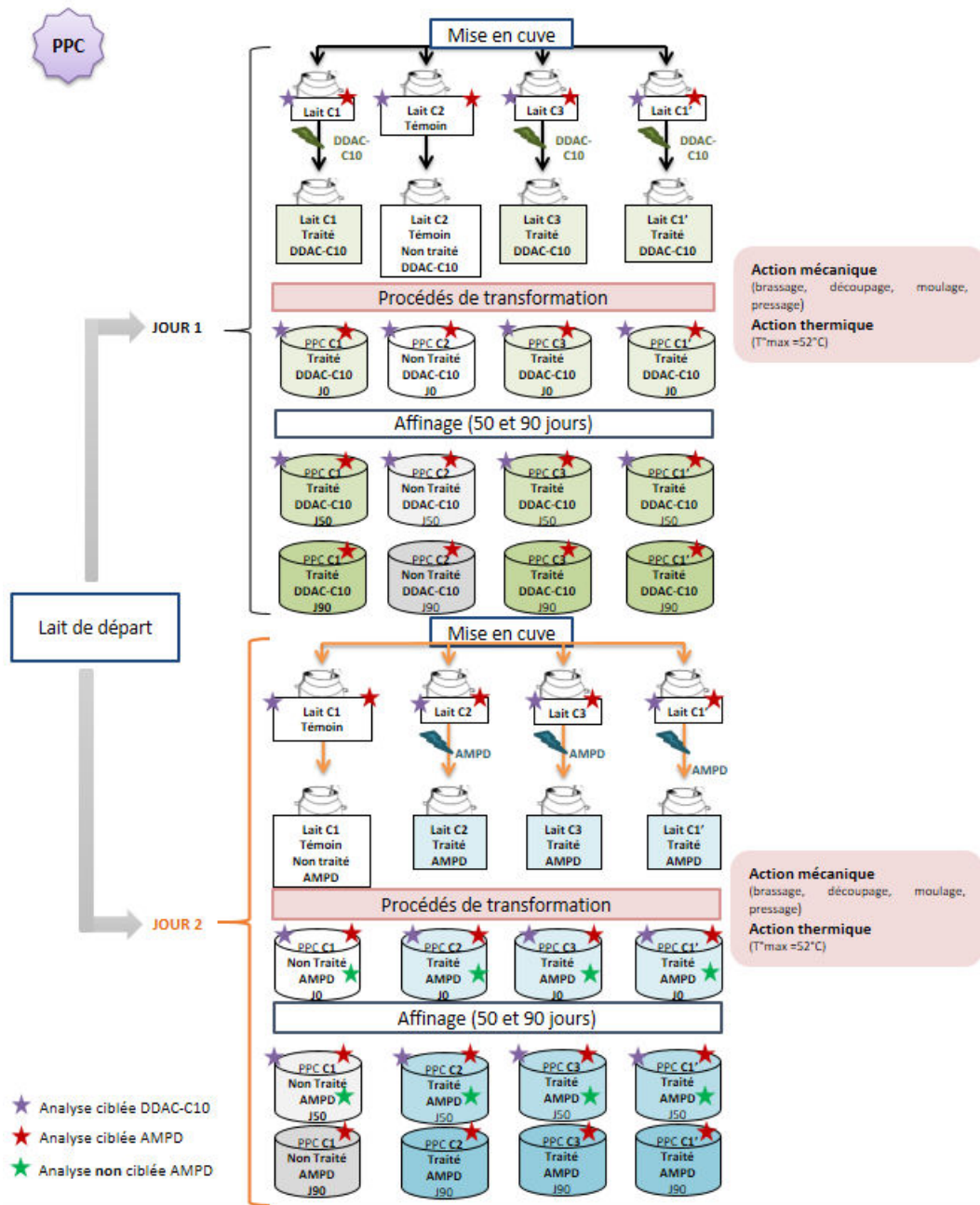


Figure 37 : Stratégie de fabrication des fromages PPC pour la série du DDAC-C10 et de l'Aminopropyldodécypropane diamine

La fabrication a été réalisée sur deux jours (1jour/SA) et avec un roulement sur 3 cuves.

La cuve C1 a été utilisée 2 fois lors des séries de fabrication (C1 = C1').

Les cuves (C1-C1') et C2 témoin ont été inversées entre la série de fabrication du DDAC-C10 et celle de l'Aminopropyldodécypropane diamine du lendemain.

Pour observer l'impact des procédés de la phase 2 lors de la fabrication des FF, la même stratégie a été appliquée par l'ajout de la SA à un fromage PPC « non traité » permettant ainsi

d'obtenir des fromages fondus « traités ». Les points clés relatifs à l'étude de la fabrication de chacun des fromages PPC ainsi que les points de prélèvements pour les différentes analyses sont présentés sur la figure 38.

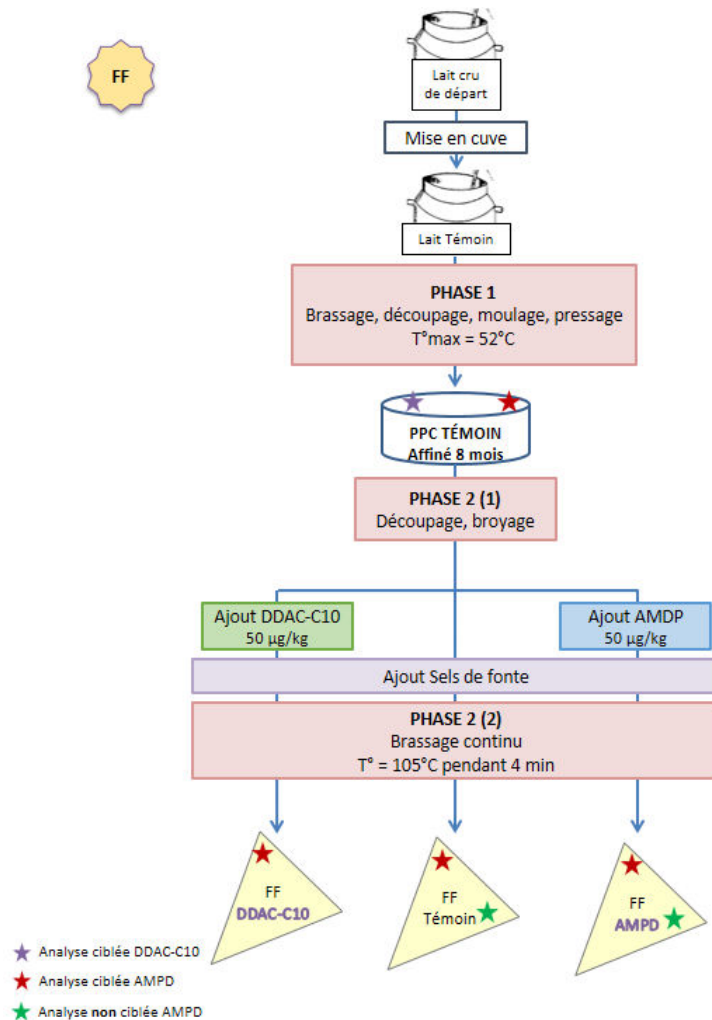


Figure 38 : Stratégie de fabrication des fromages Fondus (FF) pour la série du DDAC-C10 et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine

La démarche méthodologique générale appliquée à l'analyse des échantillons de fromages (PPC et FF) « traités » et « non traités » s'articule autour de quatre étapes principales représentées sur la figure 39 :

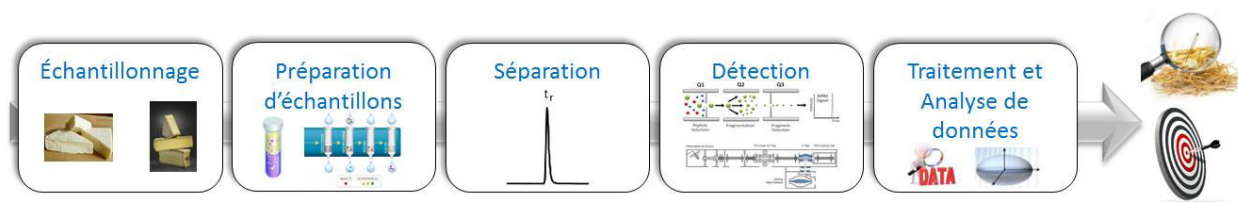


Figure 39 : Synoptique de la méthodologie analytique adoptée pour l'analyse ciblée et non ciblée de résidus de biocides et de produits néoformés dans les produits laitiers

3. ANALYSES CIBLEES

3.1 Matériels et méthodes d'analyses ciblées

3.1.1 Matrices et standards pour l'analyse

➤ **Matrices :**

La quantification des échantillons, de la matière première (Lait) aux produits transformés (fromages PPC et FF) fabriqués au cours de l'étude pilote nécessite de disposer d'une gamme d'étalonnage réalisée à partir d'une matrice blanche identique ou à défaut proche de celle des échantillons à doser. Pour cela, les matrices de référence retenues ont été le lait cru de bovin, un fromage PPC de type Comté® et un fromage fondu de type Vache qui rit®.

➤ **Les standards et étalons internes :**

Les standards de DDAC-C₁₀ et d'Aminopropyldodécylpropane diamine ainsi que leur étalon interne deutéré respectif employés pour les analyses ciblées sont de qualité analytique avec une haute pureté (>97%). La préparation des solutions de supplémentation est réalisée comme indiqué dans les méthodes figurant dans la partie 2.

3.1.2 Appareillage de chromatographie et de détection par spectrométrie de masse en tandem

○ Ammonium Quaternaire : DDAC-C₁₀

Les analyses relatives au DDAC-C₁₀, par LC-ESI-MS/MS ont été réalisées sur une chaîne analytique Thermo Surveyor® couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle Thermo TSQ Quantum® équipée d'une source d'ionisation electrospray fonctionnant en mode positif. L'ensemble de la chaîne LC-ESI-MS/MS est relié au logiciel d'acquisition et de traitement des données Xcalibur® (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA). La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Synergi Fusion®-RP 80Å greffée C₁₈ fournie par Phenomenex (provenance). Ses dimensions sont les suivantes : 75 × 2.00 mm (longueur x diamètre interne). La nature et la granulométrie des particules de la phase stationnaire, soit 4 µm de diamètre (porosité 80 Å) permettent de travailler en HPLC classique.

○ L'Aminopropyldodécylpropane diamine

Les analyses relatives à l'Aminopropyldodécylpropane diamine par LC-ESI-MS/MS ont été réalisées sur une chaîne analytique UHPLC Dionex Ultimate 3000® (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA) couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle Thermo TSQ Vantage® (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA) équipée d'une source d'ionisation electrospray chauffée (HESI, Heated Electrospray Ionization) fonctionnant en mode positif. L'ensemble de la chaîne UPLC-HESI-MS/MS est relié au logiciel d'acquisition et de traitement des données Xcalibur® (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA). La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne Hypersil Gold™ à silice ultrapure greffée C₁₈ fournie par ThermoFisher (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA). Ses dimensions sont les suivantes : 50 × 2.1 mm (longueur x diamètre interne), 1.9 µm de diamètre de particule (porosité 175 Å).

3.1.3 Préparation des échantillons et gamme matrice

La figure 40 illustre la préparation des échantillons réalisée comme décrits dans les articles intégrés en partie 2.

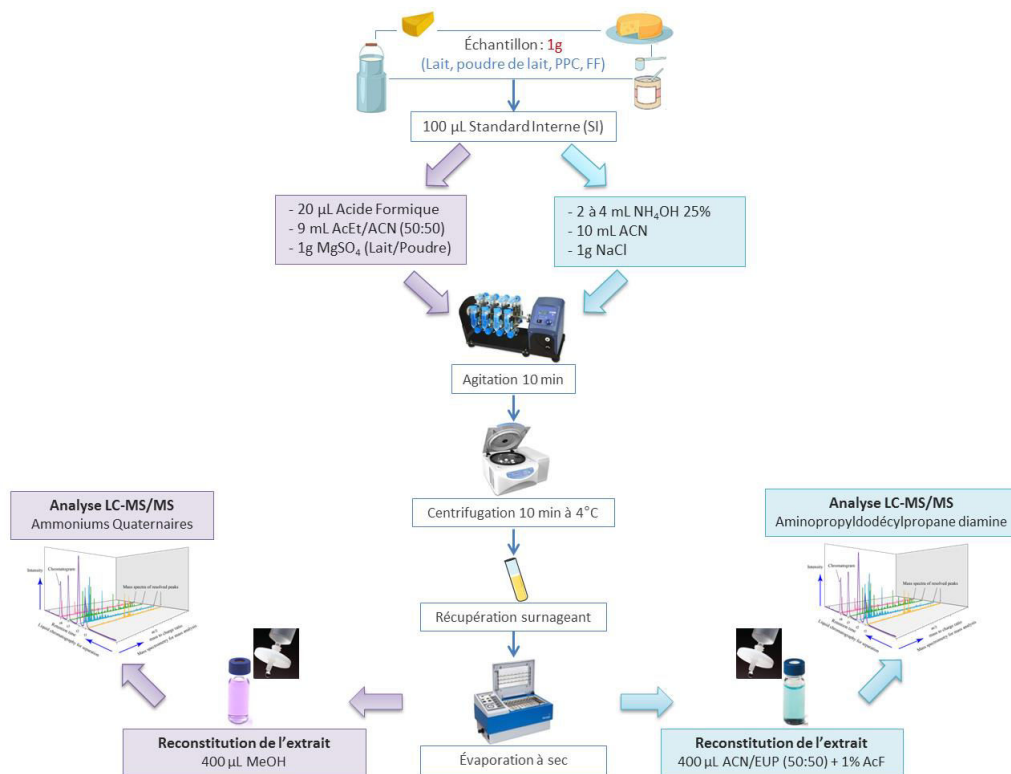


Figure 40 : Synoptique de la méthodologie d'extraction pour l'analyse ciblée et non ciblée

Pour chaque méthode d'analyse, une gamme matrice qui couvre le domaine de validité a été réalisée dans les mêmes conditions (matrice de référence, protocole d'extraction) que celles des échantillons inconnus pour quantifier indépendamment les teneurs en DDAC-C₁₀ et en

Aminopropyldodécylpropane diamine. Le tableau suivant résume les gammes utilisées pour la quantification des SA dans les échantillons :

Tableau 13 : Domaine de validité et gamme appliquée pour l'analyse ciblée du DDAC-C10 et de l'AMDP dans les produits laitiers

(des points supplémentés supérieurs à 150 µg/kg ajoutés pour la quantification figurent entre parenthèse)

	DDAC-C10		AMPD	
	Domaine de validité (µg/kg)	Gamme appliquée (µg/kg)	Domaine de validité (µg/kg)	Gamme appliquée (µg/kg)
Lait		[T-20-50-100-150-(250-500)]	[5-150]	[T-5-10-25-50-100]
PPC	[18-150]	[T-20-50-100-150-(250-500-1000)]	[7.3-150]	[T-5-10-25-50-100-150-(500)]
FF		Non analysés	[5-150]	

3.2 Résultats d'analyses ciblées

La fabrication des fromages lors de cette étude pilote a été réalisée en deux temps en raison de la disponibilité des installations de la Halle Technologique d'Actalia et de la nécessité de disposer de fromages PPC pour fabriquer les fromages fondus. Ainsi, les résultats obtenus seront présentés dans cette partie dans l'ordre de fabrication des échantillons.

3.2.1 Les Ammoniums Quaternaires : Cas du DDAC-C₁₀

L'analyse du DDAC-C₁₀ dans les échantillons de fromages PPC non affinés (J₀) et affinés 50 jours (J₅₀) des deux jours de fabrication (traitement au DDAC-C10 et traitement à l'AMDP) a été réalisée avec la méthode multi-résidus d'AQs en se focalisant particulièrement sur le DDAC-C₁₀ comme étant la seule SA devant se trouver dans les échantillons. La figure 41 représente les teneurs (exprimée en µg/kg) en DDAC-C₁₀ retrouvées dans les différents échantillons.

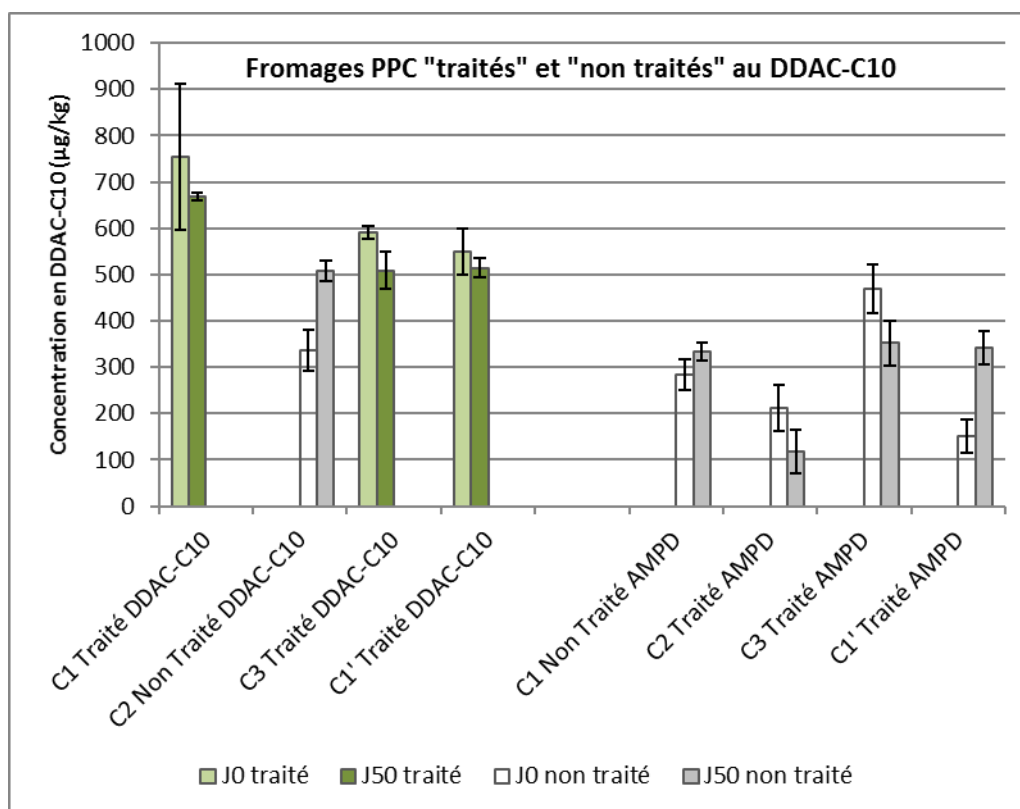


Figure 41 : Teneurs en DDAC-C10 dans les fromages PPC « traités » et « non traités »

Les échantillons « traités » au DDAC-C₁₀ présentent des teneurs (diagrammes vert clair et foncé) supérieures à 500 µg/kg quel que soit le temps d'affinage. Sachant que la fabrication d'1 kilogramme de fromage nécessite entre 8 et 12 litres de lait, un facteur de concentration d'environ (x10) est généralement constaté. Ces résultats démontrent ce phénomène de concentration des résidus de biocides dans les fromages puisque 50 µg/kg de DDAC-C₁₀ ont été initialement introduits dans le lait.

La présence de DDAC-C₁₀ a été retrouvée, à des teneurs supérieures à 100 µg/kg, dans les échantillons (J₀ et J₅₀) « non traités » en DDAC-C₁₀ des deux séries de fabrication, dont celle relative à la fabrication « traité » et « non traité » en AMPD. La matière première laitière et les fromages PPC qui en découlent n'ont en théorie pas été volontairement mis en contact avec la SA étudiée, de ce fait, une contamination externe et/ou une rémanence du DDAC-C₁₀ sur les surfaces pourraient expliquer ces résultats inattendus. Si l'on se rapporte aux résultats relatifs à la cuve n°1 (C1 = C1') utilisée 4 fois durant cette étude pilote de fabrication de PPC, on observe pour J₀ une diminution de la teneur en DDAC-C₁₀ dans les PPC au cours de son utilisation et ceci d'autant plus lorsqu'elle celui-ci n'a pas été introduite dans le lait (ex. C1' Traité AMPD) (Figure 42). L'incertitude de mesure au-delà du domaine d'application de la méthode n'étant pas

maitrisé, la significativité de la variabilité entre les échantillons C1 Traité et C1' Traité n'a pas été étudiée.

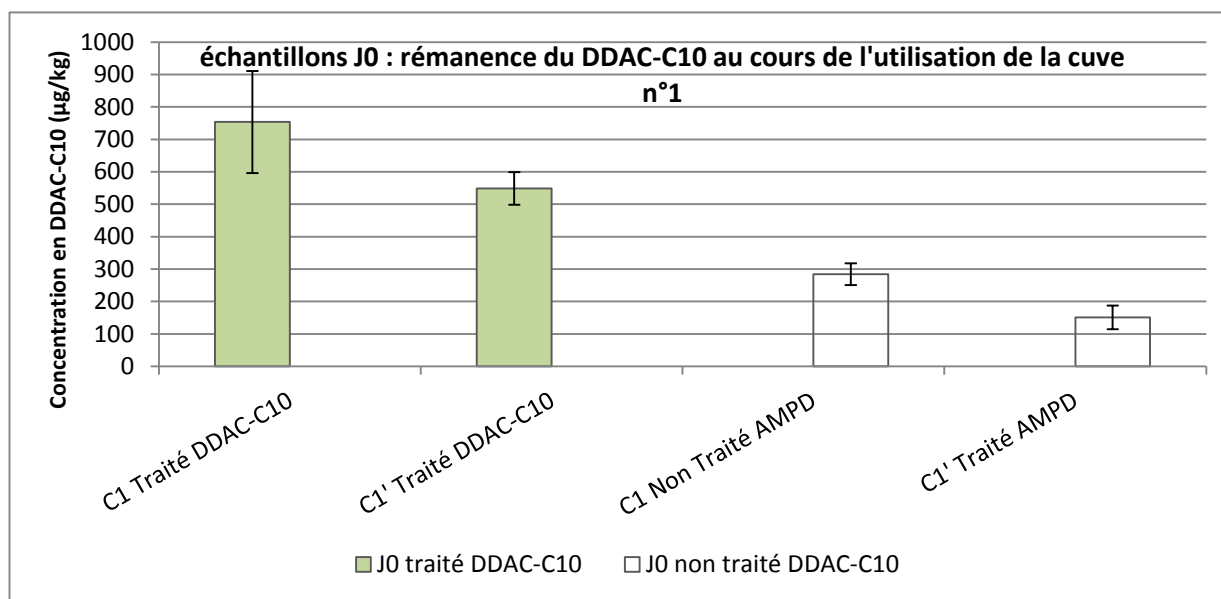


Figure 42 : Teneurs en DDAC-C10 dans les fromages PPC J0 « traités » et « non traités » permettant de mettre en évidence sa rémanence sur les surfaces alimentaires

En outre, des analyses complémentaires ont révélé la présence de DDAC-C₁₀ dans les laits non traités prélevés après la mise en cuve. Ainsi, l'hypothèse de l'usage de préparations industrielles comportant du DDAC-C₁₀ antérieur à notre étude peut être émise, ce qui expliquerait sa présence dans les produits laitiers fabriqués. Malgré les procédures de ND appliquées, les résidus n'auraient pas été correctement éliminés et les outils d'autocontrôle des eaux de rinçage et des surfaces, de type bandelettes disponible en IAA, aux performances insuffisantes n'ont pas permis de les révéler.

Quel que soit la nature de cette contamination, l'étude du devenir du DDAC-C₁₀ lors de la fabrication des PPC et FF par une analyse non ciblée n'est pas envisageable car l'absence d'échantillons blancs ne permet pas d'effectuer une étude comparative des empreintes chimiques d'échantillons « traités » et « non traités » ayant été soumis aux mêmes procédés de transformation.

3.2.2 L'Aminopropyldodécylpropane diamine

Les résultats d'analyse ciblée des divers échantillons « traités » et « non traités » à l'Aminopropyldodécylpropane diamine sont présentés dans le tableau 14. Aucune trace d'Aminopropyldodécylpropane diamine n'a été détectée dans les différents laits.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

Tableau 14 : Teneurs en Aminopropyldodécylpropane diamine dans les fromages PPC et FF « traités » et « non traités »

(Le nom des échantillons est relatif à la cuve utilisée et/ou au traitement. ND = Non Détecté)

Nom d'échantillon	Affinage	Méthode finale Teneur calculée ($\mu\text{g}/\text{kg}=\text{ppb}$)
		AMPD PPC : $LD_{PPC} = 0.19$ et $LQ_{PPC} = 7.3$ FF : $LD_{FF} = 0.09$ et $LQ_{FF} = 5$
C1 Traité DDAC-C10	J0	ND
	J50	
	J90	
C2 Non Traité DDAC-C10	J0	ND
	J50	
	J90	
C3 Traité DDAC-C10	J0	ND
	J50	
	J90	
C1' Traité DDAC-C10	J0	ND
	J50	
	J90	
C1 Non Traité AMPD	J0	ND
	J50	
	J90	
C2 Traité AMPD	J0	332
	J50	289
	J90	304
C3 Traité AMPD	J0	235
	J50	210
	J90	214
C1' Traité AMPD	J0	210
	J50	252
	J90	221
PPC pour FF	8 mois	ND
FF Témoin	∅	ND
FF Traité DDAC-C10	∅	ND
FF Traité AMPD	∅	47

Les résultats obtenus confirment que nous disposons bien d'échantillons (PPC et FF) « traités » et « non traités » nécessaires pour la comparaison d'empreinte chimique par analyse non ciblée.

Pour les fromages PPC, on observe en moyenne un facteur de concentration en résidus (x5) de la matière première laitière au produit fini. Ceci reste néanmoins inférieur au facteur (x10) théoriquement attendu, ce qui permet d'émettre l'hypothèse d'une réaction ou dégradation de l'Aminopropyldodécylpropane diamine avec les constituants de la matrice au cours de la fabrication des fromages.

Concernant le FF, la teneur en Aminopropyldodécylpropane diamine dans l'échantillon dit FF « traité » est proche de la concentration introduite ce qui est conforme aux attentes dans l'hypothèse où aucune réaction n'a lieu. En raison de l'absence de lots différents, une interprétation catégorique ne peut être émise. L'approche métabolomique mérite donc également d'être appliquée sur les FF

3.3 Conclusions sur les analyses ciblées

Cette étude pilote à petite échelle industrielle a montré une rémanence du DDAC-C₁₀ sur les surfaces alimentaires (ex. camion de transport, cuve de fabrication, matériels de découpe et brassage). Ceci confirme donc la persistance du DDAC-C₁₀ sur les surfaces inertes, rémanence qui a constitué une contrainte lors du développement et de la validation de la méthode multirésidus d'AQs. La contamination des échantillons témoins ne nous a donc pas permis d'explorer le devenir des AQs dans les produits laitiers et l'impact des procédés de transformation.

Pour l'Aminopropyldodécylpropane diamine, les résultats montrent un phénomène de concentration (x5) entre la matière première laitière et le produit fini PPC qui est inférieur à ce qui était attendu (x10). Ainsi, les hypothèses (i) d'une rémanence sur les surfaces alimentaires comme pour le DDAC-C₁₀, (ii) d'une dégradation ou d'un manque de stabilité de l'AMDP à la température, (iii) d'une réactivité des fonctions amines avec les constituants naturellement présents dans les produits laitiers qui pourraient conduire à la formation de substances chimiques indésirables, peuvent être émises.

Compte tenu des hypothèses formulées, la recherche de composés non-ciblés par comparaison d'empreinte chimique fromages « traités » et « non traités » pourraient permettre de répondre au questionnement lié à l'impact de la fabrication sur le devenir des résidus de biocides présents dans les produits laitiers.

4. ANALYSES NON CIBLEES

4.1 Matériels et méthodes d'analyses non ciblées

4.1.1 Les échantillons

Les fromages PPC et FF « traités » et « non traités » à l'Aminopropyldodécylpropane diamine issus de l'étude pilote de la Halle technologique d'Actalia (Figure 37-38) ont été choisis pour étudier l'impact des différents procédés de transformation par une approche d'analyse non ciblée.

