HAL
open science

Développements méthodologiques autour du couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse, pour la quantification de composés vétérinaires présents à l'état de traces dans des matrices complexes environnementales

Alexandre Guironnet

To cite this version:

Alexandre Guironnet. Développements méthodologiques autour du couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse, pour la quantification de composés vétérinaires présents à l'état de traces dans des matrices complexes environnementales. Chimie analytique. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1287 . tel-03716251

HAL Id: tel-03716251

https://theses.hal.science/tel-03716251v1

Submitted on 7 Jul 2022

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

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

N°d'ordre NNT : 2021LYSE1287

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206

Ecole Doctorale de Chimie

Spécialité de doctorat : Chimie Analytique

Soutenue publiquement le 14 décembre 2021, par :

Alexandre GUIRONNET

Développements méthodologiques autour du couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse, pour la quantification de composés vétérinaires présents à l'état de traces dans des matrices complexes environnementales

---

Devant le jury composé de :

Léonard Didier	Professeur, Université Lyon 1	Président du Jury
Koltalo Florence	MCF, Université de Rouen-Normandie	Rapporteure
Millet Maurice	Professeur, Université de Strasbourg	Rapporteur
Casellas Magali	MCF, Université de Limoges	Examinatrice
Patureau Dominique	DR INRAE Narbonne	Examinatrice
Vulliet Emmanuelle	DR CNRS, Université Lyon 1	Directrice de thèse
Wiest Laure	IR CNRS, Université Lyon 1	Co-encadrante

Travail réalisé au sein de l'Institut des Sciences Analytiques (ISA) – UMR 5280

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Petru MIRONESCU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Education	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Développements méthodologiques autour du couplage chromatographie liquide-spectrométrie de masse, pour la quantification de composés vétérinaires présents à l'état de traces dans des matrices complexes environnementales

Mots-clés : Antibiotiques, Aminoglycosides, Bêta-lactames, LC-MS/MS, Quantification, Boues de STEP, Eaux usées

Résumé :

Lors de la prise d'antibiotiques aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, les différents principes actifs ne sont que peu assimilés et sont alors excrétés tels quels. Ils rejoignent ensuite l'environnement, notamment par le biais d'épandage comme engrais des boues issues des stations d'épuration (STEP) et des effluents agricoles dans les champs. La présence de ces antibiotiques dans l'environnement peut alors se propager dans les sols et dans les eaux de rivières et causer des phénomènes d'antibiorésistance. Il est donc nécessaire de pouvoir évaluer leur présence aussi bien dans les matrices aqueuses que solides environnementales. Alors qu'ils font partie des antibiotiques les plus utilisés, les familles des aminoglycosides et des bêta-lactames sont peu analysées dans les matrices environnementales. Les aminoglycosides étant des molécules ultra-polaires, ils ne sont pas chromatographiquement retenus avec des conditions classiques en phase inverse. Les bêta-lactames, quant à eux, sont hautement dégradables dans l'environnement et des méthodes suffisamment sensibles et spécifiques sont donc nécessaires. Enfin, afin d'obtenir une vision plus globale de la contamination d'un milieu, il est important de développer des méthodes de criblage, permettant d'élargir le spectre de molécules recherchées.

Dans le cadre de cette thèse, différentes méthodes d'analyse basées sur la chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) ont été développées. Une première méthode d'appariement d'ions a été mise au point pour l'analyse des aminoglycosides dans des intrants et effluents de STEP. Grâce à l'optimisation des sels d'appariement, des limites de quantification (LOQ) entre 0,7 $ng.mL^{-1}$ et 465 $ng.mL^{-1}$ ont été atteintes. Concernant les bêta-lactames, une extraction basée sur la méthodologie QuEChERS a été optimisée. L'ajout d'une étape de dispersion a augmenté les rendements d'extraction, conduisant à des LOQ entre 2,4 $ng.g^{-1}$ et 17,4 $ng.g^{-1}$. Une méthode d'analyse par LC-MS/MS/MS (MRM^3) a également été développée afin de permettre un gain en sensibilité et en spécificité lors de l'analyse d'extraits de matrices fortement chargées en matière organique telles que les boues et d'abaisser les LOQ. Enfin, une méthode d'analyse par criblage de suspects (MS/MS et HRMS) de différentes familles de composés vétérinaires a été mise en place, permettant de détecter 16 substances et produits de dégradation dans des boues, lisiers et fumiers bovins.

Methodological developments based on liquid chromatography-mass spectrometry coupling, for the quantification of veterinary pharmaceuticals present at trace levels in complex environmental matrices

Keywords: Antibiotics, Aminoglycosides, Beta-lactams, LC-MS/MS, Quantification, Wastewater, Sludge

Abstract:

When antibiotics are used in human and veterinary medicine, the active ingredients are only slightly assimilated and are excreted unchanged. They are then released into the environment, principally through the spreading of wastewater treatment plant (WWTP) sludge and agricultural effluents on the fields. These antibiotics can spread in the soil and river water, causing antibioresistance. It is therefore necessary to evaluate their presence in both aqueous and solid environmental matrices. Although they are amongst the most widely used antibiotics, aminoglycosides and beta-lactams families are rarely analysed in environmental matrices. Aminoglycosides being ultra-polar molecules, are not chromatographically retained with classical reverse phase conditions. Beta-lactams are highly degradable in the environment and sufficiently sensitive and specific methods are necessary. Finally, to achieve a more global vision of the contamination of an environment, it is important to develop screening methods, allowing to widen the scope of searched molecules.

Within the framework of this thesis, different analytical methods based on liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS) have been developed. A first ion-pairing method was developed for aminoglycosides analysis in WWTP inputs and effluents. By optimizing the pairing salts, limits of quantification (LOQ) between 0.7 $ng.mL^{-1}$ and 465 $ng.mL^{-1}$ were achieved. For beta-lactams, an extraction based on the QuEChERS methodology was optimised. The addition of a dispersion step increased the extraction yields, leading to LOQs between 2.4 $ng.g^{-1}$ and 17.4 $ng.g^{-1}$. An LC-MS/MS/MS (MRM^3) analytical method was also developed to increase sensitivity and specificity when analysing extracts from matrices highly loaded with organic matter, such as sludge, to lower LOQs. Finally, an analytical method by suspect screening (MS/MS and HRMS) of different families of veterinary compounds has been set up, allowing the detection of 16 substances and degradation products in sludge, slurry, and cattle manure.

Remerciements

Ce manuscrit de thèse représente l'achèvement de trois ans passionnants et enrichissants aussi bien sur des aspects scientifiques que sociaux. Je tiens ainsi à remercier l'ensemble des personnes ayant participé à cette thèse.

Tout d'abord , je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à Florence Koltalo et à Maurice Millet pour avoir rapporté ce manuscrit. Merci également à Magali Casselas, Dominique Patureau et Didier Léonard pour avoir examiné mes travaux. Merci à tous pour vos questions et commentaires , générateurs de discussions fortement intéressantes lors de ma soutenance de thèse.

Je souhaite ensuite à remercier grandement Emmanuelle Vulliet, ma directrice de thèse, et Laure Wiest, qui m'ont encadré et supporté au quotidien pendant ces trois ans. Merci à toutes les deux pour l'ensemble des connaissances et conseils partagés au cours de l'ensemble des travaux, ainsi que de la confiance que vous m'avez accordée pour tester tous azimuts , que vous soyez au courant avant ou après !! Finalement, après trois ans passés avec les « boulets de l'analyse», c'est (presque) du gâteau !

Manue, merci de m'avoir permis de travailler dans l'équipe TRACES, avec un parc analytique conséquent dans un cadre agréable mais rigoureux, nécessaire pour mener à bien aussi bien la partie expérimentale que la partie rédaction, non sans difficultés !

Laure, merci pour ta bonne humeur imperturbable et ta disponibilité au quotidien pour répondre à toutes les questions qui me passaient par la tête tous les jours. Sans ça, ces 3 ans auraient certainement été très différents !

Ensuite , un immense merci à tous les membres de l'équipe TRACES : Aurélie, Barbara, Emmanuelle L, Emmanuelle V, Florent, Gaëlle, Laura, Laure, Lucie, Rachel, Vincent, et toutes les personnes qui ont été présentes dans l'équipe au cours de ces trois ans. Merci pour la bonne ambiance au quotidien et l'ensemble des conversations qui ont pu faire évoluer mes réflexions . Mais surtout merci de m'avoir fait confiance et me permettre de tester mes idées (même les plus folles) sur l'ensemble des différents appareils, même lorsqu'ils viennent juste d'être installés. Et oui, j'ai réussi mon pari de tous les utiliser au moins une fois ! Bon, promis, un jour j'arriverai à lancer une séquence sur le Xevo tout seul sans aucun problème…

Merci également à l'ensemble des partenaires du projet RISMEAU. J'ai beaucoup apprécié nos discussions lors des différentes rencontres et réunions sur le terrain ou en visioconférence, qui m'ont permis d'avoir un aperçu d'autres domaines que celui de la chimie analytique.

A coté du travail, je tiens à remercier l'ensemble de la team Café 1er : Anthony, Aurélien, Erik, Julien, Marie H, Marie M, Patrick, Xavier, pour les moments de convivialité passés autour d'un café, à la cantine ,d'un verre à la sortie du labo. Ce sont des moments comme ceux-là qui permettent de se changer les idées de temps en temps, tout en en générant des nouvelles

Après le boulot , merci à tous mes amis, et en particulier à la coloc des Galipotes , Nono et Max , pour l'ensemble des activités, des soirées, weekends et même de la vie au quotidien ! C'est autour d'une bière, d'un resto , d'une soirée pizza-switch, d'un escape game ou toute autre activité que la pression peut retomber, pour évacuer le stress et se changer les idées après des longues journées de travail ces dernières années !

Enfin, merci à ma famille, Papa, Maman, Alban, Antoine et tous les autres qui ,entre deux « alors, tu trouves ? » ; « alors ça avance ? » ou encore « mais en fait , tu fais quoi ? », m'ont toujours soutenu et supporté au cours de ces trois ans.

Liste des communications

Publications

Guironnet A, Sanchez-Cid C, Vogel T M, Wiest L, Vulliet E, Aminoglycosides analysis optimization using Ion pairing Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry and application on wastewater samples, *Journal of Chromatography A* (2021) (https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462133)

Guironnet A, Wiest L, Vulliet E, Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC- MS/MS, Talanta (2021), (https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122923)

Guironnet A, Wiest L, Vulliet E, Advantages of MS/MS/MS (MRM^3) vs Classic MRM quantification: Analysis of Beta-lactams in WWTP sludge, *Analytica Chimica Acta*, **Soumise**

Sanchez-Cid C, Guironnet A, Wiest L, Vulliet E, Vogel T M, Gentamicin adsorption onto soil particles prevents it from having overall short-term effects on the soil microbiome and resistome, Antibiotics 10 (2021) 191 (https://doi.org/10.3390/antibiotics10020191) Special issue : "The Distribution of Antibiotic Resistance in Terrestrial Ecosystems"

Sanchez-Cid C, Guironnet A, Keuschnig C, Wiest L, Vulliet E, Zang T, Vogel T M, Gentamicin at sub-inhibitory concentrations selects for antibiotic resistance in the environment, *ISME Journal*, **Soumise**

Communications orales

Guironnet A, Wiest L, Vulliet E, Quantification d'antibiotiques et de biocides dans l'environnement, matrices solides complexes : Boues de STEP, Lisier, Fumier, Journée de l'AFSEP, Club Lyonnais de Chromatographie, en ligne, 1er juillet 2021

Guironnet A, Wiest L, Vulliet E**,** In vial Ion Pairing Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry for Aminoglycosides analysis and application to wastewater samples, JFSM 2021, journées virtuelles du 14 au 24 juin 2021

Sanchez-Cid C, Guironnet A, Franqueville L, Wiest L, Vulliet E, Vogel T, Environmental resistome transcriptional response to gentamicin pollution at sub-inhibitory concentrations, 8th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment (ARAE), Tours, 1-3 juillet 2019

Communications par affiche

Sanchez-Cid C, Guironnet A, Franqueville L, Wiest L, Vulliet E, Vogel T, Environmental resistome transcriptional response to gentamicin pollution, 5th International Symposium on the Environmental Dimension of Antibiotic Resistance, Hong Kong, 9-14 juin2019

Guironnet A, Sanchez-Cid-Torres C, Vogel T, Wiest L, Vulliet E, Optimization of polar antibiotics analysis by Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry, Congrès SMAP Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique, Strasbourg 16-19 septembre 2019

Guironnet A, Wiest L, Vulliet E**,** Quantification of beta-lactams by Liquid Chromatography – cubed MS (MRM3) in environmental complex matrices, JFSM 2021, journées virtuelles du 14 au 24 juin 2021

Table des matières

Liste des communications 11

Table des matières 13

Liste des figures 18

Liste des tableaux 21

Liste des abréviations 24

Introduction Générale 25

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique 30

I. Les antibiotiques vétérinaires 31

1. Généralités 31

i. Les grandes familles d'antibiotiques 31

ii. Evolution de la consommation 33

iii. Antibiorésistance : Les plans Ecoantibio 1 et 2 36

2. Les aminoglycosides 37

i. Propriétés physicochimiques 38

ii. Spectre et mode d'action 39

iii. Présence dans l'environnement 39

3. Les bêta-lactames 41

i. Caractéristiques physicochimiques 41

ii. Spectre et Mode d'action 43

iii. Présence dans l'environnement 44

iv. Dégradation 45

v. Adsorption 46

II. Les différents types d'effluents 47

1. Effluents de station d'épuration 47

i. Traitements primaires 47

ii. Traitement secondaire 47

iii. Traitement des boues 48

2. Effluents d'élevage et problématique d'épandage sur les sols agricoles 49

III. Les méthodes d'analyse des antibiotiques dans les matrices environnementales complexes 50

1. Extraction 50

i. Extractions de matrices liquides 51

ii. Extraction de matrices solides 59

2. Séparation par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC) 66

i. Séparation en phase inverse (RP-LC) 66

ii. Chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC) 67

iii. Autres types de chromatographie liquide 67

3. Analyse 68

i. Analyses ciblées 68

ii. Analyses non ciblées et criblage de suspects 71

IV. Objectifs de la thèse 74

Chapitre 2 : Développement d'une méthode d'analyse par chromatographie d'appariement d'ions couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour la quantification d'aminoglycosides dans l'environnement 76

I. Introduction 77

II. Analyse des aminoglycosides dans des eaux 77

Article 1: Aminoglycosides analysis optimization using Ion pairing Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry and application on wastewater samples 79

III. Analyse des aminoglycosides dans des matrices solides 103

IV. Perspectives d'analyses 106

V. Conclusion 108

Chapitre 3 : Développement d'une méthode d'extraction et d'analyse pour la quantification de bêta-lactames dans des boues de station d'épuration 110

I. Introduction 111

II. Résumé des principaux résultats 111

Article 2: Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC-MS/MS 113

III. Perspectives 141

Chapitre 4 : Apports de la MRM³ pour la quantification d'antibiotiques dans des matrices complexes : Application à l'analyse des bêta-lactames dans les boues de STEP 142

I. Introduction 143

II. Résumé des principaux résultats 143

Article 3: Advantages of MS/MS/MS (MRM³) vs classic MRM quantification for complex environmental matrices: Analysis of Beta-lactams in WWTP Sludge 145

III. Perspectives 170

Chapitre 5 : Quantification d'antibiotiques dans des matrices solides environnementales après criblage de suspects 172

I. Introduction 173

II. Matériel et méthodes 174

1. Standards et réactifs 174

2. Prélèvements et préparation des échantillons 174

3. Criblage de suspects 174

i. Extractions 175

ii. Analyses 175

4. Analyse ciblée 178

i. Extraction 178

ii. Analyse 179

III. Résultats et discussion 179

1. Criblage de suspects et établissement de liste de molécules 179

2. Analyse ciblée et quantification 184

i. Développement de la méthode d'analyse 184

ii. Développement de la méthode d'extraction 187

3. Application 193

IV. Conclusion 195

V. Perspectives 196

Conclusion générale 197

Bibliographie 199

Annexes 221

Annexe A : rendements des composés obtenus par extraction QuEChERS suite au criblage de suspects 221

Annexe B : Paramètres de spectrométrie de masse des composés sélectionnés par criblage de suspects 222

Annexe C: Exemple de chromatogramme obtenu en mode positif lors de l'analyse ciblée résultante du criblage de suspects 225

Liste des figures

Figure 1 : Descriptif du projet RISMEAU, source : Site internet du GRAIE 27
Figure 2 : Consommation d'antibiotiques vétérinaires en Europe en 2017. La France est représentée en orange (68,8 mg/PCU) 34
Figure 3 : Evolution de la consommation d'antibiotiques vétérinaires entre 2005 et 2018 en France 36
Figure 4 : Structure des aminoglycosides analysés dans cette thèse 38
Figure 5 : Différences des noyaux constituant des pénicillines (a) et des céphalosporines (b) 41
Figure 6 : Structures des bêta-lactames étudiés dans cette thèse 42
Figure 7 : Schéma du devenir des antibiotiques après un épandage de MAFORs sur les sols (Goulas, 2016) 50
Figure 8 : Résumé des différentes étapes d'une extraction SPE (cas où les analytes sont retenus sur la phase adsorbante) 54
Figure 9 : Principe de fonctionnement de l'extraction par SBSE 55
Figure 10 : Principe de fonctionnement de l'extraction MSPE (adaptée de Safarik *et al*., 2012) 57
Figure 11 : Schéma du montage de l'extraction PLE (adapté de Lundstedt, 2003) 62
Figure 12 : Schéma de fonctionnement d'un triple quadripole en mode MRM, adapté de (Boja and Rodriguez, 2011) 69
Figure 13 : Schéma de fonctionnement de l'acquisition par MRM^3 (source : Sciex®) 69
Figure 14 : Description des niveaux de confirmation des données en HRMS proposés par Soulier *et al*. (2021) 72
Figure 15:Principe de fonctionnement de la SPE MIP (adapté de Sigma Aldrich) 107
Figure 16 : Gains et pertes d'aires suivant le sel d'ammonium ajouté à la phase aqueuse à 10 mM par rapport à l'ajout d'acide formique seul 185
Figure 17 : Aires normalisées en fonction de la phase organique employée 186
Figure 18 : Facteur de gain mesuré en passant de 10 mM à 1 mM de sels d'ammonium dans les phases mobiles 187
Figure 19 : Aires normalisées de différentes molécules en fonction du kit d'extraction QuEChERS utilisé (5 mL H_2O+0,1M EDTA, 10 mL ACN) 188
Figure 20 : Aire normalisée en fonction de la phase aqueuse employée 189
Figure 21 ; Aires normalisées (%) en fonction du volume de phase aqueuse utilisée lors de l'extraction 190

Figure 22 : Aires normalisées (%) en fonction du volume d'acétonitrile ajouté lors de l'extraction 190
Figure 23 : Aires normalisées (%) en fonction de la phase où est additionné l'acide acétique 191

Article 1: Aminoglycosides analysis optimization using Ion pairing Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry and application on wastewater samples

Figure 1: Comparison of the LC-MS/MS signals of GEN C1, GEN C1A and GEN C2 solutions at 200 ng.mL-1, left for 24h at 4°C in PP or glass vials (n = 3)..... 86
Figure 2: Evolution of retention factor k for the aminoglycosides SPEC, KAN, and NEO as a function of the ion pair carbon chain lengths……87

Figure 3: Evolution of retention factors k with proportion of heptanesulfonate in vial….....89

Figure 5: Evaluation of matrix effects for aminoglycosides in river water (calibration curve : LOQ-50*LOQ)..... 94

Article 2: Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC-MS/MS

Figure 1 : Recoveries with 4 different QuEChERS Extraction kits (1 g sludge, extraction with 5 mL H_2O and 10 mL ACN) 121
Figure 2 : Recoveries (A) and matrix effects (B) obtained with or without EDTA-treated sand as dispersive agent (500 mg sludge; extraction solvent: 5 mL H_2O and 10 mL ACN; mass ratio sludge/sand)..... 123
Figure 3 : Normalized area obtained for the extraction of the analytes with various sludge/sand ratio (500 mg sludge; extraction solvent: 5 mL H_2O and 10 mL ACN). 124
Figure 4 : Normalized area obtained for the extraction of the analytes, as a function of the addition of EDTA and formic acid (FA) in the aqueous phase: (500 mg sludge, 5 mL aqueous phase, 10 mL ACN) 125
Figure 5 : Matrix effects (A) and SPE pass-through recoveries (B) obtained with or without the SPE pass-through clean up 127

Article 3: Advantages of MS/MS/MS (MRM3) vs classic MRM quantification for complex environmental matrices: Analysis of Beta-lactams in WWTP Sludge

Figure 1 : Repartition of the second-generation fragments with the modification of the applied AF2 energy (25 ms frag., dynamic LIT time, no Q0) 151
Figure 2 : CEF fragmentation pattern in MRM^3 acquisition, Structure proposals from Metfrag (https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/) 152
Figure 3: Repartition between 1st generation and 2nd generation fragments as a function of the excitation time (AF2=0.1V, Dynamic LIT time) 153
Figure 4 :Signal increase noted for the second generation fragment with the accumulation time increase (AF2=0.1V, 25 ms excitation time) 154
Figure 5: Enhancement with Q0 trapping enabled 155
Figure 6: Comparison of MRM and MRM^3 calibration curves of Ceftiofur in sludge extracts 160
Figure 7 : Extracted chromatogram of D5-Ampicillin in sludge extract: a) MRM transition, b) MRM^3 transition 161

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples de molécules correspondant à chaque grande famille d'antibiotiques vétérinaires, avec quelques propriétés physicochimiques (PubChem, 2020) 32

Tableau 2 : Exemple de poids utilisés dans le calcul de la PCU (ESVAC) 33

Tableau 3 : Exemples des MRL pour quelques aminoglycosides et bêta-lactames (ESVAC 2019)..... 35

Tableau 4 : Quelques propriétés physicochimiques des aminoglycosides..... 39

Tableau 5 : Propriétés physicochimiques des bêta-lactames (PubChem 2020) 43

Tableau 6 : Exemple de bêta-lactames retrouvés dans des matrices aqueuses 44

Tableau 7 : Temps de demi-vie des bêta-lactames recensés dans la littérature 46

Tableau 8 : Exemples de composés extraits par SPE..... 52

Tableau 9 : Exemples de méthodes SPME pour l'analyse des aminoglycosides..... 55

Tableau 10 : Exemples d'extraction de divers composés dans des matrices aqueuses par SBSE 56

Tableau 11 : Exemples d'extractions MSPE d'antibiotiques dans des matrices aqueuses environnementales..... 58

Tableau 12 : Exemple d'extractions UAE pour l'analyse des antibiotiques dans des matrices solides environnementales..... 60

Tableau 13 : Exemples d'extractions par micro-ondes dans des matrices solides..... 61

Tableau 14 : Exemples d'extraction d'antibiotiques par PLE..... 63

Tableau 15 : Exemples de quelques composés extraits par la méthode QuEChERS..... 65

Tableau 16: Compilation des rendements obtenus avec des méthodes « douces » d'extractions pour les aminoglycosides 104

Tableau 17 : Gradient utilisé dans la méthode Quanpédia..... 176

Tableau 18 : Paramètres de source Xevo Quanpédia..... 176

Tableau 19: Gradient d'élution utilise pour le criblage TASQ en mode positif et en mode négatif 177

Tableau 20 : Liste initiale de composés sélectionnés suite au criblage de suspects 181

Tableau 21 : Liste finale des composés sélectionnés dans le cadre de l'étude (noms et formules brutes) 183

Tableau 22 : Exemple de limites de quantification atteintes dans des boues de STEP avec des méthodes multi résidus 192

Tableau 23 : Limites de détection et quantification et concentrations dans les MAFORs 194

Article 1: Aminoglycosides analysis optimization using Ion pairing Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry and application on wastewater samples

Table 1: Validation results: Linearity and reproducibility at 3 different levels (a: intraday n=3; b: interday n=3 days) 91

Table 2: Quantification limits obtained in different environmental matrices 92

Table 3: Quantification of Aminoglycosides in spiked raw and treated wastewater (n=3) 95

Article 2: Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC-MS/MS

Table 1 : Overall beta-lactams extraction efficiency at three different concentrations..... 129

Table 2 : Method validation results (linearity, LOQs, and precision at 3 different concentrations (a: intraday n=4; b: interday n=5 days)) 130

Table 3 : Literature comparison for the determination of beta-lactams in solid environmental matrices 131

Table 4 : Application on 8 WWTP sludges, not spiked (concentrations in $ng.g^{-1}$ (%RSD)) and spiked at 100 ng.g-1 (accuracy percentage (%RSD)) 133

Article 3: Advantages of MS/MS/MS (MRM3) vs classic MRM quantification for complex environmental matrices: Analysis of Beta-lactams in WWTP Sludge

Table 1 : Overall optimisation gains in MRM^3infusion acquisition 156
Table 2: Method validation results in LC-MRM^3 mode: linearity, LOQs, and precision at 3 different concentrations (a: intraday n=4; b: interday n=5 days) 158
Table 3 : Sensitivity gain (computed with slopes ratio between MRM^3 and MRM) in LC-MRM^3 mode for both solvent and sludge extract..... 159

Liste des abréviations

AA : Acide Acétique

AF / FA : Acide Formique/ Formic acid

ACN: Acetonitrile

ANSES: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AOAC: Association of Official Agricultural Chemists

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

EMA: European Medicine Agency

ESVAC: European Surveillance of Veterinary antimicrobial consumption

HF: Acide fluorhydrique

(U)HPLC: (Ultra) High Performance Liquid Chromatography

IS: Internal Standard

MeOH: Methanol

sMRM: (scheduled) Multiple Reaction Monitoring

MRM^3: Multiple Reaction Monitoring cubed

MS/MS: Tandem Mass Spectrometry

NH_4F: Fluorure d'ammonium

NH_4OAc: Acetate d'ammonium

NH_4OFA : Formate d'ammonium

PT : Produit de transformation

QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe

RPM: Rotations Par Minute

TASQ: Target Analysis for Screening and Quantification

Introduction Générale

Les Matrices Fertilisantes d'Origine Résiduaire (MAFORs) proviennent majoritairement d'effluents d'élevages, suivis par les boues de station d'épuration (STEP) urbaines et industrielles, et par les biodéchets (composts, digestats de méthanisation, résidus de pyrolyse de déchets). En France, la valorisation des MAFORs en épandage compte pour environ 73% de la production, le reste étant majoritairement mis en décharge ou incinéré (INRA, IRSTEA (regroupés en INRAE) et CNRS, 2014). Ces MAFORs ayant un fort taux de matière organique et des fortes teneurs en Azote, Potassium et Phosphore, elles permettent d'obtenir de meilleurs rendements des cultures, tout en améliorant les propriétés physicochimiques du sol et en stimulant son activité biologique. L'épandage de ces matrices sur des champs, des prairies ou l'ensemble des terrains agricoles soulève le problème de leur caractérisation en termes de micropolluants. Parmi les micropolluants, les antibiotiques et les biocides nécessitent une attention particulière. En effet, leur usage important dans les élevages et la possibilité de leur transfert dans les sols épandus ou dans les eaux posent la question de leur présence et de leur concentration dans les différentes matrices environnementales.

Cette thèse se concentre sur le développement de méthodes d'extractions, de purifications et d'analyses spécifiques à deux familles d'antibiotiques majoritairement utilisées dans la médecine vétérinaire : les aminoglycosides et les bêta-lactames, composés des sous-familles des pénicillines et des céphalosporines, représentant respectivement 11% et 15% des traitements.

Ces deux familles d'antibiotiques ont été sélectionnées pour leurs particularités physicochimiques : leur forte polarité pour les aminoglycosides et leur rapidité de métabolisation/dégradation pour les bêta-lactames. Ces composés sont régulièrement analysés dans les matrices alimentaires pour satisfaire les réglementations fixées par la Commission Européenne en termes de Limites Maximales Résiduelles, pour toutes les denrées destinées à l'alimentation humaine ou animale. Cependant, peu d'études ont actuellement été réalisées sur ces composés dans les matrices environnementales.

Différentes matrices environnementales ont été étudiées pour le développement de ces méthodes : eaux usées, sols, boues de STEP ainsi que des fumiers ou lisiers issus d'élevages de bovins.

Le développement de ces méthodes est réalisé dans le cadre du projet RISMEAU (RISques liés aux résidus de Médicaments, biocides et antibiorésistance d'origine humaine et vétérinaire sur les ressources en EAU du bassin versant de l'Arve), piloté par le GRAIE (Groupe de Recherche, Animation technique et Information sur l'Eau), en collaboration avec l'ensemble des partenaires de l'observatoire SIPIBEL (Site Pilote de Bellecombe) et soutenu par l'Office Français de la Biodiversité et l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse.

Ce projet global comprend trois parties :

- Le projet Télésphore qui vise à évaluer les transferts de résidus médicamenteux et de biocides suite à l'épandage de boues de STEP ou de fumiers et lisiers sur des parcelles de sols.
- Le projet Perséphone qui porte sur les impacts environnementaux liés à cet épandage.
- La réalisation d'un diagnostic à l'échelle d'un bassin versant de la présence de médicaments d'origine humaine et vétérinaire dans les eaux de surface.

Le détail des actions menées dans ces différents projets est présenté dans la Figure 1.

Ce projet permet ainsi de rassembler des données complémentaires en termes de transfert et de mobilité des molécules dans l'environnement, de biodisponibilité et de bioaccumulation dans différents organismes à l'échelle d'un bassin versant.

Dans le cadre du projet RISMEAU, le rôle de l'Institut des Sciences Analytiques est de mettre au point l'ensemble des méthodes analytiques permettant de doser dans les divers compartiments de l'environnement (eaux, MAFORs, sols, vers de terre) les différents résidus de médicaments et l'ensemble des travaux décrits dans cette thèse a été réalisé dans la partie Télésphore du projet RISMEAU.

En parallèle de ce projet, une collaboration avec le Groupe de Génomique Microbienne Environnementale (Ecole Centrale Lyon, Université de Lyon) dans le cadre de la thèse de Concepcion Sanchez-Cid a été réalisée. Sa thèse étudie le développement et la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement, en se concentrant sur les effets de la pollution aux antibiotiques sur les bactéries et leur résistome, ainsi que le lien entre la concentration en antibiotique et la réponse observée chez les bactéries environnementales. Ses études se sont portées sur la gentamicine, un antibiotique de la famille des aminoglycosides.

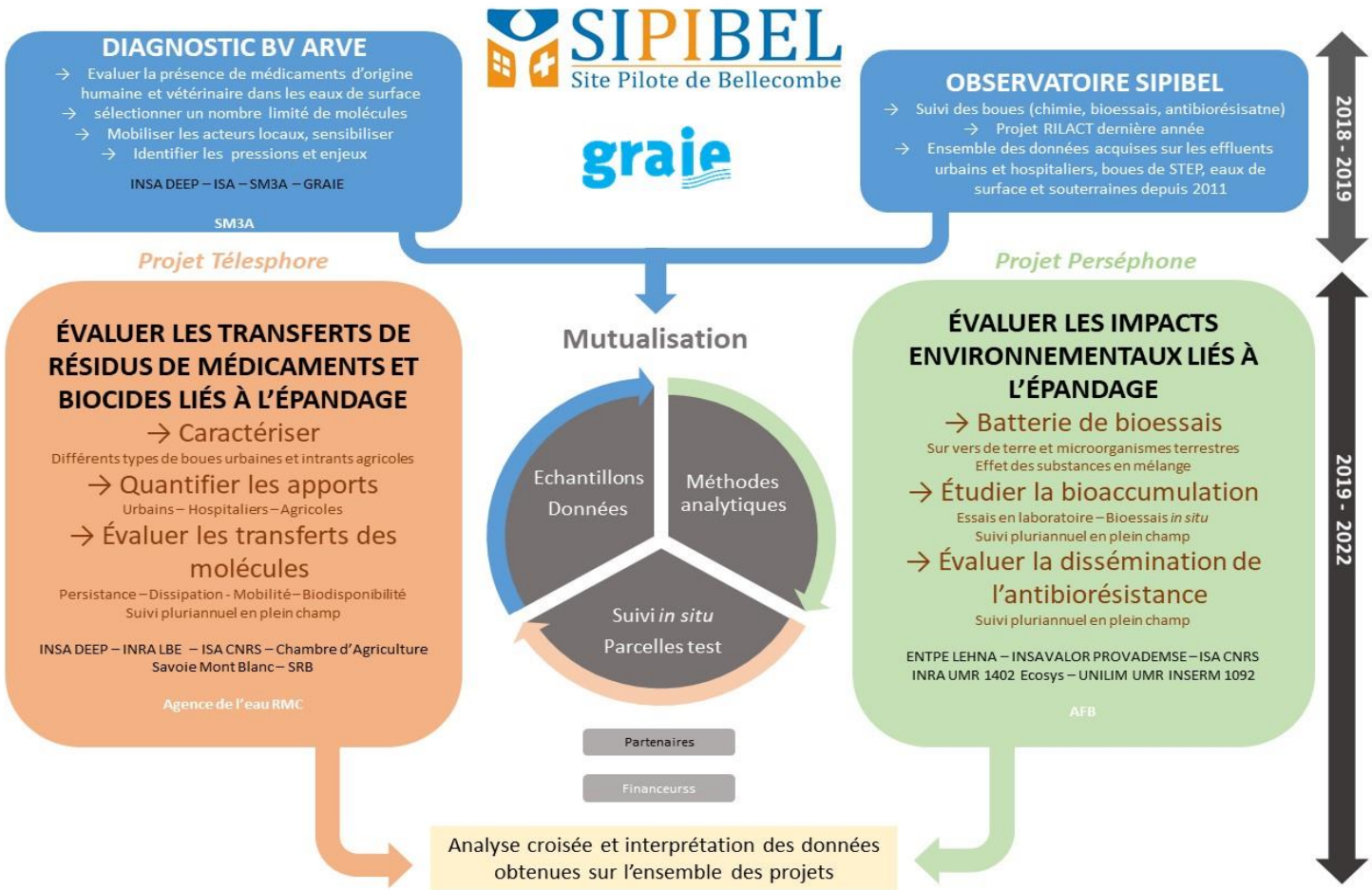


Figure 1 : Descriptif du projet RISMEAU, source : Site internet du GRAIE

L'ensemble des travaux décrits dans ce manuscrit a été réalisé à l'Institut des Sciences Analytiques, au sein de l'équipe TRACES, qui concentre ses développements analytiques sur l'étude de l'impact de micropolluants et de contaminants organiques sur l'environnement et ses espèces sentinelles.

Ce manuscrit est organisé en 5 chapitres :

Le **chapitre 1** contient une étude bibliographique sur la présence des antibiotiques, principalement les aminoglycosides et les bêta-lactames, dans l'environnement ainsi que les différentes techniques d'extractions et d'analyses employées pour la quantification des antibiotiques dans les matrices environnementales.

Le **chapitre 2** présente dans un premier temps le développement d'une méthode de séparation des aminoglycosides avec une application à des échantillons d'intrants et d'effluents de stations d'épuration, sous la forme d'un article publié dans Journal of Chromatography A. Dans un second temps, les résultats de tests d'extraction des aminoglycosides dans du sol sont reportés.

Le **chapitre 3** porte sur le développement d'une méthode d'extraction des bêta-lactames dans des boues de station d'épuration, adaptée de la méthode QuEChERS. Ce développement fait l'objet d'un article publié dans Talanta.

Le **chapitre 4** met en avant l'utilisation de l'analyse par LC-MS/MS/MS (MRM^3) et ses avantages par rapport à la LC-MS/MS. L'étude a été réalisée avec une application à l'analyse des bêta-lactames dans des boues de station d'épuration et fait l'objet d'un article soumis dans Analytica Chimica Acta.

Le **chapitre 5** présente le développement d'une méthode d'analyse par criblage de suspects (MS/MS et HRMS) de différentes familles de composés vétérinaires dans des boues, lisiers et fumiers bovins.

Chapitre 1 :

Synthèse bibliographique

I. Les antibiotiques vétérinaires

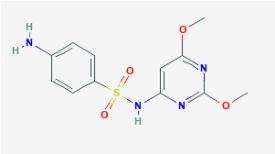
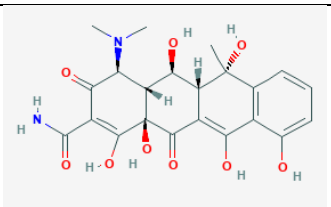
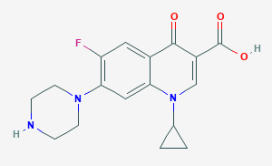
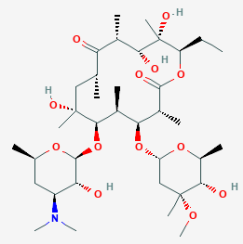
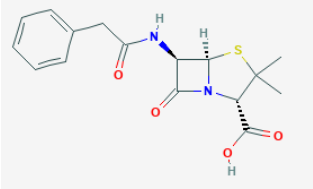
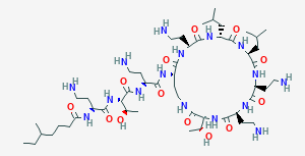
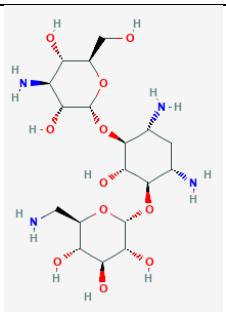
1. *Généralités*

i. Les grandes familles d'antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules qui possèdent les capacités de tuer (propriété bactéricide) ou de limiter la diffusion (propriété bactériostatique) des bactéries. Ils peuvent être utilisés en traitement curatif suite à une infection bactérienne, ou en traitement prophylactique afin de prévenir l'apparition ou la propagation d'une maladie.

Les antibiotiques sont classés en différentes familles suivant leur structure moléculaire de base. Au sein d'une même famille, les antibiotiques présentent globalement les mêmes propriétés physicochimiques, ainsi que le même mode d'action contre les bactéries. Les sept principales familles d'antibiotiques sont les sulfonamides, les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides, les bêta-lactames, les polymyxines et les aminoglycosides (exemples dans le Tableau 1).

Tableau 1 : Exemples de molécules correspondant à chaque grande famille d'antibiotiques vétérinaires, avec quelques propriétés physicochimiques (PubChem, 2020)

Famille	Exemple de molécule	Structure	Masse ($g.mol^{-1}$)	pKa	LogKow
Sulfonamides	Sulfadimethoxine		310,3	6,9	1,6
Tétracyclines	Oxytetracycline		460,4	3,3	-0,9
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine		331,3	6,1	0,3
Macrolides	Erythromycine		733,9	8,9	3,1
Bêta-lactames	Benzylpénicilline		333,4	2,7	1,8
Polymyxines	Colistine		1155,4	6,9	-2,4
Aminoglycosides	Kanamycine		484,5	7,2	-6,3

ii. Evolution de la consommation

Pour suivre l'évolution de la consommation d'antibiotiques, deux indicateurs sont utilisés : la quantité vendue d'une famille de molécules (en tonne), et l'Unité de Correction de la Population (PCU). La PCU est une unité de mesure théorique conçue par l'Agence Européenne du Médicament. Cet indicateur tient compte du nombre d'animaux vivants dans le pays au cours d'une année ainsi que d'un poids théorique par animal au moment de l'administration des antibiotiques (exemples dans le Tableau 2). Bien qu'il soit théorique, l'utilisation de la PCU dans toute l'Europe permet de réaliser un suivi sur plusieurs années et de dégager des tendances.

Tableau 2 : Exemples de poids utilisés dans le calcul de la PCU (ESVAC)

Animaux	Poids moyen estimé au moment du traitement (kg)
Vache à viande	425
Génisse	200
Vache laitière	425
Porcs	65
Moutons	20
Chevaux	400

La valeur de référence pour pouvoir comparer l'utilisation d'antibiotiques entre les pays d'Europe est donc le ratio Vente par famille/ PCU. Ce ratio est exprimé en mg/PCU.

a. **En Europe**

D'après le rapport annuel de l'ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption), publié en 2019, suivant la consommation dans 31 pays européens sur l'année 2017, la principale famille de molécules consommées est celle des tétracyclines (mg/PCU médian : 19,6), suivie par les bêta-lactames (13,6), les sulfonamides (7), les macrolides (4,7), les aminoglycosides (2,6) et enfin les polymyxines et les quinolones (respectivement 1,3 et 1,1).

A l'échelle de l'Europe, les cinq pays les plus consommateurs d'antibiotiques sont Chypre (423,1 mg/PCU), l'Italie (273,8), l'Espagne (230,3), la Hongrie (191) et la Pologne (165,2) (Figure 2). La France se place en 14ème position avec 68,8 mg/PCU. Le pays utilisant le moins d'antibiotiques vétérinaires est la Norvège avec un mg/PCU de 3,1, soit 136 fois moins que Chypre.

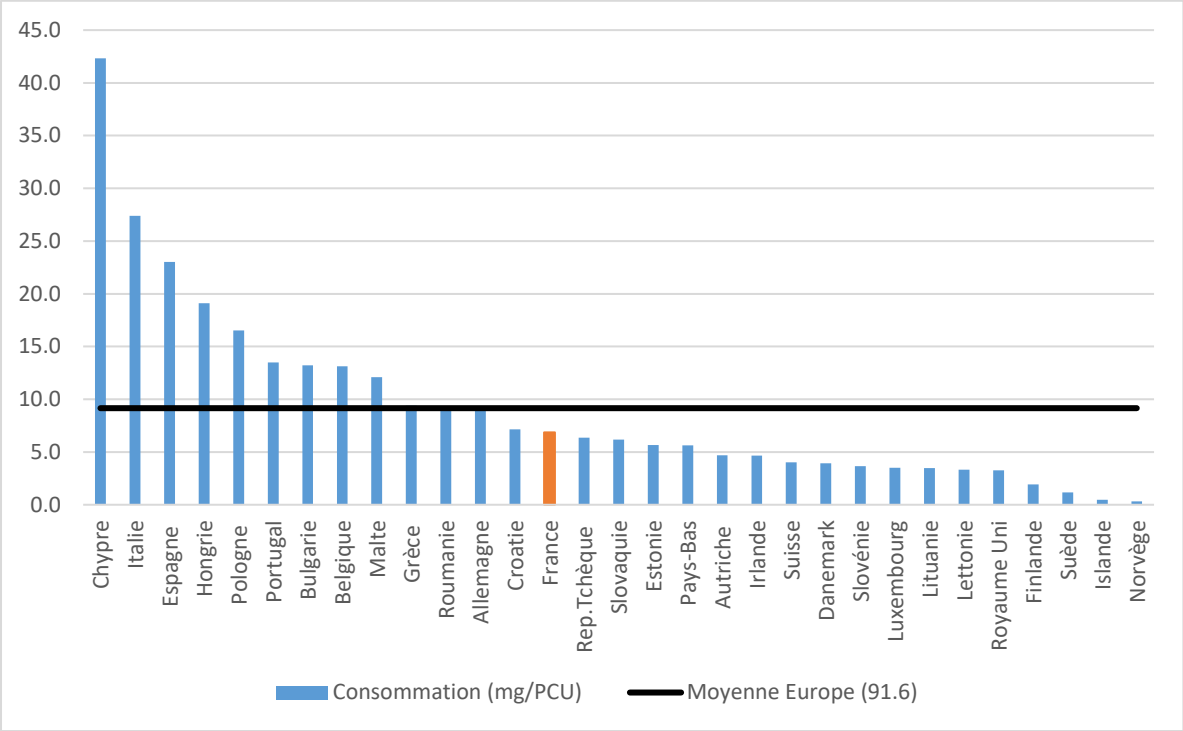


Figure 2 : Consommation d'antibiotiques vétérinaires en Europe en 2017. La France est représentée en orange (68,8 mg/PCU) (ESVAC)

Parmi les 31 pays présents dans le rapport de 2019, 25 ont communiqué leurs ventes d'antibiotiques et leur PCU de façon annuelle depuis 2011. Ainsi, il est possible de mettre en évidence une diminution globale de la consommation d'antibiotiques vétérinaires d'environ 32%. Cette baisse est à mettre en relation avec la mise en place en 2010 de réglementations sur les limites maximales de résidus médicamenteux dans les aliments d'origine animale (MRL : Maximum Residue Limit) par la commission européenne (règlement n°37/2010). Ces limites sont établies pour chaque antibiotique en fonction de la matrice analysée. Quelques exemples sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Exemples des MRL pour quelques aminoglycosides et bêta-lactames (ESVAC 2019)

Famille	Molécules	Matrice	Valeur ($\mu g.kg^{-1}$)
Aminoglycosides	Gentamicine	Muscle	50
		Graisse	50
		Lait	100
	Néomycine	Lait	1500
		Œufs	500
		Muscles	500
Bêta-lactames	Amoxicilline	Muscles	50
		Lait	4
	Cloxacilline	Muscles	300
		Lait	30

b. En France

En France, le relevé annuel des ventes d'antibiotiques est effectué par l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire (ESVAC 2019). Depuis l'année 2005, on peut noter une forte diminution de la consommation totale d'antibiotiques, avec une valeur divisée environ par 3 (Figure 3). Cette diminution a surtout été marquée pour les familles des quinolones, sulfonamides et tétracyclines utilisées de façon importante dans les différents traitements. Cependant, cette diminution générale a également favorisé l'augmentation de l'utilisation de 2 familles : les aminoglycosides et les bêta-lactames. Leur part dans la vente d'antibiotiques vétérinaires a ainsi été multipliée par 2 au cours des 15 dernières années. Ces deux familles présentant des spectres d'actions larges et peu d'alternatives économiques étant disponibles, elles sont classées comme médicaments d'importance critique en médecine vétérinaire.

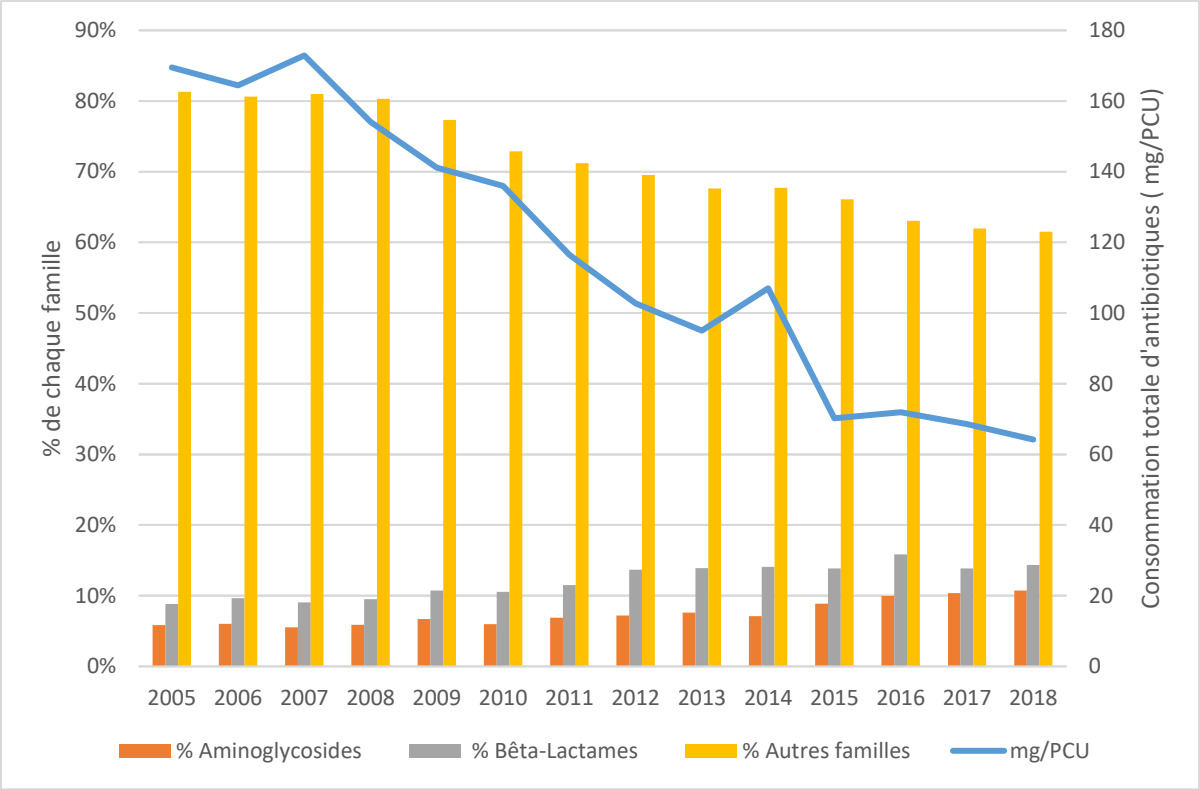


Figure 3 : Evolution de la consommation d'antibiotiques vétérinaires entre 2005 et 2018 en France (ANSES 2019)

iii. Antibiorésistance : Les plans Ecoantibio 1 et 2

A l'instar de la médecine humaine avec l'ensemble des campagnes « Les antibiotiques, c'est pas automatique ! » en 2002 et « Antibiotiques : Utilisés à tort, ils deviendront moins forts ! » en 2010 (L'Assurance Maladie, 2010) pour sensibiliser les Français à l'antibiorésistance et ainsi les inciter à diminuer leur consommation d'antibiotiques, la médecine vétérinaire a également lancé des campagnes de prévention et de communication sur l'utilisation des antibiotiques dans les élevages ainsi que pour les animaux de compagnie. Il s'agit des plans Ecoantibio 1 et 2. Le premier s'appliquait sur la période 2012-2016 et visait à réduire d'au moins 25% l'utilisation des antibiotiques chez les animaux. Quatre axes ont été ainsi développés : (1) développer des mesures de prévention des maladies et faciliter les traitements alternatifs ; (2) communiquer et former sur la lutte contre l'antibiorésistance et la prescription raisonnée d'antibiotiques ; (3) mettre à disposition des outils d'évaluation et de suivi d'utilisation des antibiotiques et s'assurer de l'application des règles d'usage au niveau national et (4) favoriser leur adoption à l'international (Direction Générale de l'alimentation 2012).

Ce plan a permis de mobiliser des éleveurs de toutes les filières, les vétérinaires et les pharmaciens, les scientifiques et l'industrie pharmaceutique. Il a également pu sensibiliser le grand public, notamment tous les propriétaires d'animaux.

Ecoantibio 1 a bénéficié d'une forte communication et d'implication de nombreux acteurs ce qui a permis d'atteindre et de dépasser l'objectif de 25% de diminution de l'utilisation d'antibiotiques: sur les cinq ans du plan, l'exposition aux antibiotiques des animaux a diminué de 37% (ANSES 2017). En particulier, l'exposition aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de 3ème et 4ème génération a reculé de 75% et de 81% respectivement, deux familles d'antibiotiques considérées comme critiques par l'OIE (World Organisation for animal health (OIE) 2019). En 2017, le plan Ecoantibio 2 a été lancé pour permettre de consolider les acquis et les pratiques, afin de poursuivre les efforts de diminution d'utilisation d'antibiotiques (Ministère de l'agriculture,de l'agroalimantaire et de la forêt 2017).

Dans le cadre de cette thèse, l'attention sera principalement portée sur deux familles d'antibiotiques vétérinaires: les aminoglycosides et les bêta-lactames. En effet, bien que leurs présences soient bien suivies et contrôlées dans les produits alimentaires, leur suivi dans l'environnement n'est que très peu réalisé.

2. *Les aminoglycosides*

Les aminoglycosides sont des molécules antibiotiques caractérisées par un groupement aminocytol lié à des aminosucres (sucres où des fonctions alcools sont substituées par des fonctions amines) par des liaisons osidiques (Figure 4).

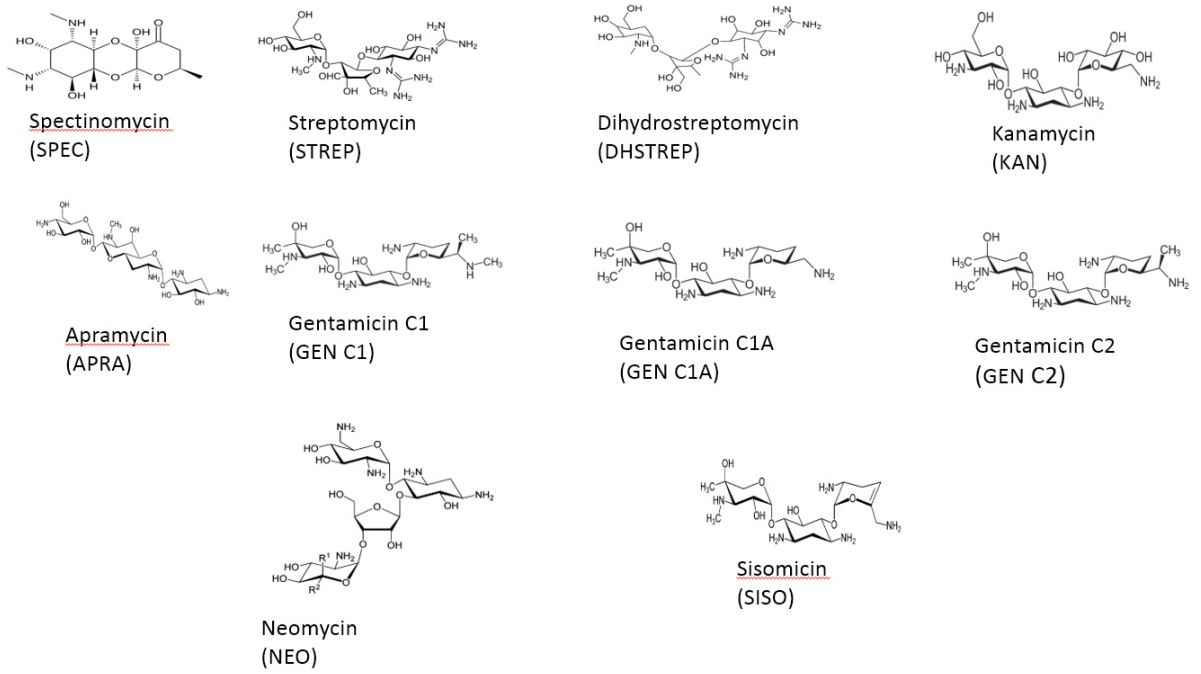


Figure 4 : Structure des aminoglycosides analysés dans cette thèse

i. Propriétés physicochimiques

Les aminoglycosides possédant de nombreux groupements alcools, ce sont des molécules extrêmement hydrophiles et polaires. Ainsi, elles possèdent toutes des logKow inférieurs à -3.

La présence de nombreux groupements amines confère également un caractère basique à ces antibiotiques, qui présentent de nombreux pKa répartis sur la gamme de pH 0-14. Quelques propriétés physicochimiques sont regroupées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Quelques propriétés physicochimiques des aminoglycosides

Nom	Formule	Masse molaire ($g.mol^{-1}$)	Solubilité ($mg.L^{-1}$)	logKow	pKa
Apramycine	$C_{21}H_{41}N_5O_{11}$	539,6	>1000	-7	5,9/6,5/6,9/7,5/8,4
Dihydrostreptomycine	$C_{21}H_{41}N_7O_{12}$	583,6	>1000	-8	6,2/8,4/9,1
Néomycine	$C_{23}H_{46}N_6O_{13}$	614,6	>1000	-9	5,7/6,3/6,6/7,4/7,8/8,5
Gentamicine	$C_{21}H_{43}N_5O_7$	477,6	>1000	-4	4,8/6,5/7/8,5/9
Kanamycine A	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$	484,5	>1000	-7	5,5/7/7,5/8
Spectinomycin	$C_{14}H_{24}N_2O_7$	332.3	>1000	-3	5,7/9,8
Streptomycine	$C_{21}H_{39}N_7O_{12}$	581.5	>1000	-8	6,3/8,4/9,1

ii. Spectre et mode d'action

Du fait de leur forte polarité, une fois assimilés, les aminoglycosides traversent la paroi membranaire des bactéries et se fixent sur le ribosome pour perturber ou inhiber la synthèse protéique. Les aminoglycosides sont des antibiotiques à large spectre particulièrement efficaces sur les bactéries à Gram négatif telles que les bacilles ou les staphylocoques, ainsi que sur quelques bactéries à Gram positif. Leur usage est limité aux infections les plus sévères à cause de leurs caractères néphrotoxique et ototoxique. Les aminoglycosides sont faiblement assimilés lors de leur administration et rejetés inchangés dans les urines (Marzo et Dal Bo 1998; Lutz et Alber 2004).

iii. Présence dans l'environnement

Du fait de leur haute polarité et de leur forte solubilité dans l'eau, les aminoglycosides se retrouvent facilement dans les milieux aqueux et peuvent être mobiles dans l'environnement (Reemtsma et al. 2016). Ce sont des molécules très persistantes. Deux synthèses sur l'évolution des antibiotiques réalisées par Thiele-Bruhn (2003) et Lutz et Alber (2004) ont recensé plusieurs expériences de dégradations des aminoglycosides. La streptomycine et la dihydrostreptomycine ne se sont pas dégradées dans des sols amendés de lisiers après deux mois à température ambiante, la kanamycine et la néomycine ont présenté une très faible

dégradation (< 5%) après un an à température ambiante. Berendsen *et al*. (2011) ont également montré que les aminoglycosides étaient stables sur des périodes supérieures à trois mois dans des matrices musculaires.

Il existe encore peu de données sur l'analyse des aminoglycosides dans l'environnement. Mokh *et al.* (2014, 2015) ont développé une méthode de quantification de 12 aminoglycosides dans les influents et effluents de deux stations d'épurations et d'hôpitaux au Liban. De la gentamicine a été uniquement détectée dans un échantillon d'effluent hospitalier à 30 $ng.L^{-1}$. Löffler et Ternes (2003) ont également détecté de la gentamicine entre 0,4 et 7,6 $\mu g.L^{-1}$ dans des échantillons d'effluents hospitaliers non filtrés. De la néomycine et de la streptomycine ont été détectées par Qiu *et al.* (2020) dans une mare à proximité d'un élevage porcin à hauteur de 22,5 $\mu g.L^{-1}$ et 36,4 $\mu g.L^{-1}$ respectivement. Une recherche d'aminoglycosides dans de l'eau du robinet, des lacs ou de réseaux d'irrigations menée par Zhang *et al.* (2020) a révélé de la streptomycine à 2 $\mu g.L^{-1}$ dans un lac. Enfin, Peru *et al*. (2006) ont étudié la spectinomycine présente dans des extraits de lisiers porcins liquides et des lixiviats de champs sur lesquels a été épandu le lisier. Bien que, dans les extraits de lisiers, la spectinomycine ait été détectée à des concentrations entre 64,1 et 105,4 $\mu g.L^{-1}$, elle n'a pas été détectée dans les lixiviats.

Les aminoglycosides étant cationiques sur une large gamme de pH, ils peuvent être adsorbés sur des particules de sols chargées négativement (Katz et Katz 1983; Thiele-Bruhn 2003). Ceci a été montré par Löffler et Ternes (2003) qui ont trouvé des concentrations plus faibles en gentamicine dans des effluents hospitaliers (entre 0,5 et 1,3 $\mu g.L^{-1}$) suite à la filtration de leurs échantillons pour retirer les matières en suspension. Peru *et al.* ont également mis en évidence que les aminoglycosides peuvent s'adsorber sur les particules solides de fumiers ou lisiers (2006). À la suite d'une extraction à partir de solides dopés, il a été noté une adsorption d'environ 34% de la spectinomycine.

L'ensemble des aminoglycosides présentés dans ce manuscrit ont été sélectionnés principalement à partir d'un article de Soulier *et al.* (2016) recensant les antibiotiques les plus souvent prescrits dans les élevages bovins laitiers et porcins en France.

<u>Molécules sélectionnées</u> : Spectinomycine, Streptomycine, Dihydrostreptomycine, Kanamycine, Apramycine, Gentamicine, Néomycine

3. *Les bêta-lactames*

i. Caractéristiques physicochimiques

Les bêta-lactames sont divisés en deux catégories: les pénicillines et les céphalosporines. Ces deux catégories se différencient par la structure de leur noyau: les pénicillines proviennent de l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) alors que les céphalosporines proviennent de l'acide 7-aminocéphalosporanique (7-ACA) tels que présentés dans la Figure 5.

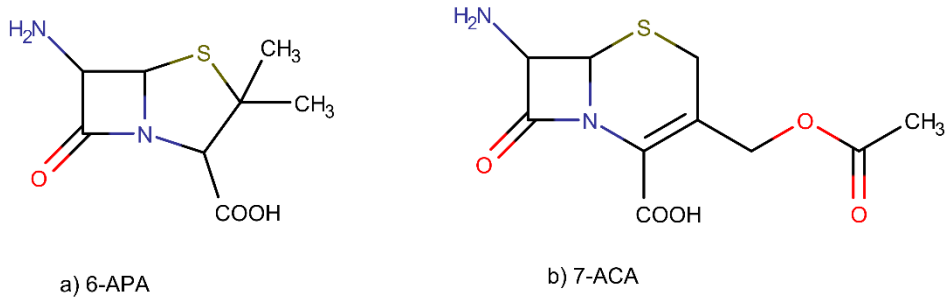


Figure 5 : Différences des noyaux constituant des pénicillines (a) et des céphalosporines (b)

Les bêta-lactames sélectionnés dans cette thèse sont les plus utilisés en médecine vétérinaire (Soulier *et al.* 2016) et sont les suivants, présentés en Figure 6:

- Amoxicilline, Ampicilline, et Cloxacilline pour les pénicillines

- Cefapirine (1ère génération), Cefopérazone (3ème génération), Cefquinome (4ème génération) et Ceftiofur (3ème génération) pour les céphalosporines

- Amoxicilline diketopiperazine, un métabolite de l'Amoxicilline

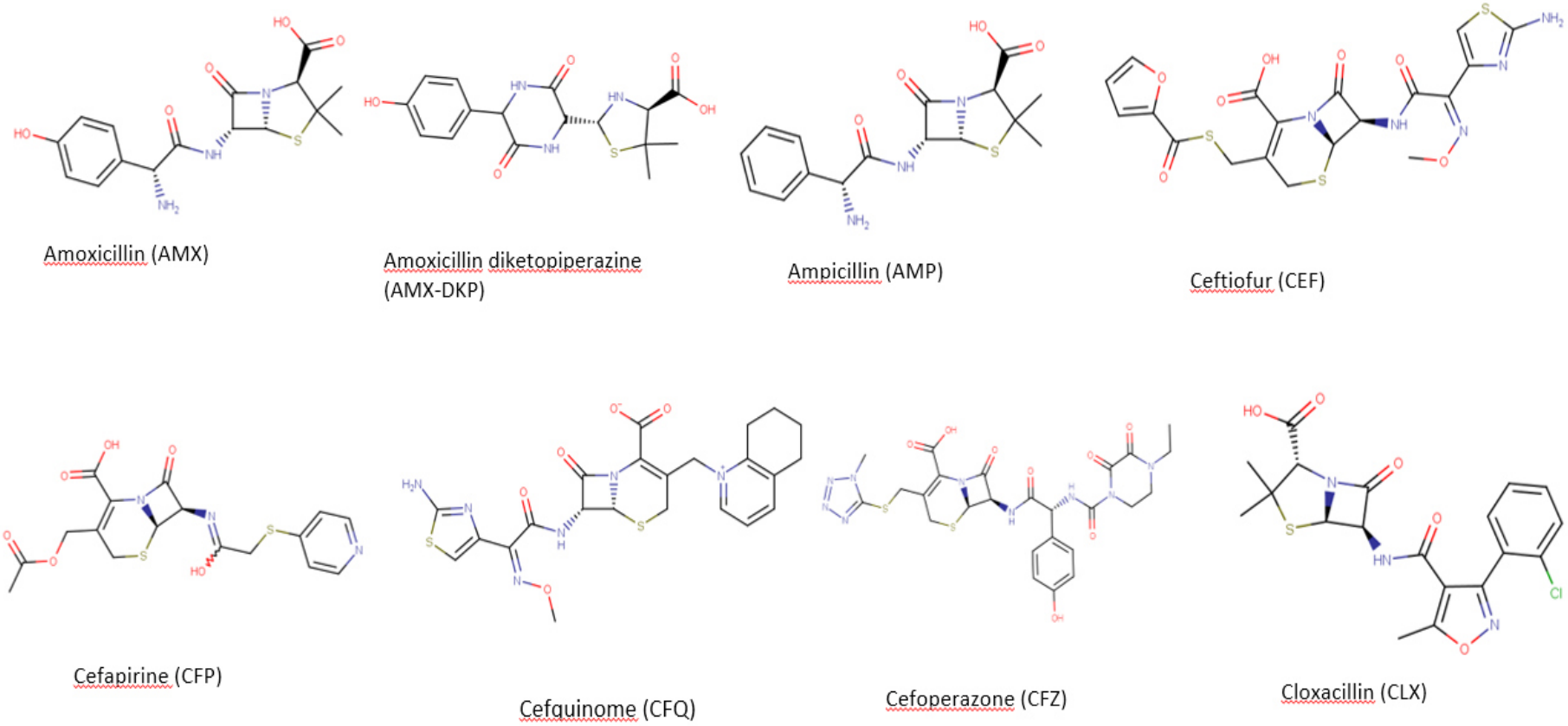


Figure 6 : Structures des bêta-lactames étudiés dans cette thèse

Les propriétés physicochimiques des bêta-lactames sont regroupées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Propriétés physicochimiques des bêta-lactames (PubChem 2020)

Nom	**Formule**	**Masse molaire ($g.mol^{-1}$)**	**Solubilité ($mg.L^{-1}$)**	**logKow**	**pka1/2/3**
Amoxicilline	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	365,4	3430	0,9	3,2/7,2/9,5
Ampicilline	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	349,4	10100	1,4	3,2/7,2/11,9
Cefapirine	$C_{17}H_{17}N_3O_6S_2$	423,4	1030	-0,1	3,4/5/11,5
Cefopérazone	$C_{25}H_{27}N_9O_8S2$	645,6	286	-0,7	3,2/9,5/11
Cefquinome	$C_{23}H_{24}N_6O_5S_2$	528,6	$9.0e10^{-3}$	-3,6	2,7/3,5/10,8
Ceftiofur	$C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$	523,5	23	1,6	2,5/3,5/10,8
Cloxacilline	$C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$	435,8	13,9	2,4	3,8/10,7

ii. Spectre et Mode d'action

Le mode d'action est le même pour les pénicillines et les céphalosporines : la déstabilisation de la synthèse de la paroi cellulaire.