Nous avons pu disposer au laboratoire d'un lot de PPC « non traités » et de 3 lots indépendants de PPC « traités », tous déclinés en deux catégories selon la durée de l'affinage (J0 et J50). Le plan d'expérience des échantillons de fromage PPC pour l'analyse non ciblée est détaillé dans le tableau suivant :

Tableau 15 : Plan d'expérience (nombre de lot et de réplicat) pour l'analyse non ciblée des échantillons de fromages PPC « traités » et « non traités »

	PPC « non traités »		PPC « traités »	
Nombre de Lot	1		3	
Déclinaison échantillons/lot	J0	J50	J0	J50
Nombre de répétitions/échantillons	Lot Blanc J0 : x9	Lot Blanc J50 : x9	Lot1-J0 : x3 Lot2-J0 : x3 Lot3-J0 : x3	Lot1-J0 : x3 Lot2-J0 : x3 Lot3-J0 : x3
Total	18 « non traités »		18 « traités »	

En ce qui concerne les fromages fondus, nous disposons d'un lot pour chaque groupe « traités » et « non traités ». Le plan d'expérience des échantillons des FF pour l'analyse non ciblée est détaillé dans le tableau suivant :

Tableau 16 : Plan d'expérience (nombre de lot et de réplicat) pour l'analyse non ciblée des échantillons de fromages fondus « traités et « non traités »

	FF « non traités »	FF « traités »
Nombre de Lot	1	1
Nombre de répétitions	Lot « traités » : x10	Lot « non traités » : x10
Total	10 « non traités »	10 « traités »

4.1.2 Standards, réactifs et consommables pour l'extraction et l'analyse non ciblée

- **Les standards et étalons internes :**

L'Aminopropyldodécylpropane diamine (SA biocide) et l'Aminopropyldécylpropane diamine (analogue C₁₀), de haute pureté analytique (>97%), fournies par BOC Sciences (USA) et AtlanChim Pharma (Saint-Herblain, France), ont été utilisées essentiellement pour l'optimisation des conditions de séparation chromatographique et de détection, et pour le contrôle de la validité de la séquence analytique.

○ **Réactifs chimiques :**

- Acide formique, pur à 98-100%, fourni par Merck,
- Acétonitrile pour l'analyse MS et HPLC fourni par Fisher,
- Eau ultrapure (EUP) de résistivité > 18,2 MΩ.cm à 25°C, produite à partir d'un appareil *Milli-Q* (Millipore, Molsheim, France),
- Chlorure de sodium provenant de la société Merck.

○ **Fioles et tubes d'extraction :**

Afin d'éviter toute contamination croisée, tous les contenants utilisés, nécessaires à la préparation des solutions ainsi qu'à l'extraction, sont en matière plastique (PP, PMP) et jetables (autant que possible).

4.1.3 Appareillage de chromatographie et de détection par spectrométrie de masse à haute résolution

Les analyses par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution relié à une source electrospray, ont été réalisées sur une chaîne analytique UHPLC Accela® (ThermoFisher Scientific, Brême, Allemagne). Le système de chromatographie est équipé d'une pompe quaternaire et d'un passeur d'échantillons thermostaté permettant l'injection en mode automatique. La colonne chromatographique retenue présente les mêmes caractéristiques (diamètre interne 2.1 mm et de particules 1.9 µm) que celle utilisée en analyse ciblée, à savoir une colonne Hypersil Gold™ à silice ultrapure greffée C₁₈ fournie par ThermoFisher (ThermoFisher Scientific, San Jose, USA). Afin d'optimiser la séparation chromatographique d'un maximum de composés, le choix s'est porté sur une colonne d'une longueur de 100 mm.

La détection est réalisée au moyen d'un spectromètre de masse à haute résolution de type LTQ Orbitrap XL™ (ThermoFisher Scientific, Brême, Allemagne). Les analyses ont été réalisées par ESI en mode positif. Pour des raisons techniques, le mode négatif n'a pu être employé.

L'ensemble de la chaîne UHPLC-ESI-MS/MS est relié au logiciel de pilotage, d'acquisition et de traitement des données brutes Xcalibur® (ThermoFisher Scientific).

4.1.4 Préparation des solutions

La préparation des différentes solutions, toutes indépendantes, est réalisée dans des fioles en PMP de la manière suivante :

○ Solutions mères (SM)

Des solutions unitaires à 1 mg/mL de chaque analyte, l'Aminopropyldodécylpropane diamine (SM1) et le standard interne d'Aminopropyldécylpropane diamine (SM2), sont préparées dans l'acétonitrile et conservée à 4°C pendant une durée d'au moins 6 mois.

○ Solutions intermédiaires

Les solutions intermédiaires d'Aminopropyldodécylpropane diamine (SolInt1) et du SI (SolInt2) à 10 µg/mL chacune sont réalisées dans l'ACN à partir de SM1 et SM2.

○ Solutions de travail

De façon similaire, les solutions de travail d'Aminopropyldodécylpropane diamine (ST1) et du SI (ST2) à 1 µg/mL chacune sont réalisées à partir de SolInt1 et SolInt2 dans un mélange constitué EUP+0.3% AcF et ACN +0.3% AcF (95 :5, v:v).

Les solutions ST1 et ST2 serviront pour le QC standard. La solution ST2 de standard interne sert également à compléter les extraits en fin de préparation des échantillons (donc après extraction).

4.1.5 Préparation des échantillons

L'objectif de cette étape est d'appliquer un traitement d'échantillon permettant d'extraire les constituants de la matrice de façon la plus exhaustive possible, maximisant ainsi les chances de récupérer des marqueurs pertinents. La préparation d'échantillon retenue pour notre étude repose sur une extraction à l'ACN qui apparait comme la technique la plus simple et la plus générique. Cette condition d'extraction écarte la possibilité d'extraire l'Aminopropyldodécylpropane diamine qui nécessite un milieu fortement alcalin. L'Aminopropyldodécylpropane diamine étant chimiquement réactive, une dégradation ou une réaction entre les fonctions amines primaires et les constituants de la matrice pourrait être envisagée et contribuerait ainsi à réduire son caractère alcalin. La figure 43 illustre le protocole appliqué aux échantillons quel que soit leur nature.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

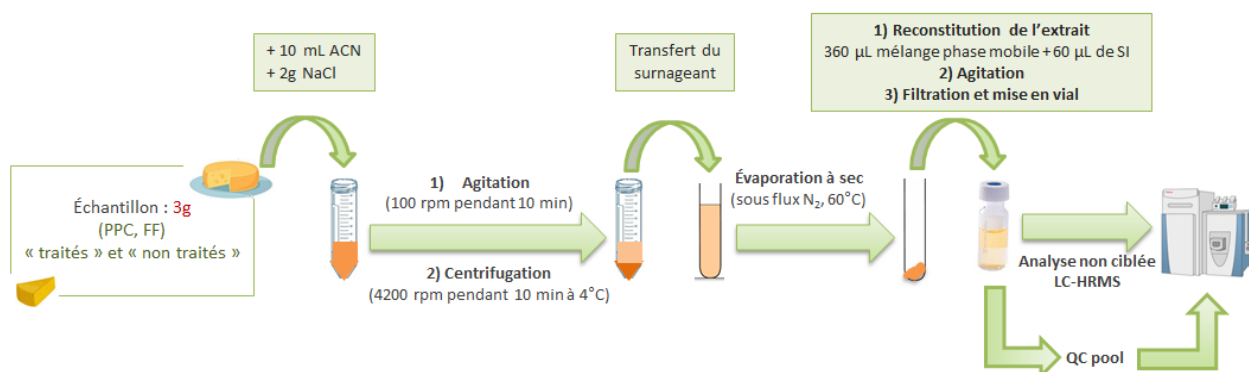


Figure 43 : Synoptique de la méthodologie d'extraction mise en œuvre pour l'analyse non ciblée

En complément, un échantillon sans matrice dit blanc réactif (BR) est préparé dans les mêmes conditions (réactifs, solvants, étapes) que les échantillons.

4.1.6 Préparation des contrôles qualité (QC)

○ QC Standard

Le QC Standard, ici à 100 µg/kg, est préparé à partir de 40 µL de chaque solution de travail (ST1 et ST2) et complété par 320 µL du mélange de phase mobile dans un flacon d'injection. Il est injecté en début de séquence d'analyse pour vérifier l'état du système analytique.

○ QC pool

Le QC pool est un extrait représentatif de la totalité des échantillons de la série d'analyse. Pour réaliser le QC pool, il est nécessaire de prélever le même volume (50 µL) de chaque échantillon (« traités » et « non traités »), hormis le Blanc Réactif, filtré et mis en flacon. La totalité des volumes prélevés est regroupée, agitée et répartie dans plusieurs flacons d'injection identifiés QC pool.

4.1.7 Conditions d'analyse par LC-HRMS

○ Conditions de détection HRMS

Les conditions de détection ont pu être optimisées avec l'infusion du standard d'Aminopropyldodécylpropane diamine ainsi que du SI, comme molécules de référence. Les paramètres de source les plus courants ont été appliqués afin de détecter le maximum d'analytes ionisés par électrospray en mode positif. La détection des signaux est réalisée au moyen de l'analyseur à transformée de Fourier Orbitrap™ (FTMS, de l'anglais « Fourier Transform Mass Spectrometer »), de résolution FHMW 60000, sur une gamme m/z = 100 à 2000 uma en mode fullscan. Le tableau 17 reprend les conditions HRMS appliquées aux échantillons de l'étude pilote.

Tableau 17 : Paramètres de détection en spectrométrie de masse à haute résolution

Phase mobile		Voie A : EUP + 0.3% AcF Voie B : ACN + 0.3% AcF
Débit ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Phase mobile	200
	pousse seringue	10
Source et mode d'ionisation		ESI+
Spray Voltage (kV)		4.00
Gaz de désolvatation (u.a.)		5
Gaz de nébulisation (u.a.)		0
Gaz auxiliaire (u.a.)		10
Température Capillaire ($^{\circ}\text{C}$)		300
Lentilles électrostatiques (V)		60

○ Conditions chromatographiques

En analyse non ciblée, les conditions chromatographiques doivent permettre la séparation du maximum d'analytes présents dans l'échantillon.

Les optimisations ont été réalisées par injection des solutions de travail ainsi que d'échantillons de PPC et FF issus des analyses ciblées. Ceci a permis d'établir les conditions ci-après, en prenant soin de limiter le bruit de fond notamment en début d'analyse. La phase mobile retenue fait intervenir un mélange binaire composé d'EUP et d'ACN tous deux acidifiés à 0.3% d'acide formique. La séparation des analytes est réalisée en mode gradient pour une durée d'analyse de 30 minutes (Tableau 18).

Tableau 18 : Gradient d'élution binaire pour la séparation chromatographique en analyse non ciblée

Débit ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Temps (min)	Voie A (%)	Voie B (%)
		EUP + 0.3% AcF	ACN + 0.3% AcF
250	0	95	5
	22	0	100
	26	95	5
	30	95	5

Le protocole analytique global étant optimisé, il a donc été mis en application pour l'analyse non ciblée des échantillons « traités » et « non traités » issus de l'étude pilote.

○ Séquence d'injection

Les échantillons ont été analysés de manière aléatoire en LC-HRMS. Pour cela, le séquençage des échantillons a été randomisé grâce au logiciel R (fonction « rand »). La randomisation des échantillons à analyser constitue le critère le plus important lors de la préparation de la séquence d'injection. Compte tenu du fait que l'intensité du signal peut évoluer au cours de la séquence d'analyse, il est nécessaire de procéder de la sorte pour réduire l'impact de la

variabilité du signal sur les résultats. La séquence commence toujours par plusieurs injections de QC standard et de solvant afin de s'assurer de la stabilité du système analytique, puis de deux injections de BR suivie des QC pool. Les échantillons sont ensuite analysés 4 par 4, avec entre chaque, un échantillon de QC (Figure 44). Chaque série d'échantillons (PPC et FF) a été analysée en continu de façon indépendante sur 2 jours différents.

1.	QC standard= solution standard (AMPD + SI) : injection x 3	[...]	
2.	solvant	22.	4 échantillons
3.	Blanc réactif : injecter 2 fois	23.	QCpool
4.	QC pool : injecter 3 fois	24.	4 échantillons
5.	4 échantillons	25.	QC pool
6.	QC pool	26.	QCpool ½
7.	4 échantillons	27.	QC pool ¼
8.	QCpool	28.	QC pool analysé MS ²
9.	4 échantillons	29.	Solvant- rinçage colonne

Figure 44 : Exemple de séquence d'analyse appliquée en approche non ciblée HRMS

4.1.8 Traitement des données pour l'analyse non ciblée

○ **Conversion des données**

Les données brutes au format de fichier constructeur .raw ont été converties en format universel netCDF (extension .cdf) avec le programme Xconverter disponible sous le logiciel Xcalibur® (ThermoFisher Scientific).

○ **Traitement des données brutes**

Le traitement des données brutes a été réalisé avec les packages XCMS et CAMERA du logiciel RStudio, tous deux disponibles au sein de la plateforme Galaxy « Work4metabolomics » [ref]. Les paramètres utilisés ainsi que leur signification sont répertoriés en annexe X. La détection des pics a été réalisée grâce à l'algorithme CentWave. Ensuite, les étapes d'alignements des empreintes et de correction des temps de rétention (Tr) ont pu être réalisées. A l'issue de la recherche et la complétion des données manquantes, le package CAMERA a permis de générer une table de données comportant l'ensemble des « features » avec création pour chacun les EIC et boxplots correspondants. La table de pics a été traitée selon la procédure décrite ci-après. Les variables ont été normalisées, c'est-à-dire que la variabilité intra-série du signal des ions présents dans les QCs a été corrigée en appliquant la régression la plus adéquate : « linéaire » pour les échantillons de FF et « lowess » pour les PPC. Ensuite, les variables ont été filtrées selon leur intensité par rapport aux blancs analytiques et leur coefficient de variation. Les ions issus des blancs réactifs ont été éliminés uniquement pour l'expérience relative aux PPC. La filtration des variables selon le coefficient de variation réalisée pour les deux séries (PPC et FF) a permis de conserver dans le jeu de données les variables qui ont une variabilité analytique inférieure à 30% dans les QC.

4.1.9 **Analyses statistiques**

Le traitement des données acquises par des méthodes chimiométriques univariées (t-Student, Wilcoxon-Mann-Whitney) et multivariées (ACP, PLS-DA) a été réalisé grâce à l'outil « Statistical Analysis » de la plateforme w4m regroupant des packages R dont le package « ropls » pour les analyses multivariées.

○ **Analyses univariées**

L'hypothèse de normalité n'ayant pas été testée, les tests paramétriques de Student et non-paramétriques Wilcoxon-Mann-Whitney avec une erreur α de 5% pour déterminer la significativité (p-value) des variables entre deux groupes (« traités » et « non traités ») ont été tous deux réalisés.

○ **Analyses multivariées**

Une transformation logarithmique (série FF) des intensités de tous les features, puis une normalisation par centrage et mise à l'échelle standard ont été effectuées avant les analyses multivariées. L'algorithme nipals a été choisi pour réaliser les analyses d'ACP et de PLS-DA. Les modèles de PLS-DA permettent de mettre en évidence les variables les plus impliquées dans la discrimination des groupes « traités » et « non traités » qui sont matérialisées par leur score VIP (de l'anglais, *Variable Importance in the Projection*). Une variable est considérée comme discriminante pour le modèle si son score VIP est supérieur à 2. Des tests de permutations (k = 1000) ont été réalisées pour valider les modèles de PLS-DA.

Une comparaison des variables discriminantes obtenus en PLS-DA et en analyses univariées a été réalisée pour conforter ou non les résultats.

4.1.10 **Identification**

Des essais d'annotation sont réalisés à partir d'une sélection de variables jugées discriminantes issue des analyses en PLS-DA et univariées. Ces variables ont été comparées à celles présentes dans les bases de données publiques et spectrales (HMDB, Chempider, et MassBank) [ref site internet]. De plus, une vérification de la pertinence des variables retenues après PLS-DA a été effectuée via l'observation des spectres et chromatogrammes sous le logiciel d'acquisition XCalibur®. Enfin, les spectres de masse de chaque variable ont été étudiés dans le but d'en déterminer la structure.

Des hypothèses de réaction de l'Aminopropyldodécylpropane diamine ont été émises pour contribuer à l'annotation des variables d'intérêt.

4.2 Résultats des analyses non ciblées sur les fromages et discussion

4.2.1 Le Fromage Fondu

Les données ont été dans un premier temps analysées à l'aide d'une ACP afin de visualiser la répartition des échantillons « traités » et « non traités » dans un espace à deux dimensions. La carte factorielle du poids des individus, appelée « score plot », issue de l'ACP est représentée en figure 45. Les QC pool sont tous regroupés en son centre montrant la qualité du jeu de données et la validité de la séquence analytique. De plus, celle-ci montre une discrimination nette entre les deux groupes FF « traités » (contaminated sur le graphe) et les « non traités » (control sur le graphe) à l'AMPD selon l'axe de la première composante principale (CP1) qui représente 21% de la variance du jeu de données. La seconde composante principale (CP2) représente 10% de la variabilité du jeu de données restante. La capacité descriptive du modèle est signifiée par la valeur $R2X = 0,513$. Ce paramètre indique que la moitié de la variabilité du jeu de données est pris en compte par ce modèle.

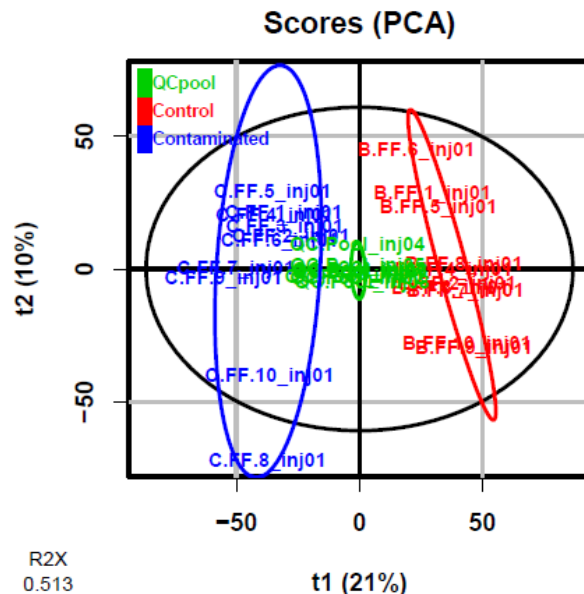


Figure 45 : Représentation « score plot » de l'ACP sur les échantillons de fromages fondus

La PLS-DA, autre modèle dit cette fois « supervisé », a permis de confirmer le résultat d'ACP relatif à une différenciation entre les deux groupes de FF. Les résultats de la PLS-DA sur les composantes 1 (23%) et 2 (8%) sont représentés graphiquement en Figure 46. Pour ce type de modèle, le nombre optimal de composantes principales à considérer est automatiquement déterminé par une validation croisée (algorithme nipals, $n=7$ par défaut) qui permet de valider le modèle [ref Westerhuis]. Ici, une faible proportion de la variabilité du jeu de données est représentée ($R2X = 0.309$). Le pourcentage de variabilité de Y ($R2Y$) expliqué par le modèle est

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

de 99,8% et le pouvoir prédictif (Q2Y) du modèle est de 95,9% ; ce qui est très satisfaisant pour expliquer et prédire l'appartenance à un groupe.

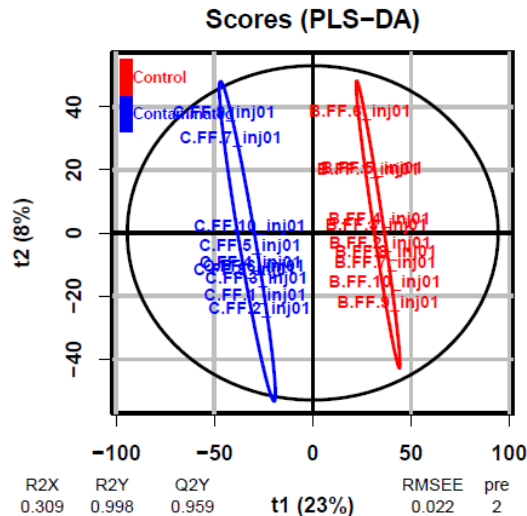


Figure 46 : PLS-DA sur les échantillons de fromages fondus
(les FF « traités » et « non traités » sont respectivement de couleur bleue et rouge)

Des tests de permutations des étiquettes de données ($k=1000$) ont été effectués pour évaluer la significativité des critères diagnostiques R2Y et Q2Y. Le test de permutation consiste en la permutation aléatoire des étiquettes de données Y des échantillons de façon à obtenir un nouveau jeu de données. A chaque permutation des valeurs de Y, un nouveau modèle statistique est construit auquel sont associés de nouveaux $R2Y_{perm}$ et $Q2Y_{perm}$. Si le modèle obtenu est aussi robuste statistiquement qu'avec les données réellement observées, alors la validité du modèle peut être considérée comme non acceptable. On obtient ainsi des valeurs de p (ou p-value), $pR2Y$ et $pQ2Y$, qui sont des indicateurs de performances du modèle. Les valeurs de p estimées pour le R2Y (< 0.01) et le Q2Y (< 0.05) traduisent la performance du modèle, confirmant sa validité (Figure 47).

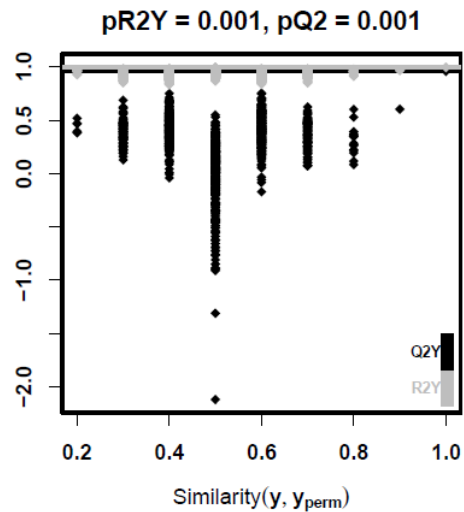


Figure 47 : Représentation de la validation du modèle PLS-DA pour les échantillons de FF par des tests de permutations (k=1000)

A l'issue de la PLS-DA, les variables ont été triées selon le critère VIP qui prend en compte l'importance de chaque variable dans la création de la composante et dans la prédiction de Y. Les variables pour lesquelles le critère de VIP est supérieur à 2 sont au nombre de 101, et seules les 35 premières ont été retenues pour l'annotation. En absence de vérification de l'hypothèse de normalité, la significativité de toutes les variables a été confrontée par les tests univariés de Student et de Wilcoxon-Mann-Whitney. Tandis qu'aucun résultat n'a été obtenu en non paramétrique, les résultats du T-test a permis d'obtenir 25 variables identiques à celles de PLS-DA. (TableauX), ce qui permet d'asseoir leur significativité dans la discrimination des groupes. A chaque variable sont associés son EIC et sa représentation de type boîte à moustache (boxplot). Parmi les variables corrélées représentées sur le tableau 19, quatre d'entre elles dont les EIC et boxplot sont repris en figure 48, ont été jugées pertinentes. En effet, les résultats sous forme de boxplot montrent leur présence de façon significative dans les échantillons « traités », observation confirmée visuellement par la superposition de l'EIC de tous les échantillons pour chacune des variables.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

Tableau 19 : Liste des variables d'intérêts sélectionnées par PLS-DA et analyse univariée (t-test) répondant aux critères de VIP (>2) et p-value (< 0.05)

(Les variables marquées d'un astérisque * sont identifiées uniquement en analyse univariée t-test. Les ions indiqués en couleur sont corrélés.)

VIP décroissant	PLSDA	univarié (t-test avec correction bonferroni)	p-value croissante
	M460T350	M344T242	
	M476T375	M180T190	
	M180T190	M476T375	
	M477T375	M416T313	
	M416T313	M388T313	
	M344T242	M432T350	
	M388T313	M433T350	
	M371T313	M520T395	
	M415T350	M460T350	
	M433T350	M300T165	
	M432T350	M521T395	
	M459T375	M246T356	
	M520T395	M477T375	
	M372T241	M415T350	
	M300T165	M225T189	
	M521T395	M564T411	
	M504T375	M371T313	
	M503T395	M174T311	
	M481T375	M372T241	
	M219T285	M219T285	
	M246T356	M419T457	
	M225T189	M565T411	
	M349T240	M481T375	
	M174T311	M503T395	
	M564T411	M138T202	
	M138T202	M608T425*	
	M548T395	M105T125*	
	M393T313	M175T311*	
	M547T411	M122T125*	
	M389T313	M174T285*	
	M305T165	M339T387*	
	M419T457	M196T311_2	
	M565T411	M286T618*	
	M196T311_2	M128T285*	
	M461T351	M273T239*	
	M460T375		
	M482T375		
	M504T375		

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

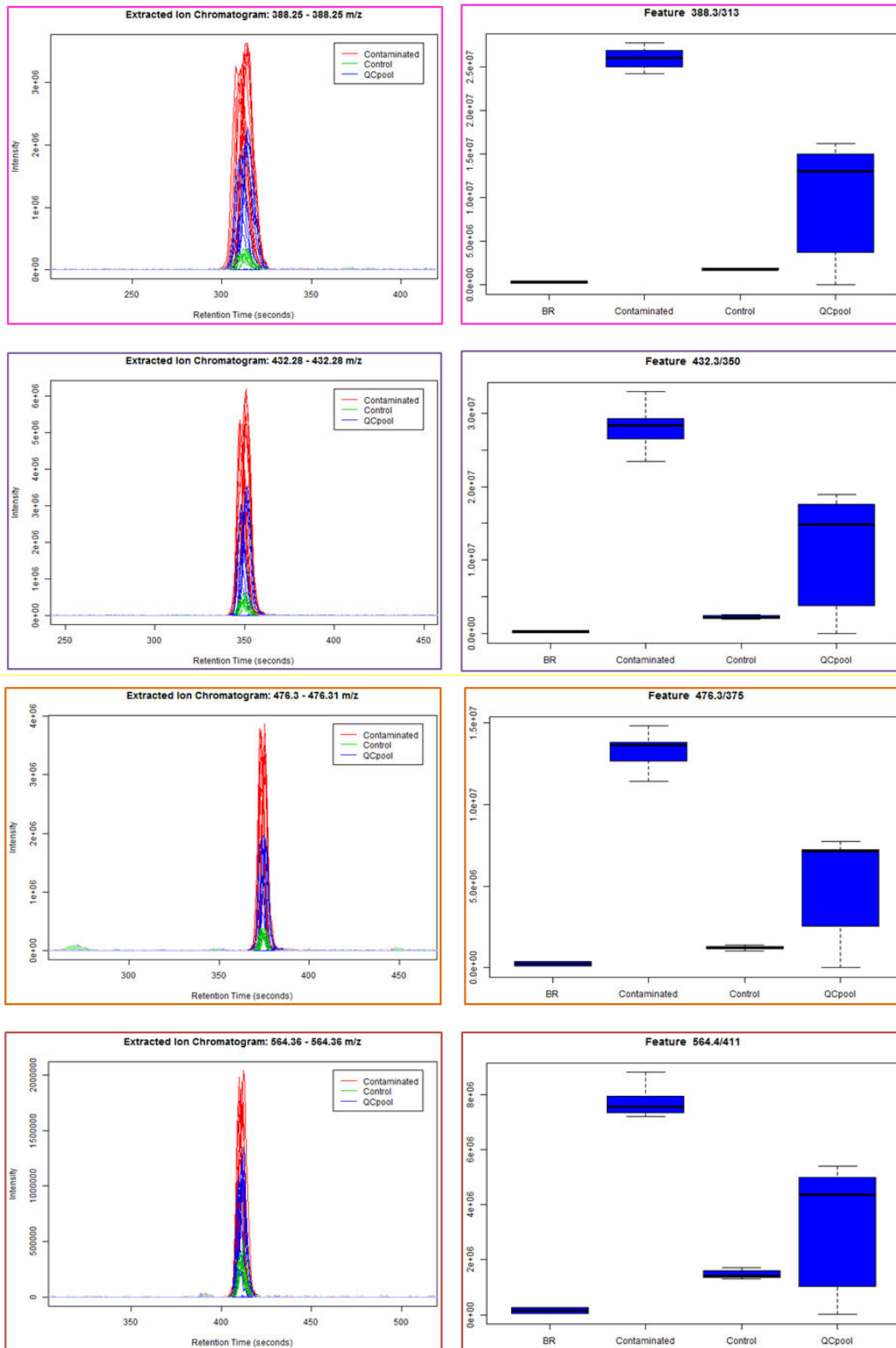


Figure 48 : Boxplot et EIC des quatre variables parmi les plus significatives de la PLS-DA pour les échantillons de fromages fondus

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

Les chromatogrammes (Figure 49) et les spectres de masse (Figure 50-51-52-53-54) des quatre variables jugées pertinentes, [M388T313], [M432T350], [M476T375] et [M564T411], ont été extraits afin d'émettre des hypothèses quant à la structure des ions. La comparaison des chromatogrammes de l'Aminopropyldodécylpropane diamine (AMDP) M300T527 et des 4 features jugées pertinents donnent une information quant à la polarité de ces derniers par rapport au biocide (Figure 49). Les 4 ions ayant un temps de rétention inférieur à celui de l'AMDP sont vraisemblablement plus polaires. Ils peuvent être constitués de groupements polaires (ex. OH, NH₂) ou présenter une chaîne aliphatique plus courte que celle de l'AMDP (C₁₂).