Les céphalosporines sont classées en quatre générations selon leur spectre d'action (Marshall and Blair, 1999):

- La première génération est efficace contre les bactéries à Gram positif ;
- La deuxième génération possède en plus une activité contre certaines bactéries à Gram négatif ;
- La troisième génération comporte les céphalosporines les plus actives contre les bactéries à Gram négatif ;
- La quatrième génération présente un spectre d'action étendu aux bactéries à Gram négatif et positif.

iii. Présence dans l'environnement

a. Matrices aqueuses

Les bêta-lactames étant des composés relativement polaires, avec des logKow <1, ils sont susceptibles d'être retrouvés dans les milieux aqueux tels que des eaux de rivières(Grujić, Vasiljević, et Laušević 2009; Locatelli, Sodre, et Jardim 2011; Tuc Dinh et al. 2011; Aydin et Talinli 2013; Braschi et al. 2013; Gros, Rodríguez-Mozaz, et Barceló 2013; Cha, Yang, et Carlson 2015; Mandaric et al. 2017; H. Wang et al. 2017; Yi 2019; Xue et al. 2020) et des influents et effluents de STEP (Xiaolin Li et al. 2011; Gros, Rodríguez-Mozaz, et Barceló 2013; Cha, Yang, et Carlson 2015; Arsand et al. 2016; Hirte et al. 2016; Lucas 2016; Szekeres 2017). Les bêta-lactames les plus recherchés et analysés dans les eaux sont l'amoxicilline et l'ampicilline, du fait de leur importante utilisation tant en médecine humaine qu'animale. Les concentrations retrouvées se situent entre 3 $ng.L^{-1}$ et 1300 $ng.L^{-1}$ (Tableau 6).

Tableau 6 : Exemple de bêta-lactames retrouvés dans des matrices aqueuses

Composés	**Matrice**	**Concentrations ($ng.L^{-1}$)**	**Référence**
Amoxicilline, ampicilline et céfalexine	Eaux de rivières	4,0-1284	Locatelli, Sodre and Jardim, 2011
Amoxicilline	Eaux de rivières	68	Tuc Dinh *et al.*, 2011
11 bêta-lactames	Eaux de rivières	ND	Gros, Rodríguez-Mozaz and Barceló, 2013
	Intrants et effluents de STEP	Amoxicilline : 216-258	
6 bêta-lactames	Effluent de STEP hospitalier	Ampicilline : 8,1-53 100	Szekeres, 2017
Amoxicilline	Eaux de rivières	2,9-40,6	Aydin and Talinli, 2013
Céfalexine	Eaux de rivières	17,1	Mandaric *et al.*, 2017

b. Matrices solides

Beaucoup de méthodes de quantification ont été développées dans des sols, incluant des bêta-lactames (Ho et al. 2012; Salvia, Cren-Olivé, et Vulliet 2013; Yi et al. 2015; Yi 2019), les sédiments (Zhou et al. 2012; Cha, Yang, et Carlson 2015); les boues de STEP (Zhou et al. 2012; Peysson et Vulliet 2013; Ajibola, Tisler, et Zwiener 2020) et les effluents agricoles (Zhou et al. 2012; Argüeso-Mata 2021) mais aucun des bêta-lactames recherchés n'a été retrouvé à des concentrations supérieures aux limites de quantification établies. Cela peut s'expliquer par le fort taux de dégradation des bêta-lactames dans les matrices environnementales.

iv. Dégradation

Les bêta-lactames possédant un cycle à 4 atomes par nature instable, ces molécules sont susceptibles de se dégrader rapidement et former des produits secondaires, de types métabolites ou produits de transformations/dégradations abiotiques. Par exemple, la pénicilline G possède jusqu'à 12 métabolites possibles dans l'environnement (Aldeek et al. 2016). En augmentant la complexité de la structure, le nombre de produits de transformation augmente. Ainsi, l'ampicilline et l'amoxicilline peuvent présenter jusqu'à 16 et 29 métabolites respectivement (Arsand et al. 2018). Les céphalosporines possèdent un nombre plus faible de produits de dégradation rapportés, avec seulement 3 pour le ceftiofur par exemple (Xiaolin Li et al. 2011)

Lu *et al.* ont étudié les effets du pH et de la température sur la stabilité de la pénicilline G (Lu et al. 2008). En milieu neutre (pH 6,5-7,5), la pénicilline G se dégrade lentement, mais plus le pH s'éloigne de cette zone, plus la dégradation est forte. Ainsi, à pH 5 et pH 9, Lu *et al.* constatent un taux de dégradation multiplié par 23. De même, Mitchell *et al.* (2014) ont étudié la dégradation de l'ampicilline et de deux céphalosporines. Ils ont noté que l'hydrolyse en milieu acide était négligeable, mais qu'en milieu basique, ces bêta-lactames se dégradaient fortement. Ainsi, le temps de demi-vie de l'ampicilline était de 27 jours dans un milieu aqueux à pH 7, et réduit à 7 dans des solutions basiques à pH 9. Le Tableau 7 recense les temps de demi-vie de quelques bêta-lactames en fonction du pH.

La température du milieu a également un fort impact sur la dégradation des composés. En augmentant la température de 10°C, la pénicilline G se dégrade 4 fois plus vite (Lu et al. 2008) ; l'ampicilline voit également sa vitesse de dégradation multipliée par 20 entre 25°C et 50°C (Mitchell et al. 2014), avec une demi-vie de seulement 1 jour à 50°C.

Tableau 7 : Temps de demi-vie des bêta-lactames recensés dans la littérature

Analytes	**Temps de demi-vie**			**Référence**
	Milieu acide	Milieu neutre	Milieu basique	
Ceftiofur	/	21 jours	/	X. Li et al. 2011
	100 jours (pH 5)	8 jours	4 jours (pH 9)	Gilbertson et al. 1990
Pénicilline G	2,4 h (pH 2)	/	1,35 h (pH 12)	Aldeek et al. 2016
	8 h (pH 4)	73 jours	3 jours (pH 9)	Lu et al. 2008
Ampicilline	31 jours (pH 4)	27 jours	7 jours (pH 9)	Mitchell et al. 2014
Amoxicilline	4 jours (pH 3)	6 jours	7 h (pH 11)	Hirte et al. 2016

v. Adsorption

Bien que les bêta-lactames présentent un caractère fortement hydrolysable dans les matrices aqueuses, ils peuvent être également adsorbés à la surface des particules solides. Par exemple, dans un mélange eau/boues de station d'épuration, la céfalexine sera majoritairement éliminée par hydrolyse, alors que plus de 50% de l'ampicilline sera adsorbée à la surface des boues (Li and Zhang, 2010). Une fois adsorbée, la dégradation des bêta-lactames peut être fortement ralentie. Par exemple, alors que le ceftiofur a une demi-vie dans les eaux de 21 jours, dans les sols et les boues, elle est augmentée à 49 jours (Thiele-Bruhn, 2003).

Ainsi, il est donc nécessaire de développer des méthodes permettant de détecter les molécules parentes et leurs métabolites à l'état de traces voire d'ultra-traces afin d'effectuer un bilan global de la présence des bêta-lactames dans les matrices environnementales.

II. Les différents types d'effluents

1. *Effluents de station d'épuration*

Avant leur retour dans le milieu récepteur, les eaux usées sont préalablement traitées au sein de STEP. Ces stations sont généralement situées à la fin d'un réseau de collecte. L'ensemble des dispositifs mis en place dans ces stations vise à éliminer les différents polluants présents dans les intrants. La première étape correspond à un prétraitement mécanique (traitement primaire), suivi d'un traitement biologique à l'aide de microorganismes dans un bassin aéré et oxygéné, afin de digérer les polluants biodégradables (traitement secondaire) et enfin d'une clarification.

i. Traitements primaires

Les dispositifs de traitements primaires ont pour but d'éliminer les éléments solides grossiers, potentiellement capables de gêner les traitements suivants. La première étape est le dégrillage. Les eaux usées passent à travers différentes grilles permettant de retenir les solides les plus gros tels que les branches et les feuilles. Les déchets récupérés sont éliminés avec les ordures ménagères. Les eaux usées sont ensuite transférées dans des bassins où l'écoulement est ralenti pour une étape de dessablage et de déshuilage-dégraissage. Le sable et autres matières lourdes vont se déposer au fond des bassins et les huiles et graisses vont flotter à la surface. Une étape de tamisage avec des grilles au maillage plus fin complète le traitement primaire.

ii. Traitement secondaire

Le traitement secondaire le plus répandu en France est le procédé biologique dit « à boues activées ». Dans celui-ci, des bactéries sont introduites dans des bassins alimentés en eaux à traiter, et également en oxygène par bullage d'air. Les bactéries sont en suspension dans l'eau et sont donc en contact permanent avec les matières polluantes présentes. L'apport d'oxygène favorise l'assimilation de ces polluants par les bactéries, ainsi que leur oxydation. Dans ces bassins, l'objectif est d'éliminer le carbone, l'azote et le phosphore. En pratique, le carbone est transformé en CO_2, l'azote en nitrates puis en azote gazeux (N_2) et le phosphore est stocké par les bactéries.

iii. Traitement des boues

Le traitement des eaux en station d'épuration produit une eau dépolluée d'une part, et un agglomérat de résidus solides appelé « boues » d'autre part. Il existe différentes formes de boues, obtenues à différentes étapes du procédé de traitement des eaux usées :

- Les boues primaires, résultant de la décantation des matières en suspension présentes dans les eaux usées. Ces boues sont majoritairement composées de matières inorganiques, comme le sable récupéré à l'issue du traitement primaire. Une majorité des particules solides sont éliminées par ce biais.
- Les boues dites secondaires, essentiellement constituées de la masse des bactéries épuratrices ainsi que des matières organiques en suspension. Elles sont séparées de l'eau lors d'une étape de clarification ou d'ultrafiltration.
- Les boues dites « mixtes », formées par le regroupement des boues primaires et secondaires.
- Les boues physico-chimiques qui sont obtenues par floculation. L'agglomération des matières particulaires est réalisée par ajout d'un réactif coagulant (sels de fer ou d'aluminium). L'ensemble sera ensuite séparé par décantation. Ce type de boues est surtout produit dans les stations d'épuration situées dans des zones touristiques, qui doivent adapter leur traitement aux fluctuations importantes de la population sur de courtes périodes.

L'ensemble de ces boues subit ensuite différents traitements afin de réduire leur volume et de les stabiliser pour stopper la biodégradation. Dans un premier temps, les boues sont déshydratées par centrifugation ou filtration pour obtenir un solide ayant une siccité entre 20% et 40%. Les boues déshydratées sont ensuite séchées pour atteindre des siccités supérieures à 80%.

La stabilisation de la matière organique est opérée principalement pour empêcher la formation de mauvaises odeurs, résultant de leur forte teneur en matière organique fermentescible et en bactéries. Cette stabilisation peut être biologique, par compostage ou par méthanisation, ou également par traitement chimique, par chaulage, afin d'augmenter le pH des boues au-dessus de 12 et ainsi bloquer toute activité biologique.

2. *Effluents d'élevage et problématique d'épandage sur les sols agricoles*

Les lisiers et les fumiers sont les composants principaux des effluents d'élevages. Ils sont riches en matières organiques et en éléments fertilisants. Les lisiers sont souvent un mélange liquide constitué de l'urine et des déjections des animaux. Le fumier est un mélange entre du lisier et de la paille des litières, donnant un rendu plus solide que le lisier.

Les boues de STEP, les lisiers et les fumiers sont regroupés sous l'appellation de Matières Fertilisantes d'Origine Résiduaire (MAFORs). D'après le rapport d'expertise scientifique commune sur les MAFORs établi par l'INRA, l'IRSTEA et le CNRS en 2014, la quasi-totalité des effluents d'élevage en France sont épandus majoritairement sans traitement préalable (109 Mt de matière brute en 2012). Moins de 1% des effluents d'élevage est valorisé énergétiquement par méthanisation. Concernant les boues de stations d'épuration, 73% de la production est épandue sur les sols agricoles (42% sans modification et 31% après compostage), 18% incinérée pour valorisation thermique et 9% mise en décharge. Les antibiotiques n'étant que peu assimilés par les organismes, ils peuvent être rejetés dans les MAFORs où ils peuvent s'accumuler (Yuan Wang et al. 2015). Leur transfert dans les sols lors de l'épandage peut donc causer des problèmes de développement d'antibiorésistance ainsi qu'une bioaccumulation dans les espèces biologiques présentes, en fonction de leur biodisponibilité (Goulas et al. 2016; 2019) Les antibiotiques peuvent également être mobiles dans les sols et être transportés par lixiviation jusqu'aux eaux souterraines (Figure 7). Au sein de l'environnement, des produits résultant de dégradations et de transformation peuvent être formés et se propager également dans les différents milieux.

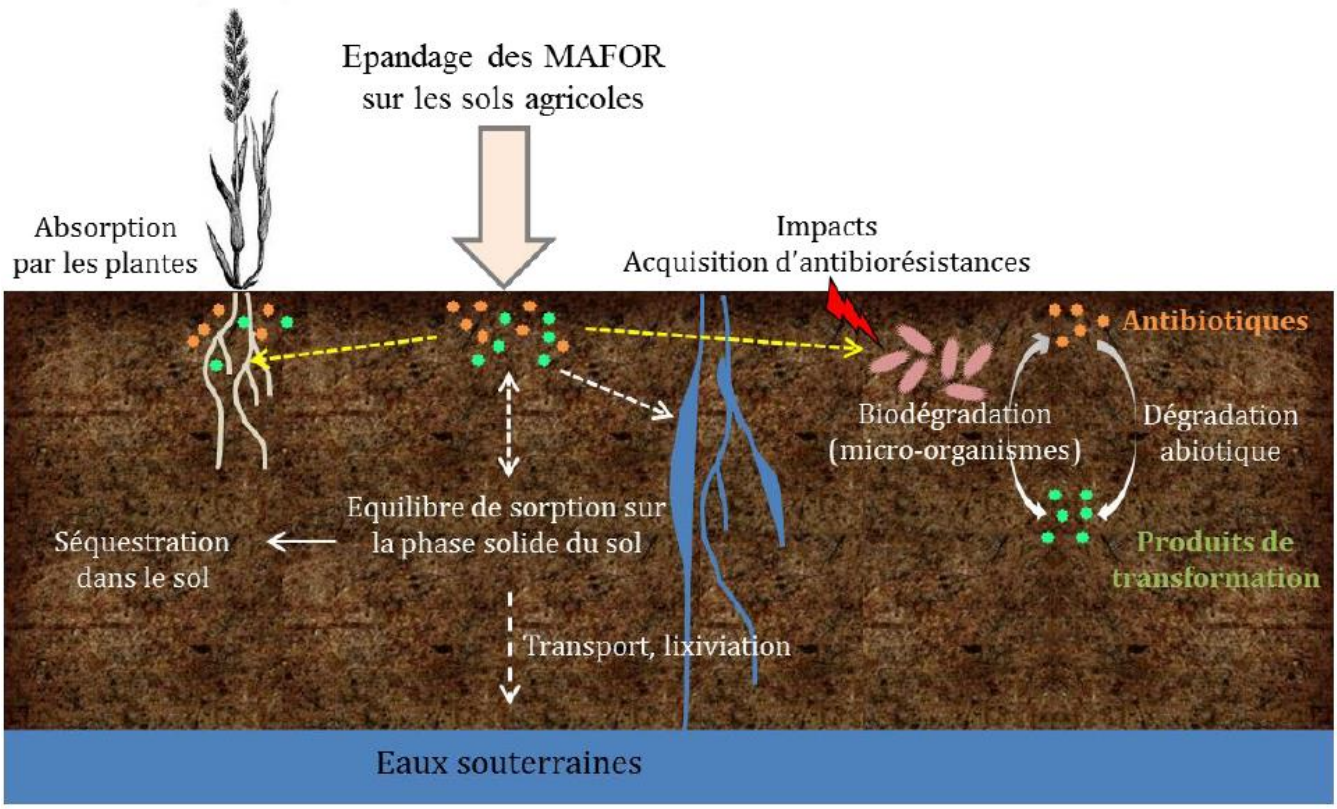


Figure 7 : Schéma du devenir des antibiotiques après un épandage de MAFORs sur les sols (Goulas, 2016)

III. Les méthodes d'analyse des antibiotiques dans les matrices environnementales complexes

1. *Extraction*

La préparation d'échantillon incluant l'extraction des composés présents dans la matrice sont les premières étapes nécessaires avant analyse. L'extraction consiste à transférer quantitativement les composés d'intérêt de la matrice vers des solvants compatibles avec les conditions d'analyses instrumentales.

i. Extractions de matrices liquides

a. Extraction sur phase solide (SPE)

L'extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction (SPE)) est l'une des techniques d'extraction, de purification et d'enrichissement des analytes les plus couramment employées pour les matrices liquides. Le principe de l'extraction par SPE est celui de la chromatographie de partage, en phase liquide : une différence d'affinité des analytes entre l'échantillon liquide et une phase stationnaire. La matrice est chargée sur un adsorbant dans lequel sont retenus les composés d'intérêt ou les interférents qui sont ensuite élués de façon sélective avec un ou des solvants spécifiques. La majorité du temps, l'adsorbant est conditionné sous forme de poudre fine compactée dans une cartouche et la nature de l'adsorbant déterminera les interactions mises en jeu. Il est donc possible de réaliser des séparations sur la base d'interactions hydrophobes, hydrophiles, polaires, apolaires ou encore ioniques en fonction de la phase employée.

Les deux grandes familles de cartouches sont à base de silice greffée ou de phase polymérique. Les phases polymériques sont chimiquement très stables, résistant le plus souvent à des pH entre 1 et 14. Bien qu'elles possèdent une capacité de charge bien supérieure, les cartouches SPE à phases polymériques sont plus faiblement sélectives. Ainsi, les phases polymériques de type HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balanced Copolymer) ont été développées en combinant un monomère hydrophile permettant la rétention de composés polaires et un monomère lipophile pour une rétention de type phase inverse. Ce type de cartouches HLB est actuellement le plus souvent utilisé (Tableau 8), favorisant la rétention des composés sur une large gamme de polarité, paramètre important lors de développement d'analyse multi-familles (Grujić, Vasiljević, et Laušević 2009; Aydin et Talinli 2013; Mokh et al. 2014; Cha, Yang, et Carlson 2015; Mandaric et al. 2017; Bajkacz et al. 2020; Xue et al. 2020).

Tableau 8 : Exemples de composés extraits par SPE

Composés extraits	**Matrice**	**Volume extrait (mL)**	**Type de phase**	**Masse d'adsorbant (mg)**	**Référence**
Antibiotiques (dont 3 bêta-lactames), antiépileptiques	Eau de surface Eau souterraine	100	HLB	200	Grujić, Vasiljević, et Laušević 2009
Antibiotiques (dont 1 bêta-lactame), bétabloquants, AINS, hormones	Lac	1000	HLB	200	Aydin et Talinli 2013
6 bêta-lactames	Eau de surface Effluent de STEP	120	HLB	60	Cha, Yang, et Carlson 2015
Aminoglycosides	Effluent de STEP	50	C_{18}/SCX*	200/60	Mokh et al. 2015
Composés pharmaceutiques et produits de soins personnel	Eau de rivières	500	HLB	200	Mandaric et al. 2017
Antibiotiques (dont 3 bêta-lactames)	Effluent de STEP	15	HLB	500	Bajkacz et al. 2020

*Strong Cation eXchange

Une méthode d'extraction SPE se décompose en plusieurs étapes (Figure 8) :

- Premièrement, le conditionnement de la cartouche avec un solvant organique qui permet d'éliminer les impuretés préalablement présentes sur la cartouche et de favoriser les échanges avec l'adsorbant. En phase inverse, le méthanol est généralement employé. Ensuite, l'équilibrage de la cartouche avec une phase liquide correspondante à la phase constitutive de l'échantillon, pour que l'adsorbant soit équilibré dans les conditions les plus proches de l'échantillon.
- L'étape suivante est le chargement de l'échantillon, étape au cours de laquelle les analytes d'intérêt sont sélectivement retenus et une majorité des impuretés est éliminée (ou inversement). Le volume d'échantillon pouvant être chargé sur la cartouche dépend de la nature et de la masse d'adsorbant ainsi que du débit de chargement. Ainsi une cartouche avec une masse plus importante permettra de charger un plus grand volume d'échantillon sans risque de saturer l'adsorbant et de perdre des analytes non retenus. Un débit trop important ne permettra pas des interactions optimales entre les composés et la phase.
- Afin de purifier l'extrait, le lavage de l'adsorbant permet d'éliminer les impuretés présentant moins d'interactions avec l'adsorbant que les composés d'intérêt (ou inversement). Il est nécessaire d'optimiser les solvants employés dans cette étape en termes de polarité ou de pH afin de maximiser les interactions du solvant de lavage avec les impuretés (ou analytes) mais minimiser celles des analytes (ou interférents) retenus dans l'adsorbant. Une étape de séchage de l'adsorbant peut permettre d'éliminer les traces restantes de solvant de lavage afin d'améliorer les rendements d'extraction.
- Enfin, la dernière étape est celle de l'élution. Cette étape consiste à récupérer 100% des composés d'intérêt retenus dans l'adsorbant. Le solvant employé doit donc avoir un maximum d'interactions avec les analytes. Il est également nécessaire de maintenir son volume le plus faible possible, afin de garantir un facteur de préconcentration important.

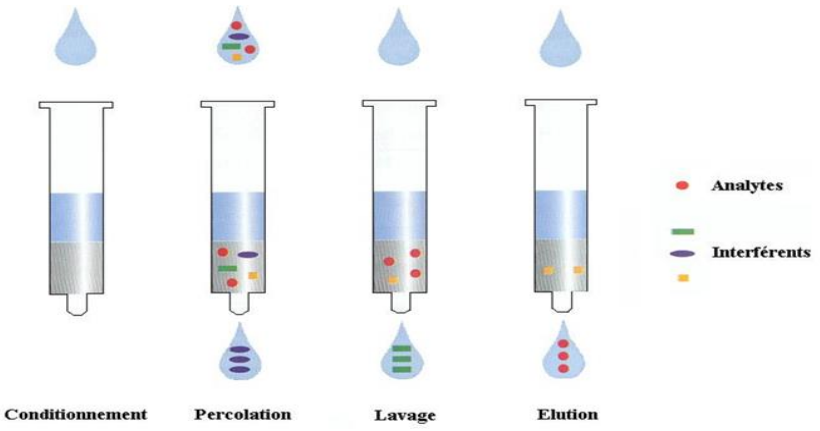


Figure 8 : Résumé des différentes étapes d'une extraction SPE (cas où les analytes sont retenus sur la phase adsorbante) (adapté de Combes et al.*, 2013)*

b. Micro-extraction sur phase solide (SPME)

La micro-extraction sur phase solide ou Solid Phase Micro-Extraction est une technique également employée dans l'analyse de micropolluants dans les matrices aqueuses environnementales (Chen, Mei, et Huang 2017; H. Wang et al. 2017; Costa Queiroz, Donizeti de Souza, et Marchioni 2019). L'extraction est basée sur l'adsorption des composés sur une fibre de silice recouverte d'une phase polymérique. Contrairement à la SPE, cette technique ne correspond pas à une extraction totale de l'analyte mais à son équilibre entre la matrice et le revêtement de la fibre. Le principal avantage de cette technique est de ne nécessiter qu'un faible volume d'échantillon, environ une dizaine de millilitres. Le temps d'adsorption est également rapide, entre 1 minute et jusqu'à 2h d'exposition. Cette technique reposant sur l'adsorption des analytes sur la phase puis leur désorption, il est alors nécessaire d'optimiser différents paramètres tels que la température, le pH et la force ionique de l'extrait, le temps de contact de la fibre avec l'extrait, afin d'obtenir une extraction maximale de l'ensemble des composés. Le solvant et le temps de désorption sont aussi des paramètres clés à optimiser pour récupérer la totalité des composés préalablement adsorbés sur la fibre. Plusieurs phases sont proposées, la plus courante étant le PDMS (PolyDiMéthylSiloxane), mais il en existe aussi en polypropylène ou DiVinylBenzène (DVB). La SPME est surtout utilisée pour des composés peu polaires, analysés ensuite par chromatographie en phase gazeuse après désorption de la fibre directement dans l'injecteur. Des fibres peuvent cependant être développées pour l'extraction spécifique de composés (Tableau 9).

Tableau 9 : Exemples de méthodes SPME pour l'analyse des aminoglycosides

Composés extraits	Matrice	Volume (mL)	Type de phase copolymère	Référence
Aminoglycosides	Eau de rivière	20	Polymères synthétisés spécifiques	(Chen, Mei, et Huang 2017)
Aminoglycosides	Extrait de poisson	10	Monolithe urée-formaldéhyde	(H. Wang et al. 2017)

c. Extraction par adsorption sur barreau aimanté (SBSE)

L'extraction sur barreau aimanté, ou Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) est similaire à l'extraction par SPME, en recouvrant un barreau aimanté d'une phase d'adsorption polymérique telle que le PDMS, le polyacrylate (PA) ou le PolyEthyleneGlycol (PEG) (Figure 9). Les volumes de phases employés en SBSE sont plus importants qu'en SPME, permettant d'atteindre ainsi des limites de détection et de quantification plus basses. Les paramètres à optimiser pour l'adsorption sont les mêmes que pour la SPME. La désorption se fait par l'ajout de quelques mL de solvant qui pourront ensuite être évaporés et repris dans des conditions adaptées à l'analyse. Cette technique a été initialement développée pour l'extraction de composés apolaires (exemples dans le Tableau 10). La synthèse de nouvelles fibres a permis plus récemment l'analyses de composés polaires dans les eaux (Bratkowska et al. 2012; Gilart, Cormack, et al. 2013; Gilart, Miralles, et al. 2013; Gilart et al. 2014; Padrón et al. 2014; Hu et al. 2015; Aparicio et al. 2017; Chen, Mei, et Huang 2017; Kanu 2021)

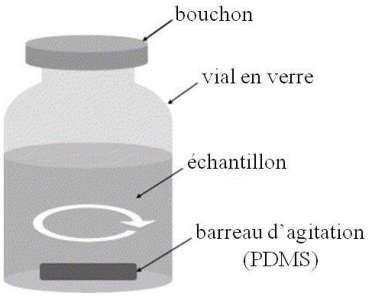


Figure 9 : Principe de fonctionnement de l'extraction par SBSE (Margoum et al. 2013)

Tableau 10 : Exemples d'extraction de divers composés dans des matrices aqueuses par SBSE

Composés extraits	Matrice	Volume (mL)	Type de phase copolymère	Référence
Composés pharmaceutiques	Eau de rivière	100	MAA-DVB	(Bratkowska et al. 2012)
	Rejet de STEP			
Composés pharmaceutiques	Intrant et effluent de STEP	50	PEGMA-PETRA	(Gilart, Cormack, et al. 2013)
			PA, PEG, PDMS	(Gilart, Miralles, et al. 2013)
AINS, PCB	Eaux de rivières	10	PANi/MWCNTs	(Hu et al. 2015)
Conservateurs, plastifiants, surfactants, retardateurs de flammes, hormones, composés pharmaceutiques et pesticides	Eau de surface	100	PDMS	(Aparicio et al. 2017)
	Eau du robinet		EG-Silicone	

d. Extraction sur particule magnétique (MSPE)

Depuis quelques années, l'extraction à l'aide de particules magnétiques (MSPE – Magnetic Solid Phase Extraction) est utilisée pour l'analyse d'antibiotiques dans les milieux liquides environnementaux (Tableau 9). Des particules magnétiques sont greffées avec différents substrats, tels que des nanotubes de carbones (MWCNT) (Herrera-Herrera et al. 2013), des polymères (Huang et al. 2013; Tolmacheva 2016; Xinghua Li et al. 2020), ou encore des complexes métalliques (Pinheiro et al. 2018; Zhao et al. 2020; Y. Li et al. 2021).

Lors de l'extraction, une certaine masse de particules magnétiques est ajoutée à l'échantillon, et les analytes d'intérêt sont adsorbés à leur surface (Figure 10). Les particules sont ensuite isolées à l'aide d'un aimant afin de pouvoir éliminer l'échantillon liquide. Elles sont ensuite remises en solution dans un solvant de désorption afin de libérer les analytes précédemment adsorbés. Les particules sont finalement à nouveau aimantées pour s'agglomérer et permettre la récupération du solvant enrichi en analytes. Une fois débarrassées de leurs analytes, les particules magnétiques peuvent être réutilisées plusieurs fois, permettant ainsi une économie de consommable et une réduction des déchets générés lors de l'extraction.

Les paramètres à optimiser lors de l'extraction MSPE sont également le pH et la force ionique de l'échantillon, la masse d'adsorbant, le temps de contact entre l'adsorbant et l'échantillon, ainsi que le solvant d'élution et le temps de désorption.

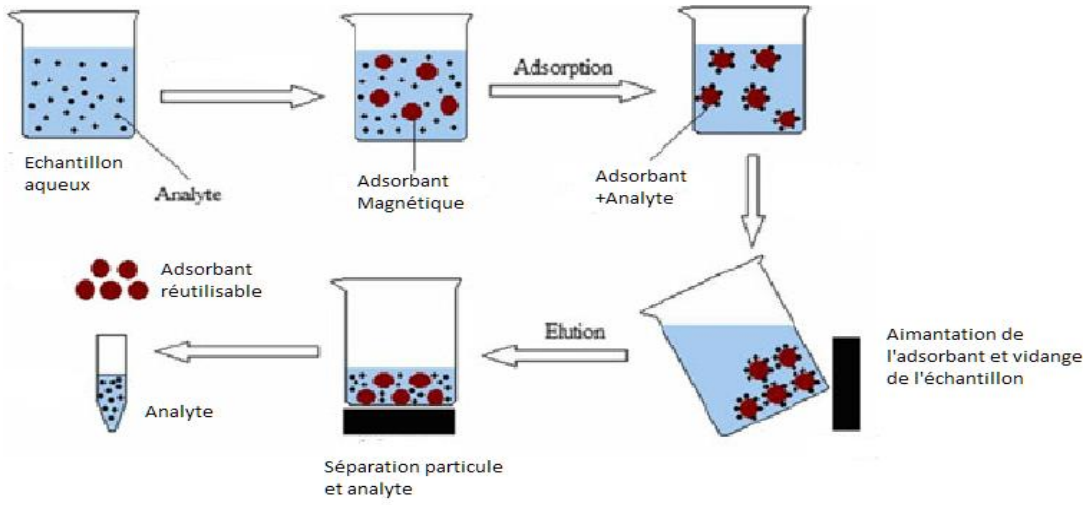


Figure 10 : Principe de fonctionnement de l'extraction MSPE (adaptée de (Safarik et al. 2012)

Tableau 11 : Exemples d'extractions MSPE d'antibiotiques dans des matrices aqueuses environnementales

Composés extraits	**Matrice**	**Volume extrait (mL)**	**Type de phases**	**Masse d'adsorbant (mg)**	**Références**
Sulfonamides	Eau milliQ	250	MWCNT	300	(Herrera-Herrera et al. 2013)
	Eau faiblement minéralisée				
	Eau de rivière	25	Polystyrène	20	(Tolmacheva 2016)
Fluoroquinolones	Eau de lac	50	Poly(vinylimidazole-co-divinylbenzene)	50	(Huang et al. 2013)
	Eau de surface				
	Eau de lac	50	Acide boronique	30	(C. Liu, Liao, et Huang 2016)
	Eaux de surface				
Macrolides	Eau de surfaces	50	Acide oléique	70	(Pérez et al. 2017)
Bêta-lactames	Eau de rivières	100	Polypyrole	30	(Xinghua Li et al. 2020)

ii. Extraction de matrices solides

Avant la réalisation d'extraction, les matrices solides sont lyophilisées, broyées et tamisées afin de ne garder que des particules fines, souvent de diamètre inférieur à 250 µm. Ceci permet de travailler sur un échantillon homogène et d'augmenter la surface de contact avec le solvant organique, afin d'améliorer la reproductibilité des extractions et les rendements d'extraction.

a. **Extraction assistée par Ultrasons (UAE)**

Lors d'extraction par ultrasons, ou Ultrasonic Assisted Extraction (UAE), l'application des ultrasons va entrainer un phénomène de cavitation, accélérant ainsi la dissolution et la diffusion du solvant en créant des zones de hautes chaleurs. Les ultrasons fragilisent également les interactions analyte-matrice, facilitant leur passage dans le solvant d'extraction. De courts temps d'extractions avec de faibles volumes de solvants sont employés. L'extraction par ultrasons permet d'extraire une large gamme de composés, en jouant sur la polarité et les volumes de solvants utilisés. Il s'agit d'une des extractions les plus simples à mettre en œuvre lors de l'analyse d'antibiotiques dans les matrices solides environnementales (Tableau 12) telles que les boues de STEP (Martín et al. 2010; Tang et al. 2012; Gago-Ferrero et al. 2015; Malvar et al. 2020), les sols (Ferhi et al. 2016) ou encore les sédiments (Al-Khazrajy et Boxall 2017).