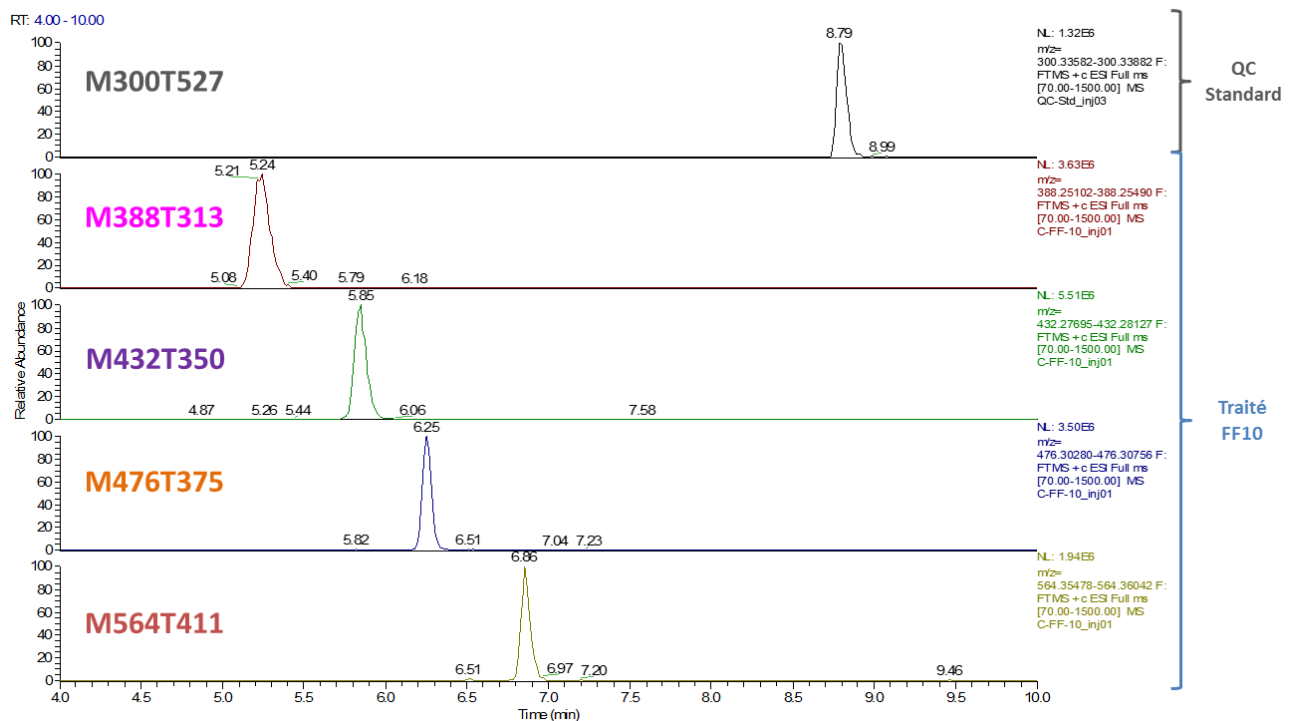


Figure 49 : Chromatogramme des quatre variables parmi les plus significatives de la PLS-DA pour les échantillons de fromages fondus

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

M300T527

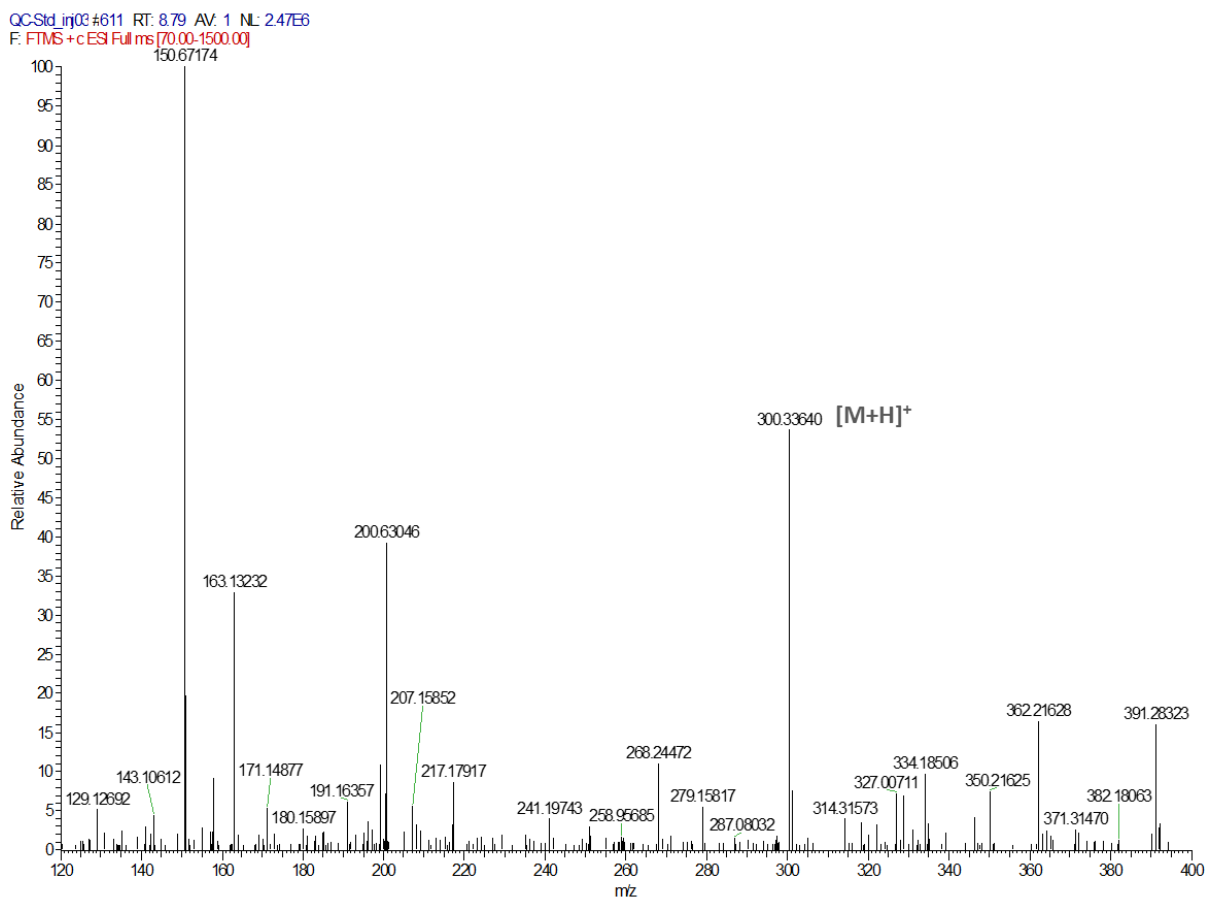


Figure 50 : Spectre de masses exactes de l'Aminopropyldodécylpropane diamine M300T527

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

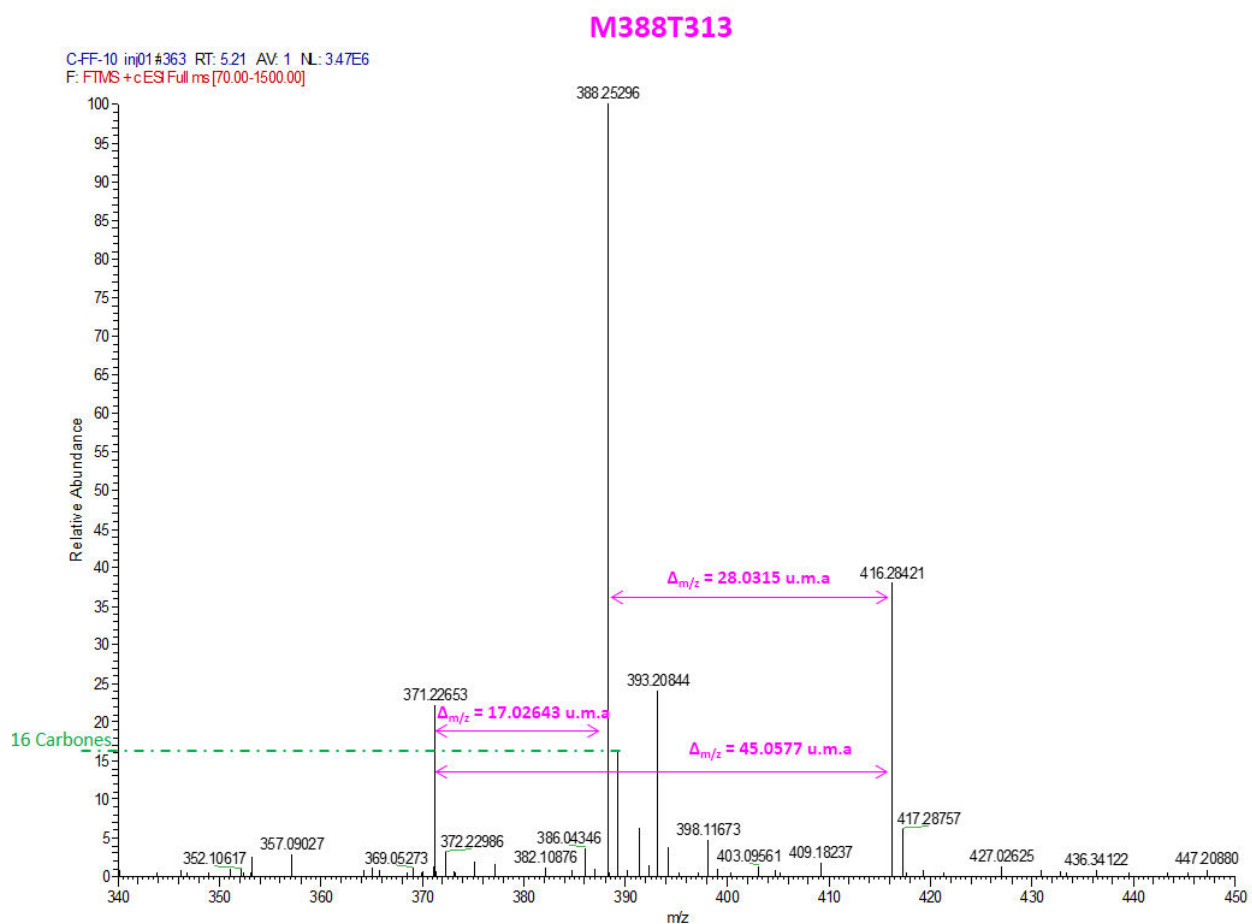


Figure 51 : Spectre de masses exactes de la variable M388T313

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

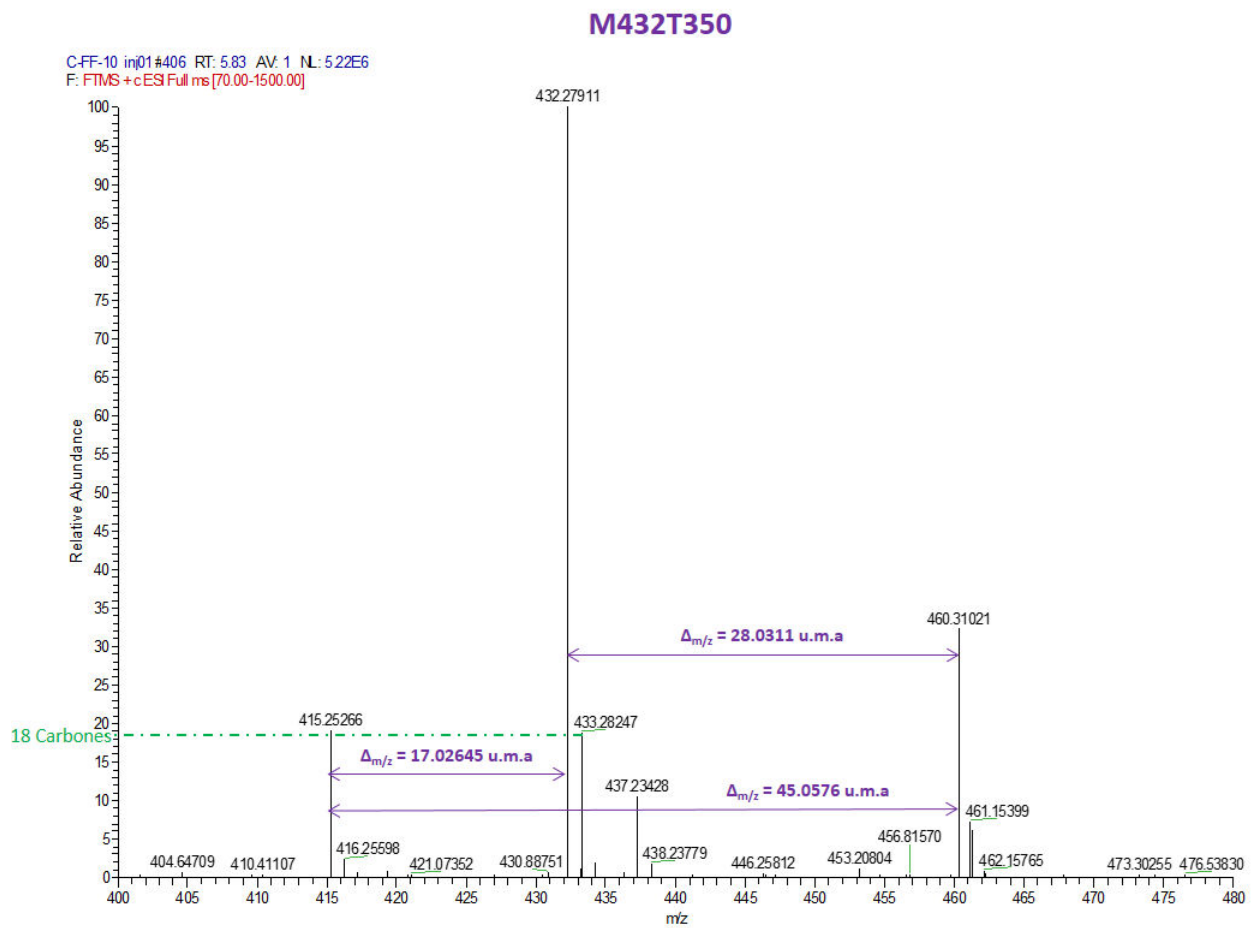


Figure 52 : Spectre de masses exactes de la variable M431T350

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

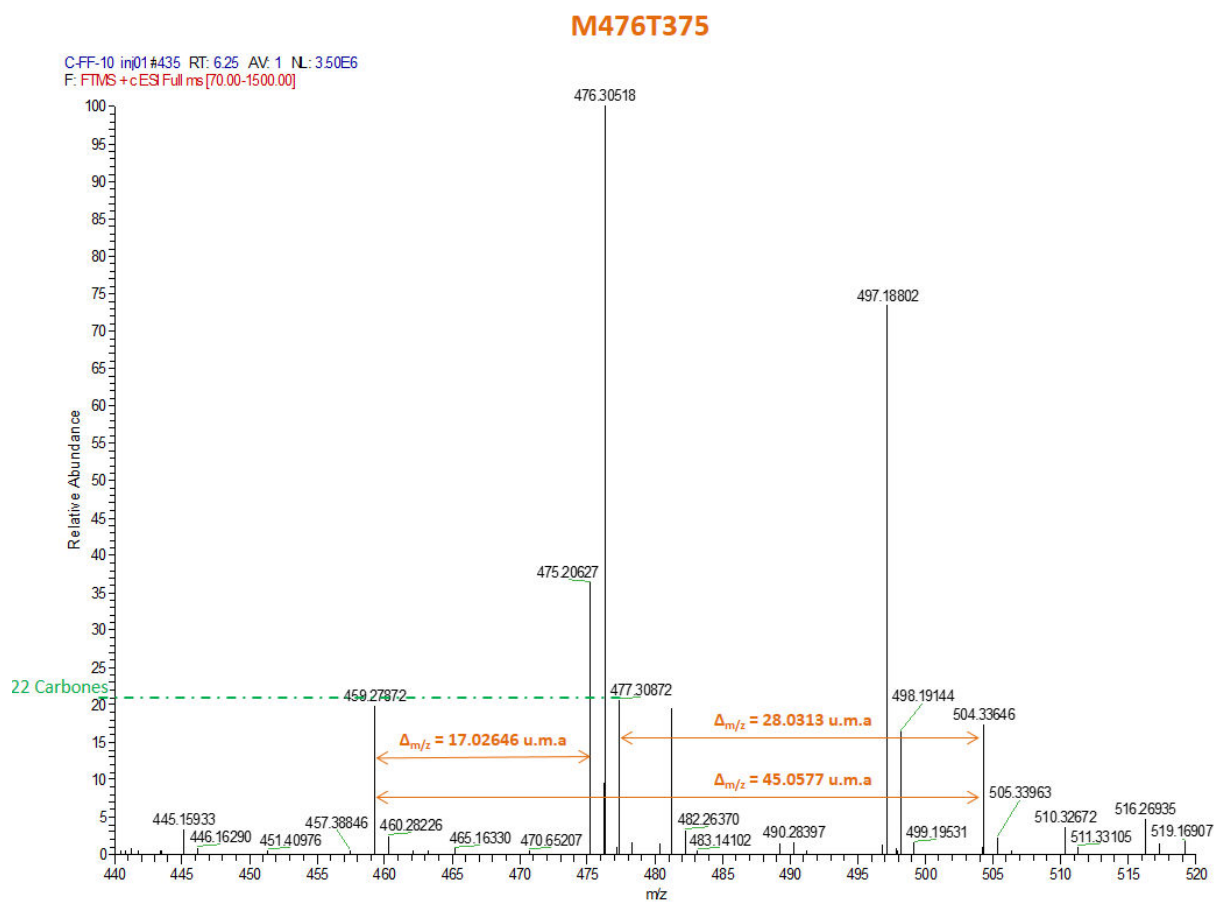


Figure 53 : Spectre de masses exactes de la variable M476T375

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

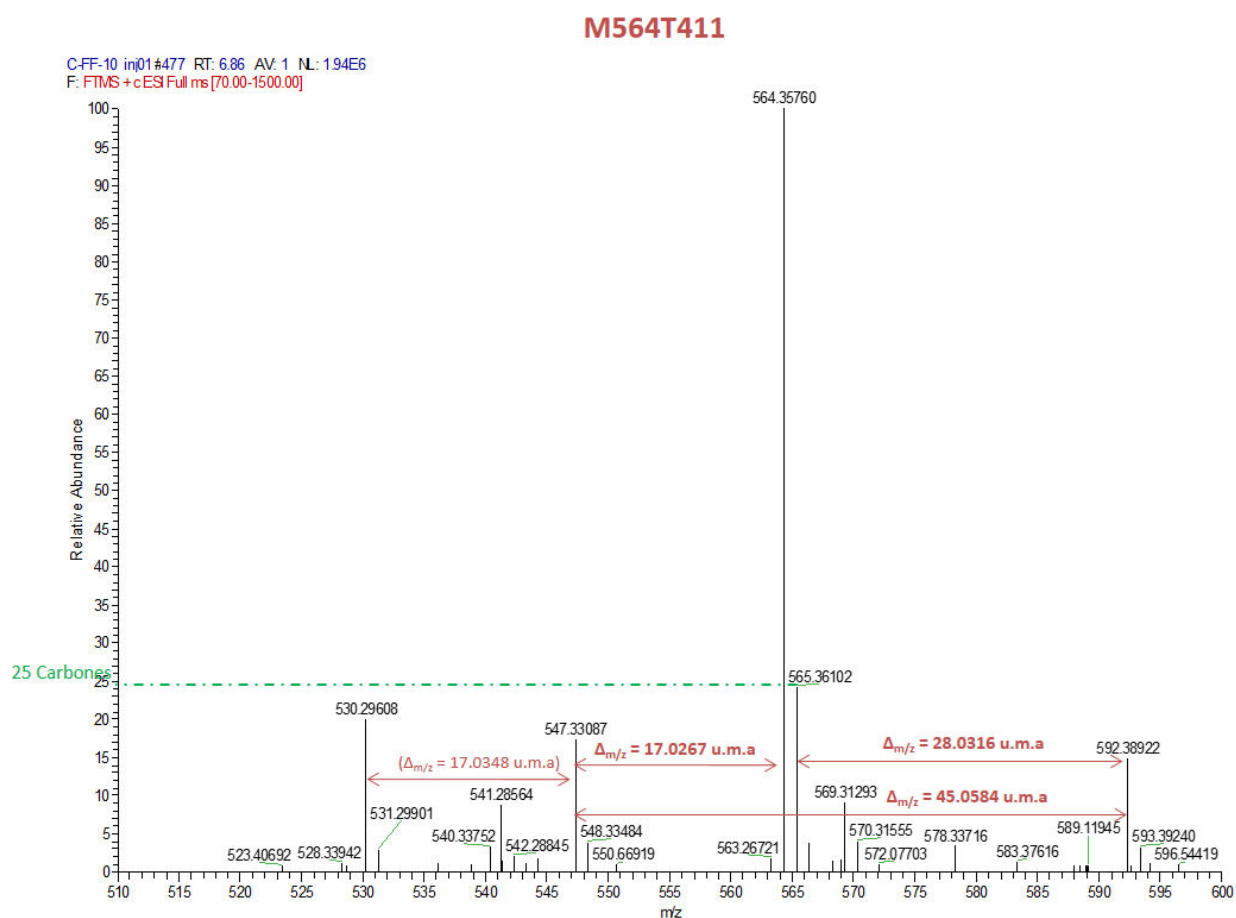
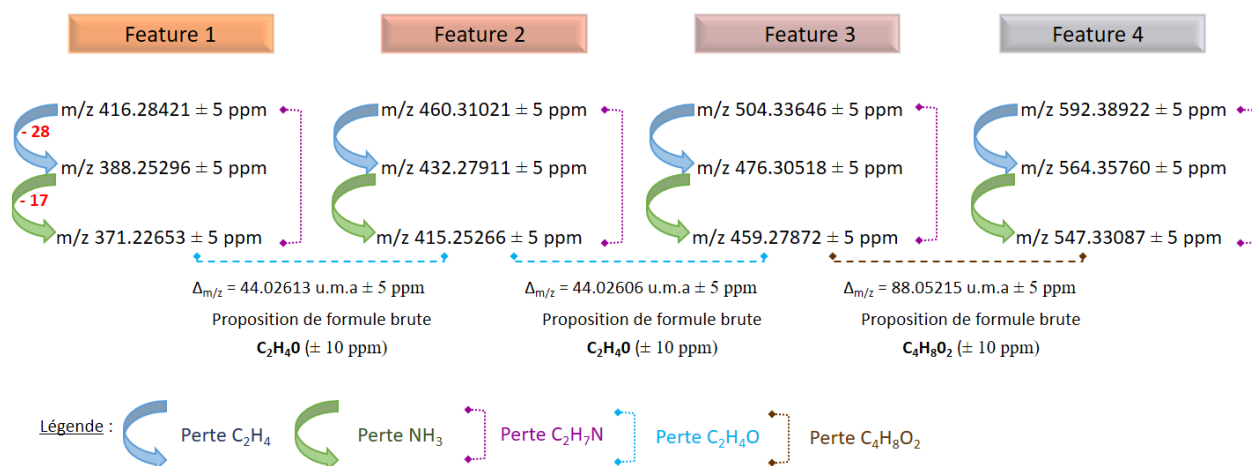


Figure 54 : Spectre de masses exactes de la variable M564T411

Notons la présence des variables M497T375 et M492T411 sur les spectres de masses qui ne figurent pas dans le tableau des VIP. La variable M497T375 a été éliminé lors du prétraitement des données (CV >30%), il n'a donc pas été intégré à l'étude de corrélation des ions. La variable M592T411, avec un VIP = 2.01, fait partie des variables d'intérêts et corrélée à celle de M564T411 lors de l'étude de corrélation.

Des écarts de masse identiques, 28,03 u.m.a \pm 5 ppm puis 17,03 u.m.a \pm 5 ppm, sont observés sur le spectre des 4 features. La détermination des formules brutes, avec un écart inférieur à 10ppm, pour les masses pré-citées considère les fragments C₂H₄ et NH₃ comme entrant dans la structure des ions étudiés. La formule brute C₂H₇N correspondrait à l'écart de masse de 45,06 u.m.a \pm 5 ppm observé, ce qui correspond à la perte successive des fragments C₂H₄ et NH₃. De plus, un écart de masse de m/z 44.03 entre les features qui correspondrait à un fragment de formule brute C₂H₄O est observé. La figure 55 récapitule les similitudes d'écart de masse observées entre et pour chaque feature.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation



Il s'avère que l'Aminopropyldodécylpropane diamine peut, de par sa structure, libérer les fragments NH_3 et C_2H_4 (Figure 56). L'hypothèse serait donc que des constituants de la matrice réagiraient avec un fragment de formule brute $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ issu de l'Aminopropyldodécylpropane diamine. Pour la détermination des formules brutes des ions d'intérêts, l'analyse des spectres de masse et l'utilisation des massifs isotopiques apportent une information quant au nombre d'éléments chimiques principaux (ex. C, H, Cl). En effet, les isotopes naturels génèrent des pics d'abondance caractéristique de la composition des fragments principaux, permettant ainsi de déterminer la formule brute de la molécule recherchée.

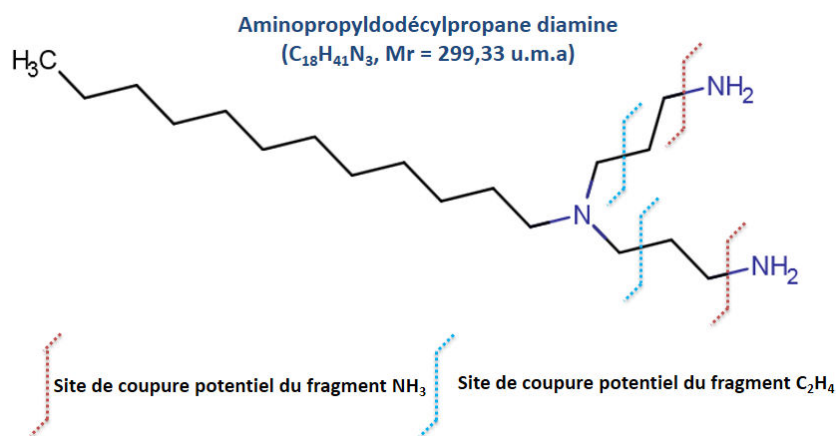


Figure 56 : Sites de coupures potentiels de l'Aminopropyldodécylpropane diamine

D'après les similitudes trouvées entre ces ions, il est possible que les features d'intérêts soient issus d'une même famille chimique comportant une ou plusieurs fonctions de formule brute $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$. A ce stade, 3 formules brutes peuvent être retenues à partir des hypothèses de masses exactes, tout en tenant compte du nombre de carbone que peut contenir chaque ion d'intérêt

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

(Figure 57). Parmi celles-ci, les formules brutes figurées ci-après en police bleue semblent plus pertinentes en raison du nombre de carbone et de doubles liaisons.

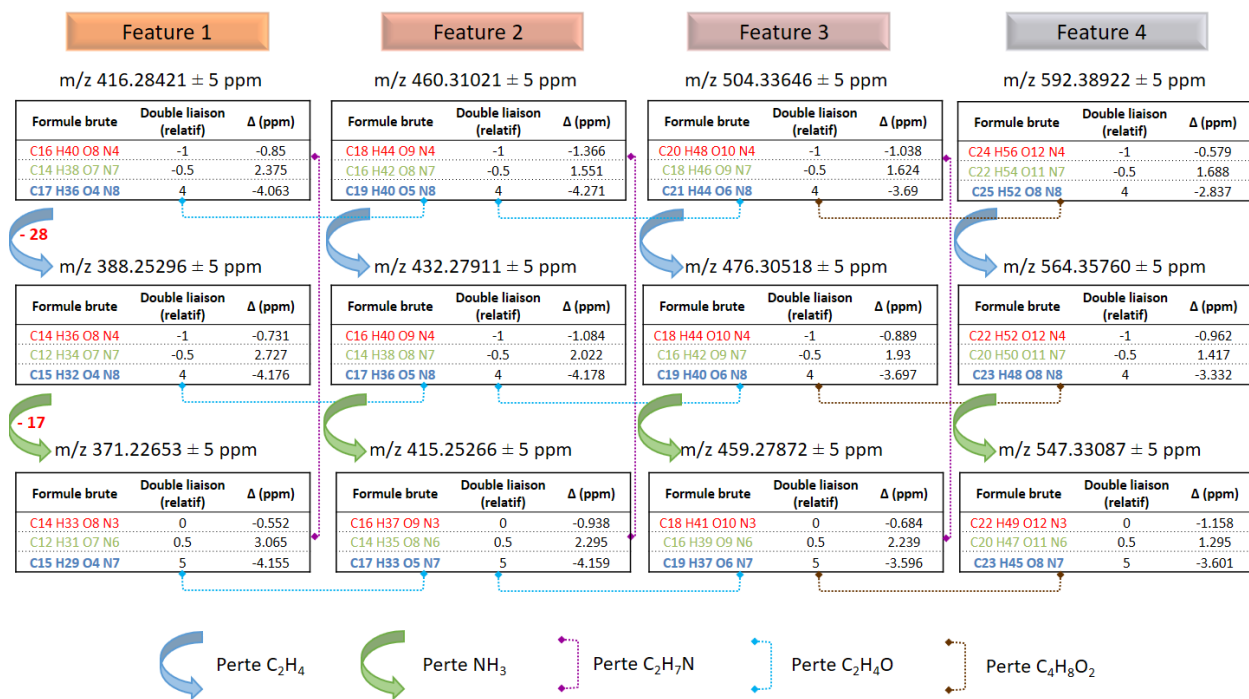


Figure 57 : Propositions de formules brutes pour les 4 features et leurs variables corrélées

Pour conforter l'hypothèse d'appartenance à une même famille chimique, une analyse comparative des spectres de masse des 4 features et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine sur l'intervalle $[m/z$ 110 ; m/z 301] a été réalisée. Aucun ion en commun entre l'Aminopropyldodécylpropane diamine et les 4 features n'a été révélé tandis que 6 ions sont communs aux 4 features (Figure 58).

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

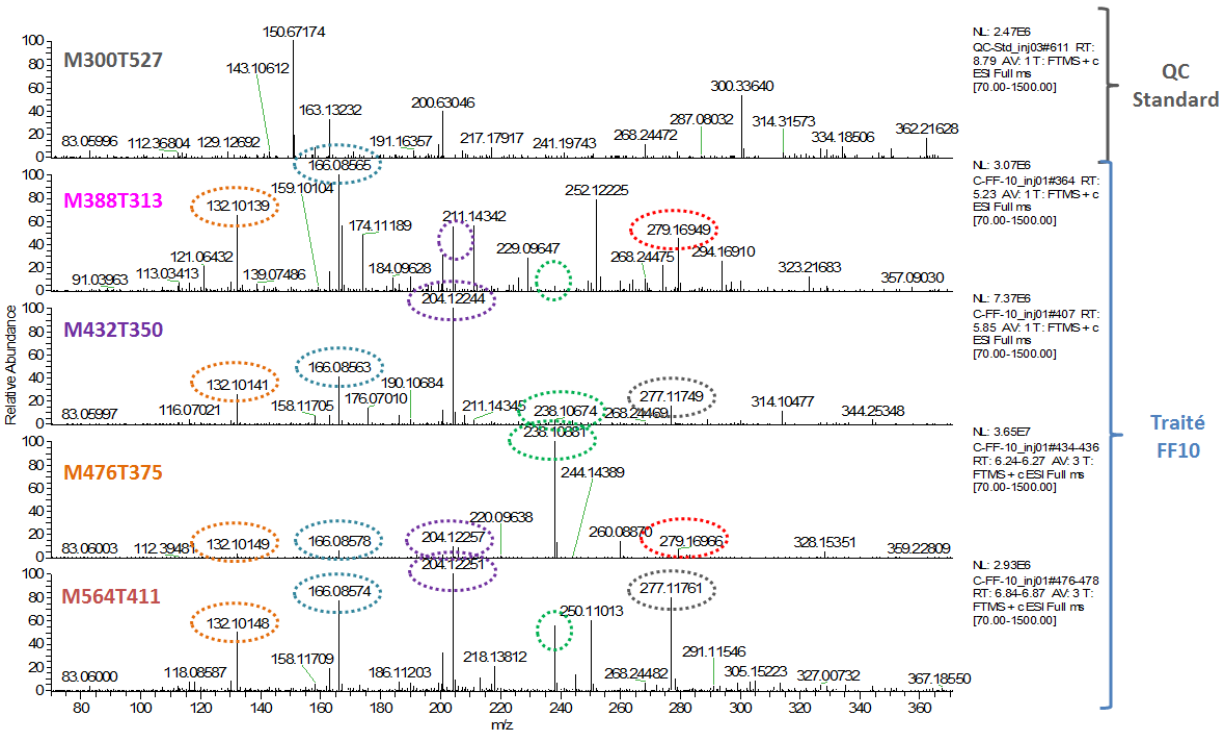


Figure 58 : Spectre de masses bruts faisant apparaître les ions similaires entre les 4 features

Pour confirmer l'affiliation de ces ions aux variables d'intérêts, ceux issus du blanc réactif et d'échantillons « non traités » ont été soustraits (Figure 59). L'ion m/z 204.12 est le seul ion commun aux 4 features. On retrouve également l'ion m/z 277.11 commun aux features M432T350 et M564T411, et l'ion m/z 279.17 commun aux features M388T313 et M476T375. En l'absence de fragmentation, ces ions peuvent être considérés comme des fragments issus d'ionisation dans la source ESI.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

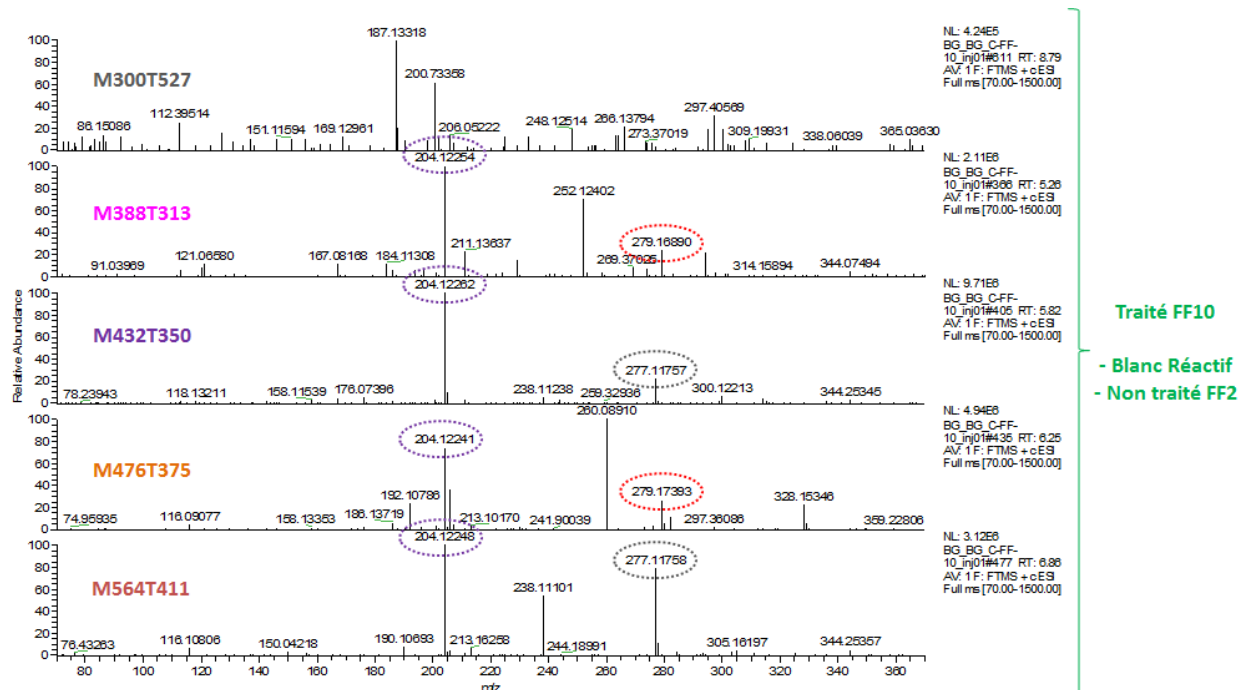


Figure 59 : Spectres de masses faisant apparaître les ions communs aux 4 features

A ce stade de l'identification, il conviendrait de procéder par étape par l'analyse (i) des formules brutes proposées pour les ions similaires (m/z 204.12, m/z 277.11 et m/z 279.17) et (ii) des formules brutes correspondant aux pertes de masse entre les ions d'intérêts et les ions communs. En faisant le lien entre les fragments, il est probable de retrouver la totalité ou une partie de la structure des ions d'intérêts. Ce travail nécessite d'être complété par des essais de fragmentation.

La consultation des bases de données publiques telles que HMDB, MassBank ou ChempSpider n'a pas permis de fournir des informations quant aux molécules que l'on cherche à identifier. Néanmoins, des hypothèses de réaction entre un fragment de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et un des constituants de la matrice fromagère peuvent être émises.

En premier lieu, la réaction de Maillard entre un sucre (aldose ou cétose) et une amine primaire (acide aminé, protéine ou xénobiotique) réalisée en plusieurs étapes est une hypothèse à explorer.

Pour ce type de réaction, le traitement thermique est un paramètre très influant dont la durée et l'intensité détermineront l'ampleur des conséquences sur les constituants matriciels au cours des procédés de transformation [154]. Il est connu que l'accélération à haute température de la réaction de Maillard qui démarre dans le lait provoque l'apparition de nouveaux composés par association entre les sucres et les protéines [42, 43, 143, 155]. A titre d'exemple, la furosine et la lactulosyllysine sont des produits de Maillard connus, formés suite à la stérilisation du lait

[144]. De ce fait, il est possible que les sucres réducteurs ou plus largement les constituants aldéhydiques ou cétoniques présents dans le lait et les fromages réagissent avec la ou les fonction(s) amine(s) primaire(s) de l'Aminopropyldodécylpropane diamine au cours de la fabrication des fromages FF qui a nécessité un traitement à 105°C. Lors de la stérilisation du lait, le traitement thermique conduit à la formation de nouveaux composés dont le lactulose, disaccharide de galactose et fructose formé par isomérisation du lactose, qui pourrait ensuite tout aussi bien réagir avec l'AMPD. La réaction de Maillard à un stade plus avancé, au-delà de 100°C, produit des radicaux libres très réactifs que l'on ne pourrait détecter avec les méthodes à notre disposition [156].

La seconde hypothèse de travail concerne la formation de liaisons peptidiques entre les amines primaires de l'AMPD et le groupe carbonyle des acides gras ou des protéines présents dans le lait et les fromages. Le traitement thermique joue un rôle sur les protéines qui ont tendance à se dénaturer sous l'effet de la chaleur, ce qui expose les acides aminés de type Lysine à des réactions avec les sucres. Il ne peut être exclu que ces acides aminés puissent réagir avec l'AMPD, en partie ou en totalité, par leur fonction carbonyle libre. Il en est donc de même pour les acides gras possédant une fonction carboxyle qui est à même de réagir avec les amines de l'AMPD.

A ce niveau d'identification, les formules brutes obtenues pour chaque ion contiennent entre 7 et 8 atomes d'azote, et entre 4 et 8 atomes d'oxygène. Une hypothèse réactionnelle à émettre serait une réaction entre un fragment de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et des polypeptides.

4.2.2 Le Fromage à pâte pressée cuite (PPC)

⇒ Analyse en Composante Principale (ACP)

De façon similaire aux fromages fondus, les données relatives aux fromages PPC ont été analysées par ACP puis par PLS-DA et dont les variables d'intérêts ont été comparées à celles trouvées en analyses univariées.

La carte factorielle ou « score plot » issue de l'ACP est représentée en figure 60. Les QC pool sont ici aussi regroupés au centre de la carte ce qui montre le bon déroulement de la séquence analytique. L'information visuelle principale qui ressort de cette analyse sans a priori est une discrimination nette selon la durée d'affinage des PPC, à savoir à J_0 et J_{50} , et entre les groupes « traités » et « non traités ». La CP1 représente 47% de la variabilité du jeu de données qui est attribuée à la durée de l'affinage quel que soit le type d'échantillon. Cette importante variabilité s'explique par des réactions biologiques et chimiques qui se produisent lors du processus d'affinage et qui sont l'intérêt intrinsèque de l'affinage. La CP2 représente à hauteur de 11% la

variabilité relative à l'appartenance à un groupe (traités ou non traités). Pour ce modèle, l'inertie totale basée sur 2 composantes est représentée par la valeur de $R^2X = 0.578$, dont la majeure partie est liée à l'affinage.

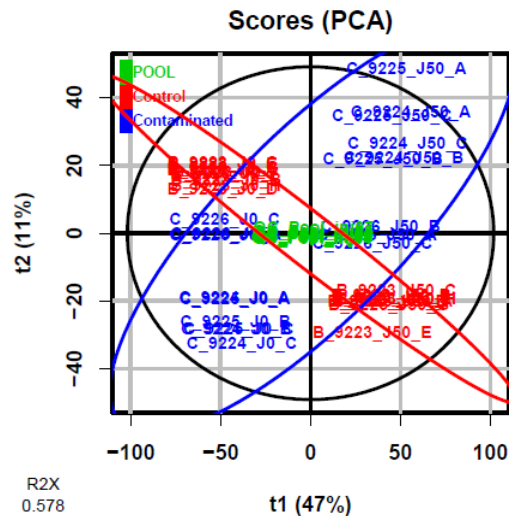


Figure 60 : Représentation « score plot » de l'ACP sur les échantillons de fromages PPC

⇒ Analyse en PLS-DA

A la suite de l'ACP, les données ont été analysées en PLS-DA dans le but de confirmer les résultats de discrimination entre les deux groupes « traités » et « non traités ». Les résultats de PLS-DA pour les échantillons de PPC sont représentés graphiquement en figure 61. Une cross-validation ($n=7$) a été réalisée pour définir le nombre optimal de CP, au nombre de 5, permettant de construire le modèle. La carte factorielle PLS-DA est construite autour de la CP1 qui représente 10% de la variabilité du jeu de données et de la CP2 qui en comptabilise 42%. Les échantillons semblent être discriminés de manière satisfaisante selon leur appartenance aux groupes « traités » et « non traités » selon la CP1. La CP2 semble discriminer les échantillons selon la durée de l'affinage (J_0 ou J_{50}), qui constitue 46% de la variabilité du jeu de données. Ce modèle permet de représenter une importante proportion de la variabilité du jeu de données ($R^2X = 0,722$). Les valeurs de $R^2Y = 0,996$ et de $Q^2Y = 0,9$ sont très satisfaisantes pour expliquer et prédire l'appartenance d'un échantillon aux groupes « traités » ou « non traités ».

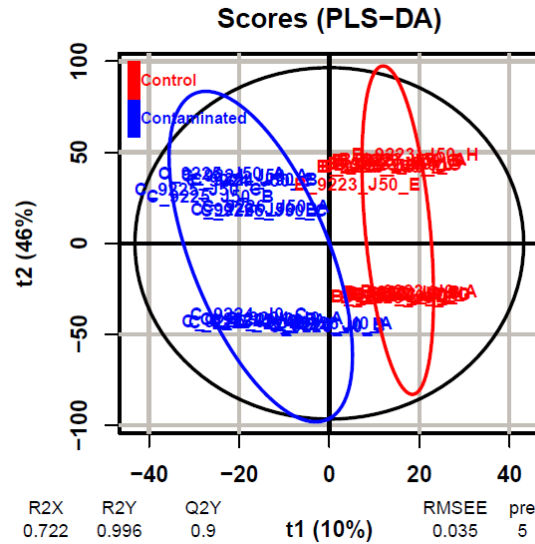


Figure 61 : PLS-DA sur les échantillons de fromages à pâte pressée cuite
(les PPC « traités » et « non traités », tout affinage confondu, sont respectivement de couleur bleue et rouge)

Des tests de permutations ($k=1000$) ont également été réalisés (Figure 62). Les faibles p -values obtenues, $pR2Y = 0.001$ et $pQ2Y = 0.001$, permettent de conclure favorablement quant à la performance du modèle et ainsi de le valider.

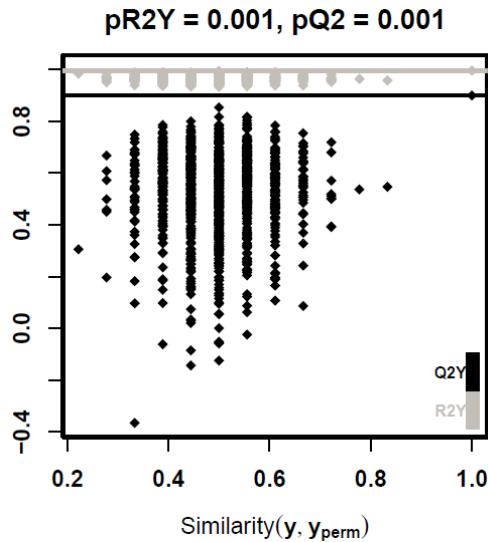


Figure 62 : Représentation de la validation du modèle PLS-DA pour les échantillons PPC par des tests de permutations ($k=1000$)

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

⇒ **Analyse des variables d'intérêts**

Les variables d'intérêts, au nombre de 39, dont la valeur de VIP est supérieure à 2.4 ont été retenues. La significativité de ces variables (37/39) a été confirmée par les tests de Student et de Wilcoxon-Mann-Whitney avec un risque $\alpha = 5\%$ (Tableau 20).

Tableau 20 : Liste des variables d'intérêts, pour les PPC, sélectionnées par PLS-DA et analyse univariée (t-test et Wilcoxon) répondant aux critères de VIP (>2,4) et p-value (< 0.05)

(Les variables marquées en gras et surlignées en rouge sont identifiées uniquement pour un seul des tests statistiques. Les variables obtenues en PLS-DA sont classées par VIP décroissant tandis que celles obtenues en analyses univariées sont présentées par couple [m/z ; Tr] croissant).

Univariés		
PLSDA	wilcoxon 44 variables (1%) trouvées significatives p-value = 0.05	t-test avec correction bonferroni 36 variables (1%) trouvées significatives p-value = 0.05
M176T115	M162T184	M162T184
M427T877	M171T430	M176T115
M300T331	M175T340	M206T430
M405T875	M176T115	M210T163
M210T163	M189T430	M222T111
M278T102	M192T340	M244T207
M449T879	M206T430	M278T102
M371T486	M210T163	M279T126
M660T871	M222T111	M291T282
M206T430	M242T184	M298T105
M298T105	M244T207	M300T331
M222T111	M259T184	M320T104
M370T486	M278T102	M353T486
M291T282	M291T282	M370T486
M527T548	M298T105	M371T486
M320T104	M299T478	M379T479
M411T511	M300T331	M380T480
M397T479	M320T104	M396T479
M379T479	M353T486	M397T479
M498T536	M370T486	M403T184
M822T511	M371T486	M405T875
M279T126	M377T320	M409T522
M528T548	M378T320	M411T511
M353T486	M379T479	M413T479
M527T547	M380T480	M427T877
M409T522	M396T479	M449T879
M487T493	M397T479	M487T493
M823T511	M403T184	M498T536
M244T207	M405T875	M513.3T541
M403T184	M409T522	M513.6T541
M396T479	M411T511	M527T547
M509T542	M413T479	M527T548
M319T426	M427T877	M528T548
M189T430	M449T879	M660T871
M413T479	M483T184	M822T511
M380T480	M487T493	M823T511
M175T340	M498T536	
M513.6T541	M500T184	
M261T207	M509T542	
	M513.3T541	
	M527T547	
	M527T548	
	M528T548	
	M660T871	

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

Après examen individuel des chromatogrammes de chacune des 39 variables jugées discriminantes en PLS-DA et confirmées en analyses univariées, il a été difficile de faire ressortir des variables intéressantes. A titre d'exemple, la boxplot de la variable M176T115 (en rose dans le tableau) montre une diminution de son intensité dans les échantillons traités à l'AMPD, ce qui tend à penser à une réaction avec l'AMPD conduisant à la diminution de la présence du constituant de m/z 176 (Figure 63). Néanmoins, l'EIC correspondant ne permet pas de conforter la significativité de cette variable. De façon similaire, l'EIC de la variable M427T877 (en violet dans le tableau) ne montre pas de distinction nette entre les groupes (Figure 63). De plus, ces deux variables étant présentes dans les échantillons « non traités » ne peuvent être considérées discriminantes à la présence du biocide.

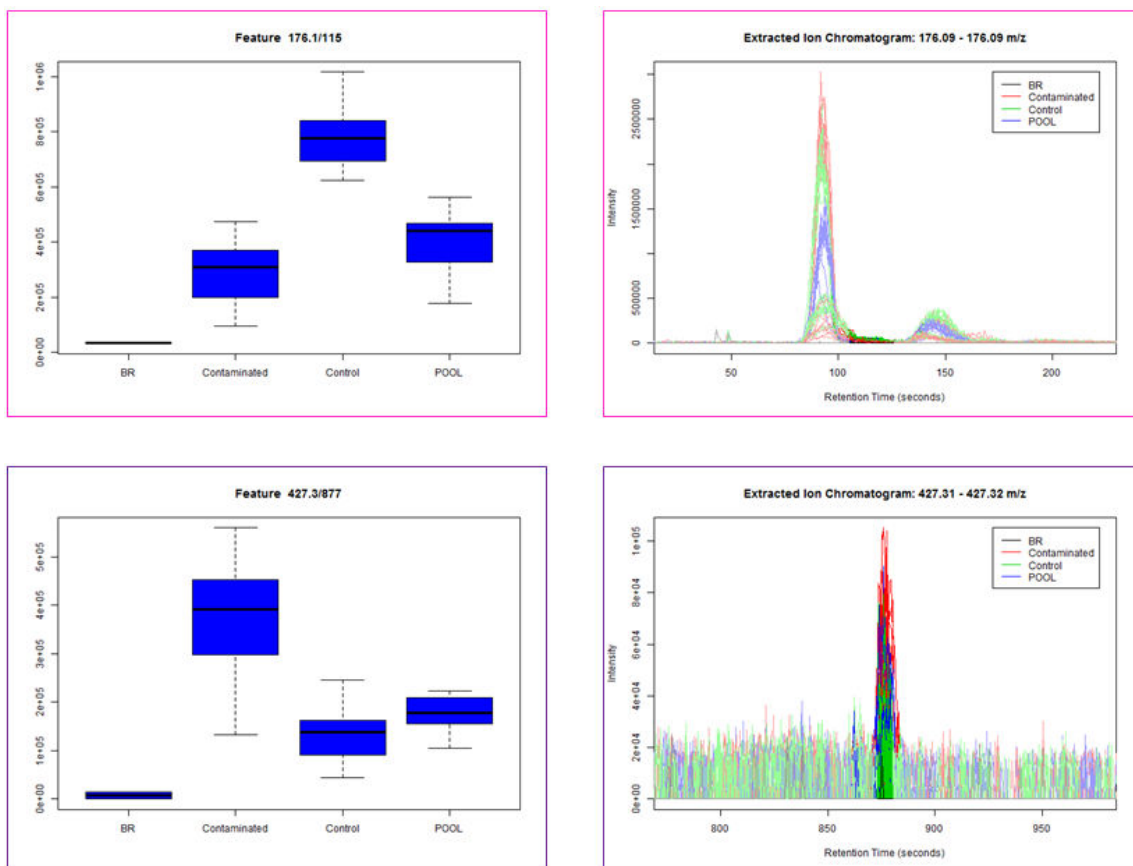


Figure 63 : EIC et bloxplot des variables M176T115 et M427T877 discriminantes en PLS-DA pour les fromages PPC

De plus, une variabilité de réponse significative entre les échantillons traités, J_0 et J_{50} , issus de cuves de fabrication différentes est observée (Figure 64). Cet « effet-cuve » lié à des contraintes pratiques de la halle technologique, non anticipé lors de la validation du design expérimental, est à l'origine de cette difficulté d'interprétation des résultats. En effet, 3 lots indépendants

d'échantillons PPC « traités » et seulement 1 lot d'échantillons « non traités » ont été fabriqués pour l'étude.

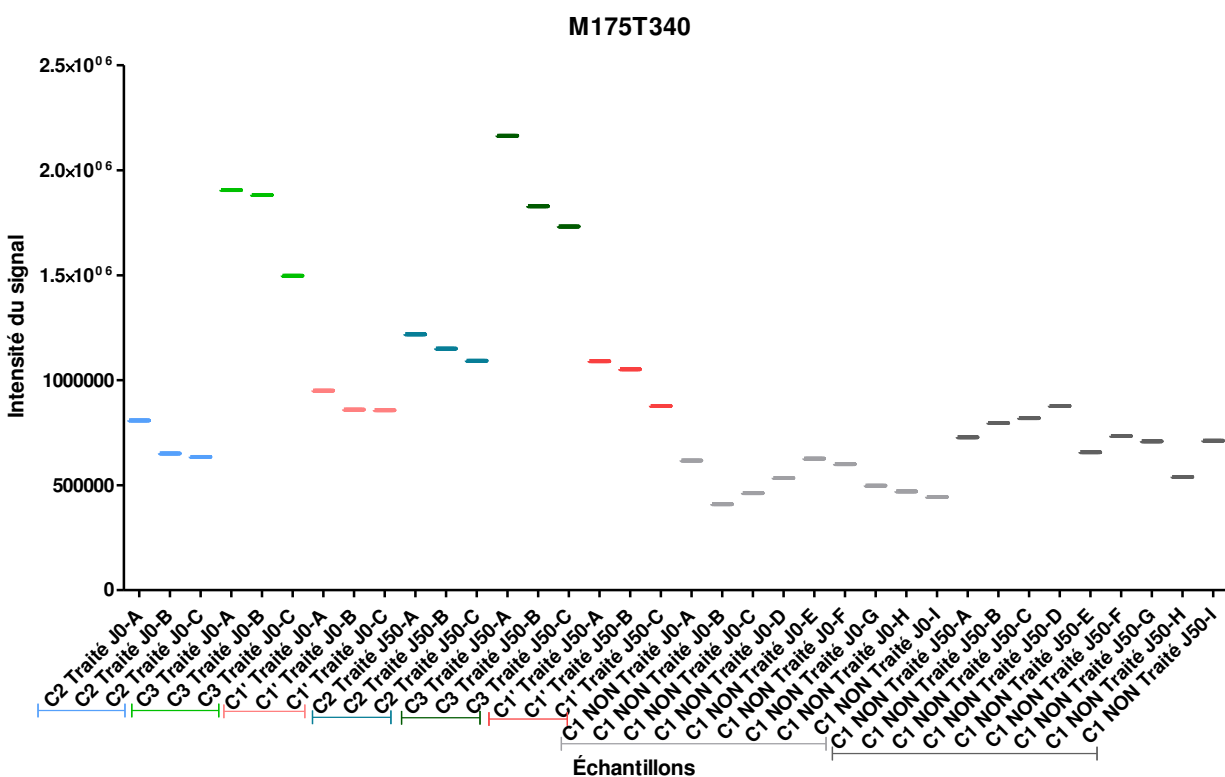


Figure 64 : Suivre de l'intensité de la variable M175T340 dans les fromages PPC (J0 et J50) mettant en évidence un « effet-cuve »

⇒ Comparaison des variables PPC et FF

Une analyse comparative réalisée à partir des variables discriminantes obtenues en PLS-DA et en analyses univariées pour les échantillons PPC et FF n'a pu faire ressortir de variable commune. L'ajout de l'Aminopropyldodécylpropane diamine à des étapes différentes de la fabrication des fromages peut expliquer cette absence de variable commune. En effet, les constituants initiaux de la matrice pouvant réagir avec et en présence de l'AMPD sont différents au cours des étapes de transformation.

4.3 Conclusions préliminaires

A ce stade, la comparaison des empreintes chimiques des échantillons de fromages , PPC et FF confondus, « traités » à l'AMPD et « non traités » n'a pas permis de discriminer avec certitude des ions en lien direct avec la présence de résidus d'AMPD dans la matrice. Plusieurs facteurs constituant les limites de notre étude peuvent être incriminés au regard :

- **Des solvants des solutions de « dopage » des laits et fromages :** Lors de la fabrication des échantillons, les laits et fromages dits « traités » ont été exposés à la substance active (DDAC-C₁₀ ou AMPD) dissoute dans un solvant adéquat, tandis que les laits et fromages « non traités » n'ont pas été exposés à un volume équivalent de solvant pur. Il apparaît comme possible que les différences relevées soient uniquement dues à un effet solvant.
- **Des concentrations d'exposition en résidus :** La teneur en SA de 50 µg/kg retenue pour se placer dans le cas d'une contamination résiduelle peut sembler faible pour la recherche de produits néoformés. Bien que les outils d'analyses utilisés soient performants, il est possible que les produits néoformés soient présents à des teneurs telles qu'ils n'ont pu être détectés. Pour une étude pilote future, il serait intéressant de viser une teneur plus importante afin de représenter un cas extrême de contamination dit « pire cas ».
- **De la puissance du design expérimental :** Bien qu'il s'agisse d'une étude pilote à mini échelle industrielle, le design expérimental semble manquer de puissance pour discriminer des ions uniquement issus du traitement au biocide. Les points critiques relèvent (i) de l'usage des mêmes cuves pour toutes les séries de fabrication qui sont vecteurs de contamination croisée, (ii) de l'usage d'un nombre différent de cuves pour la fabrication des échantillons de PPC et donc d'avoir à disposition 3 lots « traités » et 1 lot « non traité » et (iii) des moyens disponibles à la Halle technologique d'Actalia ne permettant pas de fabriquer un nombre de lots suffisants pour assoir une robustesse des modèles construits.
- **De la méthode d'analyse :** Le choix s'est porté sur une extraction par précipitation à l'acétonitrile, une séparation par chromatographie liquide en phase inverse et une détection en spectrométrie de masse à haute résolution par ionisation electrospray en mode positif. Quatre raisons principales peuvent expliquer la limite de la méthode analytique, (i) les produits potentiellement néoformés n'ont pu être extraits à l'acétonitrile, (ii) les conditions chromatographiques (colonne, phase mobile) sont peu appropriés, (iii) le mode positif en ESI n'est pas le plus appropriée pour les détecter, ou (iv) la technique de séparation et/ou de détection n'est pas adaptée.