Tableau 12 : Exemple d'extractions UAE pour l'analyse des antibiotiques dans des matrices solides environnementales

Composés extraits	Type de matrice	Masse (mg)	Solvant sélectionné	Durée (min)	Références
16 composés pharmaceutiques	Boue de STEP	1000-1500	MeOH/Acétone	15	(Martín et al. 2010)
	Compost	2000			
	Sédiment	2000			
5 fluoroquinolones + 2 tétracyclines	Boue	200	ACN/1 mM EDTA (1/1)	10	(Tang et al. 2012)
	Sédiment				
3 AINS + 4 antibiotiques	Boue	200	MeOH/Eau (1/1)	15	(Garcia-Rodríguez et al. 2014)
148 composés pharmaceutiques	Boue	100	MeOH/ (Eau + 0.5% AF + 0.1% EDTA) (1/1)	15*3 extractions	(Gago-Ferrero et al. 2015)
6 composés pharmaceutiques	Sédiment	5000	2% NaOH dans MeOH 2% AF dans MeOH MeOH	15*3	(Al-Khazrajy et Boxall 2017)

b. Extraction par micro-ondes (MAE)

L'extraction par micro-ondes ou Microwave Assisted Extraction (MAE) se réalise par une interaction entre un rayonnement électromagnétique et la matière à extraire, avec un chauffage effectué par transfert d'énergie entre les ondes et des solvants polaires. L'application des micro-ondes va permettre l'augmentation de la solubilité des analytes ainsi qu'une perturbation des interactions matrice-analytes. Quelques exemples d'extractions par micro-ondes sont recensés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Exemples d'extractions par micro-ondes dans des matrices solides

Composés extraits	Type de matrice	Masse (mg)	Solvant	Durée (min) - Température	Références
Sulfonamides	Sol	1000	MeOH	60 min - 110°C	(Balakrishnan, Exall, et Toito 2014)
	Sédiment				
Fluoroquinolones	Compost	300	40% $Mg(NO_3)_2$ $6H_2O$+ 4%NH_3	30 min - 135°C	(Speltini et al. 2015)
7 composés vétérinaires	Sol	1000	10% $Mg(NO_3)_2$: NH_4Cl (9:1, v/v) + 0,5 mL MeOH	3*10 min - 60°C	(Łukaszewicz et al. 2017)

Les extractions assistées par ultrasons ou par micro-ondes sont cependant des méthodes qui nécessitent un temps d'extraction relativement long (souvent supérieur à 30 minutes). La MAE utilise également des moyens de chauffage importants susceptibles de dégrader les analytes présents dans les extraits.

c. Extraction par solvant pressurisé : PLE

L'extraction PLE (Pressurized Liquid Extraction) est une technique de préparation d'échantillons utilisant des températures et des pressions élevées (40-200°C et 30-200 bars). L'augmentation de température favorise l'extraction de composés en augmentant leur solubilité dans le solvant. La viscosité du solvant est également diminuée avec l'augmentation de la température, permettant une meilleure diffusion du solvant dans la matrice. L'augmentation de pression permet de maintenir le solvant sous forme liquide à ces hautes températures. Lors de l'extraction PLE, une cellule en acier est remplie d'un mélange échantillon solide-dispersant inerte. Il existe différents dispersants (Hoff et Pizzolato 2018), notamment de la terre de diatomée. Le mélange de la matrice avec de la terre de diatomée permet une meilleure dispersion de l'échantillon, augmentant ainsi la surface d'échange avec le solvant.

La cellule est placée dans un four et est préchauffée pendant quelques minutes. Le solvant remplit ensuite la cellule, augmentant ainsi la pression. Le solvant reste au contact de l'échantillon pendant une durée prédéterminée, puis une purge avec de l'azote est réalisée pour chasser l'échantillon dans un flacon de récupération (Figure 11). Il est possible d'effectuer plusieurs cycles d'extraction afin de maximiser les rendements d'extraction des composés d'intérêt. L'extraction PLE est régulièrement employée pour les antibiotiques tels que les sulfonamides ou les tétracyclines (Tableau 14).

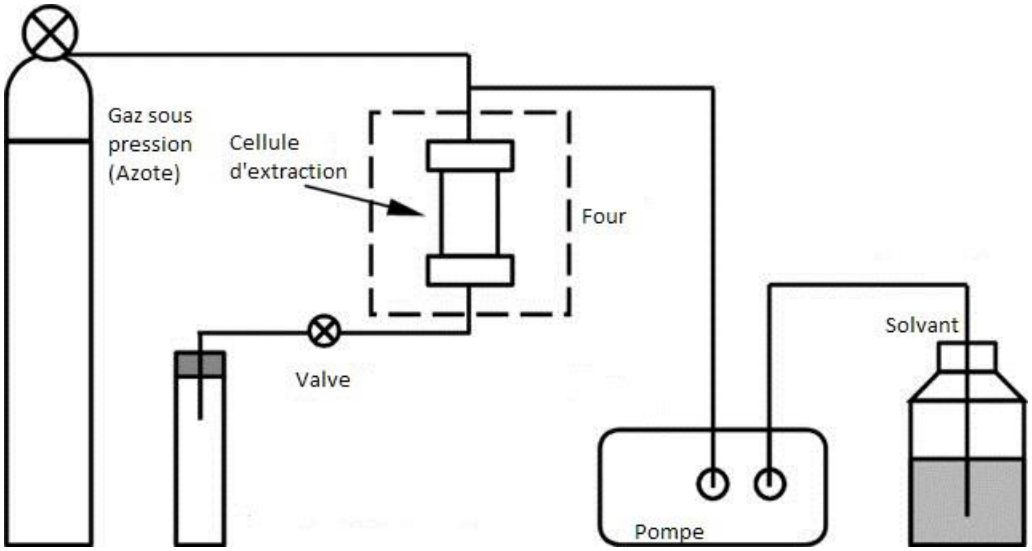


Figure 11 : Schéma du montage de l'extraction PLE (adapté de Lundstedt, 2003)

Tableau 14 : Exemples d'extraction d'antibiotiques par PLE

Composés extraits	**Type de matrice**	**Masse extraite (g)**	**Matrice inerte**	**Solvant**	**Température-Durée**	**Références**
Tétracycline, Macrolides, Sulfonamides	Sol	10	Sable d'Ottawa	MeOH/0,2M acide citrique (1/1)	TAmb-13 min	(Jacobsen et al. 2004)
Sulfonamide, macrolides et autres composés pharmaceutiques	Boue	5	Al_2O_3	H_2O (pH 3) /MeOH (1/1)	80°C-10min	(Nieto et al. 2007)
Tétracyclines, Fluoroquinolones	Sol	5	Terre de diatomée	MeOH/ACN/0,2M acide citrique (pH 4,5) (2/2/1)	80°C-20min	(Salvia, Fieu, et Vulliet 2015)
	Boue	0,5				
Sulfonamides	Sol	5	Hydromatrix dispersant	MeOH/H_2O (90/10)	100°C-20min	(García-Galán, Díaz-Cruz, et Barceló 2013)
	Boue	2		ACN/H_2O (25/75)	50°C-20 min	
Antibiotiques (dont 1 bêta-lactame)	Matières en suspension	/	Terre de diatomée	MeOH	80°C-20 min	(Tlili et al. 2016)

Berrada *et al.* (Berrada et al. 2010)ont appliqué cette technique à l'analyse des aminoglycosides dans des extraits de viande et reportent des taux d'extraction moyens de 80%.

L'efficacité de cette technique est aussi son inconvénient majeur: l'extraction peut ne pas être sélective et engendre de fortes concentrations d'interférents en plus des analytes d'intérêt dans les extraits. Il est donc nécessaire de développer des méthodes de purification ultérieures. L'extrait PLE étant liquide, il est possible d'utiliser des techniques de SPE, notamment dispersives (dSPE) pour le purifier. Également, en plus d'une matrice inerte pour disperser l'échantillon, il peut être envisageable d'ajouter une matrice permettant la purification de l'extrait, tels du florisil (oxydes de silicium et de magnésium) (Aznar et al. 2018) pour retenir les composés polaires ou encore des phases greffées en C_{18} ou PSA (Primary and Secondary Amine) (García-Valcárcel et Tadeo 2009) pour éliminer les interférents co-extraits avec les composés d'intérêts.

Bien que l'extraction par PLE soit généralement plus rapide que des extractions UAE et MAE, l'apport de chauffage dans cette méthode peut également affecter les molécules à extraire et les dégrader. Pour des molécules facilement transformables et dégradables, il est donc nécessaire d'envisager des méthodes réalisées à température ambiante telles que l'extraction QuEChERS par exemple, décrite ci-après.

d. Extraction assistée par des sels : méthodologie QuEChERS

La méthodologie QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged and Safe) a été développée par Anastassiades et *al.* (Anastassiades et al. 2003) pour l'extraction de pesticides dans des matrices végétales alimentaires. La méthode est divisée en deux étapes : l'extraction et la purification.

Dans la méthode originale, l'extraction des molécules d'intérêt est réalisée par une partition liquide-liquide assistée par NaCl, entre une phase aqueuse et une phase organique (acétonitrile). Deux mélanges de sels d'extraction sont disponibles : un mélange « Original method » correspondant à la méthode développée par Anastassiades contenant du $MgSO_4$ (asséchant) et NaCl, et un dit « Veterinary Drugs », remplaçant le $MgSO_4$ par du Na_2SO_4. Deux modifications ont été apportées à la méthode originale par l'ajout de composés modificateurs du pH des extraits, afin de limiter la dégradation de certains analytes sensibles : dans la norme américaine

(AOAC), des sels d'acétate sont ajoutés pour atteindre un pH de 4,8 alors que dans la norme européenne (EN), c'est un tampon citrate qui stabilise le pH à 5-5,5.

La méthode QuEChERS et des adaptations sont souvent utilisées pour la détermination de composés pharmaceutiques dans les matrices solides environnementales (Tableau 15) (Salvia et al. 2012; Peysson et Vulliet 2013; Alexandre Bergé et al. 2016; Guo et al. 2016; Martínez-Piernas et al. 2018; Ajibola, Tisler, et Zwiener 2020; da Silva et al. 2020; Malvar et al. 2020)

Suite à l'extraction, le surnageant organique peut être purifié par SPE dispersive (dSPE). Différents adsorbants sont utilisables en fonction de la purification souhaitée :

- PSA : mélange d'amines primaires et secondaires, permet de réduire les interférents polaires comme les sucres ou les petits acides organiques
- C_{18} : retire les interférents apolaires comme les acides gras
- GCB : noir de carbone graphite, permet d'éliminer les pigments comme la chlorophylle ou les caroténoïdes.

Tableau 15 : Exemples de quelques composés extraits par la méthode QuEChERS

Composés extraits	**Matrice**	**Masse**	**Sels QuEChERS**	**Purification**	**Références**
Composés pharmaceutiques + Hormones	Boue de STEP	2 g	Acétate	PSA	(Peysson et Vulliet 2013)
Antibiotiques	Boue de STEP	1 g	Citrate	PSA	(Ajibola, Tisler, et Zwiener 2020)
Surfactants	Boue	500 mg	Citrate	Dilution + SPE	(Alexandre Bergé et al. 2016)
Parabènes + Composés pharmaceutiques	Boue	2 g	Original	PSA/C18	(Malvar et al. 2020)

e. **Méthode QuPPe**

L'extraction QuEChERS permet d'extraire avec de bons rendements de nombreuses familles de composés, mais les composés les plus polaires ne sont que peu extraits, du fait de leur faible capacité de transfert entre la phase aqueuse et la phase organique.

La méthode QuPPe (Quick Polar Pesticide) a été développée ces dernières années par les laboratoires de référence pour l'analyse de pesticides (Domingos Alves et al. 2016; Y. Han et al. 2016; Bauer et al. 2018; Francesquett et al. 2019; Melton, Taylor, et Flynn 2019; Manzano-Sánchez et al. 2020; Subudhi et al. 2020; Hidalgo-Ruiz et al. 2021) en complément des méthodes QuEChERS afin de permettre l'extraction de composés hautement polaires, pesticides (par exemple le glyphosate) ou médicaments (par exemple aminoglycosides). L'extraction est réalisée avec 10 mL de méthanol contenant 1% d'acide formique, agité pendant 1 à 15 minutes, suivie d'une congélation pendant 90 minutes à -20°C. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et analysé.

2. *Séparation par Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)*

La chromatographie liquide est une technique de séparation reposant sur les interactions entre les analytes, une phase stationnaire solide et une phase mobile liquide. Cette technique permet la séparation de composés peu volatils et/ou thermosensibles. La rétention des composés va évoluer en fonction de leurs différentes affinités avec la phase mobile et la phase stationnaire respectivement.

i. Séparation en phase inverse (RP-LC)

La chromatographie liquide en phase inverse se base sur l'emploi d'une phase stationnaire globalement apolaire, grâce au greffage de la silice par des groupements apolaires. La phase mobile est constituée d'un solvant faible, souvent de l'eau, et d'un solvant fort, typiquement du méthanol ou de l'acétonitrile. Le solvant fort étant plus apolaire que l'eau, l'augmentation du pourcentage en solvant fort va permettre l'élution des composés de plus en plus apolaires,

préférant les interactions avec la phase mobile plutôt que la phase stationnaire. Les composés polaires seront donc les premiers élués. Il existe une multitude de phase stationnaires permettant d'améliorer et de moduler la séparation. Les phases greffées C_8 et $C_{18,}$ présentant des chaînes carbonées linéaires à 8 et 18 carbones, respectivement, sont les plus couramment utilisées (Salvia et al. 2012; Bourdat-Deschamps et al. 2014; Pinasseau et al. 2019) mais des phases de type biphenyl ou phenyl-hexyl (Jabot et al. 2016) sont également employées lors de la séparation de molécules à caractère cyclique ou aromatique. Une phase pentafluorophenyle (PFP-F5) sera plus sélective à la rétention de composés halogénés, ou polaires. Des modifications à la surface de la silice peuvent également apporter un caractère de séparation supplémentaire. Des groupements polaires ou ioniques greffés permettront une rétention améliorée des composés polaires, acides et bases afin d'améliorer la séparation chromatographique. Il est également possible d'utiliser des additifs dans les phases mobiles afin de modifier les interactions de cette dernière avec les analytes. Par exemple, en acidifiant les phases, les composés peuvent se retrouver sous forme ionisée et avoir une interaction moindre avec la phase stationnaire, favorisant leur élution.

ii. Chromatographie liquide d'interaction hydrophile (HILIC)

La séparation en mode HILIC est utilisée en complément de la séparation en phase inverse, afin de retenir les composés polaires non retenus précédemment. En mode HILIC, une couche d'eau est formée à la surface de la phase stationnaire et le solvant faible est alors l'acétonitrile. Les composés polaires vont préférentiellement se déplacer vers la phase aqueuse et interagir avec la phase stationnaire (McCalley 2017). Au cours de l'analyse, la proportion en eau augmente, éloignant les composés de la phase stationnaire et permettant ainsi leur élution. Plus le logKow d'une molécule est bas, plus la rétention de ce composé sera efficace en mode HILIC. Cette méthode a été précédemment employée pour l'analyse des aminoglycosides (Qiu et al. 2020; Peru et al. 2006; Oertel, Neumeister, et Kirch 2004; Chiaochan et al. 2010; Gremilogianni, Megoulas, et Koupparis 2010; Dasenaki, Michali, et Thomaidis 2016; Moreno-González et al. 2017; Asakawa et al. 2018) ou d'autres petites molécules (Onorato et al. 2008; Sordet, Buleté, et Vulliet 2018) de fortes polarités.

iii. Autres types de chromatographie liquide

D'autres séparations en chromatographie liquide existent également pour les composés qui ne seraient que peu retenus en RP-LC ou en HILIC. D'autres principes de séparation sont alors mis en jeu. Par exemple, une séparation par appariement d'ions se fonde sur l'utilisation d'un

contre-ion qui interagira avec la phase stationnaire d'une part et l'analyte d'autre part pour permettre sa rétention (Gustavsson et al. 2001; Cheng et al. 2010). La chromatographie ionique peut être également employée, avec l'utilisation de résines échangeuses d'ions permettant la rétention sélective des cations ou des anions. Leur élution est dans ce cas réalisée par augmentation de la force ionique de la phase mobile.

3. *Analyse*

i. Analyses ciblées

De nombreuses méthodes ont été développées pour l'analyse ciblée et quantitative de résidus médicamenteux et de biocides vétérinaires. Ces méthodes étant en majorité développées sur un faible nombre de molécules, leur optimisation permet une meilleure sélectivité, ce qui induit une plus grande sensibilité. L'augmentation de la sélectivité permet aussi de réduire les étapes de purification des échantillons, étapes qui peuvent engendrer la dégradation ou la perte de certains analytes.

a. Spectrométrie de masse en tandem – Utilisation de spectromètre à triple quadripôles

De manière générale, à la suite d'une séparation par chromatographie liquide, la détection des composés est assurée par spectrométrie de masse en tandem. Cette technique se fonde sur l'utilisation de deux analyseurs de masse, séparés par une cellule de collision (Figure 12). Un composé parent est filtré dans le premier analyseur, puis fragmenté dans la cellule de collision par contact avec un gaz inerte. Le second analyseur permet ensuite de filtrer les ions fragments (ou ions fils) ainsi générés. Typiquement, les deux analyseurs utilisés en analyse ciblée sont des quadripôles. Ces systèmes réalisent la séparation des ions selon leur rapport masse/charge (m/z) par l'application de tension continue et alternative autour de chaque quadripôle. A chaque couple tension continue-tension alternative correspond un rapport m/z et la variation de ces tensions permet le balayage d'une gamme de masse.

Le mode d'acquisition le plus couramment utilisé pour l'analyse d'antibiotiques est aujourd'hui le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring, Figure 12) (Hammel et al. 2008; Vasquez et al. 2013; Ray et al. 2014; Svahn et Björklund 2019). Ce mode permet de réaliser l'acquisition des m/z d'un couple Parent-Fragment, appelé transition. Chaque transition étant propre à un analyte, l'acquisition MRM permet une détection spécifique du composé.

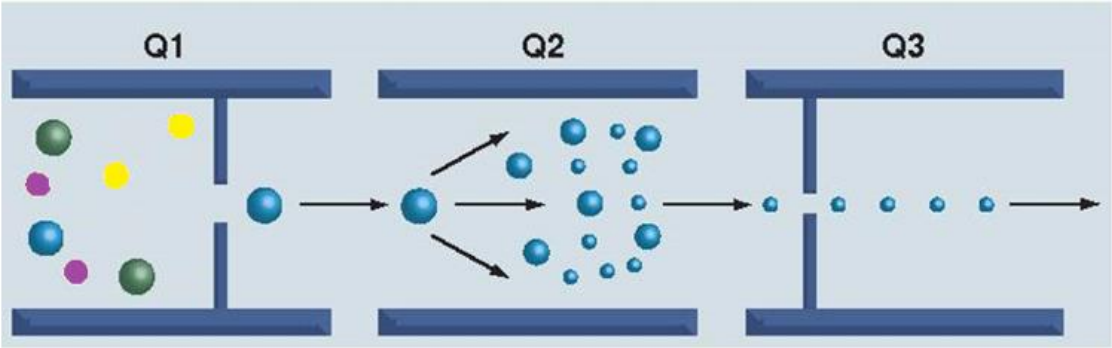


Figure 12 : Schéma de fonctionnement d'un triple quadripôle en mode MRM, adapté de Boja et Rodriguez 2011

b. Utilisation d'une trappe d'ion linéaire : cas de la MRM^3

Lors de l'analyse dans des matrices complexes, la détection par LC-MS/MS peut s'avérer limitée du fait d'un manque de spécificité ou de sensibilité. Actuellement, certains spectromètres de masse sont équipés d'une trappe à ion linéaire (LIT) à la place du troisième quadripôle. Cette modification rend possible une fragmentation de l'ion fils initialement généré en MS/MS et l'accumulation des ions fragments de 2ème génération ainsi créés (Figure 13). Cette méthode de double fragmentation est appelée MRM^3 ou MS/MS/MS. L'acquisition de ces ions de 2ème génération permet de gagner un niveau de spécificité lors de l'analyse de composés structurellement proches, ainsi que de la sensibilité liée à l'accumulation possible des fragments générés.

Figure 13 : Schéma de fonctionnement de l'acquisition par MRM3 (source : Sciex®)

La MRM^3 a été employée pour diverses matrices, et aussi bien pour l'analyse de petites molécules que de protéines. Mičová et al. (2012) proposent ainsi une analyse de quatre inhibiteurs de tyrosine kinase dans du plasma humain par dilution isotopique et introduction directe dans le spectromètre de masse avec une acquisition en MRM^3. La méthode ainsi

développée dure seulement 55 secondes et les limites de quantifications atteintes sont situées entre 1 et 6 ng.mL^{-1}, soit cinq fois plus basses que celles obtenues en LC-MS/MS. Leur méthode est également précise avec des biais de quantification inférieurs à 5% dans les échantillons de plasma ou de sang. Dans différentes études (Fortin et al. 2009; Lemoine et al. 2012; Jaffuel et al. 2013; Simon et al. 2014; Jeudy et al. 2014), l'équipe de Jérôme Lemoine a mis en avant l'usage de la MRM^3 pour l'analyse de biomarqueurs et de protéines dans des fluides biologiques tels que l'urine, le plasma ou encore le sérum. Par exemple, Jaffuel *et al.* (2013)présentent la diminution d'un facteur 5 des limites de quantifications par rapport à celles précédemment atteintes en acquisition LC-MS/MS. Dans chacune de leurs études, la détection a été significativement améliorée d'un facteur de 2 à 5.

La MRM^3 a également été employée lors de campagnes d'analyses dans lesquelles les échantillons n'étaient disponibles qu'en faible quantité, limitant les capacités de préparation d'échantillons et de concentration. Onorato *et al.* (2008) ont ainsi pu déterminer la concentration d'un biomarqueur de glycémie dans seulement 50 µL d'urine. Sans préparation d'échantillon, ils ont pu atteindre une limite de quantification de 50 ng.mL^{-1} avec une acquisition en MRM^3. Des limites de quantification similaires avaient été atteintes en LC-MS/MS précédemment avec un volume de 200 µL ayant subi une purification sur colonne échangeuse d'ions et une dérivation avant d'être analysé.

Dans les matrices alimentaires, l'apport de sensibilité et de spécificité fourni par l'acquisition en MRM^3 a permis de détecter des adultérations de produits hautement transformés. Par exemple, von Bargen *et al.* (2013; 2014)ont proposé une méthode MRM^3 pour vérifier la composition en viande dans des produits halal ou dans des plats cuisinés, en détectant des marqueurs protéiques spécifiques du porc et du cheval. Par LC-MS/MS, ils détectaient une adultération seulement à partir de 0,55% de modification. Lors de l'analyse en MRM^3, ce seuil a été abaissé à 0,15%. La détection de différents allergènes a également pu être améliorée. En effet, Korte *et al.* (2016) ont montré un gain de sensibilité apporté par la détection en MRM^3 d'un facteur 2 à 100.

Dans l'analyse environnementale, les matrices sont souvent chargées en matières organiques et contiennent un grand nombre possible de contaminants. De nombreux interférents peuvent donc être présents lors de l'analyse, augmentant les limites de quantification des composés d'intérêts. L'emploi de méthode d'analyse par LC-MRM^3 permet de diminuer ou de compenser les hausses de bruit de fond apportées par la matrice. Ainsi, Sordet *et al.* (2018) ont développé une

méthode pour la détermination d'agents de contraste dans des eaux de stations d'épuration. Lors de leur analyse, le rapport S/N des composés a été amélioré d'un facteur 2 par rapport à l'emploi de la MRM usuelle.

Le gain de signal apporté par la MRM^3 permet également de détecter de plus petites variations de concentrations entre échantillons. Cette caractéristique permet par exemple l'établissement de courbes de cinétique d'accumulation de composés dans des organismes, comme réalisé par Sordet *et al.* (2016) pour l'accumulation de 3 micropolluants émergents : la carbamazépine, l'oxazépam et la testostérone. Dans leur étude, le gain en spécificité de la MRM^3 a aussi été mis en évidence lors de la détection de la testostérone. En effet, la seconde fragmentation de la molécule leur a permis d'éliminer un composé inconnu qui interférait avec le pic de testostérone lors de l'analyse par MRM.

ii. Analyses non ciblées et criblage de suspects

Au contraire de l'analyse ciblée, réalisée par définition sur une liste prédéterminée de molécules, avec des paramètres d'acquisitions optimisés pour chaque composé, l'utilisation de méthodes d'analyses non ciblées permet une acquisition de l'intégralité de l'information présente dans un échantillon (ou un extrait), pour rechercher des composés sans *a priori*. Ce type d'analyse nécessite une précision de masse inférieure à 10 ppm et donc des analyseurs haute résolution (temps de vol ou orbitrap par exemple). Suite au grand volume de données générées par l'analyse non-ciblée, une des stratégies d'identification des composés présents est l'utilisation de bases de données. On parle alors de « criblage de suspects ». Les composés sont identifiés sur la base du temps de rétention, de la masse exacte, et de la correspondance du profil isotopique de l'ion parent et d'ions fragments. Les valeurs expérimentales sont comparées à ces mêmes informations enregistrées dans des bases de données.

En 2014, Schymanski *et al.* (2014) ont proposé un système à cinq niveaux, pour communiquer avec certitude les résultats de l'identification de composés à partir de données acquises en Spectrométrie de Masse Haute Résolution (HRMS). Cette classification a été réduite à 3 niveaux par le groupe de travail français GT-NTS (Groupe Français non-Target Screening) (C. Soulier et al. 2021)(Figure 14).

La correspondance des critères d'identification avec ceux enregistrés dans des bases de données permet d'obtenir une identification de niveau 2, c'est-à-dire la détermination de la structure

probable du composé. Afin de lever l'existence de faux positifs et de confirmer la structure, il est nécessaire de doper l'échantillon analysé avec le(s) standard(s) de référence des molécules suspectées au niveau 2. Le niveau 1 d'identification est atteint si les critères de temps de rétention et de masse entre le composé suspect et celui du standard certifié sont respectés.

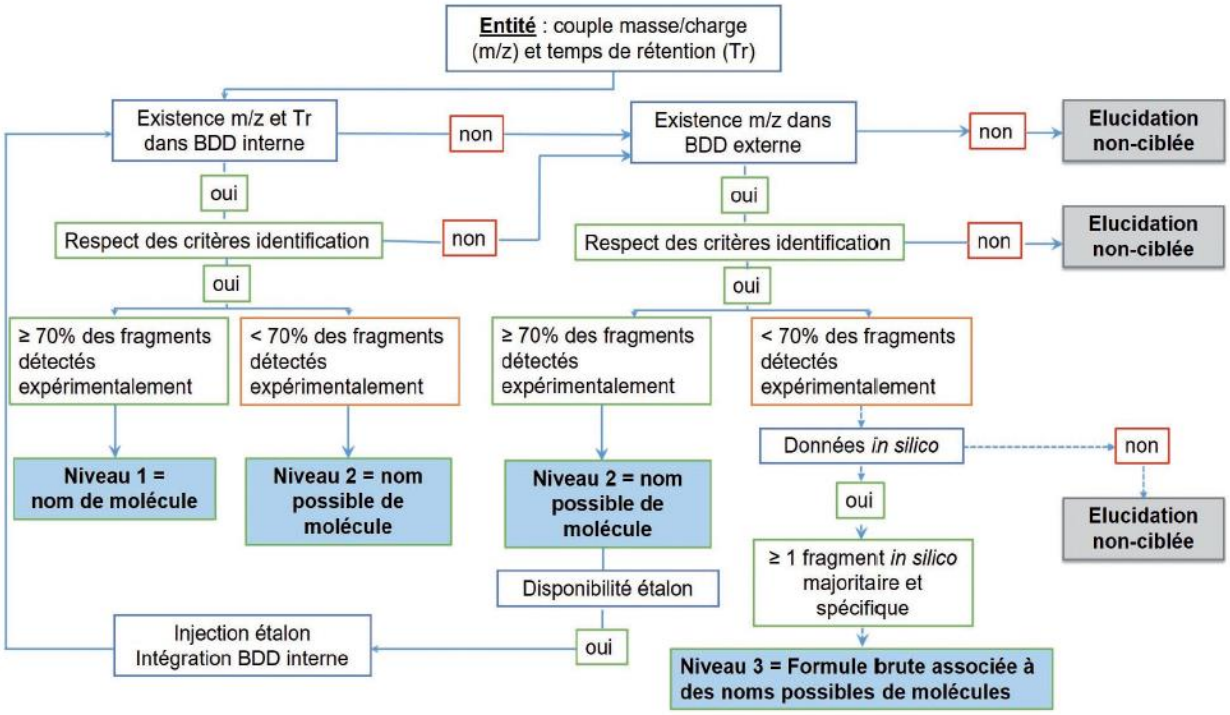


Figure 14 : Description des niveaux de confirmation des données en HRMS proposés par Soulier et al. (2021)

Avec l'obtention de la masse exacte et du spectre de masse pour chaque composé détecté, il est possible d'identifier un grand nombre de composés présents, en une seule analyse(Ibáñez et al. 2008; Aceña et al. 2015; Singer et al. 2016; Martínez-Piernas et al. 2018; Black, Anumol, et Young 2019). Les méthodes d'analyses non ciblées par HRMS suivies d'un criblage de suspects sont donc utilisées dans de nombreuses applications, et peuvent répondre à plusieurs objectifs.

Par exemple cette technique est de plus en plus employée en première approche afin de prioriser les molécules en vue de méthodes de quantification en analyse ciblée, plus sensibles(Bletsou et al. 2015; Caballero-Casero et al. 2021; Menger et al. 2021; Qian et al. 2021). Ainsi, Pinasseau *et al.* (2019)ont pu mettre en évidence 40 micropolluants dans des eaux souterraines en combinant l'analyse haute résolution avec l'utilisation d'échantillonneurs passifs et la comparaison à une base de données créée par le fournisseur du spectromètre de masse. Ces 40 polluants ont ensuite été suivis dans des campagnes d'analyse d'eaux souterraines. Wiest *et al.* (Wiest et al. 2021) ont également pu identifier et sélectionner 37 composés pharmaceutiques et

4 pesticides dans des intrants et effluents de station d'épuration, par HRMS, pertinents à quantifier ensuite de manière fine lors de plusieurs campagnes. Le criblage de suspects permet également l'identification de produits de transformation dans les échantillons (Gómez et al. 2010; Bletsou et al. 2015; Majewsky, Glauner, et Horn 2015). Les masses exactes théoriques de produits de transformation (listées d'après la littérature ou des outils de prédiction de dégradation) sont recherchées dans les données expérimentales (Jabot et al. 2016; Psoma et al. 2021).Enfin l'évaluation de l'efficacité de traitements des eaux usées peut également être faite par cette approche, en suivant un très grand nombre de composés, sans besoin de disposer d'étalons analytiques (A. Bergé et al. 2018).

IV. Objectifs de la thèse

L'objectif de cette première partie était de présenter le contexte de l'étude, la sélection des molécules d'intérêt ainsi que de recenser les différents travaux effectués sur ces analytes, avec les méthodes employées aussi bien au niveau de la préparation d'échantillon que de leur analyse. À la suite de cette étude bibliographique, différents objectifs ont été identifiés :

- Développer des méthodes d'extraction et d'analyse des aminoglycosides dans les eaux et dans les matrices solides
- Améliorer l'extraction des bêta-lactames dans les boues de station d'épuration en incluant les produits de transformation dans les méthodes, pour permettre le suivi de leur dégradation dans l'environnement
- Développer des méthodes d'analyses sensibles permettant la détection des bêta-lactames à l'état de traces ou d'ultra-traces dans les matrices solides
- Identifier les composés présents dans différentes MAFORs épandues par criblage de différentes bases de données avant de développer des méthodes d'extraction et de quantification spécifiques pour une analyse ciblée.

Chapitre 2 :

Développement d'une méthode d'analyse par chromatographie d'appariement d'ions couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour la quantification d'aminoglycosides dans l'environnement

I. Introduction

Les aminoglycosides correspondent à une famille d'antibiotiques dont la structure générale contient 2-3 cycles glycosidiques sur lesquels sont greffées des fonctions amines et alcools : ainsi ce sont des bases polycationiques. Ils sont régulièrement employés en médecine vétérinaire, représentant 10% des ventes globales d'antibiotiques vétérinaires en France. Cependant, leur analyse dans l'environnement reste peu réalisée du fait de leur haute polarité (logKow entre -3 et -9) qui rend complexes les étapes de préparation d'échantillon et de séparation chromatographique.

Dans ce chapitre, le développement de méthode s'est tout d'abord porté sur l'analyse d'eaux de stations d'épuration par LC-MS/MS. Les molécules sélectionnées sont la spectinomycine, la streptomycine, la dihydrostreptomycine, la kanamycine, l'apramycine, la gentamicine (C1, C1A, C2), la néomycine et la sisomicine. Dans la littérature, les méthodes décrites sont partagées entre la chromatographie liquide à appariement d'ions (IPLC) et la chromatographie d'interactions hydrophiles (HILIC). Une approche innovante pour l'analyse des aminoglycosides dans des matrices environnementales a été développée dans le cadre de cette thèse : la méthode s'appuie sur de l'appariement d'ions, mais en ajoutant les sels d'appariement directement dans le vial d'injection au lieu de les ajouter aux phases mobiles.