4.4 **Essai complémentaire sur le lait**

En complément de l'étude, un essai a été réalisé au laboratoire sur du lait UHT issu du commerce en tenant compte des facteurs limitants énoncés en conclusions préliminaires. Le but étant d'étudier l'impact du traitement thermique appliqué lors des procédures de transformation du lait sur l'apparition des résidus de biocides. Une comparaison des empreintes chimiques des échantillons de lait « traités » et « non traités » à l'AMPD permettra de mettre en évidence les éventuelles produits néoformés. Pour réaliser cet « essai laboratoire », nous disposons de 10 lots indépendants (n=1/lot) de lait entier stérilisé UHT pris aléatoirement dans

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

le commerce, préalablement analysés par la méthode ciblée validée afin de confirmer qu'ils soient exempts d'AMPD pour l'usage. Pour chaque lot de lait entier blanc, 30g ont été traités par ajout volontaire d'AMPD à une teneur de 150 µg/kg (90 µL de Sollnt1) : « Lait traité », et 30g ont reçu seulement le solvant de dilution (90 µL d'ACN) : « Lait non traité ». De façon similaire à l'étude pilote réalisée en collaboration avec Actalia, l'analyse des échantillons selon des approches ciblées et non ciblées a été réalisée. La démarche expérimentale mise en œuvre est représentée sur la figure 65.

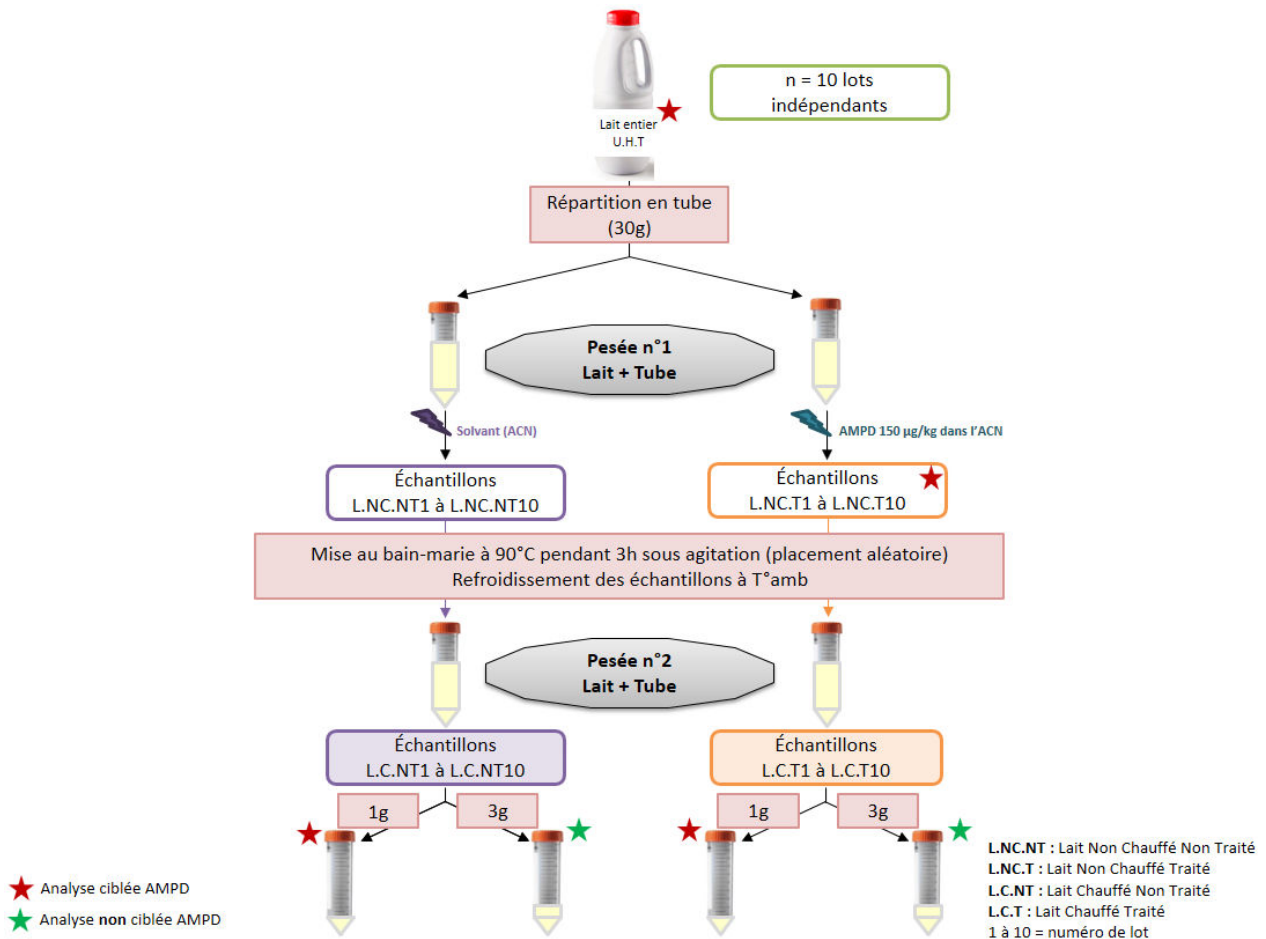


Figure 65 : Démarche expérimentale mise en œuvre pour la recherche de produits néoformés dans le lait UHT

Avant l'étape de traitement thermique, un prélèvement en triplicat (3x 1g) des échantillons traités (L.NC.T) a été réalisé en vue d'une analyse ciblée. Par soucis d'équilibre volumique, pour chaque échantillon non traité une masse totale identique, soit 3g, a été prélevée.

A l'issue du traitement, des prises d'essai (1g et 3g) ont été effectuées et les différents échantillons ont été soumis à l'étape d'extraction suivant les protocoles décrits précédemment selon le type d'analyse réalisé, ciblée ou non ciblée. Les pesées avant et après traitement thermique ont permis de vérifier qu'aucune perte de masse au cours de l'expérience,

notamment d'eau contenue dans le lait, n'est à prendre en compte lors de l'interprétation des teneurs en AMPD dans les divers échantillons analysés.

4.4.1 Résultats d'analyse ciblée pour le lait et discussions

Les résultats du dosage des 10 lots de Lait Non Traités Chauffé (L.C.NT) a permis de confirmer l'absence de contamination externe en Aminopropyldodécylpropane diamine au cours de l'expérience. Ces échantillons pourront donc servir d'échantillons témoins pour l'analyse non ciblée.

Les résultats du dosage en AMPD des 20 échantillons traités (L.NC.T et L.C.T) prélevés au cours de l'expérience sont illustrés sur la figure 66.

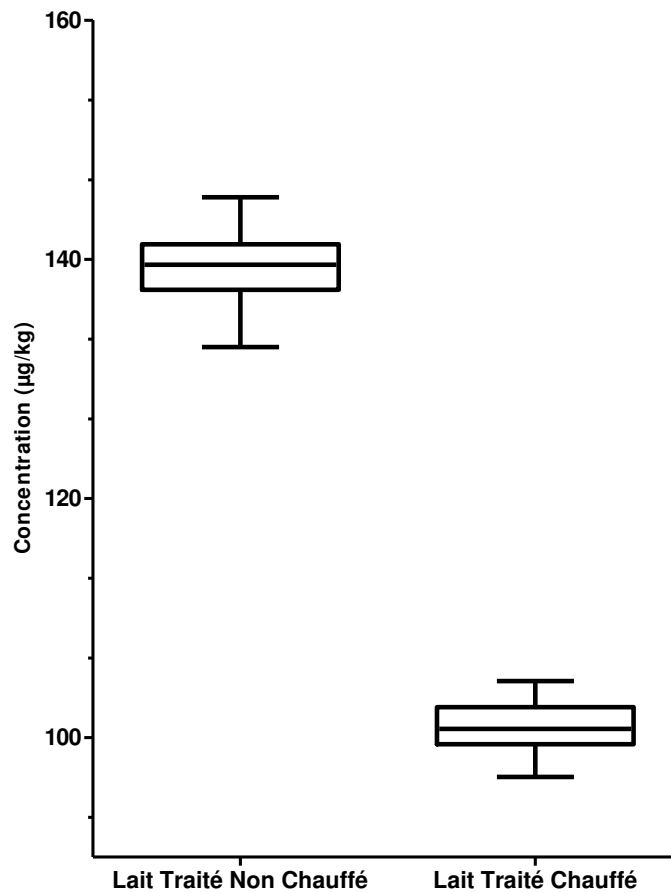


Figure 66 : Distribution quantitative des échantillons traités à l'Aminopropyldodécylpropane diamine selon le niveau de prélèvement (avant ou après traitement thermique)

La représentation des résultats sous la forme de boîte à moustache montre un abattement net des concentrations dans les échantillons de lait chauffé traité (L.C.T). Le traitement thermique (90°C pendant 3h) appliqué aux échantillons a donc un impact direct sur la teneur en

Aminopropylpropyldodécylpropane diamine ajoutée volontairement dans le lait. Plusieurs hypothèses peuvent être émises, dont une instabilité de l'Aminopropyldodécylpropane diamine à la température, ou une réactivité avec des constituants naturellement présents dans le lait. Dans les deux cas, la formation des substances chimiques indésirables peut être émise et leur recherche non ciblée peut être tentée en mettant en œuvre des comparaisons d'empreintes chimiques globales.

4.4.2 Résultats d'analyse non ciblée pour le lait et discussions

Les données extraites de l'analyse non ciblée ont été analysées en ACP puis en PLS-DA. La figure 67 représentant le score plot issu de l'ACP ne montre aucune discrimination entre les groupes. Les échantillons QCpool sont tous regroupés au centre, ce qui indique la validité de la série d'analyse. La valeur de R2X égale à 0.519 indique qu'un peu plus de la moitié de la variabilité du jeu de données, répartie sur 6 composantes principales, est représentée par le modèle.

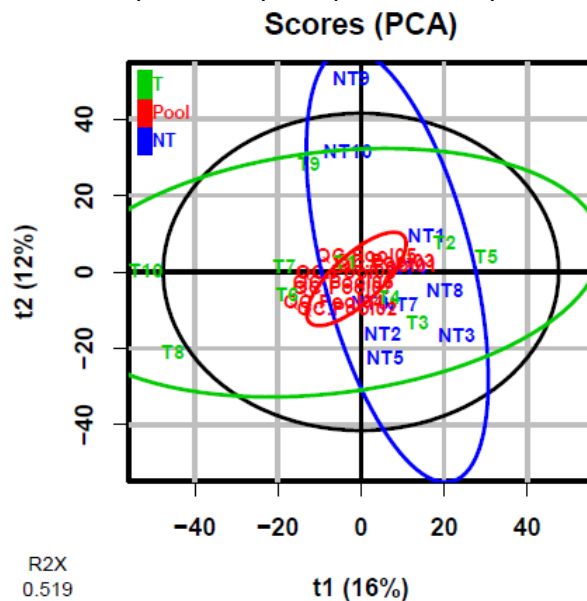


Figure 67 : Score plot de l'ACP sur les échantillons de lait soumis à un traitement thermique

Pour compléter ce résultat, une PLS-DA a été réalisée et est présentée en figure 68. Ce modèle PLS-DA permet de discriminer les groupes d'échantillons de lait, « traités » et « non traités », ayant été soumis au même traitement thermique. Une très faible proportion de la variabilité du jeu de données est représentée par le modèle ($R^2X = 0.185$). Au regard de la valeur de R^2Y à 0.96, la capacité explicative d'appartenance à un groupe paraît satisfaisante.

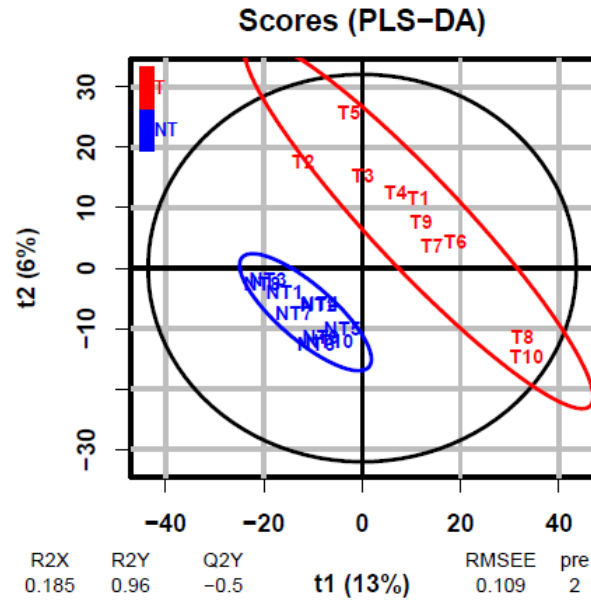


Figure 68 : PLS-DA sur les échantillons de laits soumis à un traitement thermique (90°C pendant 3h) (les laits « traités » et « non traités », sont respectivement de couleur rouge et bleue)

Des tests de permutation ($k=1000$) ont été réalisés (Figure 69). Les p -values très élevées obtenues, $pR2Y = 0.258$ et $pQ2Y = 0.91$, sont non satisfaisantes, ce qui est en accord avec la valeur $Q2Y = -0.5$ associée au pouvoir prédictif du modèle d'appartenance d'un échantillon à un groupe. Le modèle actuel n'est donc pas performant et robuste pour prédire l'appartenance à un groupe et ne peut donc être validé.

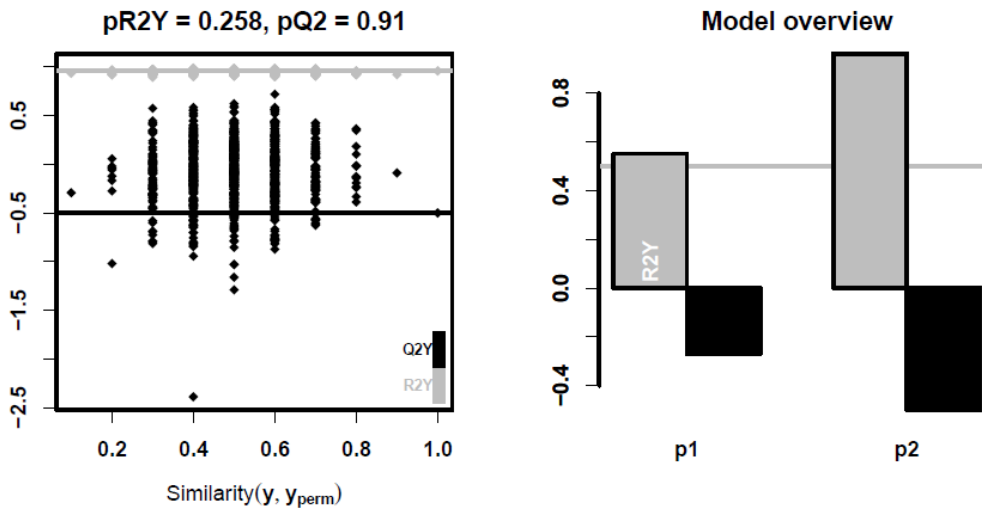


Figure 69 : Représentation des résultats des tests de permutations ($k=1000$) effectués et significativité des paramètres R2Y et Q2Y

Toutefois, les variables d'intérêt présentant une valeur de VIP supérieure à 2,2 ont été extraites (Tableau 21). Parmi celles-ci, deux variables corrélées, [M343T618] et [M172T618], ont été

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

jugées analytiquement pertinentes et semblent être discriminantes du traitement à l'Aminopropyldodécylpropane diamine. En effet, ce sont les seules variables présentes dans la quasi-totalité des échantillons « traités » (9/10) et absentes dans les échantillons « non traités ». Au regard de la variable [343T618] dont le rapport m/z est supérieur à celui de l'ion moléculaire de l'Aminopropyldodécylpropane diamine (m/z = 300.34), ceci permet de formuler l'hypothèse d'une réaction entre le biocide et un constituant présent dans la matrice. Néanmoins, celle-ci doit être au moins vérifiée par l'analyse du spectre de masses exactes.

Tableau 21 : Liste des variables d'intérêts sélectionnées par PLS-DA répondant au critère de VIP (>2,2)

Variables	Nom Couple [m/z ; Tr]	Blanc Réactif	Non Traités	QCPool	Traités	isotopes	VIP
M706T73	M705.6936T1.212	1	0	0	0		NA
M343T618	M343.3422T10.301	0	0	2	9		2.88
M101T61	M101.0593T1.02	0	4	3	4		2.80
M325T935	M325.2194T15.587	2	5	5	7	[210][M+1] ⁺	2.62
M172T618	M172.1747T10.302	0	0	4	9		2.47
M123T55	M123.0549T0.913	1	0	1	0		2.43
M357T655	M357.2261T10.92	0	0	3	4		2.38
M402T655	M402.2838T10.916	0	10	8	10	[310][M] ⁺	2.32
M192T59	M192.1669T0.981	0	3	0	5	[41][M+1] ⁺	2.31
M385T352_2	M385.2726T5.867_2	2	10	8	10	[281][M+1] ²⁺	2.30
M406T772	M406.2427T12.87	1	2	1	1	[315][M+2] ⁺	2.27
M457T773	M457.3551T12.89	2	10	8	9		2.24

Les EIC représentés en figure 70 sont une preuve visuelle de la pertinence de ces deux variables.

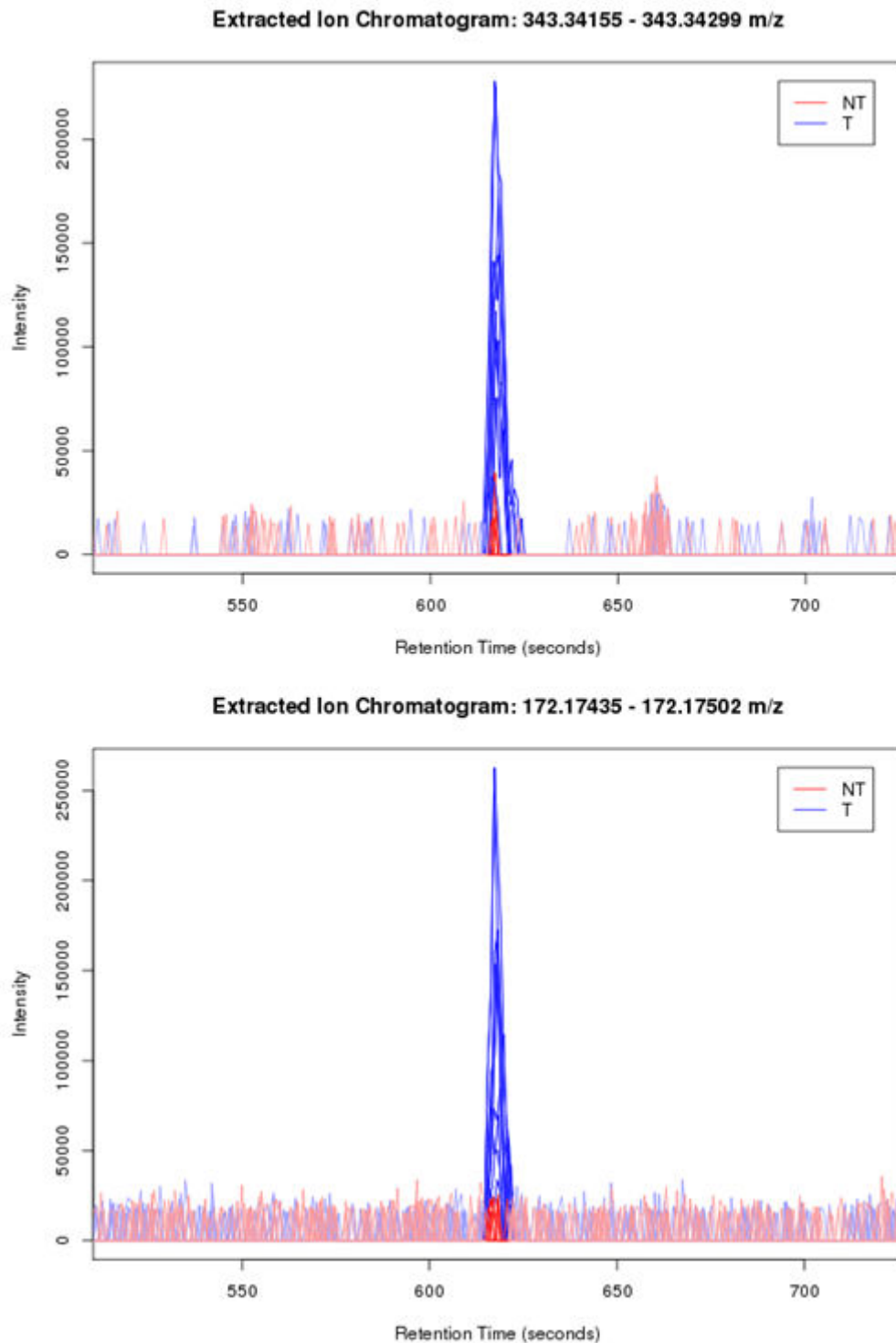


Figure 70 : EIC des variables [M343T618] et [M172T618]

Le suivi de l'intensité de ces deux variables [M343T618] et [M172T618] dans les différents échantillons (Figure 71) permet de confirmer leur significativité dans la discrimination des

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

groupes. Néanmoins, une variabilité importante des intensités entre les échantillons « traités » est constatée pour ces deux variables. Quatre facteurs peuvent expliquer cette variabilité :

- Le constituant entrant en réaction avec une partie ou la totalité de l'Aminopropyldodécylpropane diamine est présent de façon hétérogène dans la matrice, de par la composition intrinsèque des laits ou suite à une réaction antérieure,
- La réaction conduisant aux produits néoformés n'est pas totale,
- La méthode d'extraction ne permet pas d'extraire de façon optimale et répétable le produit néoformé
- Les conditions de détection ne sont peut-être pas optimales pour ce composé.

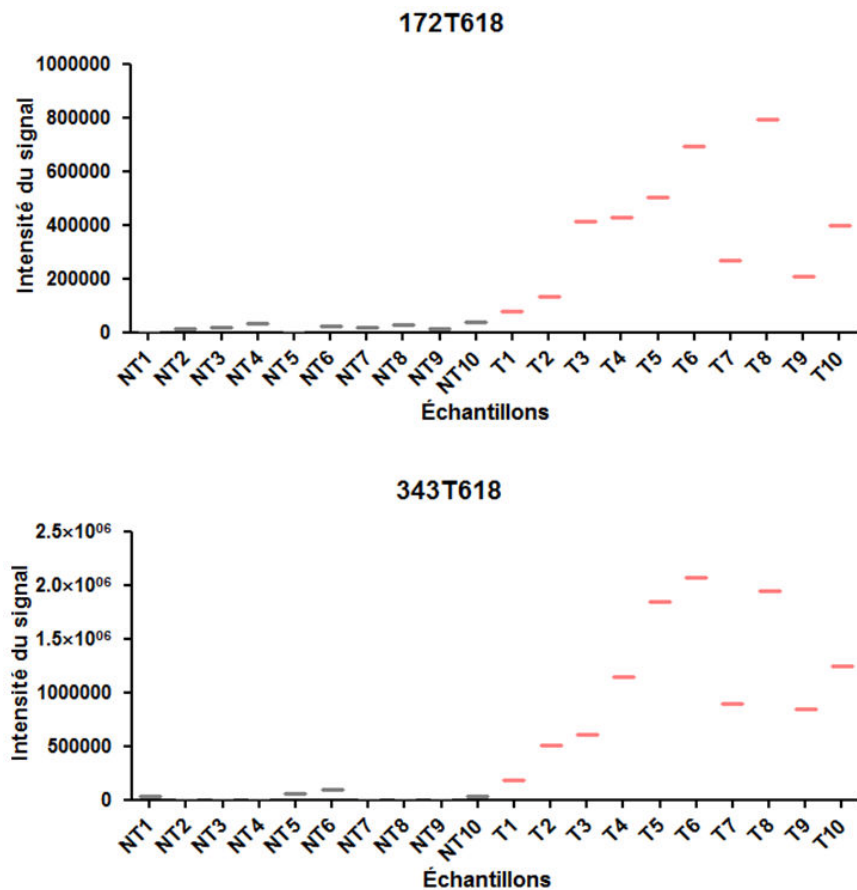


Figure 71 : Représentation de l'intensité des ions m/z 172 et m/z 343 dans les échantillons de laits

Afin d'émettre une hypothèse de structure de ces deux variables, leur spectre de masse a été étudié. Au temps de rétention des variables $T_r = 618$ secondes, soit 10.3 minutes, les ions m/z

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

172.17 et m/z 343.34 apparaissent en très faible intensité (Figure 72). La comparaison avec le spectre de masse de l'Aminopropyldodécylpropane diamine ne montre aucun ion en commun.

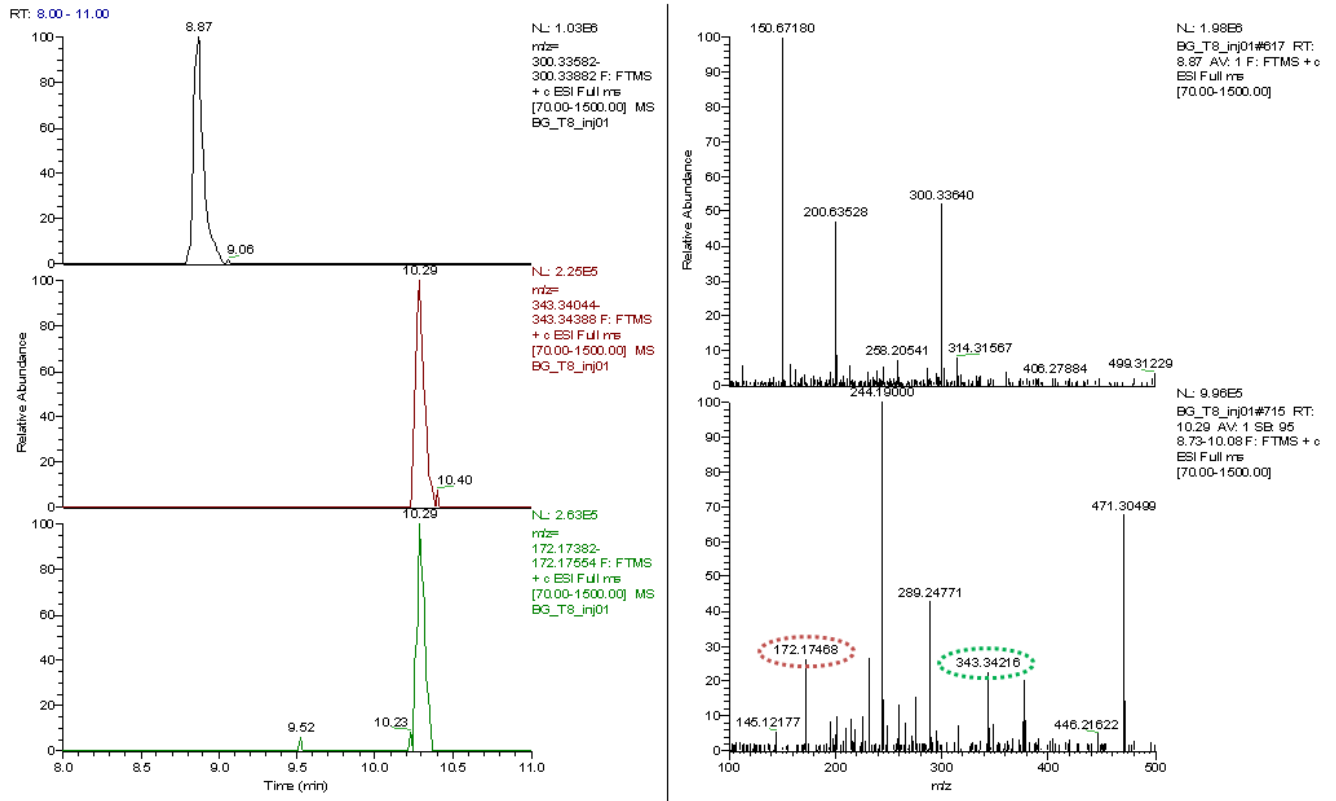


Figure 72 : Chromatographe et spectre de masses exactes des variables M172T618 et M343T618

La faible intensité pourrait donc expliquer la variabilité du signal observé sur la figure 71. On constate sur le spectre de masse, trois autres ions : m/z 244.19, m/z 289.25 et m/z 471.30, qui ne figurent pas dans la liste des variables d'intérêts de la table de données issue de la PLS-DA, et pour cause puisque ces 3 ions se sont révélés présents dans chaque groupe d'échantillon (Figure 73). Ce sont donc des ions issus de la matrice laitière.

Partie 3 : Etude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et impact des procédés de transformation

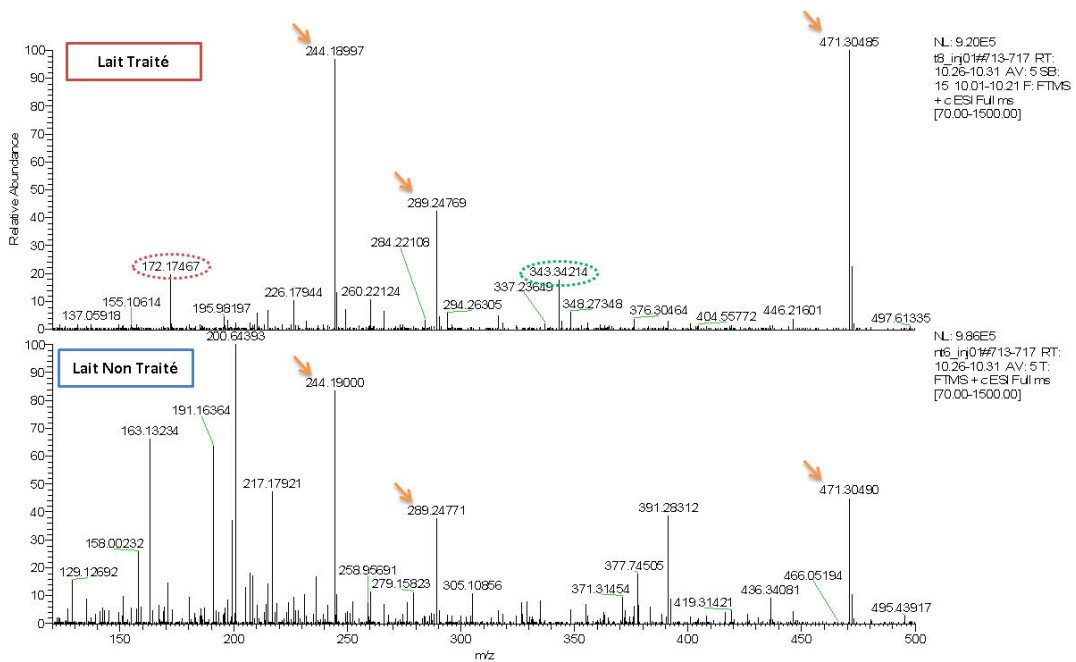


Figure 73 : Comparaison des spectres de masses exactes d'échantillons de lait traité et non traité au temps de rétention 10.3 minutes

L'identification des variables s'est donc portée sur les ions m/z 172.17 et m/z 343.34 à partir du spectre brut (Figure 74).

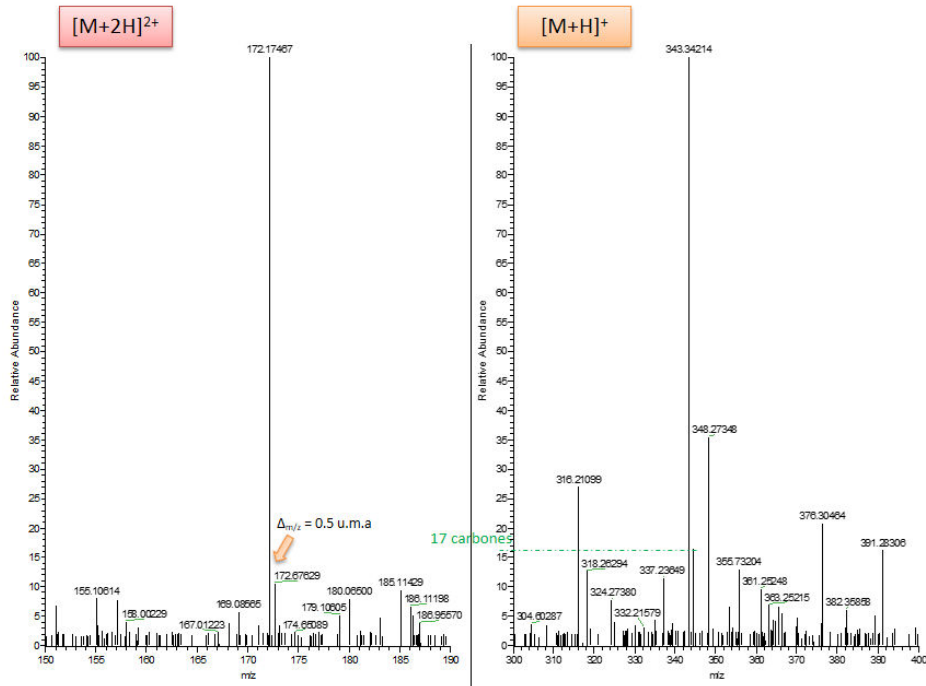


Figure 74 : Spectres de masses exactes des ions corrélés m/z 172.17 et m/z 343.34

Pour l'ion m/z 172,17, on peut supposer qu'il est doublement chargé puisqu'on visualise un ion m/z 172,67 soit un écart de masse de 0,5 u.m.a. Le spectre pourrait correspondre à un composé de masse 342, soit l'observation de l'ion $[M+2H]^{2+}$, par la présence de l'ion m/z 172,17.

A partir de ces informations spectrales, 2 formules brutes sont proposées pour l'ion m/z 343,34 (Figure 75).

Feature 1

m/z 343.34214 \pm 5 ppm

Formule brute	Double liaison (relatif)	Δ (ppm)
C17 H41 N7	1	0.344
C19 H43 O N4	0.5	-0.998

Figure 75 : Propositions de formules brutes pour l'ion m/z 343.34 discriminant à la présence de l'AMDP dans le lait chauffé

L'hypothèse réactionnelle pour l'obtention de ces ions pertinents est proche de celle émise pour ceux obtenus dans le fromage fondu, à savoir une réaction entre un fragment de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et des constituants à groupements amines. Cette hypothèse nécessite une étude plus poussée des constituants du lait qui n'a pas fait l'objet de cette étude. Il est également possible qu'il s'agisse d'un constituant du lait d'où la nécessité de poursuivre le travail en ce sens.

5 CONCLUSION ET DISCUSSIONS

Cette étude a permis de démontrer que les approches d'analyses ciblée par LC-MS/MS et non ciblée par LC-HRMS sont complémentaires pour étudier le devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et l'impact des procédés de transformation du lait sur l'apparition de produits néoformés. Ces outils sont d'intérêts pour mieux caractériser les résidus de biocides et leurs dérivés dans les matrices alimentaires. L'étude portant sur deux biocides d'intérêts, le DDAC-C10 et l'Aminopropyldodécylpropane diamine, volontairement ajoutés dans le lait ou les fromages a soulevé plusieurs points intéressants.

En analyse ciblée, une contamination croisée et une rémanence du DDAC-C₁₀ sur les surfaces alimentaires en acier inoxydable a été démontrée. En effet, les échantillons de PPC « non traités » présentent une teneur en DDAC-C₁₀ du même ordre de grandeur que celle des échantillons « traités ». De plus, l'analyse ciblée en DDAC-C₁₀ des échantillons « traités » et

« non traités » en Aminopropyldodécylpropane diamine fabriqué le lendemain avec le même matériel a permis de confirmer cette démonstration de rémanence. Les résultats d'analyse ciblée pour l'Aminopropyldodécylpropane diamine dans les différents échantillons (lait, fromages, « traités », « non traités ») ont montré deux phénomènes en lien avec les procédés de transformation du lait. Une concentration en résidus dans les échantillons de fromages fabriqués à partir de laits « traités » a pu être observée. L'impact potentiel des procédés de transformation du lait qui pourrait conduire à la formation de produits néoformés a été étudié en raison d'une teneur en Aminopropyldodécylpropane diamine inférieure à celle attendue dans les fromages lors du traitement du lait à 50 µg/kg. Sur la base de ces résultats, deux axes d'améliorations peuvent être proposés, (i) un autre ammonium quaternaire, moins rémanent et/ou moins utilisé en IAA, pourrait être retenu pour étudier leur devenir dans les produits laitiers, et (ii) une troisième série de fabrication de PPC à la suite de celles des échantillons « traités » à l'Aminopropyldodécylpropane diamine serait à effectuer pour exclure un potentiel phénomène de rémanence sur les surfaces alimentaires et de transfert dans les aliments.

En analyse non ciblée, la contamination en DDAC-C₁₀ des échantillons de PPC « non traités » n'a pas permis d'étudier le devenir des résidus d'ammoniums quaternaires dans les produits laitiers en lien avec les procédés de transformation du lait. Le choix s'étant porté sur la SA majoritairement employée en industrie laitière, cette limitation de rémanence sur les surfaces alimentaires pourtant pressentie aurait pu être contournée par l'étude d'un autre AQ (BAC ou DDAC) à disposition. L'analyse ciblée préalable des échantillons FF et PPC « traités » et « non traités » à l'Aminopropyldodécylpropane diamine a confirmé la validité des deux groupes d'échantillons préparés pour l'étude de recherche de produits néoformés.

Les résultats d'analyses statistiques ont montré une discrimination nette entre les groupes « traités » et « non traités » d'échantillons de FF d'une part, et de PPC d'autre part. L'étude de preuve de concept concernant les fromages fondus, a permis de retenir 4 variables d'intérêts dont la significativité a été confirmée en analyses statistiques univariées et multivariées. Un premier travail d'élucidation à partir des spectres de masses exactes a permis de proposer une formule brute pour chaque variable, qui doit être confirmée par des essais complémentaires (ex.fragmentation).

Néanmoins, le manque de variabilité d'échantillonnage, 1 lot « non traité » et 1 lot « traité » à l'AMPD, constitue un paramètre critique du design expérimental et limitant à l'interprétation des résultats obtenus. Des hypothèses de réaction peuvent être émises, telles que (i) une réaction de Maillard entre les fonctions amines primaires de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et les constituants aldéhydiques ou cétoniques de la matrice, (ii) des liaisons peptidiques formées avec les acides aminés libérés au cours de la transformation du lait, (iii)

une réaction avec les acides gras de la matrices dont la fonction acide carboxylique peut réagir avec les amines primaires de l'AMPD.

L'analyse non ciblée des fromages PPC « traités » et « non traités » n'a pas permis de mettre en évidence d'ions réellement pertinents malgré la qualité des analyses statistiques univariées et multivariées qui ont montré une discrimination nette entre les groupes d'échantillons. L'affinage des fromages constituent la plus grande source de variabilité du jeu de données. De plus, un « effet-cuve » non pressenti correspondant à un nombre non équilibré de lots d'échantillons « traités » et « non traités » a été observé, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats d'analyses statistiques. L'essai sur le lait a été nécessaire pour compléter cette étude. Celui-ci a permis de mettre en évidence deux variables d'intérêts corrélées. Deux formules brutes ont pu être proposées pour la variable M343T618 qui correspondrait à l'ion $[M+H]^+$. L'élucidation de la structure doit maintenant être effectuée.

Néanmoins, deux facteurs peuvent expliquer l'absence de produits néoformés :

- Les températures appliquées lors des procédés de transformation peuvent constituer une limite à l'apparition ou à la détection de produits néoformés. A titre d'exemple, les adduits de Maillard formés à des températures supérieures à 100°C sont des radicaux libres très réactifs que ne peuvent être détectés avec la méthode mise en œuvre pour cette étude. Ceci serait donc une limite de notre étude.
- La loi d'action de masse qui définit la dynamique d'une réaction chimique en fonction de la concentration en substance est une règle clé qui peut s'appliquer dans le cas de la recherche de produits néoformés à partir de résidus. En effet, les faibles concentrations en biocides (50 µg/kg) volontairement ajoutés dans les produits laitiers peuvent faire défaut à la détection de produits néoformés.

Ces études de preuve de concept sur les fromages PPC et FF, complétées par un essai sur le lait, ont montré la difficulté de rechercher des composés non ciblés. Malgré les outils analytiques puissants et des outils chimométriques performants, la recherche de composés néoformés inconnus est un exercice très complexe et le résultat des tentatives menées est parfois décevant. Dans un premier temps, il convient de répéter l'expérience dans les mêmes conditions pour s'assurer des résultats. Pour aller plus loin dans la recherche de produits néoformés, il serait intéressant de mettre en œuvre d'autres outils analytiques tels que des techniques d'extraction différentes, des conditions de séparation en chromatographie liquide différentes (colonne, phase mobile), des analyses en chromatographie gazeuse, des conditions en HRMS différentes (modes d'ionisations).

Conclusions générales et perspectives

La présence de résidus de biocides dans les denrées alimentaires est un problème de santé publique avéré. En effet, leur usage massif lors des opérations de nettoyage-désinfection des surfaces alimentaires au sein de l'IAA entraîne leur transfert, à l'état de résidus, dans l'aliment. Depuis 2012, la contamination des denrées par les biocides désinfectants, essentiellement les ammoniums quaternaires préoccupe les autorités européennes. Les plans de surveillances et une enquête menée par l'EFSA ont montré la présence de BACs et DDAC-C10 dans les aliments à des teneurs en supérieures à 500 µg/kg LMR en vigueur à l'époque, ce plus particulièrement dans les produits laitiers. D'utilisation plus récente, l'Aminopropyldodécylpropane diamine a été proposée, par les industriels formulateurs, aux professionnels de la filière laitière comme substance active de substitution.

Dans ce contexte, deux objectifs ont été assignés à ce travail de thèse. Il s'agissait de développer des méthodes d'analyses quantitatives de résidus d'ammoniums quaternaires et d'Aminopropyldodécylpropane diamine, afin de fournir à nos tutelles des méthodes d'analyses fiables permettant de mesurer l'exposition des consommateurs à ces classes de composés. Ces mesures devant permettre une analyse du risque posé par ces substances. Le second objectif était de répondre à un questionnaire de l'impact des procédés de transformation du lait sur les résidus de biocides en étudiant leur devenir dans les produits dérivés du lait.

Pour répondre au premier objectif, nous avons développé deux méthodes indépendantes d'analyse de biocide dans les produits laitiers par LC-MS/MS. Soient une méthode quantitative multirésidus d'analyse des ammoniums quaternaires et une méthode d'analyse de l'Aminopropyldodécylpropane diamine. Les produits laitiers retenus, en concertation avec les professionnels de l'industrie laitière et partenaires du projet Resbiolact, sont le lait cru de vache, la poudre de lait, et deux types de fromages, à pâte pressé cuite et fromage fondu.

La mise au point de la méthode relative aux ammoniums quaternaires a été réalisée de façon à permettre l'analyse quantitative des cinq BACs (C_8 à C_{16}) et des cinq DDACs (C_{10} à C_{18}) dans les produits laitiers. Cinq standard internes deutérés ont pu être ajoutés pour améliorer la quantification. Au cours de cette phase de développement, une rémanence des AQs et plus particulièrement du DDAC- C_{10} dans le système analytique a été observée. Ce phénomène est connu et rapporté dans la littérature sans pour autant apporter des informations quant à son origine. Les expérimentations réalisées nous ont conduit à émettre l'hypothèse d'une concentration du DDAC C_{10} en tête de colonne analytique suite à sa présence à l'état de traces dans la phase mobile. Les conditions d'extraction ont été optimisées et appliquées aux quatre matrices étudiées. Le protocole final comprend une seule étape d'extraction par agitation mécanique dans un mélange acétonitrile : acétate d'éthyle (50 :50 ; v :v).

Les performances de la méthode ainsi décrite ont été évaluées au cours d'un processus de validation, sur un intervalle de 5 à 150 µg/kg, basé sur l'approche d'erreur totale et la construction du profil d'exactitude, le profil d'exactitude a été construit en fixant les limites d'acceptabilité à $\pm 30-40\%$, et de la valeur de β fixée à 70-80%. Les caractéristiques de performances ont ainsi été évaluées pour chaque combinaison molécule/matrice. L'objectif initial de limite de quantification (LQ) visé à 10 µg/kg pour chaque composé est dans l'ensemble atteint puisque pratiquement tous présentent une LQ à 5µg/kg.

L'applicabilité de la méthode a été testée sur un panel d'échantillons de produits laitiers pris aléatoirement dans le commerce où une partie des échantillons (9%) présentait des teneurs en DDAC-C₁₀ pouvant atteindre 200 µg/kg.

A l'issue de ces étapes de développement et de validation de la méthode, la méthode a été jugée apte à être proposée à nos tutelles.

L'Aminopropyldodécylpropane diamine a la particularité de N'avoir pas fait l'objet de publication quant à l'analyse de résidus dans les denrées alimentaires. Compte tenu de ses propriétés physico-chimiques, deux stratégies d'analyse en chromatographie liquide en phase inverse ont été testées : (i) la dérivation qui neutralise les fonctions amines et (ii) l'ajout d'agents d'appariement d'ions dans la phase mobile. L'approche par dérivation a été étudiée par la réaction de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et de la fluorescamine. Les essais réalisés en infusion sur un spectromètre de masse ont montré une instabilité de la forme dérivée en raison, d'un phénomène de déshydratation de la forme dérivée. De plus, la nécessité d'attendre environ 24 h pour atteindre la stabilité de la molécule dérivée a été un élément pour abandonner cette stratégie. De ce fait, le développement d'une méthode quantitative par l'approche d'appariement d'ions a été préféré pour analyser ce biocide dans les produits laitiers. La séparation chromatographique sur une colonne C18 à silice ultrapure est excellente avec un mélange binaire composé d'eau et d'ACN tous deux acidifiés par 25 mM d'HFBA et 1% d'AcF. En ce qui concerne l'extraction, les meilleures performances pour les 4 matrices étudiées ont été obtenues avec une extraction à l'ACN à pH 12 par ajout d'ammoniaque à 25% et en présence de NaCl.

La validation de la méthode ainsi décrite a été entreprise selon la même approche globale basée sur le profil d'exactitude. L'évaluation des performances de la méthode a permis de montrer une justesse et une fidélité satisfaisante, avec des valeurs inférieures à 20%, sur l'intervalle de 5 à 150 µg/kg.

Enfin, la méthode, elle aussi a montré son applicabilité pour l'analyse de divers produits laitiers pris aléatoirement dans le commerce.

Ces méthodes d'analyse quantitative d'ammoniums quaternaires et de l'Aminopropyldodécylpropane diamine présentent un double intérêt. - Etudier le devenir des

biocides dans les produits laitiers, en lien avec l'impact des procédés de transformation du lait. - A l'échelle nationale et européenne, ces méthodes pourront être mises en application dans le cadre de plans nationaux qui permettront de mesurer l'exposition des consommateurs aux produits biocides désinfectants et aux autorités compétentes d'en faire l'évaluation du risque.

La seconde partie de ce travail doctoral a été consacrée à l'étude du devenir des résidus de biocides dans les produits laitiers et la recherche d'éventuels produits néoformés suite à l'impact des procédés de transformation du lait. Le DDAC-C₁₀ et l'Aminopropyldodécylpropane diamine ont été retenus pour étudier leur devenir. Pour ce faire, deux études d'application de l'approche métabolomique en LC-HRMS sur des fromages PPC et FF ont été réalisées. Pour réaliser ce travail de recherche de composés néoformés en lien avec la présence de biocides dans les produits laitiers, un protocole analytique regroupant le design expérimental, la préparation des échantillons, l'acquisition et le traitement des données faisant appel à des outils analytiques et chimométriques, a été établi. La fabrication des échantillons a été sous-traitée à la halle technologique d'Actalia, partenaire du projet Resbiolact. La complémentarité des approches d'analyses ciblée en LC-MS/MS et non ciblée par LC-HRMS a permis de mieux caractériser le comportement des résidus de biocides au cours de la fabrication de produits laitiers.

L'analyse ciblée a permis de mettre en évidence une contamination et une rémanence du DDAC-C₁₀ sur les surfaces alimentaires en acier inoxydable utilisées pour la fabrication des fromages PPC et FF. En effet, les échantillons « non traités » de PPC présentent des teneurs proches de celles des échantillons traités volontairement au DDAC-C₁₀. En l'absence d'échantillons témoins, le devenir du DDAC-C₁₀ n'a pas été étudié. Pour l'Aminopropyldodécylpropane diamine, l'étude du devenir par la comparaison des empreintes chimiques globales en LC-HRMS a pu être testée. Un phénomène de concentration (x5) a été observé dans les fromages PPC, ce qui est inférieur à ce qui était attendu. Ceci peut être lié à un impact des procédés de transformation sur ce biocide conduisant à la dégradation ou l'apparition de produits néoformés.

Pour les AQs, l'absence d'échantillons témoins n'a pas permis d'appliquer l'approche d'analyse non ciblée par comparaison d'empreinte chimique. La stabilité physicochimique des ammoniums quaternaires rendait peu probable l'apparition de produits néoformés, il est plus judicieux de se pencher sur des molécules réactives chimiquement telles que l'Aminopropyldodécylpropane diamine.

Concernant l'Aminopropyldodécylpropane diamine, les résultats d'analyses statistiques pour les échantillons « traités » et « non traités » ont montré une discrimination nette entre ces deux groupes, que ce soit pour les fromages PPC et FF. Pour les fromages fondus, 4 variables d'intérêts dont la significativité a été confirmée par l'analyse statistique ont été retenues.

L'analyse des spectres de masses exactes nous a permis d'émettre l'hypothèse que ces composés d'intérêts seraient issus d'une réaction entre un fragment de l'Aminopropyldodécylpropane diamine et les constituants présents naturellement dans les fromages. Une seconde hypothèse a été émise quant à la nature de ces composés néoformés, à savoir qu'ils font partie d'une même famille chimique puisqu'ils présentent des fragments communs représentés par les écarts de masses identiques sur leur spectre de masse respectif. Une phase d'élucidation de la structure de ces variables reste à réaliser. Notons que le manque de variabilité d'échantillonnage lié aux contraintes technologique au sein de la halle est un point limitant à l'interprétation des résultats. En perspective, il serait intéressant de reproduire l'expérience avec un nombre de lots indépendants statistiquement suffisants pour assurer les résultats obtenus.

Malgré une discrimination nette entre les groupes d'échantillons de PPC « traités » et « non traités », l'analyse des variables d'intérêts n'a pas permis d'en retenir comme étant discriminante de l'exposition au biocide. La majeure partie de la variabilité observée est liée à l'affinage des fromages étudiés. En effet, cette variabilité s'explique par les réactions biologiques et chimiques se produisant au cours du processus d'affinage, qui sont l'intérêt même de la maturation. De plus, un effet-cuve non pressenti lors du design expérimental a été observé. Les contraintes expérimentales de la halle qui disposait de 4 cuves nous ont conduits à faire le choix de fabriquer 3 lots « traités » et 1 lot « non traité ». L'observation sur les 3 lots d'échantillons « traités » d'un effet cuve inattendu a complexifié l'analyse des résultats et perturbé leur fiabilité.

La recherche de marqueurs d'exposition à un xénobiotique à des concentrations traces par l'analyse non ciblée est par nature complexe. Les données obtenues par cette étude « pilote » sont évidemment limitées, d'autant plus par les conséquences de cet « effet cuve » précité. Il aurait également été nécessaire de recourir à différentes techniques analytiques afin d'augmenter la probabilité de trouver des produits néoformés mais ceci n'a pas été possible pour des raisons de temps limité mais aussi de matériel à disposition.

L'approche que nous avons menée dans le cadre de ce travail doctoral sur les fromages PPC et FF est, à notre connaissance, une première du genre pour l'étude du devenir de résidus de biocides désinfectants dans les produits laitiers et de l'impact des procédés de transformation sur l'apparition de produits néoformés. Bien que les résultats n'aient pas permis de répondre précisément à la question, cette étude se devait d'être réalisée.

Cette étude, avec ses défauts, a le mérite de démontrer la complexité de l'approche recherche non ciblée en ce qui concerne le design expérimental. Si cette approche devait être reprise pour la recherche de produits néoformés une des pistes serait d'utiliser des concentrations très

élevées en biocide. Ceci permettrait de répondre à une interrogation quant à la pertinence de cette approche. En effet les lois fondamentales de la cinétique chimique (loi d'action de masse) pourraient à elles seules être un argument pour abandonner cette recherche. De plus, dans le cadre de l'éventuelle apparition de produits de Maillard les conditions de température pour la transformation du lait sont assez loin des conditions de température associées à ces réactions.

Dans une démarche de sécurité alimentaire, la contamination croisée des aliments et la rémanence des biocides sur les surfaces alimentaires constitue une problématique qui mérite d'être précisément étudiée. Il est nécessaire d'étudier de plus près le transfert des résidus de biocides désinfectants de la surface alimentaire vers les aliments. Cette perspective conceptualisée dans le cadre de la thèse mais en dehors de celle-ci sera rapidement mise en application puisqu'elle constitue le dernier volet du projet Resbiolact sur lequel j'aurai plaisir à travailler.

Références Bibliographiques

- [1] Commission Européenne, (2012), Règlement (UE) n ° 528/2012 du Parlement européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides, Official Journal of the European Union, L167, 1-123.
- [2] Commission Européenne, (2004), Règlement (CE) N° 852/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires, Journal officiel de l'Union européenne, L139, 1-54.
- [3] EFSA (European Food Safety Authority), (2013), Evaluation of monitoring data on residues of didecyltrimethylammonium chloride (DDAC) and benzalkonium chloride (BAC), EN-483, 1-30.
- [4] SCoFCAH (Standing Committee of the Food Chain and Animal Health), (25 July 2012), Guidelines as regards measures to be taken as regards the presence of Benzalkonium Chloride (BAC) in or on food and feed, 1-2.
- [5] SCoFCAH (Standing Committee of the Food Chain and Animal Health), (13 July 2012), Guidelines as regards measures to be taken as regards the presence of DDAC in or on food and feed, 1-3.
- [6] <https://www.anses.fr/fr/content/les-produits-biocides>, consulté le 12/07/2017
- [7] <https://echa.europa.eu/fr/support/dossier-submission-tools/r4bp>, consulté le 21/08/2017
- [8] Commission Européenne, (2017), Règlement Délégué (UE) 2017/698 de la Commission du 3 février 2017 modifiant le règlement délégué (UE) no 1062/2014 relatif au programme de travail pour l'examen systématique de toutes les substances actives existantes contenues dans des produits biocides visé dans le règlement (UE) No 528/2012 du Parlement européen et du Conseil concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides, L103, 1-16.
- [9] A. Brisabois, C. Collette, V. Lafarge, A. Brouillaud, B. Garin-Bastuji, M.-L. de Buyser, M.-F. Thorel, Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe, Revue Scientifique et Technique de l'OIE, 16 (1997) 452-471.
- [10] S. Fourour. (2015). Impact des résidus de biocides sur la colonisation bactérienne de surfaces alimentaires. Université de Rennes 1, <https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/anses-01229047/document>.
- [11] <https://www.anses.fr/fr/content/le-paquet-hygiène>, consulté le 16/05/2017
- [12] Commission Européenne, (2002), Règlement (CE) No 178/2002 du Parlement Européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires, L31, 1-24.
- [13] <http://critt-iaa-paca.com/wp-content/uploads/2015/02/Guide-Effinet-ND.pdf>,
- [14] <https://www.anses.fr/fr/content/limites-maximales-de-résidus-ou-lmr-de-médicament-vétérinaire>, consulté le 26/09/2017
- [15] Commission Européenne, (2014), Règlement (UE) No modifiant l'annexe III du règlement (CE) no 1119/2014 DE LA COMMISSION du 16 octobre 2014 396/2005 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les limites maximales applicables aux résidus de chlorure de benzalkonium et de chlorure de didécyltriméthylammonium présents dans ou sur certains produits, L304, 1-32.