II. Analyse des aminoglycosides dans des eaux

Afin d'effectuer l'analyse des aminoglycosides dans les eaux, le développement d'une méthode par chromatographie liquide avec appariement d'ions (IPLC) a été réalisé. Celui-ci a fait l'objet d'un article paru dans Journal of Chromatography A (https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462133).

Pour résumer cette étude, les sels d'IPLC qui ont été sélectionnés font partie de la famille des alcane-sulfonates. Le groupement SO_3^- étant chargé négativement en permanence, des interactions ioniques se créent avec les différents sites cationiques des aminoglycosides. La rétention est ensuite assurée par les interactions entre la chaîne alcane du sel d'appariement et les chaînes C_{18} de la colonne chromatographique.

L'optimisation de la séparation chromatographique a été réalisée en modifiant la longueur des chaînes carbonées du sel d'appariement. Il a été noté que plus la longueur de chaîne augmente, plus les aminoglycosides sont retenus sur la colonne, et que sans sels, aucune rétention n'est observée. A partir d'une chaîne composée de 5 carbones (C_5), la séparation commence à être efficace et la globalité des pics des composés sont résolus lors de l'emploi de sels en C_6 ou C_7. Un intérêt particulier a ensuite été porté sur l'optimisation des proportions de ces deux sels afin d'améliorer la séparation. Il a été démontré qu'un mélange 50/50 C_6/C_7 permet une séparation suffisante et rapide. Enfin, l'impact du temps de conditionnement de la colonne a été étudié. Sur une colonne exempte de sels, il a été mis en évidence que l'injection d'au moins 5 blancs contenant des sels d'appariement permettait d'obtenir des temps de rétention stables et répétables au cours de la séquence d'analyse.

Les performances de la méthode ainsi développée ont été évaluées dans des eaux de rivières ainsi que dans des eaux d'influent et d'effluent de stations d'épuration. Les limites de quantification ont été déterminées à partir de courbes de calibration et sont comprises entre 0,6 et 470 $ng.mL^{-1}$. Elles sont similaires à celles obtenues dans la littérature pour l'analyse dans l'environnement. Cependant, les autres études comportent toutes une étape de préconcentration pour atteindre ces limites. La méthode proposée ici se rapproche plus d'une méthode « dilute and shoot » avec seulement l'addition des sels directement dans le vial. Elle est donc plus rapide et moins consommatrice de solvant, tout en possédant une sensibilité similaire. Les effets de matrices se situent globalement entre -20% et 20%. Ils sont donc négligeables, ce qui implique que des calibrations externes en solvant peuvent être employées. Enfin, la répétabilité intra-jours et la précision intermédiaire ont été déterminées : au niveau de la limite de quantification, les variations standards intra-jours étaient inférieures à 20% pour tous les composés. Aux niveaux supérieurs aux limites de quantification, les variations ont été inférieures à 12%. Ainsi, avec cette méthode, l'ensemble des composés sont quantifiés entre 85% et 115% de leur concentration nominale.

La méthode a finalement été appliquée à 3 intrants et 3 effluents de stations d'épuration autour de Lyon. Aucun aminoglycoside n'a été détecté dans les échantillons d'eau. Ces échantillons ont également été préalablement dopés à 10 fois la limite de quantification, afin d'évaluer l'exactitude de la méthode : pour chaque analyte, la concentration mesurée se situe entre 75 et 125% de la concentration ajoutée.

Article 1: Aminoglycosides analysis optimization using Ion pairing Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry and application on wastewater samples

Alexandre Guironnet[1], Concepcion Sanchez-Cid[2], Timothy M. Vogel[2], Laure Wiest[1], Emmanuelle Vulliet[1]

[1] Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 Rue de la Doua, F-69100, Villeurbanne, France

[2] Environmental Microbial Genomics, Laboratoire Ampère, UMR 5005, CNRS, Ecole Centrale de Lyon, Université de Lyon, 69134 Ecully

Corresponding author: emmanuelle.vulliet@isa-lyon.fr

Abstract

Aminoglycosides are mostly used as veterinary antibiotics. In France, their consumption accounts for about 10% of all prescribed animal medicine. Due to their high polarity nature (logKow < -3), they require chromatographic separation by hydrophilic interaction liquid chromatography or ion-pairing chromatography. This study presents the development of an ion pairing liquid chromatography with alkanesulfonates coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of 10 aminoglycosides (spectinomycin, streptomycin, dihydrostreptomycin, kanamycin, apramycin, gentamicin, neomycin and sisomicin) in wastewater samples. The novelty of this method lies in the addition of the ion paring salt directly and only into the sample vial and not in the mobile phase, lowering the amount of salt added and consequently reducing signal inhibition. The optimized method was validated and showed satisfactory resolution, performances suitable with the analysis of aminoglycosides in wastewater samples, with limits of quantifications less than 10 $ng.mL^{-1}$ for most of the compounds, low matrix effects, high accuracy (85%-115% recoveries) and reproducibility (2%-12% RSD). It was then applied successfully to raw and treated wastewater samples.

Keywords: Aminoglycosides, wastewater, ion-pairing chromatography

Highlights:

- In vial addition of salt, limiting the presence of salts in the LC-MS/MS system
- A sample preparation reduced to a simple addition of salt in the vial
- Low matrix effect allowing external calibration with solvent standards

1. *Introduction*

During the past decade, aminoglycosides (AGs) became one of the most widely used veterinary antibiotics in both bovine and pork herds (ESVAC 2011; 2019; A. Soulier et al. 2016), because of their wide action range for both Gram-negative and Gram-positive bacteria. In France, while the global antibiotic consumption is decreasing constantly (divided by 3 in 12 years), aminoglycosides portion is increasing with up to 10% prescription share in 2017 (ESVAC, 2011, 2019). Furthermore, aminoglycosides are poorly absorbed due to their high polarity nature and are excreted unchanged in urine (Chiaochan et al. 2010; Asakawa et al. 2018). Aminoglycosides antibiotics are also used in human medicine formulation (Adams et al. 1997; Caudron et al. 2012), increasing the probability of their presence in wastewaters.

Despite their increasing consumption, analytical procedures for environmental matrices are very few and aminoglycosides are still among the least analysed antibiotics today. The main reason is probably their highly polar nature, with logKow comprised between -3 for spectinomycin and -9 for neomycin. Indeed, as noted by Reemtsma et al.(2016), this kind of very polar molecules requires specific analytical tools which do not currently exist and which need to be developed. Analysis of AGs are more frequent in food-related samples as reported by Glinka, Wojnowski, et Wasik (2020) such as meat (Arsand et al. 2016; Dasenaki, Michali, et Thomaidis 2016; Saluti et al. 2018), milk (Berruga et al. 2016; Saluti et al. 2018) or honey (Kumar et al. 2012; El Hawari et al. 2017; Yang et al. 2017; Perkons, Pugajeva, et Bartkevics 2018; Gajda et al. 2019). Maximum residues limits are defined by food regulations and analytical method performances are set to respect these values. In the environmental field, there is no regulation or monitoring regarding aminoglycosides. To the best of our knowledge, only a few studies deal with aminoglycosides analysis (Löffler et Ternes 2003; Peru et al. 2006; Mokh et al. 2014; Qiu et al. 2020).

Whatever the matrix of interest, separation methods for AGs analysis are based on two major techniques: Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) (Oertel, Neumeister, et Kirch 2004; Chiaochan et al. 2010; Dasenaki, Michali, et Thomaidis 2016; Asakawa et al. 2018) or Ion Pairing Liquid Chromatography (IPLC) (Savoy et al. 2018; Gajda et al. 2019), often followed by tandem mass spectrometry detection. When HILIC is used, a wide variety of column chemistry can be employed for the analysis of aminoglycosides.

Alechaga *et al.* (2014) obtained poor peak shapes using bare silica, Ianni *et al.* (2018) used a two-dimensional LC with HILIC in 1st but required between 51 and 70 minutes to obtain

selectivity. Diez tested a variety of HILIC columns and only obtained resolution with zwitterionic ones (Díez et al. 2015). Altogether, HILIC separations lacks robustness, as variations in mobile phase composition, pH, buffer concentration or temperature can have a very noticeable effect on selectivity and retention of compounds (McCalley 2017).

In case of very polar compounds as aminoglycosides, Mokh *et al.* (2015) reported that ion-pairing liquid chromatography could represent a more suitable and powerful technique, with better retention time consistency. One of the first and most critical steps of IPLC optimization is the selection of the counter ion. In most reported works in IPLC, heptafluorobutyric acid (HFBA) (Löffler et Ternes 2003; Gremilogianni, Megoulas, et Koupparis 2010; Joseph et Rustum 2010; X. Wang et al. 2018), perfluoropentanoic acid (PFPeA) (Bijleveld et al. 2014), trichloroacetic acid (TCA) or trifluoroacetic acid (TFA) (Joseph et Rustum 2010) were used, added in the mobile phase. To match chromatographic conditions, ion-pairing reagents were also added in the sample vial. Nevertheless, those additives are known to cause signal inhibition in mass spectrometry (Gustavsson et al. 2001) increasing detection and quantification limits. A comparison of HILIC and IPLC with HFBA as counter ion was realised by Gremilogianni *et al.* (2010) and concluded to greater performances of the HILIC method, because of high ion suppression caused by IPLC. Moreover, introduction of high salt content mobile phases in the mass spectrometer source also leads to more frequent instrument maintenance. To circumvent this problem, Lehotay and Lightfield (2018) proposed an IPLC method for the analysis of drug residues, adding ion-pairing reagents only into the injection vial, thus reducing the amount injected in the LC column and in the mass spectrometer, preventing some down-time of the instrument for cleaning and maintenance. The ion suppression caused by the IP reagent was consequently reduced, allowing to achieve better quantifications limits. Wang *et al.* (2018) and Amelin and Bol'shakov. (2019) also proposed this "in vial only addition" method, using HFBA as ion pair whereas Lehotay used sodium heptanesulfonate, known as more volatile reagent, to further reduce signal suppression. However, in all studies with only in vial addition, little to no resolution was obtained, with AG separation spread only over 0.5 to 1 min, which may cause analytical difficulties in complex and charged matrices.

Based on these observations, the objective of this work was to develop and optimize an "only in vial addition" IPLC-MS/MS method with satisfactory resolution of 10 AGs and to evaluate its suitability for their surveillance in environmental waters. First, various alkanesulfonate counter-ions with different carbon chain length were tested to evaluate retention and separation. Chromatographic conditions such as organic mobile phase, gradient or isocratic elution,

mixture of IP reagents was developed to obtain good separation and minimize matrix effects. The final method was validated and applied on water samples from both wastewater treatment plants around Lyon and from the Rhône River (France). This is then the first method reporting resolution of aminoglycosides with only "In vial addition" IPLC.

2. *Experimental*

2.1. *Chemicals and reagents*

Apramycin (APR), dihydrostreptomycin (DHSTREP), gentamicin (GEN), kanamycin (KAN), neomycin (NEO), spectinomycin (SPEC), streptomycin (STREP) and sisomicin (SISO) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) in VETRANAL quality or equivalent purity (>98%). The GEN standard contained three distinct molecules: gentamicin C1 (GEN C1); gentamicin C1A (GEN C1A) and gentamicin C2 (GEN C2) (Figure S1). Stock solutions (1 $mg.mL^{-1}$) of each aminoglycoside were prepared by dissolving about 10 mg powder, accurately weighted in 10 mL of water/methanol (1/1, v/v) in high density polyethylene Wheaton vials were stored at -18°C.Accurate concentration was then calculated taking each standard purity in account. Autosampler vials and centrifuge tubes in polypropylene (PP) were used to prevent adsorption of the analytes on glass. Calibration solutions of each analyte (500 $ng.mL^{-1}$) were prepared by diluting individual stock solutions in water/methanol (1/1, v/v).

Alkanesulfonate salts ranging from butanesulfonate to decanesulfonate (Figure S1) were acquired from Tokyo Chemical Industry, Belgium to be used as ion-pairing salts. Individual salt solutions were realised at 75 mM in water and stored in the fridge at 4°C for one month.

Water (LC-MS grade) was obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France), methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) (LC-MS grade) from Honeywell (Seelze, Germany) and formic acid (UPLC-MS grade) from Biosolve (Dieuze, France).

2.2. *Real sample collection and preparation*

Three kinds of water matrices were collected: river water for the optimization and raw and treated wastewaters (WW) for application of the optimized method. River water was grab sampled in the Rhône River (France). WW were collected at 3 different WW treatment plants in the region of Lyon (France).

Samples were stored at -20°C before analysis. With the optimized method, after thawing, a 2 mL aliquot was sampled and transferred to a PP centrifuge tube, centrifuged at 10000 rpm for 5 min (3K3OH, Sigma, Germany). Then 200 µL of supernatant was transferred into a 1 mL PP vial together with 200 µL of sodium hexanesulfonate solution and 200 µL of sodium heptanesulfonate solution. The vial was then capped and agitated on a rotor mixer for 20 seconds.

2.3. Ion Pair Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (IPLC-MS/MS)

The system used was an Agilent (Massy, France) 1200 Series High-Performance Liquid Chromatography system with a binary pump. The column was a Kinetex XB-C18, 100*2.1mm, 1.7 µm from Phenomenex (Le Pecq, France). Optimized IPLC conditions were as followed: a binary mobile phase was used with a flowrate set to 300 $\mu L.min^{-1}$ for a total run time of 15 min, with the column maintained at 40°C. Mobile phase A was an aqueous solution of 0.1% formic acid, and B was a mixture of ACN/MeOH (1/1) with 0.1% formic acid. The separation was performed with an isocratic mobile phase at 10% B for 7 min. B was then increased to 90% for 5 min and then decreased back to 10% for 3 min starting re-equilibration of the column. An equilibration time of 5 min (i.e. 6 column volumes) was realised before each injection, leading to a total run time of 20 min. The sample injection volume was 10 µL. The final injection solvent was composed of 90/10 H_2O/(MeOH/ACN) containing 50 mM of both hexanesulfonate and heptanesulfonate sodium salts.

A 5500 QTrap from Sciex® (Les Ulis, France) was used in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with positive electrospray ionization. Source parameters are detailed in Table S1.

MS/MS detection was optimized by infusion of individual standard solutions at 100 $ng.mL^{-1}$ via syringe pump at a flow of 10 $\mu L.min^{-1}$ and are presented in Table S2. For SPEC, both protonated and water adducts showed a similar sensitivity; we chose to monitor both ions and use the H_2O ion for quantification and the $[M+H]^+$ adduct for confirmation (Lehotay *et al.*, 2013). NEO and SISO also formed a doubly charged ion in the ionisation source, it was decided to follow both ions.

2.4. *Method validation*

Limits of quantification (LOQs) were evaluated as the concentrations leading to a signal-to-noise ratio of 10. The method linearity for each molecule was determined by injection of standards mixtures from 0.5*LOQ to 50*LOQ. Intra day repeatability and intermediate precision were both evaluated for three days. Each day, a calibration curve for each component was freshly prepared and injected, followed by three standard solutions spiked at three concentration levels: LOQ, 2*LOQ and 10*LOQ, also freshly prepared. For each analyte and each level, the concentration was computed with the calibration curve and the accuracy calculated with the mean of the 3 replicates versus the nominal concentration. Intraday repeatability was determined by calculating the relative standard deviation (RSD) of replicates injected the 2nd day and interday precision was determined by calculating the RSD on the three days means.

Matrix effects were evaluated for each analyte by comparing a calibration curve prepared in pure LC-MS grade water and in river water, after centrifugation. The ratio of the slopes was considered as matrix effect indicator.

3. *Results and discussion*

3.1. *Adsorption of GEN on container material*

During the first experiments, decreases appeared on several signals, especially for GEN. A comparison between glass and PP vial was carried out to test for adsorption of the three distinct molecules composing GEN. Figure 1 illustrates the significant signal diminution, of about 50% for each component of the GEN mix when using glass vials. Moreover, the variations in-between vials were also increased in glass container. PP vials were hence used for all the study. No adsorption difference was noted between the three gentamicin components as their distribution was unchanged between glass and PP vials: 29% GEN C1; 34% GEN C1A and 37% GEN C2.

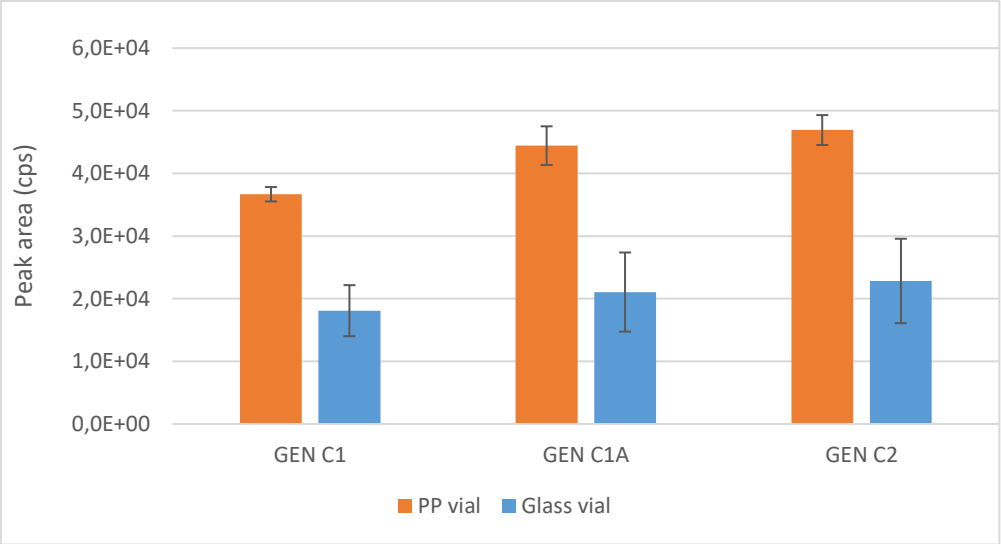


Figure 1: Comparison of the LC-MS/MS signals of GEN C1, GEN C1A and GEN C2 solutions at 200 ng.mL^{-1}, left for 24h at 4°C in PP or glass vials (n = 3).

3.2. ***IPLC-MS/MS method optimization***

3.2.1. ***IP salts choice***

Alkanesulfonates ion-pairing salts from sodium butanesulfonate to sodium decanesulfonate were tested for the separation of AGs. Each salt was evaluated individually at 50 mM, by mixing 300 µL of standard solution with 600 µL of IP salt at 75 mM in the injection vial, except for nonanesulfonate and decanesulfonate, tested at 25 mM due to their lower critical micellar concentration (estimated from Huibers et al. 1997 at 65 mM and 32 mM for nonanesulfonate and decanesulfonate, respectively). An injection was also realised without addition of IP salt. The separation was evaluated by considering the retention factor (k). An illustration of the results for three aminoglycosides with dispersed retention times (SPEC, low; KAN, middle, NEO, high) is presented in Figure 2.

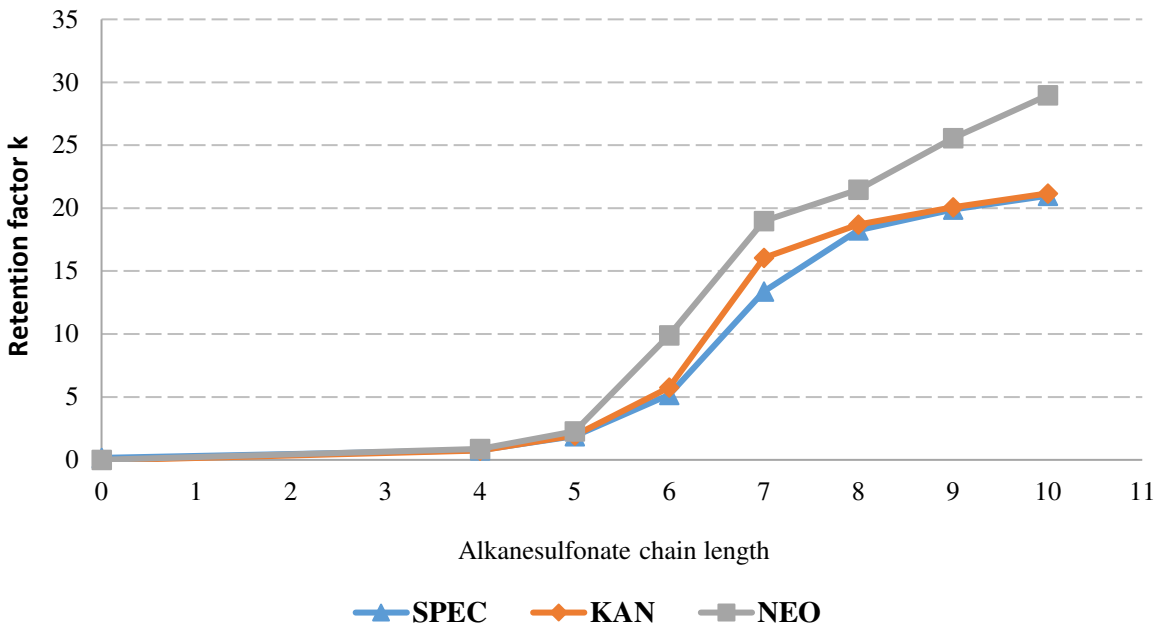


Figure 2: Evolution of retention factor k for the aminoglycosides SPEC, KAN, and NEO as a function of the ion pair carbon chain length

It can be observed that when no salt was added, all compounds were eluted in the column dead volume, without separation. On the other hand, a separation was possible in the presence of salts, with k increase with the carbon chain length. Same behaviour was observed for all targeted AGs. Satisfactory separation was obtained when using ion pairing alkanesulfonate salt between n=6 and n=7. For n>7, similar retention was observed for compounds that were previously separated with heptanesulfonate salt.

To further optimize the separation, different proportions of hexanesulfonate (IP6) and heptanesulfonate (IP7) salts were tested: 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 and 100/0. For all AGs, an increase of the IP7 percentage resulted in an increase of the retention factor (Figure 3). The 50/50 proportion of hexanesulfonate and heptanesulfonate ion pairing salt was finally chosen, which allowed a satisfactory separation in 8 minutes. If more retention or faster separation is required, the method could be easily modulated by modifying IP ratios.

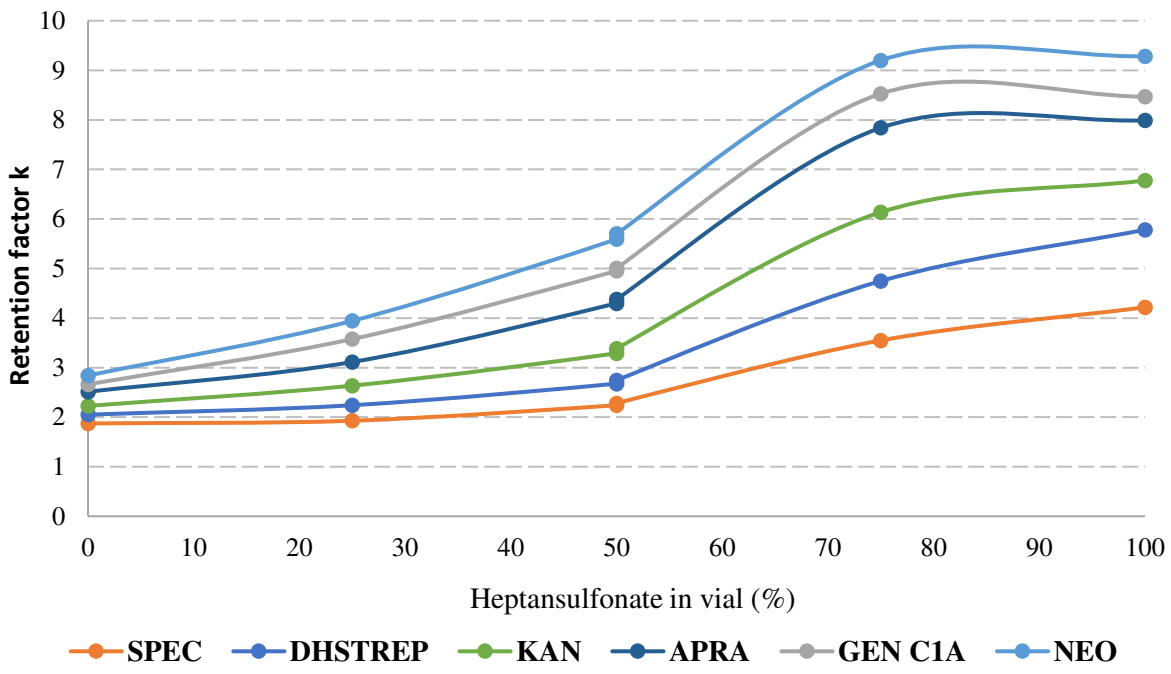


Figure 3: Evolution of retention factors k with proportion of heptanesulfonate in vial

3.2.2. ***Organic solvent mobile phase***

After the selection of the ion pairing salts, interest was moved to the organic solvent used (ACN or MeOH) to both reduce the analysis run time and improve separation. When ACN was used in the mobile phase, all compounds eluted earlier, reducing the analytical time, but also reducing the resolution between compounds that elutes at close retention times i.e. streptomycin and dihydrostreptomycin or the gentamicin components. A one-to-one mixture of MeOH/ACN was finally selected to obtain a satisfactory separation of critical pairs while keeping a shorter analysis time than using only MeOH. The presence of MeOH also allowed better ionisation of each molecule in the MS source (data not shown).

3.2.3. ***Column conditioning and storage***

To ensure reproducibility of analysis, the column needed to be conditioned with IP salts before each sequence. To determine the number of injections needed to obtain a repeatable retention time, a series of six standards injections in IP6/IP7 (50/50, v/v) salt was carried out on a clean column (with salt removed, with the procedure described thereafter). The evolution of the retention factors with the number of injections is presented in Figure 4 and it can be noticed that constant retention factors were obtained after four injections of IP salts. Therefore, to

maintain repeatable retention times, six consecutive injections of IP6/IP7 (50/50, v/v) salts were realized prior to any sequence of analysis.

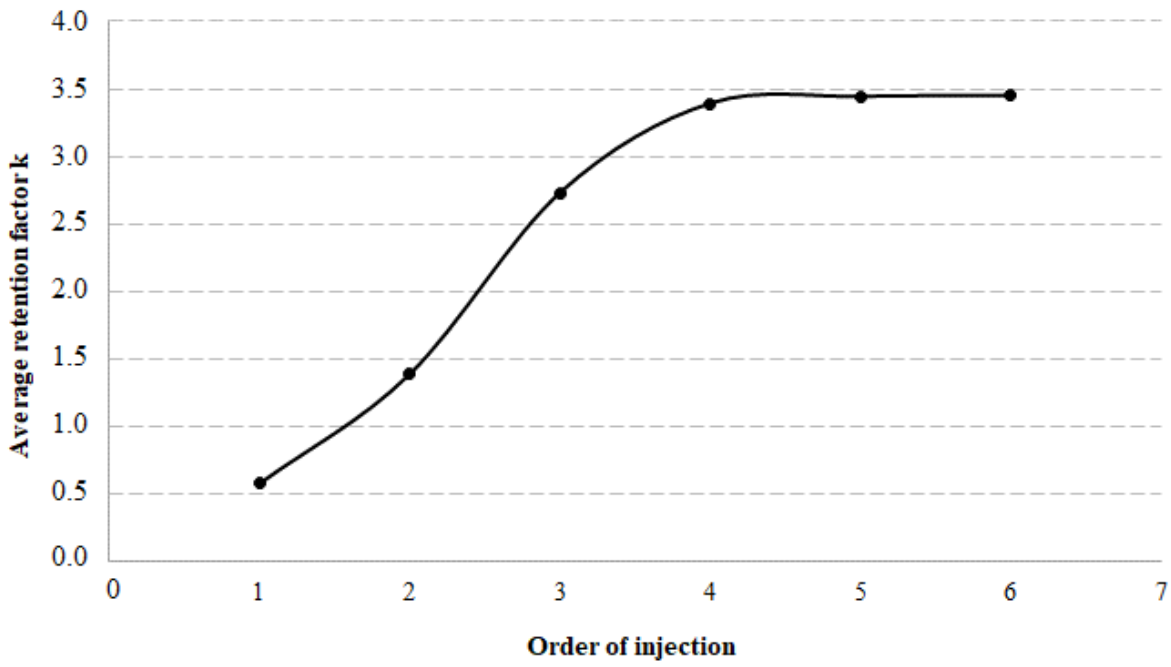


Figure 4: Evolution of the average retention factor of all targeted AGs with injection number

The final chromatogram is presented in supplementary materials (Figure S2).

One of the major drawbacks in using ion pairing chromatography is the possible clogging of the LC column. Removal of the salts after an analysis sequence is important to preserve the column and avoid increasing pressure, or even column blockage. The cleaning procedure proposed included three steps. First the LC was disconnected from the mass spectrometer and the flow was directed to a waste bottle. A 75/25 H_2O/MeOH mixture was then flowed through the column at 100 µL.min^{-1} for 15-20 min for optimal salts solubilisation. Then, 50/50 H_2O/MeOH was flowed at the same rate for 15 min, resulting in a higher pressure, allowing further penetration in the column particles pores and further salts solubilisation. Finally, 25/75 H_2O/MeOH mixture was flowed at 300 µL.min^{-1} to equilibrate the column for storage and to allow the C_{18} chains to be reconditioned.

3.3. *Method validation*

3.3.1. *Linearity of the method*

First, approximate quantification limits of aminoglycosides were determined by injecting replicates (n=3) of standard solutions, based on signal-to-noise ratios of 10. Aminoglycosides response linearity was then determined from the injection of standards. Each compound displayed a good linearity over the selected range, with determination coefficients (R^2) greater than 0.99 (Table 1).

3.3.2. *Limits of quantification*

Quantification limits of the optimized analytical method were calculated according to the obtained calibration curves and the coefficients of variation and were comprised between 0.7 and 460 $ng.mL^{-1}$ (Table 1) therefore consistent with the literature for aqueous environmental matrices (Table 2). Mass spectrometry response factors of NEO and SISO were lower leading to higher LOQs than for the other analytes (Mokh et al. 2014). It is worth noting that previous studies included a pre-concentration step (solid phase extraction, lyophilisation) whereas the method optimised in the present work includes a simple addition of salts in the injection vial. It is therefore just as sensitive while being faster and less solvent consuming. For STREP, DHSTREP and KAN, the method developed in this work resulted in improved LOQ by a factor of 10, 50 and 5, respectively, regarding the work of Mokh *et al.* (2014), who used pentafluoropropionic acid as IP in the mobile phases with a 16 min run time. Qiu *et al.* (2020) reported similar LOQs, after a preconcentration step by a factor of 10.