- [16] Commission Européenne, (2005), Règlement (CE) N° 396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005 concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil, Official Journal of the European Union, L70, 1-16.
- [17] http://www.sssh.ch/uploads/media/4_De_sinfectants_SSSH_SR_mars_2013_Herve_.pdf, consulté le 9/10/2017
- [18] EFSA (European Food Safety Authority), (2008), Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance incorrectly named didecyldimethylammonium chloride, (it is in fact a mixture of alkyl-quaternary ammonium salts with typical alkyl chain lengths of C8, C10 and C12, with more than 90% of C10), 214, 1-54.
- [19] <https://echa.europa.eu/fr/registration-dossier/-/registered-dossier/5864/4/10>, consulté le 18/10/2017
- [20] U. Tezel. (2009). Fate and Effect of Quaternary Ammonium Compounds in Biological Systems. Georgia Institute of Technology.
- [21] https://www.anses.fr/en/system/files/DMCIDULTRA_20150020_TAMM_Ans.pdf, consulté le 18/09/2017
- [22] <https://chemicalize.com/>, consulté le 18/09/2017
- [23] BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), (9 July 2012), Health assessment of didecyldimethylammonium chloride ddac residues in food, 1-14.
- [24] BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung), (13 July 2012), Health assessment of benzalkonium chloride residues in food, 1-14.
- [25] http://www.actalia.eu/wp-content/uploads/2014/08/IAA_Mai-Juin2014_p38-41.pdf, consulté le 27/09/2017
- [26] <https://fr.calameo.com/read/002230051fa492499bf0f>, consulté le 27/09/2017
- [27] <http://www.filiere-laitiere.fr/sites/default/files/medias/documents/process-fabrication-laits.pdf>, 27/09/2017
- [28] <https://www.produits-laitiers.com/le-circuit-de-fabrication-du-fromage/>, consulté le 27/09/2017
- [29] <http://www.filiere-laitiere.fr/sites/default/files/medias/documents/process-fabrication-poudres.pdf>, 29/09/2017
- [30] <https://fncl.coop/filiere-laitiere/collecter-et-transformer-le-lait>, 27/09/2017
- [31] <http://www.fao.org/docrep/t4280f/T4280F00.htm#Contents>, consulté le 29/09/2017
- [32] <https://www.produits-laitiers.com/article/presure-et-ferments-lactiques-quels-roles-dans-la-fabrication-du-fromage>, 29/09/2017
- [33] P. Legrand, Intérêts nutritionnels des lipides d'origine laitière, Medecine et nutrition, 42 (2006) 105-112.
- [34] Michel Van Bruijnsvoort, Joop Rooselaar, ALFRED G. Stern, K.M. Jonker, Determination of Residues of Quaternary Ammonium Disinfectants in Food Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, Journal of AOAC International, 87 (2004) 1016-1020.
- [35] <https://www.enil.fr/docs/r&d/GUIDE-PRATIQUE-Ammoniums-quaternaires-et-pratiques-de-nettoyage.pdf>, 29/09/2017
- [36] <https://www.anses.fr/fr/system/files/GBPH2014SA0036.pdf>, 12/11/2017

- [37] <http://www.processalimentaire.com/Procedes/Composes-neoformes-indesirables.-Quelles-solutions-pour-les-eviter-7255>, consulté le 29/09/2017
- [38] C. Rannou, D. Laroque, E. Renault, C. Prost, T. Serot, Mitigation strategies of acrylamide, furans, heterocyclic amines and browning during the Maillard reaction in foods, *Food Res Int*, 90 (2016) 154-176.
- [39] R.H. Stadler, D.R. Lineback, *Process-Induced Food Toxicants : Occurrence, Formation, Mitigation and Health Risks*, John Wiley & Sons, 2009.
- [40] C. Esnouf, J. Fioramonti, B. Laurieux, *L'Alimentation à découvert*, CNRS Editions, 2015.
- [41] F. Souard, C. Delporte, P. Stoffelen, E.A. Thevenot, N. Noret, B. Dauvergne, J.M. Kauffmann, P. Van Antwerpen, C. Stevigny, Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS, *Food Chem*, 245 (2018) 603-612.
- [42] W.P. Semedo Tavares, S. Dong, W. Jin, Y. Yang, K. Han, F. Zha, Y. Zhao, M. Zeng, Effect of different cooking conditions on the profiles of Maillard reaction products and nutrient composition of hairtail (*Thichiurus lepturus*) fillets, *Food Res Int*, 103 (2018) 390-397.
- [43] A.J. Trevisan, D. de Almeida Lima, G.R. Sampaio, R.A. Soares, D.H. Markowicz Bastos, Influence of home cooking conditions on Maillard reaction products in beef, *Food Chem*, 196 (2016) 161-169.
- [44] G. Daniali, S. Jinap, P. Hajeb, M. Sanny, C.P. Tan, Acrylamide formation in vegetable oils and animal fats during heat treatment, *Food Chem*, 212 (2016) 244-249.
- [45] A.A. Elbashir, M.M. Omar, W.A. Ibrahim, O.J. Schmitz, H.Y. Aboul-Enein, Acrylamide analysis in food by liquid chromatographic and gas chromatographic methods, *Crit Rev Anal Chem*, 44 (2014) 107-141.
- [46] Y. Zhang, G. Zhang, Y. Zhang, Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods, *Journal of Chromatography A*, 1075 (2005) 1-21.
- [47] B.P. Riboldi, A.M. Vinhas, J.D. Moreira, Risks of dietary acrylamide exposure: a systematic review, *Food Chem*, 157 (2014) 310-322.
- [48] K.M. Cooper, M. Whelan, M. Danaher, D.G. Kennedy, Stability during cooking of anthelmintic veterinary drug residues in beef, *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28 (2011) 155-165.
- [49] A. Gajda, T. Bladek, M. Gbylik-Sikorska, A. Posyniak, The influence of cooking procedures on doxycycline concentration in contaminated eggs, *Food Chem*, 221 (2017) 1666-1670.
- [50] A. Junza, S. Barbosa, M.R. Codony, A. Jubert, J. Barbosa, D. Barron, Identification of metabolites and thermal transformation products of quinolones in raw cow's milk by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry, *J Agric Food Chem*, 62 (2014) 2008-2021.
- [51] E. Kellnerová, P. Navrátilová, I. Borkovcová, Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk, *Acta Veterinaria Brno*, 83 (2014) S21-S26.
- [52] M. Lolo, S. Pedreira, J.M. Miranda, B.I. Vazquez, C.M. Franco, A. Cepeda, C. Fente, Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue, *Food Addit Contam*, 23 (2006) 988-993.
- [53] M. Gratacos-Cubarsi, A. Fernandez-Garcia, P. Picouet, A. Valero-Pamplona, J.A. Garcia-Regueiro, M. Castellari, Formation of Tetracycline Degradation Products in Chicken and Pig Meat under Different Thermal Processing Conditions, *J. Agric. Food Chem*, 55 (2007) 4610-4616.
- [54] M. Roca, M. Castillo, P. Marti, R.L. Althaus, M.P. Molina, Effect of heating on the stability of quinolones in milk, *J Agric Food Chem*, 58 (2010) 5427-5431.

- [55] Y. Xian, H. Dong, Y. Wu, X. Guo, X. Hou, B. Wang, QuEChERS-based purification method coupled to ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) to determine six quaternary ammonium compounds (QACs) in dairy products, *Food Chem*, 212 (2016) 96-103.
- [56] F.J. Arrebola-Liébanas, M.A.H. Abdo, J.L.F. Moreno, J.L. Martínez-Vidal, A.G. Frenich, Determination of Quaternary Ammonium Compounds in Oranges and Cucumbers Using QuEChERS Extraction and Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry, *Journal of AOAC International*, 97 (2014) 1021-1026.
- [57] P. Bassarab, D. Williams, J.R. Dean, E. Ludkin, J.J. Perry, Determination of quaternary ammonium compounds in seawater samples by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1218 (2011) 673-677.
- [58] E. Boyaci, C. Sparham, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction coupled to LC-ESI-MS/MS for determination of quaternary ammonium compounds in water samples, *Anal Bioanal Chem*, 406 (2014) 409-420.
- [59] X. Li, B.J. Brownawell, Analysis of quaternary ammonium compounds in estuarine sediments by LC-ToF-MS: very high positive mass defects of alkylamine ions as powerful diagnostic tools for identification and structural elucidation, *Anal Chem*, 81 (2009) 7926-7935.
- [60] T. Bertuzzi, A. Pietri, Determination of Benzalkonium Homologues and Didecyldimethylammonium in Powdered and Liquid Milk for Infants by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Mass Spectrometry, *Food Analytical Methods*, 7 (2013) 1278-1284.
- [61] Wilhad M. Reuter, (2015), Analysis of Quaternary Ammonium Compounds (QACs) as Possible Disinfectant Residues in Milk by LC-TOF, 1-6.
- [62] European Union Reference Laboratory for Residues of Pesticides, (2014), Analysis of BACs and DDAC in Milk using QuEChERS method and LC-MS/MS, 1-6.
- [63] J. Hepperle, E. Schüle, D. Kolberg, E. Scherbaum, Determination of quaternary ammonium compound residues in fruits and vegetables by QuEChERS following LC-MS/MS analysis, (2013).
- [64] H. Drinda, A. Romanotto, D. Wojciechowski, (2013), Quaternary ammoniums compounds (QACs) in foodstuffs - current situation and analytic method, 1.
- [65] T. Miyauchi, M. Mori, K. Ito, Quantitative determination of benzalkonium chloride in treated wood by solid-phase extraction followed by liquid chromatography with ultraviolet detection, *J Chromatogr A*, 1095 (2005) 74-80.
- [66] L.P. Labranche, S.N. Dumont, S. Levesque, A. Carrier, Rapid determination of total benzalkonium chloride content in ophthalmic formulation, *J Pharm Biomed Anal*, 43 (2007) 989-993.
- [67] Díez Cristina, Staub Spörri Aline, Cognard Emmanuelle, Ortelli Didier, Edder Patrick, R. Serge, Validation of a LC-MS/MS method for Benzalkonium chloride and Didecyldimethylammonium chloride in fruits and vegetables. Evaluation of matrix-matched calibration and the standard addition method, , (2013).
- [68] L. Xiang, X.K. Wang, Y.W. Li, X.P. Huang, X.L. Wu, H.M. Zhao, H. Li, Q.Y. Cai, C.H. Mo, Analysis of Trace Quaternary Ammonium Compounds (QACs) in Vegetables Using Ultrasonic-Assisted Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J Agric Food Chem*, 63 (2015) 6689-6697.
- [69] Klaus Kummerer, Andreas Eitel, Ulrich Braun, Peter Hubner, Franz Daschner, Georges Mascart, Milena Milandri, Franz Reinthaler, J. Verhoe, Analysis of benzalkonium chloride in the

effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 778 (1997) 281-286.

[70] Eberhard Schüle, Sigrid Schüler, Diana Kolberg, Marc Wieland, Nadja Bauer, Anne Wolheim and Ellen Scherbaum, (2012), *Residues of Quarternary Ammonium Compounds (QAC) in Fruits and Vegetables*, CVUA Stuttgart, 1.

[71] J. Dudkiewicz-Wilczynska, J. Tautt, I. Roman, Application of the HPLC method for benzalkonium chloride determination in aerosol preparations, *J Pharm Biomed Anal*, 34 (2004) 909-920.

[72] H. Cao, M. Kang, Z. Chen, L. Li, M. Cui, M. Chen, H. Zhang, Y. Wang, Determination of five quaternary ammonium compounds in foodstuffs using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods*, 6 (2014) 4790-4796.

[73] L.W. Stillway, T. Walle, Identification of the unusual Polyamines 3,3'Diaminodipropylamine and N,N'-BIS(3-Aminopropyl)1,3-Propanediamine in the white shrimp *Penaeus Setiferus*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 77 (1977) 1103-1107.

[74] A. Mondin, S. Bogialli, A. Venzo, G. Favaro, D. Badocco, P. Pastore, Characterization and quantification of N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine biocide by NMR, HPLC/MS and titration techniques, *Chemosphere*, 95 (2014) 379-386.

[75] A. Argente-Garcia, M. Munoz-Ortuno, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martinez, P. Campins-Falco, A solid device based on doped hybrid composites for controlling the dosage of the biocide N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine in industrial formulations, *Talanta*, 147 (2016) 147-154.

[76] F. Bedia Erim, Recent analytical approaches to the analysis of biogenic amines in food samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 52 (2013) 239-247.

[77] E. Dadáková, M. Krízek, T. Pelikánová, Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC), *Food Chemistry*, 116 (2009) 365-370.

[78] E. De Mey, G. Drabik-Markiewicz, H. De Maere, M.C. Peeters, G. Derdelinckx, H. Paelinck, T. Kowalska, Dabsyl derivatisation as an alternative for dansylation in the detection of biogenic amines in fermented meat products by reversed phase high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, 130 (2012) 1017-1023.

[79] G. Fiechter, G. Sivec, H.K. Mayer, Application of UHPLC for the simultaneous analysis of free amino acids and biogenic amines in ripened acid-curd cheeses, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 927 (2013) 191-200.

[80] M.R. Loizzo, F. Menichini, N. Picci, F. Puoci, U. Gianfranco Spizzirri, D. Restuccia, Technological aspects and analytical determination of biogenic amines in cheese, *Trends in Food Science & Technology*, 30 (2013) 38-55.

[81] A. Onal, A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chemistry*, 103 (2007) 1475-1486.

[82] A. Onal, S.E. Tekkeli, C. Onal, A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods, *Food Chem*, 138 (2013) 509-515.

[83] B. Redruello, V. Ladero, I. Cuesta, J.R. Alvarez-Buylla, M.C. Martin, M. Fernandez, M.A. Alvarez, A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese,

using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent, *Food Chem*, 139 (2013) 1029-1035.

[84] D. Restuccia, U.G. Spizzirri, F. Puoci, G. Cirillo, M. Curcio, O.I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, A new method for the determination of biogenic amines in cheese by LC with evaporative light scattering detector, *Talanta*, 85 (2011) 363-369.

[85] G. Sagratini, M. Fernandez-Franzon, F. De Berardinis, G. Font, S. Vittori, J. Manes, Simultaneous determination of eight underivatized biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem*, 132 (2012) 537-543.

[86] U. Gianfranco Spizzirri, D. Restuccia, M. Curcio, O. I. Parisi, F. Iemma, N. Picci, Determination of biogenic amines in different cheese samples by LC with evaporative light scattering detector, *Journal of Food Composition and Analysis*, 29 (2013) 43-51.

[87] F. Gaboriau, R. Havouis, J.-P. Moulinoux, J.-G. Delcros, Atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry method to improve the determination of dansylated polyamines, *Analytical Biochemistry*, 318 (2003) 212-220.

[88] J.M. Geuns, M.L. Orriach, R. Swennen, G. Zhu, B. Panis, F. Compernelle, M. Van der Auweraer, Simultaneous liquid chromatography determination of polyamines and arylalkyl monoamines, *Anal Biochem*, 354 (2006) 127-131.

[89] M.R. Hakkinen, T.A. Keinanen, J. Vepsalainen, A.R. Khomutov, L. Alhonen, J. Janne, S. Auriola, Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal*, 45 (2007) 625-634.

[90] M.R. Hakkinen, T.A. Keinanen, J. Vepsalainen, A.R. Khomutov, L. Alhonen, J. Janne, S. Auriola, Quantitative determination of underivatized polyamines by using isotope dilution RP-LC-ESI-MS/MS, *J Pharm Biomed Anal*, 48 (2008) 414-421.

[91] J. Sanchez-Lopez, G. Camanes, V. Flors, C. Vicent, V. Pastor, B. Vicedo, M. Cerezo, P. Garcia-Agustin, Underivatized polyamine analysis in plant samples by ion pair LC coupled with electrospray tandem mass spectrometry, *Plant Physiol Biochem*, 47 (2009) 592-598.

[92] V. Ducros, D. Ruffieux, H. Belva-Besnet, F. de Fraipont, F. Berger, A. Favier, Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 390 (2009) 46-51.

[93] S. Jia, Y.P. Kang, J.H. Park, J. Lee, S.W. Kwon, Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1218 (2011) 9174-9182.

[94] S. Jia, Y.P. Kang, J.H. Park, J. Lee, S.W. Kwon, Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry, *Food Chemistry*, 132 (2012) 1185-1190.

[95] N. Cesur, T. Idil Apak, H.Y. Aboul-Enein, S. Ozkirimli, LC determination of aminoglutethimide enantiomers as dansyl and fluorescamine derivatives in tablet formulations, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28 (2002) 487-492.

[96] F. Gosetti, E. Mazzucco, V. Gianotti, S. Polati, M.C. Gennaro, High performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of biogenic amines in typical Piedmont cheeses, *J Chromatogr A*, 1149 (2007) 151-157.

- [97] F.B. Custodio, E. Tavares, M.B. Abreu Gloria, Extraction of bioactive amines from grated Parmesan cheese using acid, alkaline and organic solvents, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (2007) 280-288.
- [98] A. Koros, Z. Varga, I. Molnar-Perl, Simultaneous analysis of amino acids and amines as their o-phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A*, 1203 (2008) 146-152.
- [99] S. Moret, D. Smela, T. Populin, L.S. Conte, A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables, *Food Chemistry* 89 (2005) 355-361.
- [100] S. Millan, M.C. Sampedro, N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Simple and rapid determination of biogenic amines in wine by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry, *Anal Chim Acta*, 584 (2007) 145-152.
- [101] A. Apffel, S. Fischer, G. Goldberg, P.C. Goodley, F.E. Kuhlmann, Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases, *Journal of Chromatography A*, 712 (1995) 177-190.
- [102] F.E. Kuhlmann, A. Apffel, S.M. Fischer, G. Goldberg, P.C. Goodley, Signal Enhancement for Gradient Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry with Trifluoroacetic and Other Strong Acid Modifiers by Postcolumn Addition of Propionic Acid and Isopropanol, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 6 (1995) 1221-1225.
- [103] G. Vincent, M.C. Kopferschmitt-Kubler, P. Mirabel, G. Pauli, M. Millet, Sampling and analysis of quaternary ammonium compounds (QACs) traces in indoor atmosphere, *Environ Monit Assess*, 133 (2007) 25-30.
- [104] http://www.interchim.fr/cat/PDF_Emailing/7-CatInterchim-B166-172-QuEChERSInterchim.pdf, consulté le 6/01/2018
- [105] <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003048fr.pdf>, consulté le 06/01/2018
- [106] https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf, 9/01/2018
- [107] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--Part I, *J Pharm Biomed Anal*, 36 (2004) 579-586.
- [108] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, P. Chiap, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Lallier, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, C. Nivet, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part II, *J Pharm Biomed Anal*, 45 (2007) 70-81.
- [109] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures. A SFSTP proposal--part III, *J Pharm Biomed Anal*, 45 (2007) 82-96.
- [110] P. Hubert, J.J. Nguyen-Huu, B. Boulanger, E. Chapuzet, N. Cohen, P.A. Compagnon, W. Dewe, M. Feinberg, M. Laurentie, N. Mercier, G. Muzard, L. Valat, E. Rozet, Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures: a SFSTP proposal part IV. Examples of application, *J Pharm Biomed Anal*, 48 (2008) 760-771.

- [111] Christelle Marlet, G. Lognay, Development and validation by accuracy profile of a method for the analysis of monoterpenes in indoor air by active sampling and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta*, 82 (2010) 1230-1239.
- [112] E. Bony, Y. Mace, A. Pinto, D. Delvaux, R. Kiss, O. Riant, O. Feron, J. Quetin-Leclercq, Validation of a SPE HPLC-UV method for the quantification of a new ER-specific photosensitizer OR-141 in blood serum using total error concept, *J Pharm Biomed Anal*, 141 (2017) 87-94.
- [113] E. Cheneau, J. Henri, Y. Pirotais, J.P. Abjean, B. Roudaut, P. Sanders, M. Laurentie, Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: applying a total error approach, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 850 (2007) 15-23.
- [114] M. Feinberg, Validation of analytical methods based on accuracy profiles, *J Chromatogr A*, 1158 (2007) 174-183.
- [115] M. Laurentie, V. Gaudin, Use of the total error approach to evaluate the performance of a semi-quantitative immunological method (BIACORE method) for detecting sulfamethazine in bovine milk, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 2375-2379.
- [116] S. Mompelat, M.P. Fourmond, M. Laurentie, E. Verdon, D. Hurtaud-Pessel, J.P. Abjean, Validation of a liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix, *J Chromatogr A*, 1407 (2015) 119-129.
- [117] N. Mottier, M. Tharin, C. Cluse, J.R. Crudo, M.G. Lueso, C.G. Goujon-Ginglinger, A. Jaquier, M.I. Mitova, E.G. Rouget, M. Schaller, J. Solioz, Validation of selected analytical methods using accuracy profiles to assess the impact of a Tobacco Heating System on indoor air quality, *Talanta*, 158 (2016) 165-178.
- [118] M.J. Saint-Cyr, A. Perrin-Guyomard, P. Houée, M.V. Vasseur, M. Laurentie, Use of Accuracy Profile Procedure to Validate a Real-Time PCR Method to Quantify Bacteria in Feces, *Journal of AOAC International*, 97 (2014) 573-579.
- [119] D.H. Shewiyo, E. Kaale, P.G. Risha, B. Dejaegher, J. De Beer, J. Smeyers-Verbeke, Y. Vander Heyden, Accuracy profiles assessing the validity for routine use of high-performance thin-layer chromatographic assays for drug formulations, *J Chromatogr A*, 1293 (2013) 159-169.
- [120] A. Gustavo González, M. Ángeles Herrador, A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 227-238.
- [121] B. Streel, B. Cahay, R. Klinkenberg, Using total error concept for the validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of budesonide epimers in human plasma, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877 (2009) 2290-2300.
- [122] FDA, (2013), Guidance for industry - Bioanalytical Method Validation, Revision 1, 30.
- [123] E. Rozet, V. Wascotte, N. Lecouturier, V. Preat, W. Dewe, B. Boulanger, P. Hubert, Improvement of the decision efficiency of the accuracy profile by means of a desirability function for analytical methods validation. Application to a diacetyl-monoxime colorimetric assay used for the determination of urea in transdermal iontophoretic extracts, *Anal Chim Acta*, 591 (2007) 239-247.
- [124] A. Alonso, S. Marsal, A. Julia, Analytical methods in untargeted metabolomics: state of the art in 2015, *Front Bioeng Biotechnol*, 3 (2015) 23.

- [125] M.K.R. Engskog, J. Haglöf, T. Arvidsson, C. Pettersson, LC–MS based global metabolite profiling: the necessity of high data quality, *Metabolomics*, 12 (2016).
- [126] J.J. Kouassi Nzoughet, G. Dervilly-Pinel, S. Chéreau, G. Biancotto, F. Monteau, C.T. Elliott, B. Le Bizec, First insights into serum metabolomics of trenbolone/estradiol implanted bovines; screening model to predict hormone-treated and control animals' status, *Metabolomics*, 11 (2015) 1184-1196.
- [127] J. Delecolle. (2017). Approche métabolomique pour une caractérisation plus fine d'extraits de plantes d'intérêts pour la santé humaine. Université de Strasbourg.
- [128] <https://www.pf-corsaire.org/Presentation-de-la-plate-forme/Les-approches>, consulté le 15/02/2018
- [129] M. Castro-Puyana, R. Pérez-Míguez, L. Montero, M. Herrero, Application of mass spectrometry-based metabolomics approaches for food safety, quality and traceability, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 93 (2017) 102-118.
- [130] J.M. Cevallos-Cevallos, J.I. Reyes-De-Corcuera, E. Etxeberria, M.D. Danyluk, G.E. Rodrick, Metabolomic analysis in food science: a review, *Trends in Food Science & Technology*, 20 (2009) 557-566.
- [131] C. Le Boucher, F. Courant, A.-L. Royer, S. Jeanson, S. Lortal, G. Dervilly-Pinel, A. Thierry, B. Le Bizec, LC–HRMS fingerprinting as an efficient approach to highlight fine differences in cheese metabolome during ripening, *Metabolomics*, 11 (2015) 1117-1130.
- [132] J. Rubert, A. Monforte, K. Hurkova, G. Perez-Martinez, J. Blesa, J.L. Navarro, M. Stranka, J.M. Soriano, J. Hajslova, Untargeted metabolomics of fresh and heat treatment Tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) milks reveals further insight into food quality and nutrition, *J Chromatogr A*, 1514 (2017) 80-87.
- [133] R.R. Singh, Y. Lester, K.G. Linden, N.G. Love, G.E. Atilla-Gokcumen, D.S. Aga, Application of metabolite profiling tools and time-of-flight mass spectrometry in the identification of transformation products of iopromide and iopamidol during advanced oxidation, *Environ Sci Technol*, 49 (2015) 2983-2990.
- [134] E. Tengstrand, J. Rosen, K.E. Hellenas, K.M. Aberg, A concept study on non-targeted screening for chemical contaminants in food using liquid chromatography-mass spectrometry in combination with a metabolomics approach, *Anal Bioanal Chem*, 405 (2013) 1237-1243.
- [135] G. Dervilly-Pinel, F. Courant, S. Chereau, A.L. Royer, F. Boyard-Kieken, J.P. Antignac, F. Monteau, B. Le Bizec, Metabolomics in food analysis: application to the control of forbidden substances, *Drug Test Anal*, 4 Suppl 1 (2012) 59-69.
- [136] Hector Gallart-Ayala, Sylvain Chéreau, Gaud Dervilly-Pinel, B.L. Bizec, Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety, *Bioanalysis*, 7 (2015).
- [137] A. Junza, A. Montane, J. Barbosa, C. Minguillon, D. Barron, High resolution mass spectrometry in the identification of transformation products and metabolites from beta-lactam antibiotics in thermally treated milk, *J Chromatogr A*, 1368 (2014) 89-99.
- [138] A. Junza, J. Saurina, D. Barron, C. Minguillon, Metabolic profile modifications in milk after enrofloxacin administration studied by liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1460 (2016) 92-99.
- [139] W. Jia, L. Shi, X. Chu, Untargeted screening of sulfonamides and their metabolites in salmon using liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry, *Food Chem*, 239 (2018) 427-433.

- [140] Y. Li, Y. Jin, S. Yang, W. Zhang, J. Zhang, W. Zhao, L. Chen, Y. Wen, Y. Zhang, K. Lu, Y. Zhang, J. Zhou, S. Yang, Strategy for comparative untargeted metabolomics reveals honey markers of different floral and geographic origins using ultrahigh-performance liquid chromatography-hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry, *J Chromatogr A*, 1499 (2017) 78-89.
- [141] M. Bergamaschi, G. Bittante, From milk to cheese: Evolution of flavor fingerprint of milk, cream, curd, whey, ricotta, scotta, and ripened cheese obtained during summer Alpine pasture, *J Dairy Sci*, (2018).
- [142] X. Xi, L.Y. Kwok, Y. Wang, C. Ma, Z. Mi, H. Zhang, Ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry MS(E)-based untargeted milk metabolomics in dairy cows with subclinical or clinical mastitis, *J Dairy Sci*, 100 (2017) 4884-4896.
- [143] M.A.J.S.V. Boekel, Effect of heating on Maillard reactions in milk, *Food Chem*, 62 (1998) 403-414.
- [144] A. Schmidt, L.I. Boitz, H.K. Mayer, A new UHPLC method for the quantitation of furosine as heat load indicator in commercial liquid milk, *Journal of Food Composition and Analysis*, 56 (2017) 104-109.
- [145] A. Roux. (2011). Analyse du metabolome urinaire humain par chromatographie liquide couplee a la spectrometrie de masse a haute resolution. Universite Pierre et Marie Curie Paris 6.
- [146] Y. Yang, N. Zheng, X. Zhao, Y. Zhang, R. Han, J. Yang, S. Zhao, S. Li, T. Guo, C. Zang, J. Wang, Metabolomic biomarkers identify differences in milk produced by Holstein cows and other minor dairy animals, *J Proteomics*, 136 (2016) 174-182.
- [147] F. Giacomoni, G. Le Corguille, M. Monsoor, M. Landi, P. Pericard, M. Petera, C. Duperier, M. Tremblay-Franco, J.F. Martin, D. Jacob, S. Goulitquer, E.A. Thevenot, C. Caron, Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics, *Bioinformatics*, 31 (2015) 1493-1495.
- [148] Frans M. van der Kloet, Ivana Bobeldijk, Elwin R. Verheij, R.H. Jellema, Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping, *Journal of Proteome Research*, 8 (2009) 5132-5141.
- [149] Colin A. Smith, Elizabeth J. Want, Grace O'Maille, Ruben Abagyan, G. Siuzdak, XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification, *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 779-787.
- [150] C. Kuhl, R. Tautenhahn, C. Bottcher, T.R. Larson, S. Neumann, CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets, *Anal Chem*, 84 (2012) 283-289.
- [151] E.A. Thevenot, A. Roux, Y. Xu, E. Ezan, C. Junot, Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses, *J Proteome Res*, 14 (2015) 3322-3335.
- [152] <https://learnche.org/pid/latent-variable-modelling/principal-component-analysis/interpreting-score-plots-and-loading-plots>, consulté le 26/02/2018
- [153] J. Cotton. (2015). Application de l'analyse metabolomique `a la d'etecion ciblee et globale de contaminants organiques dans des matrices agroalimentaires et environnementales par spectrometrie de masse a ultra-haute resolution. Université Pierre et Marie Curie Paris 6.

- [154] Jean Adrian, (1975), Les traitements thermiques appliqués aux produits laitiers et leurs conséquences dans le domaine azoté, 543-544.
- [155] I. Birlouez-Aragon, La réaction de Maillard dans les aliments : quels enjeux pour la santé humaine ?, Cahiers de Nutrition et de Diététique, 43 (2008) 289-295.
- [156] https://www.jeanmann.com/mag/source/499/le_lait, consulté le 17/02/2018

Annexe 1

Rapport technique EFSA : Données de l'enquête sur les résidus de BACs et DDACs dans les denrées alimentaires

Table 5: Number of samples analysed per food group (analysis level 2) and per reporting country (ND=results below the LOQ).