Table 1: Validation results: Linearity and reproducibility at 3 different levels (a: intraday n=3; b: interday n=3 days)

	Retention time (min) (%RSD[b])	LOQ (ng.mL^{-1})	Linearity		Transition ratio (%RSD[b])	LOQ		2 *LOQ		10* LOQ	
			Range (ng.mL^{-1}) (0.5LOQ-50LOQ)	R²		Mean (%RSD[(a/b)])	Accuracy (%)	Mean (%RSD[(a/b)])	Accuracy (%)	Mean (%RSD[(a/b)])	Accuracy (%)
SPEC	3.4 (1.0)	9.6	5-500	0.992	0.58 (1.3)	9.0 (5/33)	94	20.2 (5/4)	105	96.2 (1/6)	101
SPEC+H2O	3.4 (1.0)	9.6	5-500	0.998	0.29 (0.7)	10.2 (5/18)	107	19.7 (4/5)	103	98.2 (4/2)	103
STREP	4.4 (1.3)	5.2	2-260	0.994	0.54 (2.3)	5.4 (4/20)	104	10.3 (3/2)	99	50.7 (1/4)	98
DHSTREP	4.4 (1.1)	0.7	0.3-35	0.995	0.37 (3.0)	0.7(19/11)	96	1.5 (12/10)	104	7.1 (6/5)	101
KANA	5.2 (1.2)	3.1	1-160	0.991	0.65 (1.9)	3.5 (6/8)	111	6.4 (2/4)	101	31.5 (4/0.6)	100
APRA	5.8 (0.3)	17	8-850	0.996	0.86 (1.6)	15.7 (6/23)	92	35 (6/12)	103	170.9 (2/11)	100
GEN C1	6.5 (0.4)	45	22-2230	0.995	0.84 (3.5)	40.0 (14/4)	90	87.8 (7/10)	98	443.8 (7/2)	100
GEN C1A	6.2 (0.5)	28	14-1420	0.999	0.57 (3.3)	30.4 (4/24)	107	55.5 (4/7)	98	285.2 (2/4)	100
GEN C2	6.3 (0.8)	64	30-3200	0.998	0.60 (2.3)	65.5 (6/10)	103	122.3 (6/4)	96	620.3 (1/6)	98
NEO	6.8 (0.1)	465	230-23234	0.995	0,49 (1.4)	577 (13/3)	124	1022.6 (7/5)	110	4671.5 (4/5)	101
NEO 2+	6.8 (0.1)	464	230-23234	0.994	0.76 (6.2)	/	/	941.3 (12/7)	101	4703.9 (9/2)	101
SISO	6.0 (0.5)	111	55-5531	0.995	0.54 (1.5)	120.4 (11/8)	109	22.3 (11/7)	100	1116.8 (7/3)	101
SISO 2+	6.0 (1.5)	111	55-5531	0.994	0.36 (12.9)	111.7 (17/21)	101	222.1 (8/12)	100	1064.4 (3/7)	96

Table 2: Quantification limits obtained in different environmental matrices

Analytes	Matrix	Sample preparation	LC conditions	LOQs (ng.mL^{-1})	Ref.
SPEC, STREP, DHSTREP, GEN, KAN, APRA, SISO, NEO	Wastewater	SPE	IPLC-MS/MS	15-45	Mokh *et al.*, 2014
SPEC, STREP, DHSTREP, GEN, KAN, APRA, SISO, NEO	Wastewater	Lyophilisation	Mixed mode LC-MS/MS	2-20	Qiu *et al.*, 2020
SPEC	Liquid hog manure	SPE	HILIC-MS/MS	6	Peru *et al.*, 2006
SPEC, STREP, DHSTREP, GEN, KAN, APRA, SISO, NEO	Wastewater	Centrifugation and dilution by salt addition	IPLC-MS/MS	0.3-60 (100-500 for SISO and NEO)	This work

3.3.3. *Intraday repeatability, intermediate precision, and recovery*

Results of both repeatability and intermediate precision experiments are compiled in Table 1. Concerning the intraday repeatability, RSD were measured inferior to 20% at LOQ level for all compounds, showing good repeatability from one analysis to another. At 10*LOQ level, RSD are further reduced, below 5% for 80% of the followed molecules. For intermediate precision, at LOQ levels, most RSD were measured below 25%, except for SPEC, evaluated at 33%. As $[M+H]^+$ ion was only monitored for confirmation, this higher variation had no impact on the validation process. These variations were deemed acceptable based on the paper from Rambla-Alegra *et al.* (2012), stating that, for analyte concentration around the $ng.g^{-1}$ level, RSD below 30% are reasonable. At levels 2*LOQ and 10*LOQ, all RSD were below 12%. For all levels, quantification was accurately realised with calculated values within ±15% of the nominal concentration. As responses of the MRM transitions corresponding to NEO 2+ were very variable at the LOQ level, it was excluded from the reproducibility results. This exclusion did not impact the results as the singly charged ion for neomycin was well detected at the LOQ.

Both variations on the retention time and the ratio between the two followed transitions were also recorded and presented in Table 1. Throughout the analysis, retention time variations were all lower than 0.1 min, and ratio variations were all below 5%RSD, except for the doubly charged transitions we followed for NEO and SISO. These higher variations could be explained by the tendency of the molecules to form either the single charged ion or the doubly charged, with no predominant form.

Qiu *et al.* reported recoveries between 66% and 116% of their analytes at 20, 50 and 100 $ng.mL^{-1}$ with inter-day RSD below 16%. The method presented here reduced the recoveries range to 85%-115%. Direct injection of the sample avoids some losses due to lyophilisation step.

3.3.4. *Matrix effects*

The matrix effects, expressed in %, are presented in Figure 5. For most molecules, matrix effects were comprised within -20% and 20% and was considered negligible. Therefore, the quantification could be performed from a calibration realised in solvent.

Only APRA and the doubly charged ion for SISO presented higher matrix effect (a signal inhibition) and would require a matrix match calibration or the use of isotope labelled standards. Further dilution of the sample could reduce those matrix effects to enable only calibration in solvent.

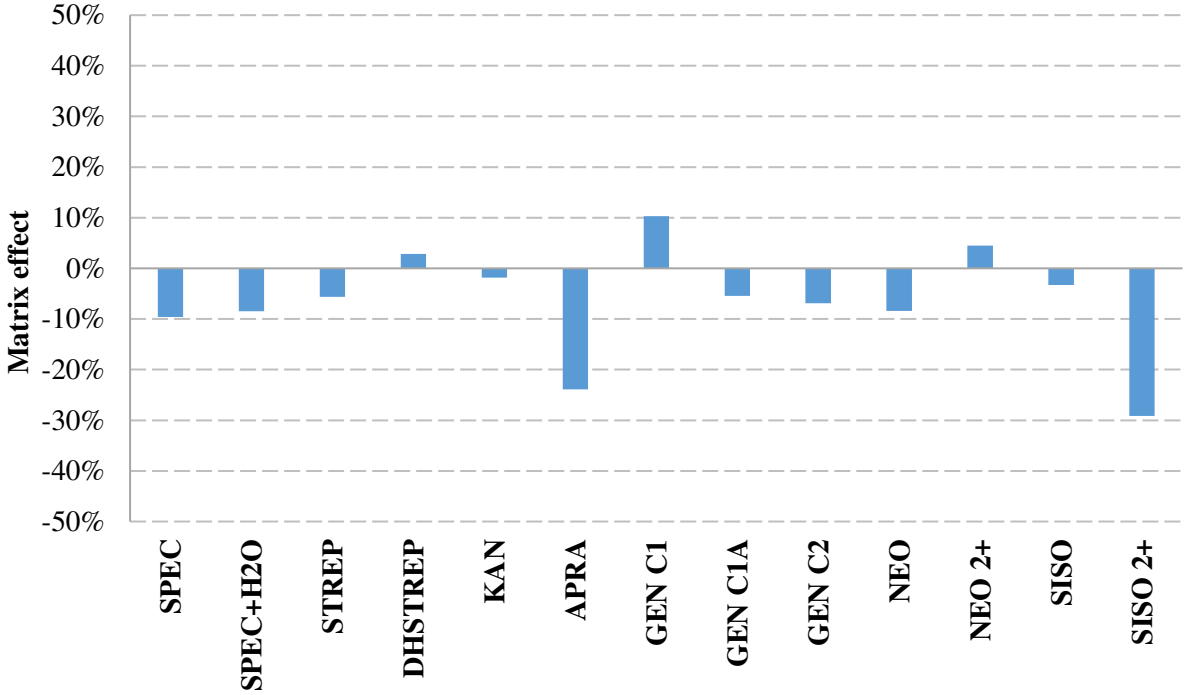


*Figure 5: Evaluation of matrix effects for aminoglycosides in river water (calibration curve: LOQ-50*LOQ)*

3.4. ***Application to WW samples***

Six samples of raw and treated WW were analysed unspiked and spiked at 10*LOQ with all the aminoglycoside standards. Blank controls composed of H_2O/ACN/MeOH (90/5/5) +0.1% formic acid, corresponding to the chromatographic initial conditions, were injected during the analytical batch, in the same way as the standard solutions and the samples. No aminoglycoside was detected in unspiked samples neither raw nor treated wastewaters. Chromatograms are supplied in supplementary materials (Figure S2). In similar studies, Löffler *et al.* (2003) and Mokh *et al.* (2014) only detected GEN (average 4 $ng.mL^{-1}$ and 0.3 $ng.mL^{-1}$, respectively) in hospital effluents, as GEN can also be used in human medicine. Regarding spiked samples, accuracy at 10*LOQ was calculated and was comprised between 75% and 125%, as reported in Table 3. These results demonstrate again the negligible matrix effects induced by this method, even when analysing more complex environmental water samples, such as wastewaters.

Table 3: Quantification of aminoglycosides in spiked raw and treated wastewater (n=3)

	Raw WW_01		Treated WW_01		Raw WW_02		Treated WW_02		Raw WW_03		Treated WW_03	
	Accuracy (%)	%RSD	Accuracy (%)	%RSD	Accuracy (%)	%RSD	Accuracy (%)	%RSD	Accuracy (%)	%RSD	Accuracy (%)	%RSD
SPEC	103.8	3.2	100.9	9.7	99.0	4.9	105.1	6.6	109.5	8.7	101.0	9.7
SPEC+H_2O	100.9	8.6	107.9	4.2	103.5	7.8	103.5	4.8	103.4	1.2	109.4	6.1
STREP	95.1	13.4	110.1	7.3	94.7	6.8	105.8	6.4	98.5	16.4	112.9	4.7
DHSTREP	91.7	1.1	112.0	10.9	90.0	2.8	102.1	9.3	99.8	9.0	109.6	10.6
KAN	120.3	9.7	115.9	4.0	95.2	8.4	131.5	7.1	99.6	12. 3	114.1	8.6
APRA	104.2	6.7	105.2	8.1	108.0	8.6	93.7	7.6	108.9	2.2	102.9	5.8
GEN C1	122.5	7.4	121.8	2.7	125.9	2.9	117.9	8.0	120.0	7.5	117.9	1.9
GEN C1A	98.3	10.9	112.5	6.1	98.3	1.5	101.4	18.1	103.5	4.5	105.6	2.5
GEN C2	97.5	10.3	101.5	8.9	99.5	0.9	107.7	2.2	109.6	6.8	116.6	10.3
NEO	80.4	15.5	87.7	9.1	81.0	8.6	87.7	14.2	82.7	14.7	93.4	6.9
NEO 2+	72.5	4.0	92.1	5.8	74.1	11.4	86.7	8.9	81.0	6.0	86.95	14.5
SISO	80.1	4.1	89.5	11.1	100.0	4.7	101.2	14.4	80.2	13.7	103.0	11.9
SISO 2+	71.0	6.4	87.7	4.5	83.8	3.6	86.6	9.0	71.0	6.4	88.2	4.6

4. *Conclusion*

The analytical method developed in this study allows the simultaneous determination of 10 aminoglycosides in environmental water samples, with simple, fast, and eco-friendly sample preparation. Ion pairing liquid chromatography was developed with a novelty: adding the ion-pairing salt directly in the sample vial instead of the mobile phases reservoirs. This allowed the use of lower quantity of ion-pairing salt per analysis, therefore limiting their negative impact in mass spectrometry such as signal inhibitions, while still obtaining a good and consistent separation. The method was found sensitive and reliable in environmental analysis with almost non-existent matrix effects, recoveries comprised between 85% and 115%, with low variations across intra and inter-day analyses. This work is the 1st to demonstrate the ability of "in vial addition only" IPLC-MS/MS methods to monitor accurately, in environmental waters, highly polar molecules and could be adapted to other substances of this type, with modulation of IP reagents ratios or chain length.

Acknowledgment

The authors thank the French Biodiversity Office (OFB) and the French RMC Water Agency for funding this study as part of the RISMEAU project (scientific partners: ISA, INRA, INSA, INSERM and ENTPE). This work was performed within the framework of the EUR H_2O'Lyon (ANR-17-EURE-0018) of Université de Lyon (UdL), within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency (ANR).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Aminoglycosides analysis optimization using Ion pairing Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry and application on wastewater samples

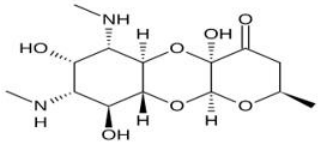
Alexandre Guironnet[1], Concepcion Sanchez-Cid[2], Timothy M. Vogel[2], Laure Wiest[1], Emmanuelle Vulliet[1]

[1] Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 Rue de la Doua, F-69100, Villeurbanne, France

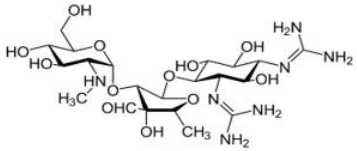
[2] Environmental Microbial Genomics, Laboratoire Ampère, UMR 5005, CNRS, Ecole Centrale de Lyon, Université de Lyon, 69134 Ecully

Corresponding author: emmanuelle.vulliet@isa-lyon.fr

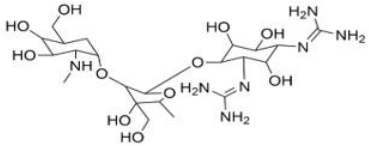
Figure S1: Structures of aminoglycosides and IP reagents selected in this study



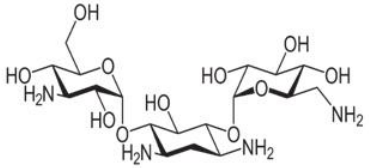
Spectinomycin
(SPEC)



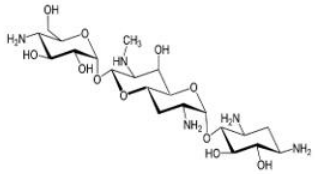
Streptomycin
(STREP)



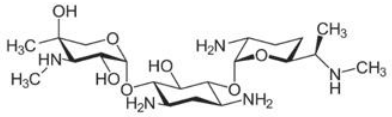
Dihydrostreptomycin
(DHSTREP)



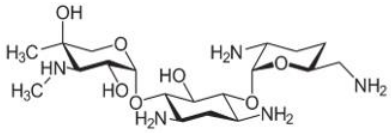
Kanamycin
(KAN)



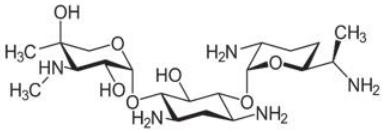
Apramycin
(APRA)



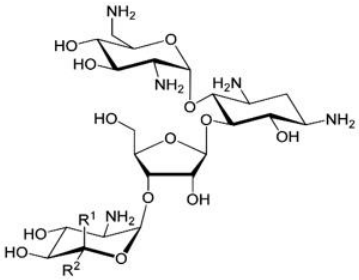
Gentamicin C1
(GEN C1)



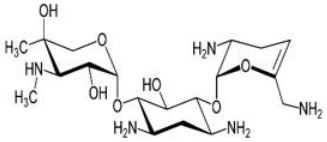
Gentamicin C1A
(GEN C1A)



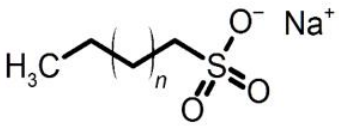
Gentamicin C2
(GEN C2)



Neomycin
(NEO)

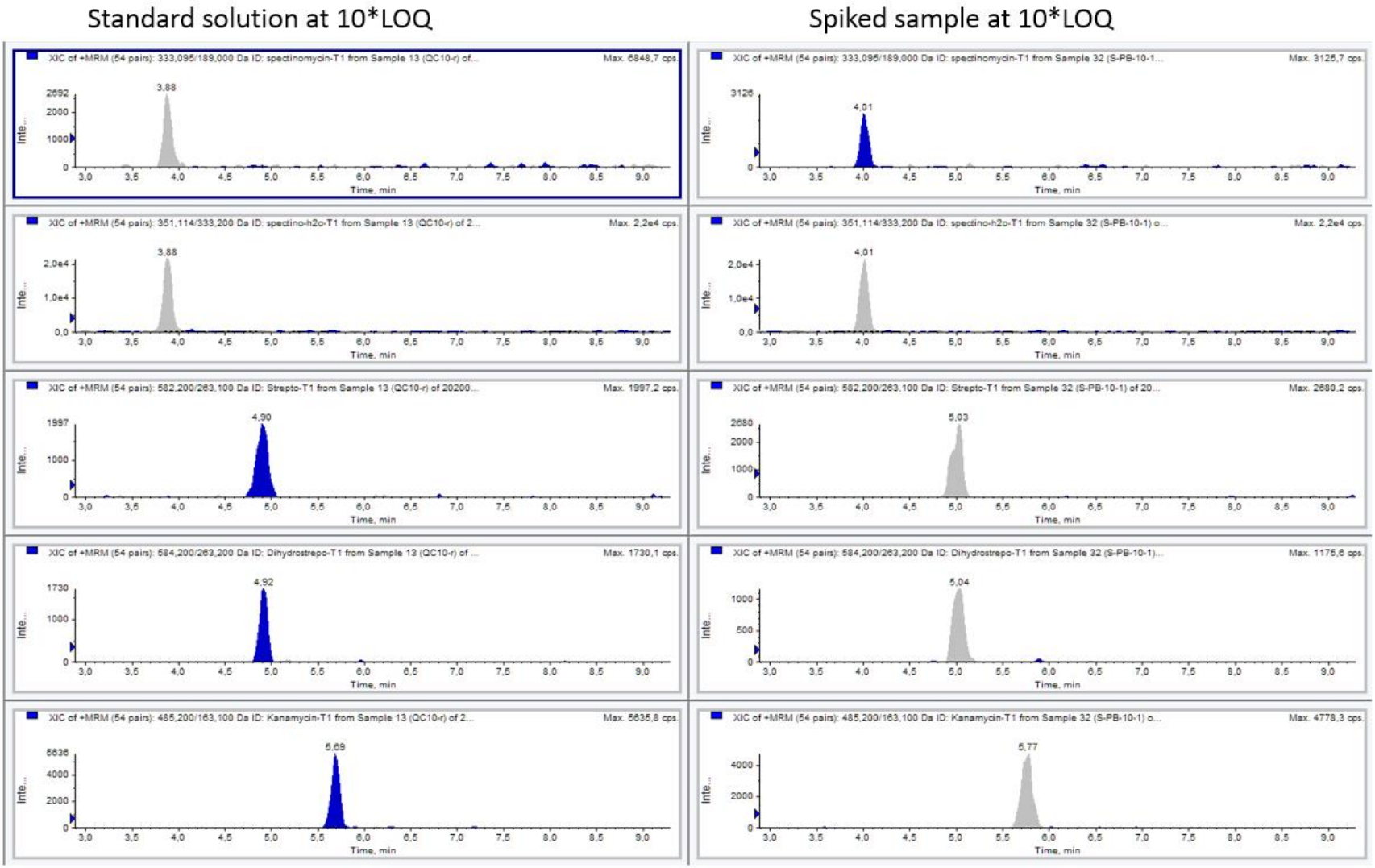


Sisomicin
(SISO)



IP reagent : Na-alkanesulfonate
1≤n≤7

Figure S2: Extract-ion chromatograms of the 10 targeted aminoglycosides, with the final IPLC-MS/MS conditions.



Standard solution at 10*LOQ

Spiked sample at 10*LOQ

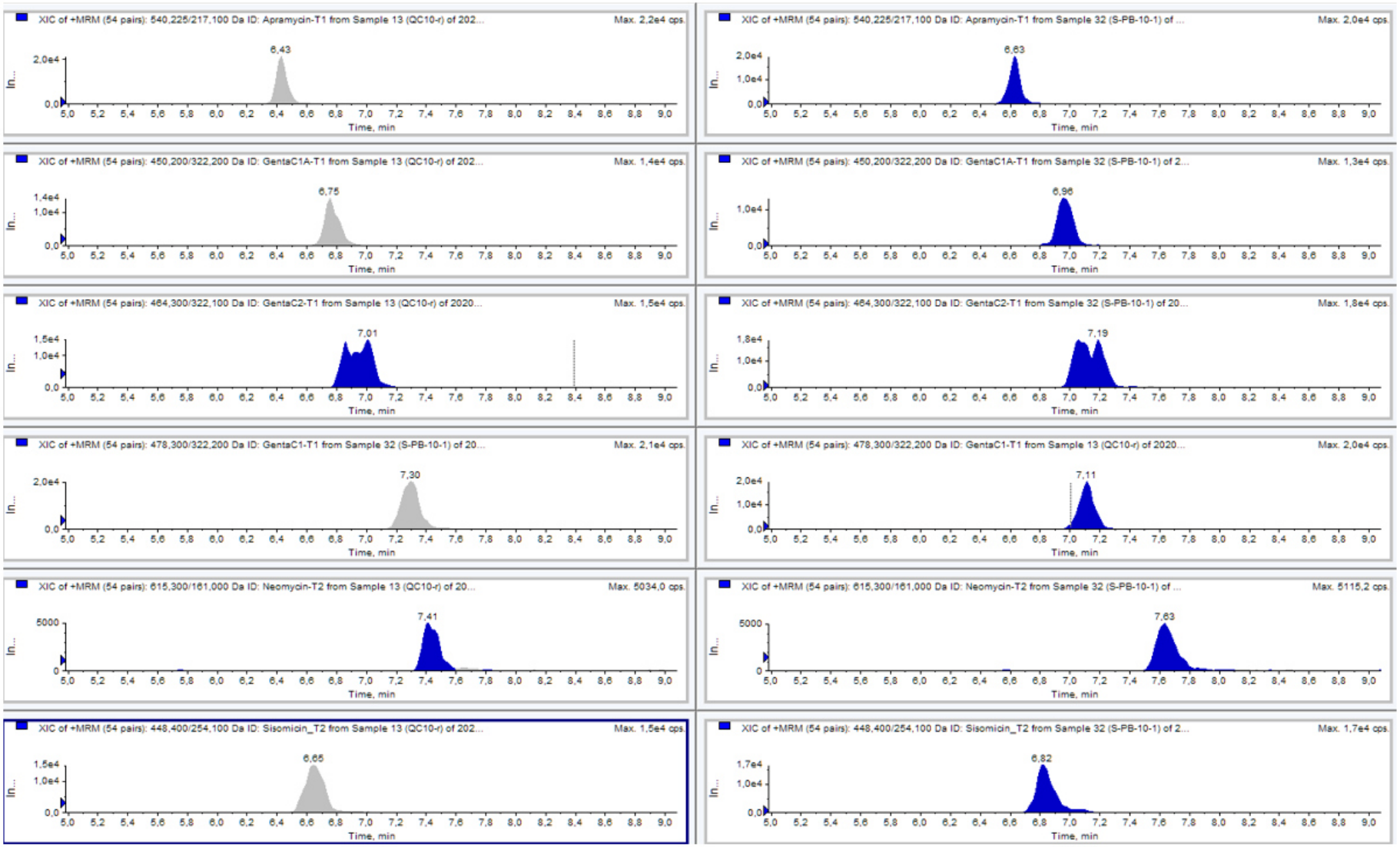


Table S1: Optimised source parameters for aminoglycosides analysis

Source parameter	Parameter value
Curtain Gas	30 psi
Ionization Tension	5500 V
Temperature	600 °C
Nebulisation Gas	40 psi
Turbo Gas	60 psi
Entrance Potential	10 V

Table S2: MS/MS optimized parameters for aminoglycosides analysis

Name	Corresponding Adducts	MRM Transitions(m/z)	Declustering Potential (Volts)	Collision Energy (Volts)	CXP (Volts)
APRA	$[M+H]^+$	540.2 → 217.1	196	37	18
		540.2 → 378.3		23	22
DHSTREP	$[M+H]^+$	584.2 → 263.2	266	39	10
		584.2 → 246.1		49	16
STREP	$[M+H]^+$	582.2 → 263.1	251	45	22
		582.2 → 246.1		49	30
SPEC	$[M+H]^+$	333 → 189.0	216	27	14
		333 → 158.1		27	8
SPEC+H_2O	$[M+H_2O+H]^+$	351 → 333.0	131	35	16
		351 → 207.0		31	12
KAN	$[M+H]^+$	485.2 → 163.1	121	33	22
		485.2 → 324.2		23	14
NEO	$[M+H]^+$	615.3 → 455.0	198	33	38
		615.3 → 161.0		39	26
NEO 2+	$[M+2H]^{2+}$	308.2 → 161.0	71	15	12
		308.2 → 455.1		13	20
GEN C1	$[M+H]^+$	478.3 → 322.2	161	21	16
		478.3 → 157.1		25	12
GEN C1A	$[M+H]^+$	450.2 → 322.2	146	19	14
		450.2 → 160.1		31	14
GEN C2	$[M+H]^+$	464.3 → 322.1	141	19	16
		464.3 → 160.1		31	12
SISO	$[M+H]^+$	448.4 → 430.3	156	17	20
		448.4 → 254.1		31	14
SISO 2+	$[M+2H]^{2+}$	224.6 → 127.2	71	13	8
		224.6 → 111.9		19	8

III. Analyse des aminoglycosides dans des matrices solides

Le caractère polycationique des aminoglycosides peut expliquer les faibles niveaux de détection dans les phases dissoutes. La matière organique présente dans l'échantillon étant négativement chargée en surface, une forte adsorption des aminoglycosides peut se produire. Par exemple, Löffler and Ternes (2003) ont rapporté une perte de 80% de la gentamicine lors de la filtration, et Peru *et al.* (2006) ont noté une adsorption de la spectinomycine dans des lisiers.

La méthode IPLC-MS/MS développée précédemment permet une quantification rapide et précise d'aminoglycosides dans des matrices aqueuses. Elle peut donc être également utilisée pour la quantification dans des matrices solides. Afin d'extraire les aminoglycosides de matrices solides, différentes techniques d'extractions dites douces ont été employées : par ultrasons seuls ou avec ajouts de cations inorganiques ou élément chélateur, et extraction QuEChERS. L'ensemble des tests ont été conduits sur du sol issu d'un champ labouré (La Côte de Saint André, France (Sanchez-Cid et al. 2021),avec une prise d'essai de 500 mg et un dopage à 100 $ng.g^{-1}$:

- Extraction par ultrasons (Eau/MeOH 1/1 +0.1% AF) pendant 10 minutes dans une cuve maintenue à 40°C.

- Extraction par ultrasons avec cations inorganiques (Na^+, K^+ et Ca^{2+}) (inspiré de (Droge et Goss 2012)

- Extraction par ultrasons avec élément chélateur (Acide citrique, acide oxalique, EDTA) (inspiré de Gajda et al. 2019)

- Extraction QuEChERS condition basique : 5 mL 20 mM NaOH (aq) + 5mL ACN + kit QuEChERS EN ou AOAC

Les détails des volumes et concentrations apparaissent dans le Tableau 16.

.

Tableau 16: Compilation des rendements obtenus avec des méthodes « douces » d'extractions pour les aminoglycosides

Test n°	Conditions d'extractions	Rendements (%)								
		SPEC	STREP	DHSTREP	KAN	APRA	GEN C1	GENC1A	GEN C2	NEO
1	5 mL (0,1%AF+0,5 mM NaCl)	15%	1%	1%	0%	1%	2%	1%	1%	10%
2	5 mL (0,1%AF+5 mM NaCl)	25%	1%	1%	0%	1%	3%	1%	3%	14%
3	5 mL (0,1%AF+15 mM NaCl)	74%	5%	4%	1%	2%	5%	4%	5%	34%
4	5 mL (0,1%AF+50 mM NaCl)	40%	22%	14%	0%	3%	6%	3%	3%	14%
5	5 mL (0,1%AF+0,5 mM KCl)	42%	2%	1%	0%	1%	3%	2%	3%	24%
6	5 mL (0,1%AF+5 mM KCl)	42%	2%	2%	0%	1%	4%	2%	3%	13%
7	5 mL (0,1%AF+15 mM KCl)	56%	6%	5%	1%	1%	3%	3%	3%	13%
8	5 mL (0,1%AF+50 mM KCl)	44%	14%	10%	0%	1%	1%	0%	2%	4%
9	5 mL (0,1%AF+0,15 mM $CaCl_2$)	48%	3%	3%	3%	3%	4%	4%	2%	6%
10	5 mL (0,1%AF+1,5 mM $CaCl_2$)	49%	4%	3%	2%	3%	3%	2%	2%	7%
11	5 mL (0,1%AF+5 mM $CaCl_2$)	76%	4%	2%	3%	4%	6%	7%	5%	17%
12	5 mL (0,1%AF+15 mM $CaCl_2$)	89%	23%	18%	2%	3%	5%	5%	5%	5%
13	5 mL (0,1%AF+50 mM $CaCl_2$)	49%	99%	164%	1%	0%	4%	0%	5%	4%
14	2 mL (20mM Acide oxalique) +1 mL (0,1M EDTA) +8 mL ACN	18%	3%	5%	1%	1%	1%	1%	1%	13%
15	5 mL (20mM Acide oxalique) +5 mL 0,1M EDTA	84%	5%	5%	0%	4%	33%	0%	33%	8%
16	5 mL (20mM Acide Citrique) +5 mL 0,1M EDTA	60%	5%	5%	0%	21%	0%	48%	46%	9%
17	10 mL (50/50 H_2O/MeOH) +0,1%AF	9%	1%	1%	0%	1%	2%	1%	1%	9%
18	QuEChERS EN 5 mL (H_2O+20mM NaOH) +5 mL ACN	27%	0%	0%	1%	10%	50%	2%	85%	17%
19	QuEChERS AOAC 5 mL (H_2O+20mM NaOH) +5 mL ACN	16%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	2%

Chaque test réalisé se fonde sur un principe d'extraction différent :

- L'extraction par ultrasons crée une fragilisation des liaisons matrice-analytes, permettant ensuite un meilleur transfert des analytes dans la phase liquide ajoutée. Ici, l'emploi de MeOH en addition de l'eau permet d'obtenir une meilleure solvatation des molécules extraites qu'en utilisant le MeOH seul. L'ajout d'acide formique induit l'ionisation de certains analytes, favorisant ainsi leur transfert dans la phase aqueuse.
- L'ajout de cations inorganiques dans la phase aqueuse des extraits engendre une compétition d'adsorption avec les cations organiques déjà adsorbés à la surface des particules de la matrice. Un échange ionique se met en place, permettant ainsi le relargage des cations organiques au profit de la fixation des cations inorganiques. Ici, nous avons testé des solutions avec deux cations monovalents (Na^+ et K^+) et un cation divalent (Ca^{2+}), à différentes concentrations, donc différentes forces ioniques.
- L'élément chélateur ajouté tel que l'acide oxalique, l'acide citrique ou l'EDTA interagit avec les espèces cationiques présentes dans l'extrait pour former des complexes et ainsi déstabiliser leurs interactions avec la matrice. Les chélateurs forment des complexes avec les cations organiques ou inorganiques, permettant ainsi leur transfert de la matrice vers le solvant d'extraction.
- Les aminoglycosides étant des molécules basiques polychargées possédant plusieurs pKa entre 0 et 14, ils sont majoritairement neutres à pH élevé. L'ajout de 20 mM de NaOH induit un pH de 12, fixant les bases amines sous leur forme neutre. En étant neutre, les molécules sont plus facilement transférées entre la phase aqueuse et la phase organique lors de l'étape de salting-out (relargage) de l'extraction QuEChERS.

Les rendements d'extractions obtenus sont compilés dans le Tableau 16. La majorité des rendements d'extractions sont inférieurs à 10%, suggérant de fortes interactions entre les composés d'intérêt et la matrice. De par sa structure plus simple, avec moins de groupements alcools et amines que les autres aminoglycosides, la spectinomycine est moins polaire, avec un logKow de -3.1 et a seulement 2 pKa. Elle est donc plus facilement extractible, ce qui est montré par les rendements plus importants obtenus, en moyenne de 48%, et allant jusqu'à 89% lors de l'extraction réalisée avec 15 mM de $CaCl_2$ +0.1% AF.

Ainsi, le caractère polycationique des aminoglycosides semble favoriser leur adsorption à la surface des matrices solides qui présentent naturellement des charges négatives, créant ainsi de fortes interactions (Peru et al. 2006; Reemtsma et al. 2016; Jafari Ozumchelouei et al. 2020).

Suite à des travaux en collaboration avec le Groupe de Génomique Microbienne Environnementale (Thèse de Concepcion Sanchez-Cid,2021), nous avons mis en évidence que les aminoglycosides sont fortement adsorbés dans les matrices solides et très faiblement biodisponibles, ne permettant pas le développement d'antibiorésistance spécifique. Ainsi, il a été décidé de ne pas poursuivre le développement d'autres méthodes d'extractions plus fortes, non pertinentes dans le cadre du projet RISMEAU.

IV. Perspectives d'analyses

Différentes évolutions sont envisageables afin de poursuivre les développements analytiques concernant les aminoglycosides dans l'environnement.

Premièrement, comme nous avons pu le mettre en évidence lors de nos essais préliminaires sur les sols, les aminoglycosides sont fortement adsorbés à la surface des matrices solides et les conditions d'extractions dites « douces » permettent seulement d'extraire une faible proportion des analytes réellement présents dans les échantillons. Des méthodes d'extractions plus fortes, telles que l'extraction par liquide pressurisé (PLE) (Bogialli et al. 2005; Berrada et al. 2010) ou l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) pourraient se révéler bénéfiques pour l'extraction des aminoglycosides dans les matrices solides afin d'obtenir un bilan complet de leur présence dans l'environnement. Cependant, les méthodes d'extraction fortes sont peu sélectives, ce qui induit des extraits chargés nécessitant des étapes de purification supplémentaires.

L'utilisation d'acides forts tels que l'acide trifluoroacetique (TFA) ou l'acide trichloracétique (TCA) a également été rapportée dans la littérature pour extraire les aminoglycosides et les composés hautement polaires (Cheng et al. 2010; X. Wang et al. 2018; Kim et al. 2017) Cependant, le TCA et le TFA peuvent se lier fortement aux analytes recherchés créant une importante réduction de signal en MS, allant même jusqu'à une suppression totale du signal. Ces acides forts sont également susceptibles de s'adsorber sur les surfaces des instruments, provocant des suppressions de signaux même lorsqu'ils ne sont plus employés.

Deuxièmement, il serait intéressant de développer une méthode de purification d'échantillon afin de diminuer les effets de matrice générés, surtout à la suite d'extractions fortes, peu sélectives. L'emploi de cartouches SPE dotées d'une phase polymérique à empreinte moléculaire (MIP : Molecular Imprinted Polymer) permettrait une purification spécifique ainsi qu'une diminution des limites de quantification atteignables en appliquant un facteur de concentration avant l'analyse. Les SPE-MIP possèdent des phases polymériques hautement sélectives qui sont synthétisées autour d'une molécule modèle correspondant à la famille de composés dont la rétention est souhaitée. Le modèle est ensuite retiré et la phase SPE peut alors être employée pour réaliser la purification des extraits.

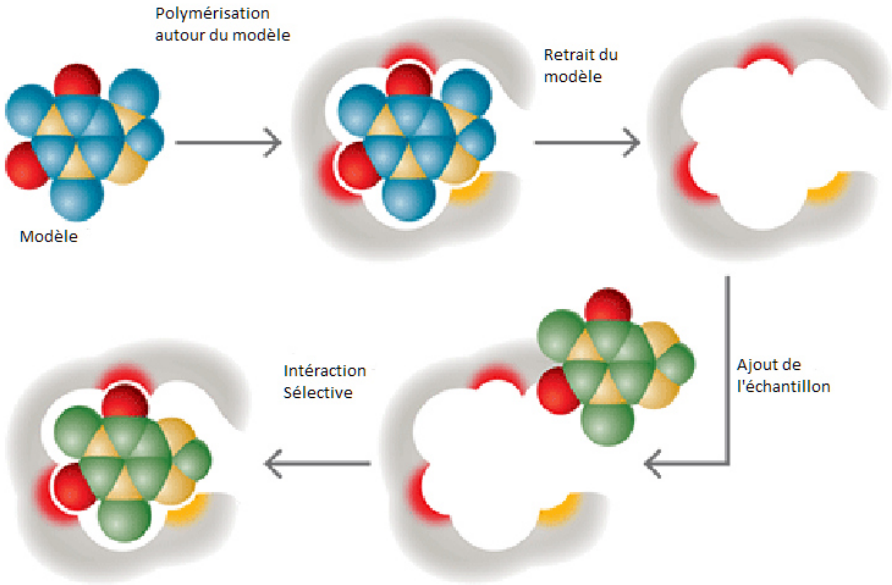


Figure 15:Principe de fonctionnement de la SPE-MIP (adapté de Sigma Aldrich)

La préconcentration d'aminoglycosides par SPE-MIP a déjà été réalisée dans de nombreuses matrices alimentaires telles que le miel, le lait, les œufs, ou encore des extraits de viandes et de poissons (Barrey 2014; Moreno-González et al. 2017; Yang et al. 2017; Savoy et al. 2018) L'ensemble des études utilise la méthode SPE-MIP développée par Merck avec les cartouches SupelMIP SPE-Aminoglycosides, qui permet d'obtenir des rendements de récupération supérieurs à 70%, et un facteur de concentration de 3. Les limites de quantification peuvent être ainsi abaissées.

Une troisième piste d'amélioration pourrait être l'utilisation d'une autre méthode de séparation chromatographique. En effet, bien que l'ajout de sels d'appariement uniquement dans le vial

réduise les phénomènes de suppression d'ions classiquement observés en IPLC, le développement d'une séparation en mode HILIC permettrait d'éliminer les sels, ou de les remplacer par d'autres, encore plus volatiles, tels que les sels d'ammonium. La réduction de la quantité de sels ainsi introduite dans le spectromètre de masse diminuerait les effets de suppression d'ion et permettrait d'atteindre des limites de quantification plus basses. Les aminoglycosides étant des molécules polycationiques, une séparation par chromatographie ionique peut également être envisagée. Ceci permettrait d'éliminer entièrement l'apport de sels dans le spectromètre de masse afin de potentiellement obtenir un abaissement des limites de quantification.

Enfin, avec le développement d'une méthode d'extraction quantitative des aminoglycosides dans les sols, il serait également pertinent d'étudier leur cinétique d'adsorption dans les matrices solides environnementales. En effet, peu de données sont disponibles concernant leurs propriétés telles que le coefficient d'affinité avec la matière organique Koc.

V. Conclusion

Bien que la quantification d'aminoglycosides dans les matrices alimentaires soit aujourd'hui bien établie, elle reste peu abordée dans l'analyse environnementale. De plus, les quelques études publiées dans le domaine de l'environnement ne traitent principalement que des matrices aqueuses. Le développement de méthodes d'extraction des aminoglycosides dans les différentes matrices solides environnementales est donc nécessaire puisqu'ils s'y adsorbent fortement. Leur forte adsorption pourrait notamment ensuite causer des modifications biologiques dans les colonies bactériennes du sol et ainsi introduire des phénomènes d'antibiorésistance.

Chapitre 3 :

Développement d'une méthode d'extraction et d'analyse pour la quantification de bêta-lactames dans des boues de station d'épuration

I. Introduction

Représentant actuellement 15% de la consommation en médecine vétérinaire et 74% de la consommation humaine, les bêta-lactames, regroupant les pénicillines et les céphalosporines, sont l'une des familles d'antibiotiques les plus utilisées. Cependant, dans les différentes matrices solides environnementales, ils ne sont quasiment jamais détectés. Ces composés étant connus pour se métaboliser et se dégrader, il est donc nécessaire d'une part de développer des méthodes suffisamment sensibles pour pouvoir détecter de faibles concentrations résiduelles des molécules parents et d'autre part d'intégrer aux méthodes les différents métabolites et produits de transformation de chaque composé suivi, afin de pouvoir effectuer un dosage plus complet de la présence de ces antibiotiques dans l'environnement.

Dans ce chapitre, une adaptation de la méthode d'extraction QuEChERS est présentée pour la quantification de 7 bêta-lactames et un métabolite dans des extraits de boues de station d'épuration.

Ce développement fait l'objet d'un article paru dans Talanta (https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122923).

II. Résumé des principaux résultats

Dans cette étude, 8 bêta-lactames (Ampicilline, Amoxicilline, Amoxicilline-diketopiperazine Ceftiofur, Cefapirine, Cefquinome, Cefopérazone, Cloxacilline) et 3 étalons internes ont été extraits de boues de station d'épuration. La méthode d'extraction développée est une variante de la méthode QuEChERS, l'originalité provenant de l'addition d'un agent dispersant afin d'augmenter la surface d'échange entre la matrice et le solvant d'extraction.

Les différents sels d'extractions QuEChERS commerciaux ont été testés et seul le mélange QuEChERS contenant des tampons citrate (norme européenne) a permis l'extraction de tous les analytes. Les effets de la variation de la prise d'essai ont été évalués et une masse de 500 mg permet d'obtenir des rendements d'extraction corrects avec une minimisation des effets de suppression de signal apportés par la matrice.

Afin de permettre une meilleure extraction des composés d'intérêt, une dispersion de la matrice a été envisagée pour augmenter la surface d'échange entre l'échantillon et les solvants d'extraction. Pour ce faire, une étape de dispersion de la matrice a été ajoutée préalablement à l'extraction par la méthode QuEChERS. Du sable de Fontainebleau, précédemment traité avec de l'EDTA, a été mélangé à l'échantillon. L'extraction dispersive a permis un gain moyen de 20% par rapport à une extraction QuEChERS standard. Le ratio Echantillon/Sable a ensuite été optimisé et un ratio 1/4 a présenté un nouveau gain de 20% en moyenne. Les solvants d'extraction ont également été optimisés en termes de volume et d'additifs. Finalement, l'extraction QuEChERS dispersive est réalisée sur 500 mg d'échantillon additionnés de 2g de sable, avec 5 mL d'une solution aqueuse à 0,1M d'EDTA et 10 mL d'ACN.

A la suite d'une extraction QuEChERS, une étape de dSPE est généralement associée pour la purification. Lors de l'emploi des adsorbants PSA et PSA/C18, la totalité des bêta-lactames ont été perdus. Afin d'éviter cette perte, une méthode de purification sur cartouche SPE a été développée. L'extrait ACN issu de l'extraction QuEChERS est directement chargé sur la cartouche SPE et est récupéré dans un tube. A la suite de cette purification, les effets matrices de l'extraits ont été réduits en moyenne de 30%.

L'ensemble de la méthode QuEChERS dispersive + SPE directe a ensuite été validée. Les limites de quantification atteintes sont comprises entre 1,9 $ng.g^{-1}$ et 17,4 $ng.g^{-1}$, similaires ou inférieures à celles obtenues dans la littérature pour l'analyse des matrices solides. La répétabilité intra-jours et la précision intermédiaire ont été déterminées : au niveau de la concentration la plus basse, les variations standards intra-jours étaient inférieures à 25% pour tous les composés. Aux niveaux supérieurs de validation, l'ensemble des variations a été mesuré inférieur à 11%. Avec cette méthode, l'ensemble des composés ont été quantifiés entre 97% et 114% de leur concentration nominale.

Cette méthode a ensuite été appliquée à 8 boues de STEP. Seuls la céfapirine et le métabolite de l'amoxicilline (AMX-DKP) ont été quantifiés, en moyenne à 13,5 $ng.g^{-1}$ et 3,8 $ng.g^{-1}$ respectivement. Ces échantillons ont également été dopés à 100 $ng.g^{-1}$ afin d'évaluer l'exactitude et l'ensemble des composés ont été quantifiés entre 94% et 106% de leur concentration nominale.

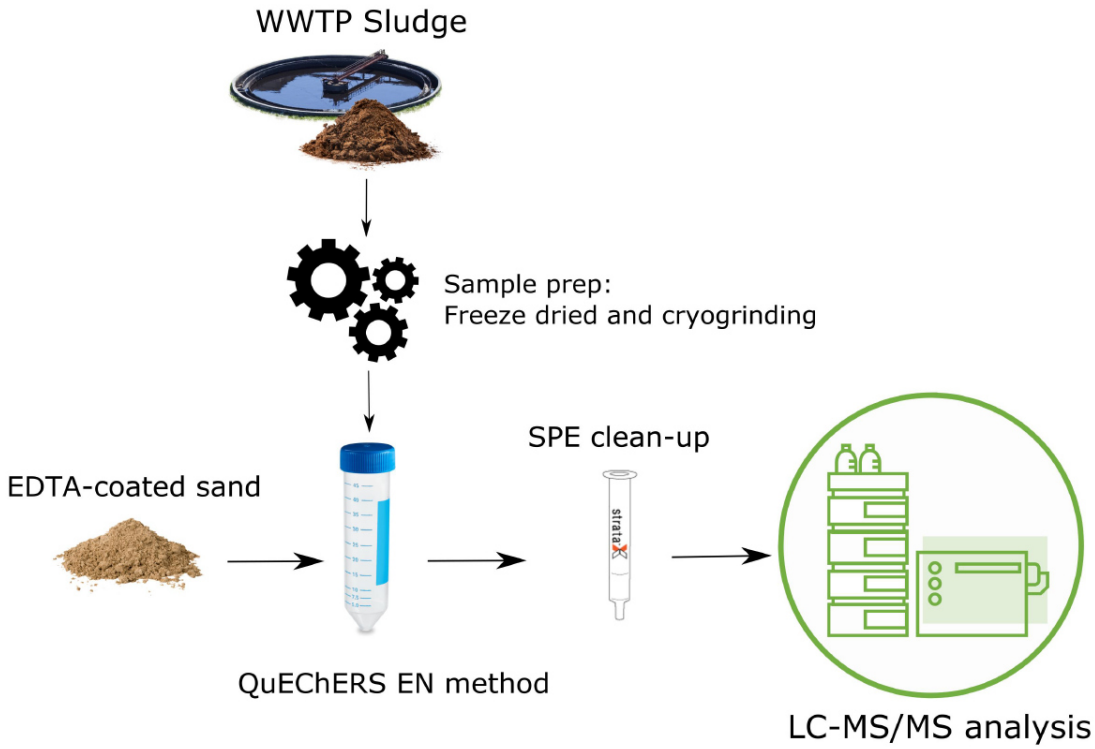
Article 2: Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC-MS/MS

Alexandre Guironnet, Laure Wiest, Emmanuelle Vulliet

Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 Rue de la Doua, F-69100, Villeurbanne, France

Corresponding author: laure.wiest@isa-lyon.fr

Graphical Abstract:



Abstract

In the last decade, beta-lactams use in veterinary and human medicine increased to represent today about 15% of the overall consumption. Beta-lactams tend to degrade and metabolize in the environment. Therefore, analytical methods must be sensitive enough to quantify low concentrations of the parent molecules and allow detection of metabolites. This study presents the development of a modified QuEChERS method for the extraction of seven beta-lactams and one degradation product (Amoxicillin, Ampicillin, Cefapirin, Cefoperazone, Cefquinome, Ceftiofur, Cloxacillin, and Amoxicillin-Diketopiperazine) from sewage treatment plant sludge and their analysis by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Before the QuEChERS extraction, a dispersion step of the sample with EDTA-treated sand was optimized and added, allowing to facilitate the exchanges between the matrix and the extraction solvent. Then, to decrease the interferences present in the extract, a fast and efficient pass-through SPE was implemented.

The optimized method was validated and showed satisfactory performances, in adequacy with the analysis of beta-lactams in solid environmental matrices. Limits of quantification lower than 20 $ng.g^{-1}$ for all analytes, high accuracy (96%-114% quantification on spiked samples nominal concentration) and interday precision (2%-12% RSD) were obtained. This method was then applied to eight sludge samples. Cefapirin and amoxicillin-diketopiperazine were detected in four samples each, at concentrations of 10.2-53.3 $ng.g^{-1}$ and 3.0-9.5 $ng.g^{-1}$ respectively. Thus, the developed method is very effective for the extraction of beta-lactams from environmental solid matrices.

Keywords: antibiotics; beta-lactam; metabolite; sludge; dispersive-QuEChERS; LC-MS/MS

1. Introduction

Beta-lactams, which include penicillins and cephalosporins, are among the most widely used antibiotics in veterinary medicine over the last 15 years, mainly in pig and cattle farms. (A. Soulier et al. 2016). Indeed, according to the European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption reports produced annually by the European Medicines Agency, their consumption has increased from 9% in 2005 to almost 15% in 2018 (ESVAC 2019; European Medicine Agency). However, over the last decade, the consumption of 3rd and 4th generation cephalosporin has been drastically reduced in France and globally in Europe (ESVAC 2011; ANSES 2017). They are also widely used in human medicine, averaging at 13% of the daily antimicrobials consumption this last 20 years (European Centre for Disease Prevention and Control 2021), being one of the first medicine prescribed.

Due to their wide use, beta-lactams are often analysed in food- matrices, such as milk (Tang et al. 2012; Zhan et al. 2012; R. W. Han et al. 2015; Berruga et al. 2016; Tian et al. 2016; H. Wang et al. 2017), honey (Hammel et al. 2008) or meat (Di Rocco et al. 2017; H. Wang et al. 2017; Y. Zhang et al. 2018). In those matrices, Maximum Residues Limits (MRLs) are set and periodically adjusted for each molecule and matrix. In the environment, beta-lactams analysis has been extensively described in liquid matrices such as surface waters (Locatelli, Sodre, et Jardim 2011; Yi et al. 2015), rivers (Tuc Dinh et al. 2011; Gros, Rodríguez-Mozaz, et Barceló 2013), wastewaters (T. Zhang et Li 2011; Lucas 2016; Dinh 2017) , or in urine (Ray et al. 2014; Chiesa et al. 2015).

Regarding liquid matrices, Solid Phase Extraction (SPE) is the most used sample preparation technique. Considering solid environmental matrices, such as manure or wastewater treatment plant (WWTP) sludge, the two most used extraction techniques for veterinary drugs are ultrasound-assisted extractions (UAE) and QuEChERS (Salvia et al. 2012; Peysson et Vulliet 2013; Salvia, Cren-Olivé, et Vulliet 2013; Chen, Mei, et Huang 2017; Bessaire et al. 2018). The principle of the QuEChERS methodology involves two main steps: (i) a liquid/solid extraction of the matrix, assisted by the addition of salts or buffers to promote phase separation and preferential transfer of analytes to the solvent; and (ii) a dispersive purification of the extract on a solid adsorption phase.

Peysson *et al.* (2013) and Salvia *et al.* (2012; 2013) developed multi-residue extractions in WWTP sludge and soil, respectively, including some beta-lactams (Penicillin G, Cefoperazone, Cloxacillin), using the acetate-based salts described in the Association of Analytical

Collaboration (AOAC) QuEChERS official method 2007.01 (Lehotay et al. 2007). Salvia *et al.* obtained maximum extraction yields of 50% for Penicillin G, and Peysson *et al.* reported an average recovery of 15% for cefoperazone but no extraction recovery of cloxacillin. As both these methods were intended for multi-family analyses, compromises were made during the optimisation to achieve suitable recoveries for most of the included analytes. Bessaire *et al.* (2018) proposed a specific QuEChERS buffer for veterinary drugs followed by a C_{18} based dispersive SPE, for the extraction of 23 beta-lactams in different food matrices, leading to extraction efficiencies of 34% on average. Matrix-matched calibration can then be used to compensate for the analytes losses but only when developing a method with a single matrix type, as suggested by Geis-Astaggiante *et al.* (2012)).

As beta-lactams are very likely to degrade (B. Li et Zhang 2010; Gozlan, Rotstein, et Avisar 2013; Hirte et al. 2016; Arsand et al. 2018), it is necessary to monitor their degradation products (DPs). One of the main DPs of amoxicillin in the environmental matrices is amoxicillin diketopiperazine (AMX-DKP), which result from cyclisation of amoxicillin after hydration and water removal. This metabolite has been detected and quantified by Gozlan *et al.* (2013) in groundwater and by Hirte *et al.* (2016) in WWTP effluent and river water. But, to the best of the authors' knowledge, the determination of AMX-DKP has never been reported before in solid matrices such as WWTP sludge.

In this context, the objective of this work was to develop an efficient and robust extraction and quantification of 7 beta-lactams and 1 DP (AMX-DKP) in wastewater sludge. These molecules were selected from the study realised by Soulier *et al.* (2016), who determined these beta-lactams as the most often prescribed. An original adaptation of the first step of salting-out extraction of the classical QuEChERS method was developed: a dispersive-QuEChERS extraction. It was followed by a rapid SPE step for clean-up, then liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was employed for the identification and quantification. The final method was validated and applied on a few WWTP sludge collected in France.

2. *Experimentals*

2.1. *Chemicals and reagents*

Ampicillin (AMP) trihydrate, Amoxicillin (AMX) trihydrate, Cloxacillin (CLX) and Cefoperazone (CFZ) were bought from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Ceftiofur (CEF), Cefquinome (CFQ) and Cefapirin (CFP) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). AMX-DKP, CEF-d3, AMP-d5 and CFP-d4 were bought from TRC (Toronto, Canada). All standards were at least 97% purity. The structure of each beta-lactam is reported in Fig. S1.

Stock solutions (1 $mg.mL^{-1}$) of each beta-lactam were prepared by dissolving about 10 mg powder, accurately weighted in 10 mL of acetonitrile (ACN) in glass Wheaton vials and were stored at -18°C for 3 months. Accurate concentration was then calculated taking each standard purity into account. Calibration solutions of each analyte (500 $ng.mL^{-1}$) were prepared by diluting individual stock solutions in water/ACN (1/1, v/v).

Water (LC-MS grade) was obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France), ACN (LC-MS grade) from Honeywell (Seelze, Germany) and formic acid (UPLC-MS grade) from Biosolve (Dieuze, France). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and Fontainebleau sand were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France), and Strata X™ SPE cartridges from Phenomenex (Le Pecq, France).

The compositions of the different QuEChERS extraction kits (from Agilent, Massy, France) were as follow: the European Committee for Standardization (EN 15662:2008) kit contains 4 g of $MgSO_4$, 1 g of NaCl, 1 g sodium citrate dihydrate and 0.5 g sodium hydrogencitrate sesquihydrate; the AOAC kit contains 6 g of $MgSO_4$ and 1.5 g of sodium acetate, the Original kit contains 4 g of $MgSO_4$ and 1 g of NaCl; and the Veterinary Drugs kit contains 4 g of Na_2SO_4 and 1 g of NaCl. Clean-up d-SPE kits (from Macherey-Nagel, Düren, Germany) PSA contains 900 mg of $MgSO_4$ and 150 mg of PSA phase, and the PSA/C_{18} contains 900 mg of MgSO4, 150 mg of PSA phase and 150 mg of C_{18} phase.

2.2. *EDTA-treated sand*

Fontainebleau sand was used to promote dispersion of the matrix. Before use, sand was treated with EDTA to remove metal impurities. Briefly, 180 g of sand were put in contact with 360 mL of 0.2 M EDTA water solution and stirred for 2h. After stirring, sand was left to settle for 10 min and excess water was dumped. Finally, sand was dried overnight in a heat chamber.

2.3. ***Sample collection***

Sludge samples were collected from a wastewater treatment plant (WWTP) located in Haute-Savoie, France. The layout of the WWTP was described in detail by Chonova *et al.* (Chonova *et al.*, 2018). Briefly, this WWTP treats effluents from both urban wastewaters and hospital wastewater for an actual capacity of 32,000 Population Equivalent and operates on activated sludge treatment. After collection, samples were transported to the laboratory where they were immediately freeze-dried (Alpha 2-4 LD Plus, Christ) then homogenized and pulverised using a cryo-grinder (6770 Freezer/Mill, SPEX Sample Prep). The resulting powders were stored at -20°C before extraction. All method developments were realised on Sludge 1, in which no beta-lactam was detected, except AMX-DKP.

2.4. ***Sample preparation***

The optimised extraction was performed in the following successive steps: first, 0.5 g of sludge were weighed into a 50 mL centrifuge tube and mixed with 2 g of EDTA-treated sand. Then, 5 mL of 0.1M EDTA water solution were added, the mixture was swirled with a vortex mixture for 30 s then 10 mL of ACN were added and swirled again for 30 s. EN QuEChERS salts were then added, agitated for 15 s by hand and by vortex for 45 s. Extraction tubes were then centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. The supernatant was then transferred to a 12 mL glass tube.

After QuEChERS extraction, a clean-up was performed using SPE (Rapid Trace SPE Workstation, Caliper). First, a Strata X™ cartridge (3 mL/200 mg) was conditioned with 5 mL of ACN at 5 $mL.min^{-1}$. Then, 10 mL of the QuEChERS ACN extract was flowed through the cartridge at 1 $mL.min^{-1}$ and collected in a new 12 mL glass tube.

Finally, the purified ACN extract was evaporated to dryness under a gentle N_2 flow, in a water bath heated to 40°C. The dry residue was later dissolved in 1 mL of 97/3 H_2O/ACN, mixed for 1 min and centrifuged at 1,500 rpm for 2 min to allow potential non dissolved particles to settle to the bottom of the tube. Particle-free supernatant was finally transferred to a 2 mL vial for LC-MS/MS analysis.

2.5. *LC-MS/MS method*

The system used was an Agilent (Massy, France) 1290 Infinity Series system equipped with a quaternary pump. The column was a Kinetex F5, 100×2.1mm, 1.7 µm from Phenomenex (Le Pecq, France). Optimized chromatographic conditions were as followed: a binary mobile phase was used with a flow rate set to 300 $\mu L.min^{-1}$ for a run time of 16 min, with the column maintained at 50°C. Mobile phase A was an aqueous solution of 0.1% formic acid, and B was ACN with 0.1% formic acid. The separation was performed with a programmed gradient: 0 min: 3% B; 10-12 min: 100% B; 12-13 min: 3% B. An equilibration time of 3 min was realised before each injection. The sample injection volume was 40 µL.

A 5500 QTrap from Sciex® (Les Ulis, France) was used in scheduled-Multiple Reaction Monitoring (s-MRM) mode with positive electrospray ionization. The mass spectrometer source was operated at 600°C, with an ionisation tension of 5,500 V. Curtain gas pressure was set to 30 psi, nebulisation and turbo gas were set to 40 and 60 psi respectively. For all compounds, the entrance potential was set to 10V. MS/MS detection was optimized by infusion of individual standard solutions at 100 $ng.mL^{-1}$ in 50/50 (H_2O/ACN) + 0.1% formic acid via syringe pump at a flow of 10 $\mu L.min^{-1}$. Optimized parameters are presented in Table S1.

2.6. Method validation

Limits of quantification (LOQs) were evaluated as the concentrations leading to a signal-to-noise ratio of 10. The method linearity for each molecule was determined by injection of six matrix extracts spiked before extraction, from 10 $ng.g^{-1}$ to 200 $ng.g^{-1}$. Calibration curves and samples were spiked with a mixture of internal standards (IS) at 100 $ng.g^{-1}$. Quantification was done based on calibration curves representing A_{STD}/A_{IS} as a function of C_{STD}/C_{IS}, with A_{STD} being the area of the standard, A_{IS} the area of the IS, C_{STD} and C_{IS} being the concentration of the standard and the IS respectively. Intraday repeatability was based on 4 replicates and intermediate precision was evaluated on five days. Intraday repeatability was determined for each level by calculating the relative standard deviation (RSD) of replicates and interday precision was determined by calculating the RSD on five days measurements.

Extraction efficiencies were calculated as the ratio between the analyte peak area of a matrix spiked before extraction and the analyte peak area of a matrix spiked after extraction, at the

same concentration. Matrix effects were evaluated by calculating the ratio between the analyte peak area of a matrix spiked after extraction and a solvent standard of the same concentration.

3. *Results and discussion*

3.1. *Development of the extraction method*

For the development of the extraction method, the first steps were the selection of the QuEChERS sorbent and the sample mass. Then, the addition of a matrix-dispersion component in the QuEChERS extraction was studied and optimised. Different extraction solvents were also tested. Finally, as sludges are very complex matrices, an addition of a sample clean-up step was considered.

3.1.1. *Extraction salt selection*

Four different commercially available QuEChERS extraction salts were tested: AOAC, EN, Original and Veterinary Drugs (VET). AOAC and EN differ in the nature and amount of salts, and result in different pH or buffering power in solution. The resulting pH in buffered sludge water extracts was measured: between 4.5-5 for EN method kit and a basic pH (8-8.5) considering the AOAC. The two other extraction salts do not contain any buffer, only desiccating agent ($MgSO_4$ or Na_2SO_4) and NaCl to promote H_2O/ACN by salting out effect and phases separation. The VET extraction kit was designed to allow softer extraction conditions, with the replacement of $MgSO_4$ by Na_2SO_4. Indeed, the absorption of water by Na_2SO_4 is a lesser exothermic reaction than the one with $MgSO_4$ and thus less likely to degrade the analytes.

To test their extraction capacity, triplicate extractions on 1 g of WWTP sludge were performed with each sorbent, 5 mL of water and 10 mL of ACN. Extraction efficiencies were calculated for each beta-lactam and are presented in Figure. 1.

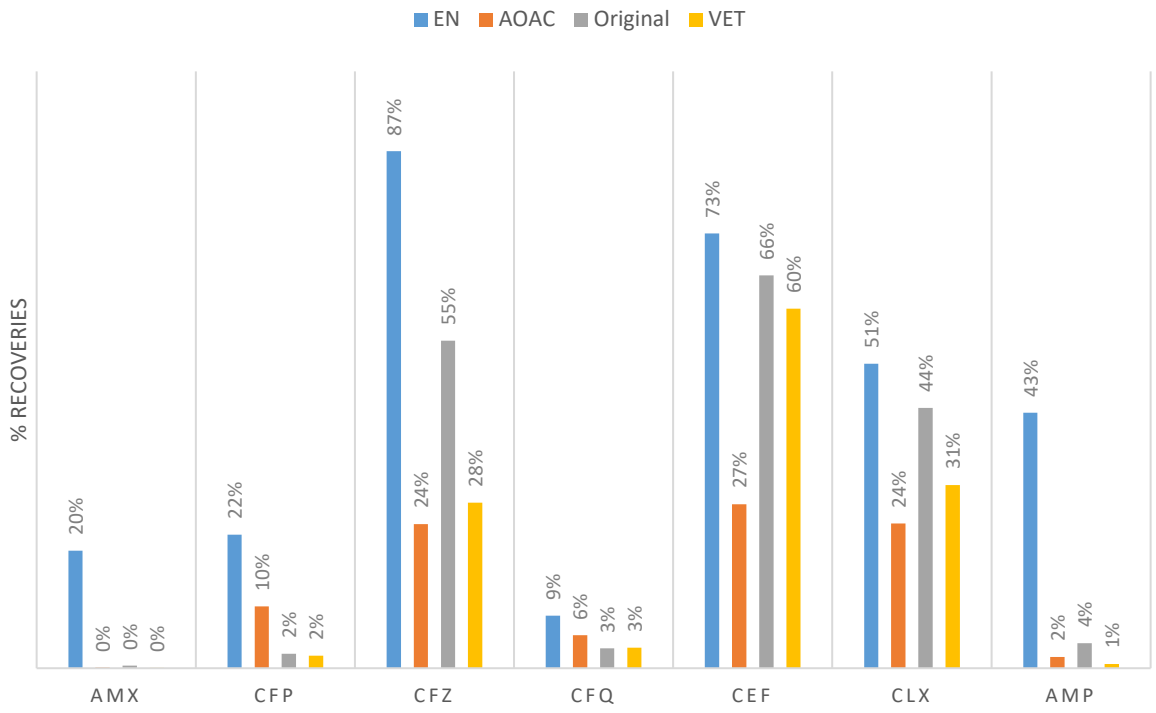


Figure 1 : Recoveries with 4 different QuEChERS Extraction kits (1 g sludge, extraction with 5 mL H_2O and 10 mL ACN)

The EN method buffer was the only one allowing amoxicillin to be detected. It also yielded better extraction for all other beta-lactams, so this buffer was selected for further optimisation. One explanation for this difference could be the variation of pH induced by the extraction kits. Indeed, each compound logD is lower at pH 8 than at pH 5, as presented in Table S2. As logD describes the polarity of the molecules as a fonction of pH, beta-lactams are more polar at pH 8. Their ability to transfer to the organic phase is then reduced, explaining lower recoveries of the analytes.

Another explanation would rather be the presence of citrate salts in the EN buffer. Indeed, these have a chelating capacity that breaks the interactions between metal cations and organic compounds, which improves their extraction (Merdoud et al. 2016; Z. Liu, Chen, et Hu 2020). In conclusion, the EN buffer was selected for the following experiments.

3.1.2. *Sample mass*

The sample mass is a critical parameter. On the one hand, increasing the sample mass increases the analyte presence in the extract, lowering detection limits. However, on the other hand, it also raises the risk to extract matrix interferences, thus increasing overall matrix effects. Three different matrix masses were selected: 500 mg, 1 g, and 2 g. All three were spiked at 50 $ng.g^{-1}$ with all analytes and extracted. A diminution of 50% of extraction recovery for all beta-lactams on average when increasing sample mass from 500 mg to 1 g was observed (Fig.S2). This reduction was stronger for the penicillins (AMX, AMP, CLX) than the cephalosporins. A further increase in sample mass to 2 g decreased the signal by a factor between 10 and 20%. The largest decrease was observed for CFQ, for which the extraction recovery decreased by 85% when going from a mass of 500 mg to 2 g. The matrix effect induced by increasing the sample mass thus outweighed the gain in sensitivity. To minimize this signal suppression, a mass of 500 mg was chosen for the following development steps.

3.1.3. *Matrix dispersion with sand*

The first step in the process of extracting a solid matrix is to bring the solvent into contact with the matrix particles. To do this, the contact surface must be maximised to increase interactions. In addition to fine grinding of the sludge and the use of a homogeniser, it is possible to increase the contact surface by adding an inert matrix. This is used for example in pressurized liquid extraction (PLE) in which the sample to be extracted is placed in a cell, supplemented with diatomaceous earth. Due to the toxicity of diatomaceous earth, we opted for Fontainebleau sand, a material that is also readily available and has been shown to facilitate the extraction of aminoglycoside antibiotics from milk (Bogialli et al. 2005). Fontainebleau sand were mixed with the sludge to add a dispersive component to the extraction. The sand was previously treated with EDTA, as it has been proven that its chelating capacity can improve extraction efficiencies (Yan Wang et al. 2017). First, a 1 to 3 ratio between sludge and sand was applied (Salvia, Fieu, et Vulliet 2015). The improvement of the extraction efficiency was significant but remained relatively moderate (20% on average for all beta-lactams) compared to a simple QuEChERS extraction (Fig. 2A). On the other hand, we noted an impact on the matrix effect for most molecules. Indeed, except for CEF and CLX, a strong reduction of matrix effects was observed (Fig. 2B), which were finally between -20% and 20%.