Food group (Analysis level 2)	No Samples	No of samples above the LOQ ^(a)	ND	ND %	AT	BE	CY	CZ	FI	FR	DE	HU	IE	IT	NL	NO	PL	SK	ES	SE	UK
Cucurbits	258	7	251	97.29 %	.	5	.	.	.	15	220	.	1	.	11	.	.	1	.	5	.
Leafy vegetables & fresh herbs	519	45	474	91.33 %	.	20	5	2	6	6	353	.	4	1	20	4	5	3	10	7	73
Sweet corn	60	0	60	100.00 %	1	59
Legume vegetables (fresh)	173	13	160	92.49 %	9	5	.	.	.	5	139	.	.	.	14	.	.	1	.	.	.
Stem vegetables	93	1	92	98.92 %	1	11	73	.	.	3	3	.	.	.	2	.	.
Brassica vegetables	242	8	234	96.69 %	45	.	.	.	1	8	180	.	2	.	5	.	.	.	1	.	.
Potatoes	252	7	245	97.22 %	39	15	3	4	5	1	74	6	.	.	3	.	2	2	11	12	75
Root and tuber vegetables (except tropical)	177	5	172	97.18 %	.	5	2	2	7	15	132	2	1	.	7	.	.	4	.	.	.
Solanacea (e.g. tomatoes, peppers)	457	6	451	98.69 %	39	5	3	2	4	15	243	.	2	18	20	.	4	7	5	4	86
Fungi	94	9	85	90.43 %	1	91	.	.	.	2
Bulb vegetables	38	0	38	100.00 %	2	27	.	1	.	2	.	.	1	.	5	.
Tropical root and tuber vegetables	4	0	4	100.00 %	1	3
Other vegetable samples	1	0	1	100.00 %	.	.	1
Tropical and sub-tropical fruit	468	31	437	93.38 %	26	43	2	9	5	13	239	.	3	13	33	3	10	5	3	23	38
Table and wine grapes	288	9	279	96.88 %	6	6	253	1	.	7	8	2	4	.	1	.	.
Citrus fruit	371	26	345	92.99 %	37	25	3	10	2	13	186	1	.	.	62	6	.	7	8	11	.
Strawberries	212	0	212	100.00 %	9	2	196	.	.	.	1	1	.	1	.	2	.
Stone fruit	353	8	345	97.73 %	2	.	.	.	3	11	326	.	.	.	7	.	3	1	.	.	.
Pome fruit	392	14	378	96.43 %	28	20	3	4	4	9	220	.	1	1	9	4	.	4	11	16	58
Cane fruit, small fruit and berries	217	3	214	98.62 %	1	2	212	.	.	.	1	.	.	1	.	.	.
Other fruit and nuts samples	2	0	2	100.00 %	2
Table olives	1	0	1	100.00 %	1
Oilseeds and oilfruits	73	0	73	100.00 %	6	61	.	.	5	.	.	.	1	.	.	.

Annexes

Food group (Analysis level 2)	No Samples	No of samples above the LOQ ^(a)	ND	ND %	AT	BE	CY	CZ	FI	FR	DE	HU	IE	IT	NL	NO	PL	SK	ES	SE	UK
Pulses	23	1	22	95.65 %	3	19	1	.	.	.
Spices	14	0	14	100.00 %	1	11	.	.	.	2
Hops	5	0	5	100.00 %	5
Tea, coffee, herbal infusions and cocoa	31	0	31	100.00 %	3	23	.	.	.	5
Sugar plants	1	0	1	100.00 %	1
Eggs	4	0	4	100.00 %	4
Milk and milk products	329	90	239	72.64 %	.	24	3	.	18	.	213	.	17	22	23	.	.	4	.	5	.
Meat (swine, bovine, sheep, goat, poultry)	10	0	10	100.00 %	10
Baby food	133	14	119	89.47 %	71	.	40	.	22
Cereals	138	0	138	100.00 %	30	30	68	.	.	6	.	.	2	2	.	.	.
Other products (incl. not classified and animal feed)	35	3	32	91.43 %	.	.	.	4	1	30

(a): This table is a synthesis at sample level; as a consequence, the number of samples above the LOQ refers to the samples where at least one positive result was found.

Table 6: Number of analytical determinations per compound and frequency of positive detections.

QAC name	Obs ^(a)	% Obs ^(a)	No Positive detections	% detected	% non detected
DDAC	4862	24.6 %	191	3.9 %	96.1 %
BAC10-16	4053	20.5 %	140	3.5 %	96.6 %
BAC 12	2946	14.9 %	78	2.6 %	97.4 %
BAC 14	2946	14.9 %	52	1.8 %	98.2 %
BAC 16	2267	11.5 %	4	0.2 %	99.8 %
BAC 10	1185	6.0 %	0	0.0 %	100.0 %
BAC 18	1017	5.1 %	0	0.0 %	100.0 %
BAC (sum)	265	1.3 %	31	11.7 %	88.3 %
Quaternary Ammonium Compounds (QACs)	240	1.2 %	3	1.3 %	98.8 %
BAC8-18	10	0.1 %	0	0.0 %	100.0 %
Total Analytical Determinations	19791	100 %	499	2.5 %	97.5 %

(a): Obs: analytical determinations.

Table 7: Total number of analytical determinations and frequency of positive detections of BACs and DDAC

Food Group (Analysis level 2)	No Analytical determinations	No Detected	% detected
Milk and milk products	960	117	12 %
Leafy vegetables & fresh herbs	1829	107	6 %
Baby food	640	31	5 %
Other products (incl. not classified and animal feed)	211	8	4 %
Legume vegetables (fresh)	517	19	4 %
Fungi	252	9	4 %
Citrus fruit	1534	46	3 %
Tropical and subtropical fruit	1762	45	3 %
Pulses	85	2	2 %
Table and wine grapes	771	17	2 %
Root and tuber vegetables (except tropical)	773	12	2 %
Pome fruit	1503	23	2 %
Cucurbits	964	11	1 %
Brassica vegetables	772	8	1 %
Stone fruit	1174	12	1 %
Solanacea (e. g. tomatoes, peppers)	1904	17	1 %
Potatoes	1167	9	1 %
Cane fruit, small fruit and berries	772	5	1 %
Stem vegetables	274	1	0 %
Bulb vegetables	128	0	0 %
Cereals	486	0	0 %
Eggs	8	0	0 %
Fruits and nuts	10	0	0 %
Hops	10	0	0 %

Food Group (Analysis level 2)	No Analytical determinations	No Detected	% detected
Meat (swine, bovine, sheep, goat, poultry)	20	0	0 %
Oilseeds and oil fruits	207	0	0 %
Spices	38	0	0 %
Strawberries	700	0	0 %
Sugar plants	4	0	0 %
Sweet corn	207	0	0 %
Table olives	6	0	0 %
Tea, coffee, herbal infusions and cocoa	88	0	0 %
Tropical root and tuber vegetables	9	0	0 %
Vegetables	6	0	0 %
Grand Total	19791	499	2.5 %

Annexes

Table 8: Distribution of BACs and DDAC (mg/kg) by food category (Analysis level 1).

Food Category (Analysis level 1)	No Obs ^(d)	No Detected	Lower bound						Upper bound						
			min	mean	p95 ^(a)	p97.5 ^(b)	p99 ^(c)	max	min	mean	p95 ^(a)	p97.5 ^(b)	p99 ^(c)	max	
Fruits and nuts	BAC10-BAC16	1756	42	0.000	0.010	0.000	0.000	0.040	14.400	0.000	0.024	0.040	0.078	0.170	14.400
	DDAC	2109	56	0.000	0.003	0.000	0.010	0.085	0.950	0.002	0.017	0.050	0.050	0.100	0.950
Vegetables	BAC10-BAC16	1844	49	0.000	0.002	0.000	0.010	0.070	0.480	0.000	0.020	0.100	0.120	0.170	0.480
	DDAC	2025	51	0.000	0.002	0.000	0.009	0.041	0.920	0.002	0.016	0.050	0.050	0.100	0.920
Animal products	BAC10-BAC16	184	32	0.000	0.059	0.440	0.820		1.774	0.010	0.099	0.440	0.820		1.774
	DDAC	343	78	0.000	0.128	0.854	1.835	2.177	3.640	0.010	0.155	0.854	1.835	2.177	3.640
Baby food	BAC10-BAC16	75	14	0.000	0.008	0.049			0.131	0.010	0.017	0.049			0.131
	DDAC	117	4	0.000	0.002	0.000			0.120	0.010	0.012	0.010			0.120
Cereals	BAC10-BAC16	68	0	0.000	0.000	0.000			0.000	0.010	0.010	0.010			0.010
	DDAC	116	0	0.000	0.000	0.000			0.000	0.010	0.037	0.100			0.100
Other plant products	BAC10-BAC16	120	1	0.000	0.006	0.000			0.730	0.010	0.016	0.010			0.730
	DDAC	117	0	0.000	0.000	0.000			0.000	0.010	0.016	0.050			0.100
Other products (incl. not classified and animal feed)	BAC10-BAC16	6	2	0.000	0.015				0.062	0.008	0.021				0.062
	DDAC	35	2	0.000	0.002				0.069	0.002	0.011				0.069

(a): 95th percentile estimates are not shown with less than 60 observations as they may not be statistically robust (EFSA, 2011)

(b): 97.5th percentile estimates are not shown with less than 160 observations as they may not be statistically robust (EFSA, 2011)

(c): 99th percentile estimates are not shown with less than 300 observations as they may not be statistically robust (EFSA, 2011)

(d): Obs: analytical determinations.

Annexes

Table 9: Number of analytical determinations in milk and milk products. The “Milk product type” was identified on the basis of the reported ‘product name’, treatment and ‘prodtex’ (free text description of the food sample).

Food Item	Treatment	PRODTXT	Obs ^(a)	Milk product type
	Churning	BUTTER	30	Butter and other churned milk products
	Churning	DAIRY PRODUCTS CATTLE	10	Butter and other churned milk products
Dairy products Cattle	Processed	MRAZENÝ SMOTANOVÝ KRÉM COKOLÁDOVÝ S KÚSKAMI COKOLÁDY 1 LITER	6	Ice cream
	Processed	RUSKÁ ZMRZLINA OD MRAZIKA, MRAZENÝ SMOTANOVÝ KRÉM S OBLÁTKOU, 845 ML	6	Ice cream
Dairy products Goat	Unprocessed	DAIRY PRODUCTS CATTLE	2	Milk
	Churning	DAIRY PRODUCTS GOAT	16	Butter and other churned milk products
Dairy products Sheep	Churning	DAIRY PRODUCTS SHEEP	8	Butter and other churned milk products
	Churning	FORMAGGIO	16	Butter and other churned milk products
	Churning	MILK AND CREAM, NOT CONCENTRATED, NOR CONTAINING ADDED SUGAR OR SWEETENING MATTER, BUTTER AND OTHER FATS DERIVED FROM MILK, CHEESE AND CURD	44	Butter and other churned milk products
	Churning	PANNA PASTORIZZATA	4	Butter and other churned milk products
Milk and cream, not concentrated, nor containing added sugar or sweetening matter, butter and other fats derived from milk, cheese and curd	Milk pasteurisation	-	18	Milk
	Milk pasteurisation	LATTE PASTORIZZATO	20	Milk
	Milk pasteurisation	LATTE UHT	16	Milk
	Milk pasteurisation	MILK AND CREAM, NOT CONCENTRATED, NOR CONTAINING ADDED SUGAR OR SWEETENING MATTER, BUTTER AND OTHER FATS DERIVED FROM MILK, CHEESE AND CURD	138	Milk
	Milk pasteurisation	SMOTANA NA ŠLAHANIE, VYSOKOPASTERIZOVANÁ 33 %	6	Other processed milk products
	Milk pasteurisation	TORTOVÁ SMOTANA NA ŠLAHANIE 36 %	6	Other processed milk products
	Processed	ICE CREAM	346	Ice cream
	Processed	MILK AND CREAM, NOT CONCENTRATED, NOR CONTAINING ADDED SUGAR OR SWEETENING	126	Other processed milk products

Annexes

Food Item	Treatment	PRODTEXT	Obs ^(a)	Milk product type
	Unprocessed	MATTER, BUTTER AND OTHER FATS DERIVED FROM MILK, CHEESE AND CURD	36	Milk
	Unprocessed	MILK AND CREAM, NOT CONCENTRATED, NOR CONTAINING ADDED SUGAR OR SWEETENING MATTER, BUTTER AND OTHER FATS DERIVED FROM MILK, CHEESE AND CURD	106	Milk

(a): Obs: analytical determinations.

Table 10: Distribution of BACs and DDAC (mg/kg) by milk product type.

Milk product type (e)		No Obs ^(d)	No Detected	Lower bound					Upper bound					
				min	mean	p95 ^(a)	p97.5 ^(b)	p99 ^(c)	max	min	mean	p95 ^(a)	p97.5 ^(b)	p99 ^(c)
Butter and other churned milk products	BAC10-BAC16	18	7	0.000	0.215				1.100	0.010	0.221			1.100
	DDAC	48	14	0.000	0.008				0.120	0.010	0.019			0.120
Ice cream	BAC10-BAC16	151	24	0.000	0.046	0.240			1.774	0.010	0.093	0.240		1.774
	DDAC	197	62	0.000	0.221	1.830	2.100		3.640	0.010	0.259	1.830	2.100	3.640
Milk	BAC10-BAC16	1	1	0.074	0.074				0.074	0.074	0.074			0.074
	DDAC	64	1	0.000	0.000	0.000			0.029	0.010	0.010	0.010		0.029
Other processed milk products	DDAC	20	1	0.000	0.002				0.032	0.010	0.020			0.032

(a): 95th percentile estimates are not shown with less than 60 observations as they may not be statistically robust (EFSA, 2011)

(b): 97.5th percentile estimates are not shown with less than 160 observations as they may not be statistically robust (EFSA, 2011)

(c): 99th percentile estimates are not shown with less than 300 observations as they may not be statistically robust (EFSA, 2011)

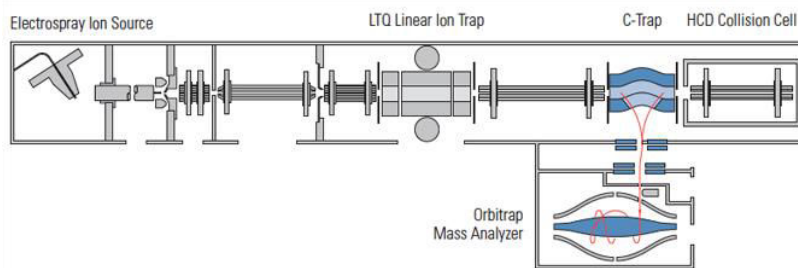
(d): Obs: analytical determinations.

(e): Categories defined in table 9.

Annexe 2

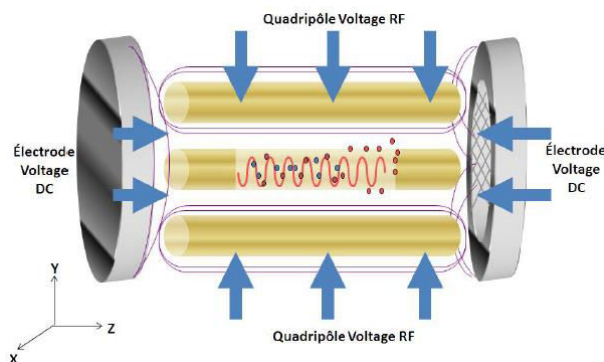
Technologie Orbitrap™ : Instrumentation

L'analyseur de masse à haute résolution à technologie hybride LTQ-Orbitrap™ est un système hybride composé d'un piège ionique linéaire (LTQ, de l'anglais « Linear Trap Quadrupole ») à basse résolution couplé à l'Orbitrap™, analyseur à haute résolution. Le LTQ-Orbitrap XL™ est composé de quatre principaux éléments repris sur la figure suivante : la trappe ou piège linéaire, la C-trap, une cellule de collision de haute énergie et l'Orbitrap™.

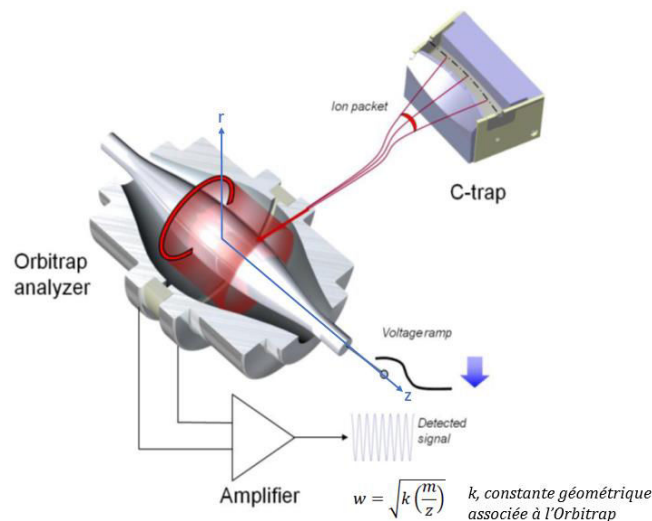


Les principaux éléments utilisés au cours de la thèse sont détaillés ci-dessous :

- 1) La **trappe linéaire 2D** est constituée de quatre barres d'un quadripôle fermé à ses extrémités par des électrodes d'entrée et de sortie permettant de repousser les ions vers l'intérieur du quadripôle. Pour ce faire, des tensions continues (positive ou négative) sont appliquées au niveau de ces électrodes pour piéger les ions. Ces derniers réalisent un mouvement d'allers-retours sur l'axe z, de manière synchronisée, entre les électrodes qui les repoussent. Par ailleurs, une tension en radiofréquence (RF) est appliquée aux 4 barres du quadripôle induisant un mouvement oscillatoire selon l'axe y. Deux types de pièges linéaires existent selon les constructeurs : (i) avec éjection radiale ou (ii) avec éjection axiale. La trappe à configuration en éjection axiale, où les ions sont expulsés suivant l'axe z, est généralement couplée avec d'autres analyseurs, tels que l'Orbitrap™, conçus pour la détection des ions.



- 2) La **C-trap** constitue le second élément sur le trajet des ions. A la sortie de la trappe linéaire, les ions traversent un octapole et sont ainsi amenés vers le C-trap situé en amont de l'OrbitrapTM. Cette trappe est un quadripôle qui a la particularité d'être courbé en forme de C, et qui piège les ions lorsqu'une tension radiofréquence (RF) est appliquée sur les barres du quadripôle. Suivant le mode d'acquisition choisie, les ions peuvent être rapidement expulsés, soit vers l'OrbitrapTM, soit vers la cellule de collision. Cette expulsion est réalisée lorsque la tension RF diminue et qu'une impulsion à haute tension DC est appliquée.
- 3) L'**OrbitrapTM** dont l'idée conceptuelle date des années 1960, a été réinventé en 2000 par Alexander Makarov puis commercialisé en 2005 sous le nom OrbitrapTM par ThermoFisher Scientific. L'OrbitrapTM est une alternative intéressante à l'analyseur FT-ICR (non détaillé) pour les approches non ciblées puisque ce spectromètre donne un accès à la haute résolution sans avoir recours à un champ électromagnétique intense. Il est constitué de deux électrodes coaxiales : la première se présente sous la forme d'un tonneau externe coupé en deux parties égales contenant la seconde électrode, centrale en forme de fuseau. L'électrode interne est mise sous tension par l'action d'un champ électrique quadri-logarithmique à haut voltage (3.5 kV) et un vide poussé (10^{-10} mbar) est réalisé. Les ions sont injectés, à une énergie de quelques keV, tangentiellement à l'électrode centrale par l'interstice, très étroit, séparant les deux moitiés de l'électrode externe, et oscillent en orbite de l'électrode centrale sous l'effet concomitant du champ électrique, de la force centrifuge et de la géométrie du piège. L'oscillation des ions résulte d'un mouvement radial autour de l'électrode et axial le long de l'axe z. Seule la fréquence d'oscillation axiale, qui dépend du rapport m/z de l'ion analysé, est exploitable pour une mesure de masse. Les ions, à leurs passages à proximité de la paroi de l'électrode externe, génèrent des courants induits, qui sont amplifiés et mesurés au cours du temps. La déconvolution des différentes fréquences d'oscillation axiale des ions est réalisée par une transformée de Fourier aboutissant à un spectre de fréquence, qui sera convertie en rapport m/z précis.



Ce type de spectromètre de masse hybride, LTQ-Orbitrap™, combine les nombreux avantages de la trappe linéaire (haute sensibilité, gamme dynamique élevée, temps de cycle rapide, et la capacité de réaliser des analyses MSⁿ), avec ceux de l'Orbitrap™ (haute précision en masse et haute résolution) ; ce qui en fera un outil de choix dans le cadre de notre étude, en approche non ciblée.

Annexe 3

Liste des valorisations et formations suivies

PUBLICATIONS

Slimani K., Féret A., Pirotais Y., Maris P., Abjean JP., Hurtaud-Pessel D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for the analysis of quaternary ammonium compounds in cheese and milk products: Development and validation using the total error approach, J Chromatogr A. 2017 Sep 29;1517:86-96. doi: 10.1016/j.chroma.2017.08.034

Slimani K., Pirotais Y., Maris P., Abjean JP., Hurtaud-Pessel D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1,3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products, Food Chemistry (en révision).

POSTERS

Kahina Slimani, Aurélie Féret, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean and Dominique Hurtaud-Pessel. A Quantitative Determination Method for the Analysis of Quaternary Ammonium Compounds Residues in Dairy Products by HPLC-MS/MS. Food Factory – Octobre 2016 – Laval (France)

Kahina Slimani, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel. Development and validation of an analytical residues method of the Aminopropyl dodecylpropanediamine biocide disinfectant in dairy products by LC-MS/MS. HPLC2017 – Juin 2017 – Prague (Republique Tchèque).

COMMUNICATIONS ORALES

Kahina Slimani, Aurélie Féret, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel. A Quantitative Determination Method for the Analysis of Quaternary Ammonium Compounds Residues in Dairy Products by HPLC-MS/MS. XXI^{èmes} rencontres du club jeune de la SFSM – Mars 2016 – Moustiers Sainte Marie (France).

Kahina Slimani, Aurélie Féret, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel. A Quantitative Determination Method for the Analysis of Quaternary Ammonium Compounds Residues in Dairy Products by HPLC-MS/MS. 12th annual LC-MS/MS workshop on environmental applications and food safety – Juillet 2016 – Barcelone (Espagne).

Kahina Slimani, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel. Développement d'une méthode d'analyse des résidus de l'aminopropyldodécylpropanediamine dans les produits laitiers par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Journée des Doctorants et Post-doctorants ANSES – Octobre 2016 – Maisons-Alfort (France).

Kahina Slimani, Yvette Pirotais, Pierre Maris, Jean-Pierre Abjean, Dominique Hurtaud-Pessel. Development and validation of an analytical residues method of the Aminopropyldodecylpropanediamine biocide désinfectant in dairy products by LC-MS/MS. HPLC2017 – Juin 2017 – Prague (Republique Tchèque).

COMMUNICATIONS ORALES DANS LE CADRE DE COLLABORATION

Pirotais Y., Slimani K., Moreau M.H., Lancien P., Soumet C., Maris P., Abjean J.P., Pessel D. LC-MS/MS détermination of residues of biocidal désinfectants products on Food contact materials. Effect of food simulating agents on the persistence of residues on the surface. 12th annual LC-MS/MS workshop on environmental applications and food safety – Juillet 2016 – Barcelone (Espagne).

Pirotais Y., Slimani K., Moreau M.H., Lancien P., Soumet C., Maris P., Abjean J.P., Pessel D. LC-MS/MS détermination of residues of biocidal désinfectants products on Food contact materials. Effect of food simulating agents on the persistence of residues on the surface. Food Factory – Octobre 2016 – Laval (France)

ENCADREMENTS

Camille Repessé, Stagiaire de 1ère Année de BTS Génie Chimique (Mai-Juin 2015)

FORMATIONS SUIVIES

Doctoriales 2015 – Université de Rennes 1.

Communication Scientifique en anglais et français – Université de Rennes 1.

Formations en statistiques sous le logiciel R – Université de Rennes 1.

Cours de spectrométrie de masse – RCJMS 2016 – Moustiers Sainte Marie.

Short Course Metabolomique et Lipidomique – HPLC2017 – Prague.

VISITE D'ENTREPRISE

Compagnie des Fromages et Richemont – Doucey (50)

Le travail de thèse décrit dans ce manuscrit porte sur l'étude de la présence de biocides désinfectants dans les produits laitiers et sur l'impact des procédés de transformation du lait sur l'apparition de produits néoformés. Les biocides désinfectants sont des composés chimiques utilisés quotidiennement en industrie laitière lors des procédures de nettoyage-désinfection (ND) des surfaces en contact avec les aliments. Les ammoniums quaternaires de type chlorure de Benzalkonium (BACs) et chlorure de dialkyldiméthylammonium (DDACs), et l'Aminopropyldodécylpropane diamine sont les désinfectants les plus largement utilisés en industrie laitière. Ces biocides peuvent entraîner des résidus sur les surfaces alimentaires, ce qui présente un risque pour la santé du consommateur.

Dans le but de mesurer l'exposition des consommateurs, deux méthodes analytiques fiables ont été développées pour l'analyse de ces substances dans les produits laitiers impliquant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Le lait cru de vache, la poudre de lait entier, les fromages à pâte pressée cuite et les fromages fondus ont été sélectionnés pour représenter la diversité des produits laitiers. L'évaluation des performances de chacune des méthodes a été réalisée par une approche globale basée sur le profil d'exactitude. Pour la plupart des composés et des matrices étudiés, les méthodes d'analyse ont été validées sur l'intervalle de dosage de 5 à 150 µg / kg.

Pour répondre au questionnement de l'impact des procédés de transformation du lait sur les résidus de biocides désinfectants, l'évolution des teneurs en composés et leur devenir dans les différentes matrices issues du lait ont été étudiées. Pour cela, deux études de faisabilité mettant en œuvre des comparaisons d'empreintes chimiques globales, acquises par spectrométrie de masse à haute résolution, de fromages fondus et de fromages à pâte cuite (contaminés vs témoins) ont été réalisées. Ces études ont permis de détecter 4 ions discriminants liés à la présence de biocides dans le fromage fondu. Leur identification reste à réaliser.

Tout ce travail a été réalisé à des fins de sécurité alimentaire. La première partie est à l'élaboration de méthodes analytiques ciblées pour les résidus de biocides dans le lait et les produits laitiers permettant ainsi de mesurer les résidus de biocides sur les denrées alimentaires. Ces mesures sont nécessaires pour effectuer une analyse du risque liée à ces résidus. La deuxième partie est en relation avec la question du comportement des résidus de biocides lors de la transformation du lait présentant la stratégie, les résultats que nous pourrions obtenir et la perspective de travaux futurs.

Mots-clés

Biocides désinfectants, sécurité alimentaire, mesure de l'exposition des consommateurs, approche ciblée et non ciblée, produits néoformés

The thesis work focuses on the presence of disinfectants biocides in dairy products and on the impact of milk processing on the possible appearance of process-induced food contaminants related to the exposition of milk with biocides. Disinfectants biocides are chemicals daily used in the dairy industry in cleaning-disinfection (CD) processes of food contact surfaces. Quaternary ammoniums as benzalkonium chloride (BACs) and dialkyldimethylammonium chloride (DDACs), and the Aminopropyl dodecylpropane diamine are the most widely used disinfectants in dairy industry. These biocides can lead residues on the surfaces of food contact materials therefore present a health risk for the consumer.

With aim of measuring consumers exposure, two reliable analytical methods have been developed for the analysis of these substances in dairy products involving liquid chromatography hyphenated with tandem mass spectrometry. Raw cow's milk, whole milk powder, hard pressed and processed cheeses were selected as representing the diversity of dairy products. The evaluation of the performances of each of the methods was carried out by the global approach based on the accuracy profile. For most of compounds and matrices studied, analytical methods were validated within the range of 5 to 150 µg/kg.

To answer to the questioning of the impact of milk processes on biocides disinfectants residues, the evolution of compounds contents and their fate in the various matrices resulting from the milk were studied. For this, two proof-of-concept studies implementing global chemical fingerprint comparisons, acquired by High Resolution Mass Spectrometry, of processed cheese and hard pressed cheese (contaminated vs control) samples were carried out. These studies allowed to detect 4 discriminant ions linked to the presence of biocides in processed cheese. Their identification remains to be done.

Whole this work is related for food safety purposes. The first part was linked to elaborate targeted analytical methods for biocides residues in milk and milk products thus allowing the measurement of biocides residues on food. These measurements are necessary for the risk analysis linked to these residues. The second part is in relation with the question of the behavior of biocides residues within milk processing presenting the strategy, the results we could obtain and the perspective for future works.

Keywords

Disinfectants biocides; food safety, measuring consumers exposure, targeted and untargeted approach, process-induced food contaminants