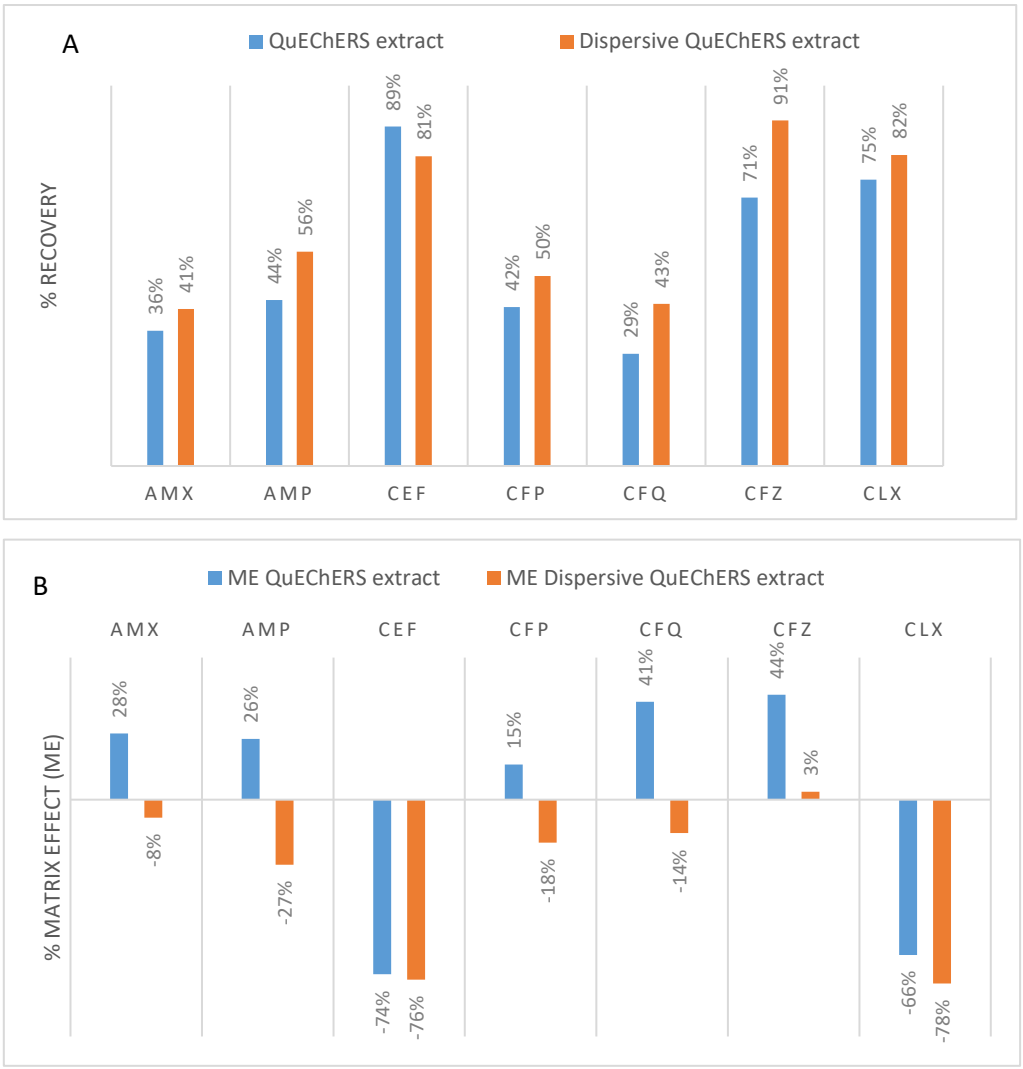


Figure 2 : Recoveries (A) and matrix effects (B) obtained with or without EDTA-treated sand as dispersive agent (500 mg sludge; extraction solvent: 5 mL H_2O and 10 mL ACN; mass ratio sludge/sand)

Secondly, the sludge/sand ratio was optimised. For all extracts, 500 mg of sludge were spiked at 100 ng.g^{-1} and extracted with different masses of EDTA-treated sand (TS) to obtain the following sludge/sand ratios: 2/1;1/1;1/2;1/4. Fig. 3 shows that adding the sand as a dispersing component resulted in a 20% signal increase when going from a 1/1 to a 1/4 sludge/sand ratio. This increase was greatly observed for CLX and AMX, with a 30% signal increase.

Figure 3 : Normalized area obtained for the extraction of the analytes with various sludge/sand ratio (500 mg sludge; extraction solvent: 5 mL H_2O and 10 mL ACN).

Supplementary experiments showed that both the addition of sand, and the treatment with EDTA had a positive impact on extraction efficiencies. Extraction recovery comparison between extraction with not treated sand and without sand indicated an area increase between 31% for CLX and 72% for AMX. The comparison between non treated sand and TS extraction revealed gains between 21% for CFP and 34% for AMX. These results show that using sand helped to disperse the sludge samples, increasing the surface area available for the extraction solvent.

3.1.4. ***Improvement of the acetonitrile-based extraction conditions***

First, we evaluated the addition of formic acid (FA) and EDTA as aqueous phase additives. Signal areas obtained with water, water at 0.1% FA, water at 100 mM EDTA, and water at 0.1% FA + 100 mM EDTA were compared (Fig. 4).

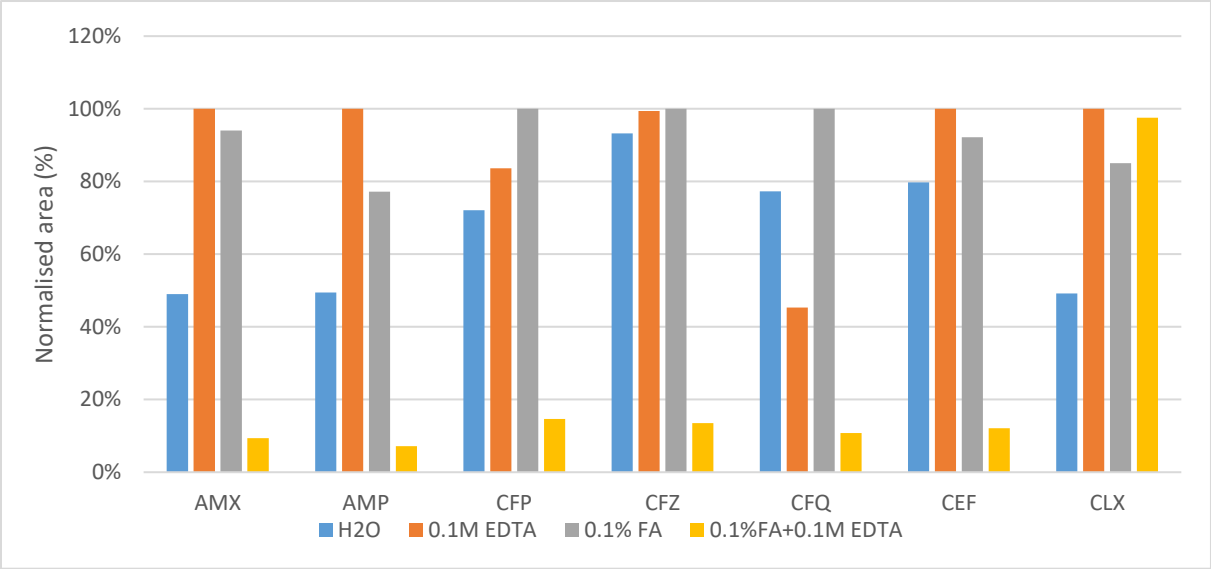


Figure 4 : Normalized area obtained for the extraction of the analytes, as a function of the addition of EDTA and formic acid (FA) in the aqueous phase: (500 mg sludge, 5 mL aqueous phase, 10 mL ACN)

When adding 100 mM EDTA to the aqueous phase, the signal is double for the penicillin subfamily. It also increases for cephalosporins, except for CFQ whose area is reduced by 40%. It is now recognised that complexation between metallic and organic cations, such as antibiotics can occur (Alekseev 2012). Metallic cations are often present in wastewater in large quantities, as shown for example by Östman et al. (2017). EDTA is known to be a powerful chelating agent for metals: when the sludge sample is exposed to an EDTA-containing solution, metal-antibiotics complexes are broken to form metal-EDTA complexes. Adding EDTA to the solvent then enables better extraction of beta-lactams.

The addition of 0.1% FA also increased the surface area of all the compounds. In sludge, most of the organic matter particle surfaces are negatively charged, and analytes are heavily bound to the solid particles (Thiele-Bruhn 2003; Reemtsma et al. 2016). Acidifying the sample reduces the amount of negatively charged particles, thus returning beta-lactams in solution rather than bound to the matrix.

While EDTA or FA added separately had a positive impact on the signal, when combined, a massive signal decrease was observed for all beta-lactams except for CLX. This behaviour may be explained by the EDTA different ionisation state with pH modification. With only water, the solution is at a neutral state (pH 7) and EDTA is mainly in its trivalent anionic state (HY^{3-}), enabling organic and metallic cations complexation. With 0.1% FA in solution, the pH is around 2.7, where EDTA is more in its monovalent anionic state (H_3Y^-) and its capacity to complex

cations is thus reduced. Unlike the other penicillins (AMP and AMX), the extraction of CLX was not massively influenced by the mixture EDTA/FA. This difference can probably be explained by the absence of primary amine in its structure. Both AMX and AMP have two ionisable sites resulting in two pKa values whereas CLX only has one cationic form. EDTA can thus complex CLX regardless of its mono-, di- or trivalent anionic state. Finally, for the following optimisation steps, EDTA was selected rather than FA due to the potential instability of beta-lactams in acidic media.

Secondly, the influence of the volumes of the aqueous and organic phases (5 mL or 10 mL) was evaluated. Increasing the volume of the aqueous phase enhanced the signal for CFZ, CFQ, CEF and CLX by about 40% on average with a higher impact for CFQ (+60%) (Fig. S3A). Beta-lactams being polar molecules (logD at pH5 between -3.25 and 1), adding more water favours their solvation and their migration from the sample to the extract solution. However, doubling the aqueous phase volume also led to a 40% reduction of the signal for AMX, AMP and CFP. This could be explained by the mass of desiccant added in the pre-mixed QuEChERS buffer (4g of $MgSO_4$) which can only absorbed about 4-5 mL of water, so the transfer between the aqueous and the organic phase may not be complete. Therefore, for the following extraction optimisation, a volume of 5 mL water was maintained. Finally, for the organic layer (Fig. S3B), a volume of 10 mL yielded a signal increase of 35% on average for all the targeted compounds. Once again here, the larger increase was noted for CFQ with about 50%. A larger quantity of organic phase allows a larger fraction of analytes to be solubilised and the transfer between the two phases is then more efficient.

As a conclusion, the final dispersive-QuEChERS extraction step was realised on 500 mg of sludge mixed with 2 g of EDTA-treated sand as dispersive agent. The extraction was performed with 10 mL of ACN, 5 mL of 0.1M EDTA and the addition of the EN QuEChERS salt kit, which is composed of citrate salts.

3.1.5. *Sample clean-up*

The use of the dispersive-QuEChERS extraction step with sand limited matrix effects, except for the compounds CEF and CLX (see section 3.1.3), which experienced signal inhibitions in the range of 75-80%. In the original QuEChERS extraction, dispersive SPE (dSPE) is used to further clean up the extracts. We tested two d-SPE phases: PSA (Primary and Secondary

Amines) and PSA/C18. For both, three sludge 10 mL extracts were supplemented at 100 $ng.g^{-1}$ and added to a d-SPE tube containing the phases. The tubes were swirled with vortex for 1 min then centrifuged for 5 min at 10,000 rpm. A volume of 10 mL of supernatant was sampled to another tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream at 40°C. Then, 1 mL of 93/7 H_2O/ACN was added, and each extract was injected into the LC-MS/MS system. We observed a strong adsorption of beta-lactams when using d-SPE phases, resulting in almost 100% attenuation for all compounds. This phenomenon could be explained by the strong hydrogen bounding interaction of the beta-lactams accessible carboxylic acid with the primary and secondary amines used for the clean up step. A similar fact was already noted by Zhi *et al.* (2020) who reported no recovery of penicillin G and oxacillin when purifying swine manure extracts with PSA conditioned in SPE cartridges.

To circumvent this problem, a SPE clean-up based on a styrene-divinylbenzene polymer (Strata X™) phase was evaluated. To limit the sample preparation time and to avoid a preliminary dilution of the extract in water, a "pass-through" SPE was considered. This consists of a single step after the cartridge conditioning: a single loading of the extract to collect the eluate. Results are presented in Fig. 5. SPE had a positive impact on the diminution of interfering substances (expressed as matrix effect -ME), as shown in Figure 5A, except for CFP and CFZ, for which ME did not significantly decrease. The largest negative MEs observed on CEF and CLX without clean-up were halved and MES on AMX and CFQ were changed to small positive effects after SPE. SPE clean-up yields were also calculated (Figure 5B)

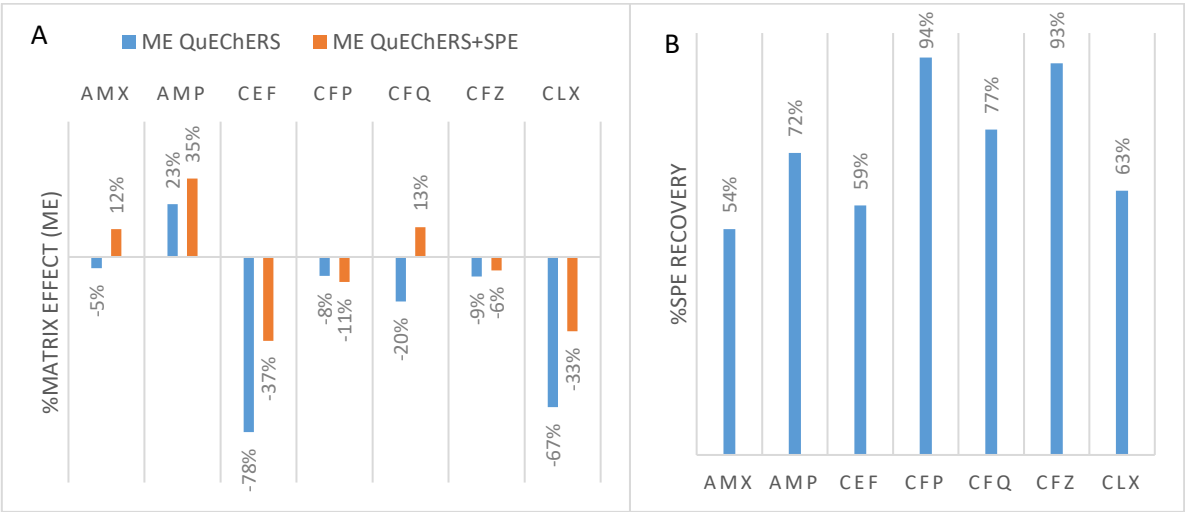


Figure 5 : Matrix effects (A) and SPE pass-through recoveries (B) obtained with or without the SPE pass-through clean up

They are quite different depending on the molecule, ranging from 54% to over 90%. The molecules with the lowest yields may still be bound to dissolved matrix components and are removed during SPE loading of the cartridge or are not released from the polymeric phase of SPE, resulting in a loss of recovery. This clean-up step, therefore, allows better responses to mass spectrometry with removal of interfering compounds, lower limits of quantification for all selected molecules, and overall, a more robust method.

3.2.*Method validation*

For validation purposes and application, one degradation product of AMX, AMX-DKP was added in the final method. In complex matrices such as sludge, identification of analytes may often be difficult. Undeniable identification is realised with retention time stability, the monitoring of two specific MS/MS transitions and the consistency of the ratio between the two transitions. Both variations on the retention time and on the MRM transitions ratio were recorded and are compiled in Table 2. Retention time variations were lower than 0.05 min, and ratio variations were mainly below 10% RSD, except for CFQ and AMX. These higher variations may be explained by the lower MS signal response of these two analytes.

Beta-lactams extraction efficiencies were evaluated with the whole final sample preparation method at low, middle, and high levels, in triplicate. Some beta-lactams exhibited absolute global recoveries below 30%, as showed in Table 1. However, for all molecules and all levels, extraction was repeatable with %RSD kept below 22% at 20 $ng.g^{-1}$ and even below 10% at 200 $ng.g^{-1}$. For these reasons, it was decided to validate the method with matrix-matched calibration to compensate for low extraction yield.

Table 1 : Overall beta-lactams extraction efficiency at three different concentrations

	20 NG.G^{-1}	**100 NG.G^{-1}**	**200 NG.G^{-1}**
	Mean recovery (%RSD)	Mean recovery (%RSD)	Mean recovery (%RSD)
AMP	43% (11)	32% (8)	30% (4)
CEF	64% (14)	62% (10)	60% (9)
AMX	12% (22)	12% (5)	11% (8)
CFP	27% (12)	26% (7)	25% (4)
CFQ	16% (15)	14% (13)	13% (8)
CFZ	65% (13)	76% (16)	67% (8)
CLX	47% (18)	46% (11)	38% (7)
AMX-DKP	68% (9)	67% (10)	67% (4)

For the validation of the linearity, approximate quantification limits of beta-lactams were determined by injecting replicates (n=3) of extracted spiked blanks solutions, based on signal-to-noise ratios of 10. Beta-lactams response linearity was then determined from the injection of a matrix-matched calibration curve, starting from the previously determined LOQ to 200 ng.g^{-1}. Each compound displayed good linearity over the selected range, with determination coefficients (R^2) greater than 0.99 (Table 2).

Table 2 : Method validation results (linearity, LOQs, and precision at 3 different concentrations (a: intraday n=4; b: interday n=5 days))

	Retention time (min) (%RSD[b])	Transition ratio (%RSD[b])	LOQ ($ng.g^{-1}$)	Linearity		20 $ng.g^{-1}$		100 $ng.g^{-1}$		200 $ng.g^{-1}$	
				Range ($ng.g^{-1}$)	R^2	Mean (%RSD)[a]	Accuracy (%RSD)[b]	Mean (%RSD)[a]	Accuracy (%RSD)[b]	Mean (%RSD)[a]	Accuracy (%RSD)[b]
AMP	3.4 (1.1)	0.2 (5)	2.4	10-200	0.991	18.4 (12)	97 (7)	97.3 (9)	100 (10)	191.5 (4)	97 (4)
CEF	5.0 (1.0)	0.5 (3)	1.9	10-200	0.997	20.2 (5)	103 (5)	98.9 (5)	99 (5)	191.8 (2)	101 (3)
AMX	2.0 (3.1)	1.1 (8)	17.4	10-200	0.995	23.2 (23)	104 (7)	99.3 (8)	101 (8)	188.4 (7)	97 (6)
CFP	3.0 (1.3)	0.6 (10)	8.7	10-200	0.996	22.2 (11)	106 (7)	99.7 (3)	97 (7)	199.4 (2)	100 (2)
CFQ	3.5 (0.7)	0.4 (16)	11.8	10-200	0.994	23.7 (13)	105 (12)	101.9 (6)	98 (4)	196.0 (4)	99 (4)
CFZ	4.6 (0.9)	1.1 (2)	9.5	10-200	0.995	21.0 (7)	103 (4)	100.3 (6)	100 (7)	200.1 (2)	100 (3)
CLX	6.5 (0.8)	1.2 (9)	7.7	10-200	0.994	17.5 (15)	114 (11)	94.8 (11)	96 (7)	177.7 (11)	100 (4)
AMX-DKP	3.5 (1.2)	0.2 (7)	2.7	10-200	0.994	21.4 (19)	97 (8)	100.9 (8)	102 (9)	204.0 (8)	101 (3)

Quantification limits were calculated more precisely from the obtained calibration curves and the coefficients of variation. They were comprised between 1.9 and 17.4 $ng.g^{-1}$ (Table 2) therefore consistent with the literature for solid environmental matrices such as sludge (Table 3). It is difficult to compare methods that do not use the same mass spectrometer, or that have multi-residue analysis objectives. However, the method developed allows the lowest LOQs to be achieved.

Table 3 : Literature comparison for the determination of beta-lactams in solid environmental matrices

Analytes	Matrix	Sample preparation	Analysis	LOQs ($ng.g^{-1}$)	Ref.
CEF	Manure Sludge Sediment	UAE + SPE concentration	LC-MS/MS	17.4 15.4 5.8	(Zhou et al. 2012)
CFP	Feces	UAE + SPE concentration	LC-MS/MS	4.0	(Ray et al. 2014)
AMX, CEF	Soils	UAE + SPE concentration	LC-MS/MS	10	(Yi et al. 2015)
AMX	Sediment	UAE + SPE concentration	LC-MS/MS	25	(Dinh 2017)
AMX	Manure	UAE + SPE concentration	LC-MS/MS	136	(Argüeso-Mata 2021)
AMX	Manure	UAE	LC-MS/MS	50	(Gorissen et al. 2015)
CLOX, CFZ	Sludge	QuEChERS AOAC + d-SPE PSA	LC-TOF	50-5000	(Peysson et Vulliet 2013)
AMX, AMP, CEF, CFP, CFQ, CFZ, CLX, AMX-DKP	Sludge	Dispersive QuEChERS + SPE	LC-MS/MS	1.9-17.4	This study

Results of both repeatability and intermediate precision experiments are compiled in Table 2. Concerning the intraday repeatability, RSD were measured inferior to 20% at 20 $ng.g^{-1}$ for all compounds, showing good repeatability from one analysis to another. At the highest concentration, RSD are further reduced, below 5% for 5 of the followed molecules.

For intermediate precision, at the lowest level, all RSD were measured below 11%. These variations were deemed following the method validation guidelines given by the AOAC for

environmental analysis (Rambla-Alegre, Esteve-Romero, et Carda-Broch 2012; AOAC International 2016). At middle and high levels, all RSD were below 10% and 5% respectively.

For all levels, quantification was accurately realised with calculated values within ±6% of the nominal concentration, except for CLX at LOW level, evaluated at ±14% of the nominal value.

3.3. *Applications*

Eight sludge samples were collected at different times in the same site, across 3 years. Extractions were realised in triplicate. To measure the accuracy of the method developed and check for bias, extractions were also performed on spiked matrices at 100 $ng.g^{-1}$, midpoint of the calibration curves.

Regarding spiked samples, as presented in Table 4, quantification of all the target beta-lactams was accurate. For samples that contained beta-lactams in the non-spiked extract, the determined concentration was subtracted from the calculated spiked concentration before accuracy was computed. On average, the lowest accuracy was at 94% and the highest was 106% for CLX and AMX-DKP respectively. For all the samples and all the analytes, %RSD were kept below 15%.

Results of quantification of the non-spiked sludge samples are presented in Table 4. Amongst all beta-lactams followed in our study, only CFP and AMX-DKP were detected in half of the samples, quantified on average at 13.5 $ng.g^{-1}$ and 3.8 $ng.g^{-1}$ respectively. Sludge 8 exhibited about 4 times more CFP and Sludge 7 exhibited about twice AMX-DKP. Absence of other beta-lactams could be partly explained by a high metabolization or degradation capacity in sewage systems. Li and Zhang (2010) determined that CLX has a short half-life of only 2h.

Table 4 : Application on 8 WWTP sludges, not spiked (concentrations in ng.g-1 (%RSD)) and spiked at 100 ng.g-1 (accuracy percentage (%RSD))

	Concentrations (ng.g-^{1})								**Accuracy at 100 ng.g^{-1}**							
Compounds	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**
AMP	/	/	/	/	/	/	/	/	102 (1)	106 (9)	107 (3)	106 (2)	108 (10)	96 (2)	99 (8)	96 (3)
CEF	/	/	/	/	/	/	/	/	101 (1)	96 (2)	106 (0.2)	103 (4)	110 (2)	101 (6)	99 (4)	98 (4)
AMX	/	/	/	/	/	/	/	/	99 (7)	98 (4)	104 (8)	91 (10)	104 (12)	105 (2)	88 (9)	112 (7)
CFP	/	/	10.2 (6)	11.9 (6)	18.4 (10)	/	/	53.3 (3)	114 (6)	98 (2)	111 (2)	107 (3)	98 (2)	103 (3)	93 (3)	100 (1)
CFQ	/	/	/	/	/	/	/	/	86 (13)	91 (4)	114 (2)	113 (6)	104 (7)	112 (7)	80 (9)	95 (12)
CFZ	/	/	/	/	/	/	/	/	106 (11)	91 (4)	91 (2)	102 (6)	93 (5)	89 (7)	114 (4)	104 (7)
CLX	/	/	/	/	/	/	/	/	104 (12)	91 (10)	87 (13)	114 (3)	104 (6)	64 (7)	97 (15)	95 (12)
AMX-DKP	3.7 (8)	4.8 (1)	/	/	/	/	9.5 (11)	3.0 (1)	111 (4)	105 (2)	107 (7)	99 (4)	103 (4)	99 (6)	113 (5)	114 (7)

Furthermore, beta-lactams present poor adsorption on sludge (Gros, Rodríguez-Mozaz, et Barceló 2013), limiting their detection. As the transformation of AMX to AMX-DKP involves the addition then loss of an H_2O molecule by cyclisation (Gozlan, Rotstein, et Avisar 2013), the metabolite may be present at higher concentrations in wastewater with a small portion adsorbed onto sludge particles. For all extracts where at least one beta-lactam was quantified, %RSD were determined to be below 11%, showing both a good matrix homogeneity and confirming method repeatability. It should be noted that the levels found in the sludge are below the limits of quantification of the previously described methods (Table 3), which shows the interest of the QuEChERS dispersive extraction to acquire data and knowledge on beta-lactams present in low concentrations.

4. *Conclusion*

The analytical method presented in this study allows determination and quantification of 7 beta-lactams and one metabolite in sludge, using a sample preparation method based on a new dispersive-QuEChERS extraction. One of the major improvements is the addition of EDTA-treated sand to the sample before extraction to disperse the sample and increase the surface available for exchange with extraction solvent. This method showed sensitivity and robustness coherent with environmental detection in solid matrices and allows accurate quantification (±6%).

The developed method presented here was validated and applied to 8 sludge samples, where CFP and AMX-DKP were detected in 4 samples, averaging 14 $ng.g^{-1}$ and 4 $ng.g^{-1}$ respectively. Due to their high metabolism capacity, the beta-lactam family has a wide range of degradation products: for example, Hirte *et al.* (2016) identified 45 potential degradation products of AMX in wastewater, 23 of which have never been reported before. However, as standard molecules of the different metabolites are not widely available commercially, few analytical methods exist at present. The quantification of the amoxicillin metabolite in our study demonstrates the need to look at metabolization or degradation products present in the environment.

Acknowledgement

The authors thank the French Biodiversity Office (OFB) and the French RMC Water Agency for funding this study as part of the RISMEAU project (scientific partners: ISA, INRA, INSA, INSERM and ENTPE).

Supplementary materials: Improvement of the QuEChERS extraction step by matrix-dispersion effect and application on beta-lactams analysis in wastewater sludge by LC-MS/MS

Alexandre Guironnet, Laure Wiest, Emmanuelle Vulliet

Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 Rue de la Doua, F-69100, Villeurbanne, France

Corresponding author: laure.wiest@isa-lyon.fr

Fig. S1: Structures of beta-lactams in this study

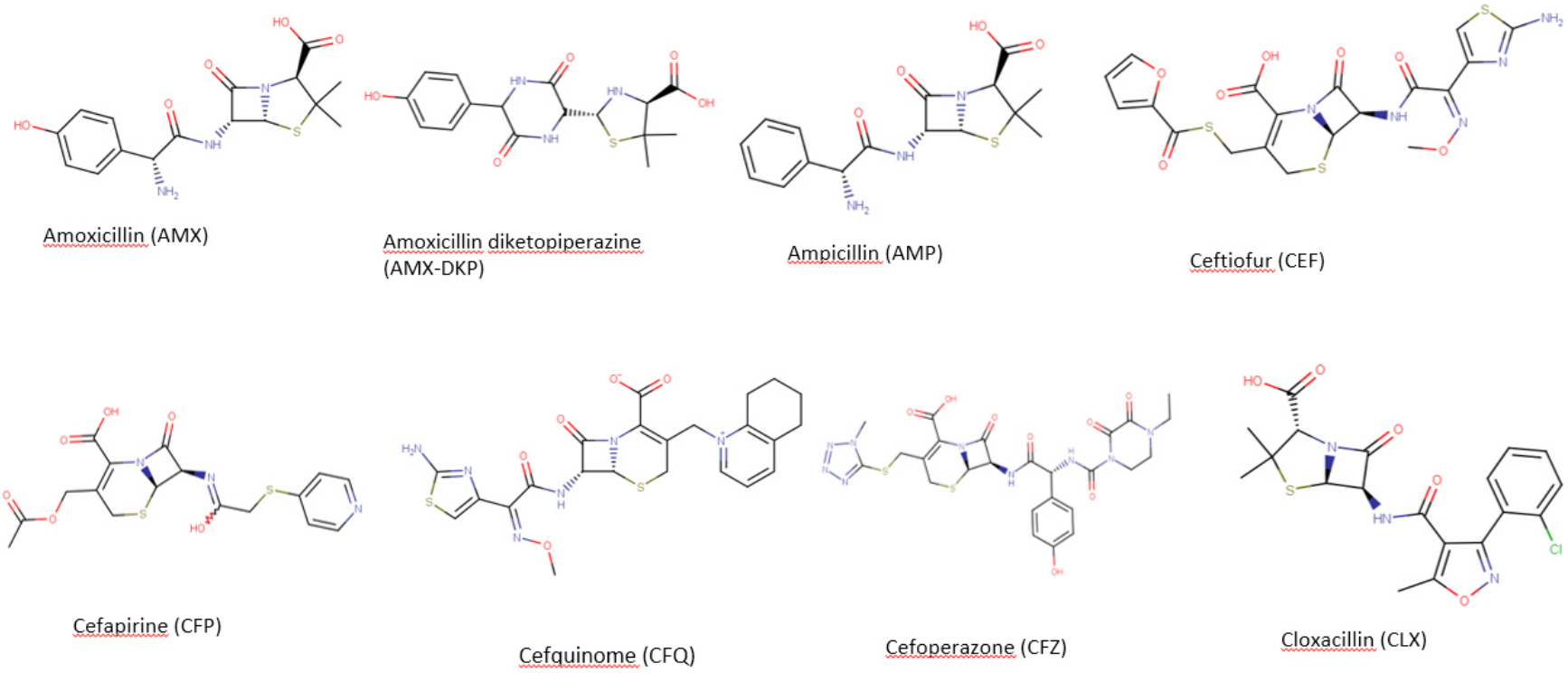


Fig. S2: Influence of increasing sample mass: normalized areas of each beta-lactam

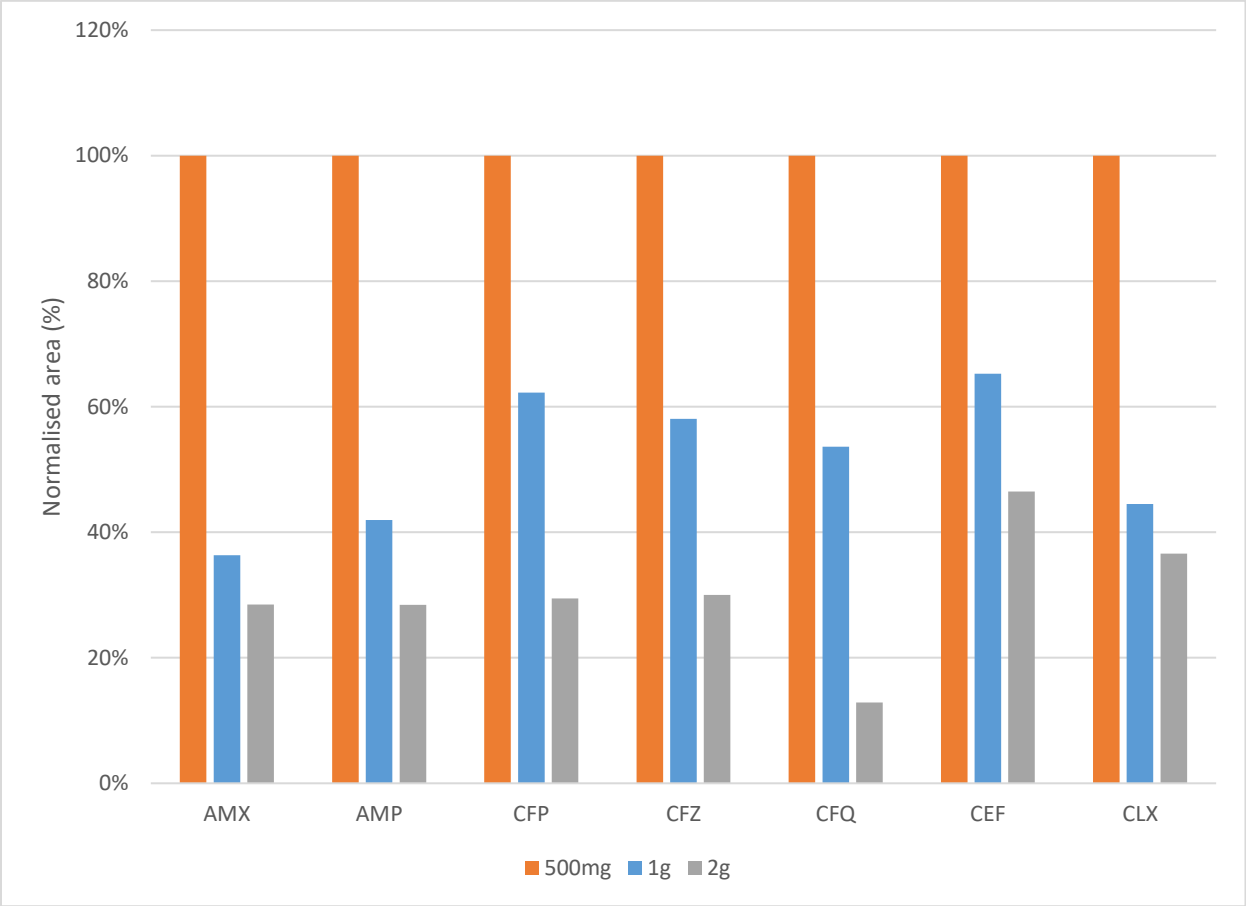
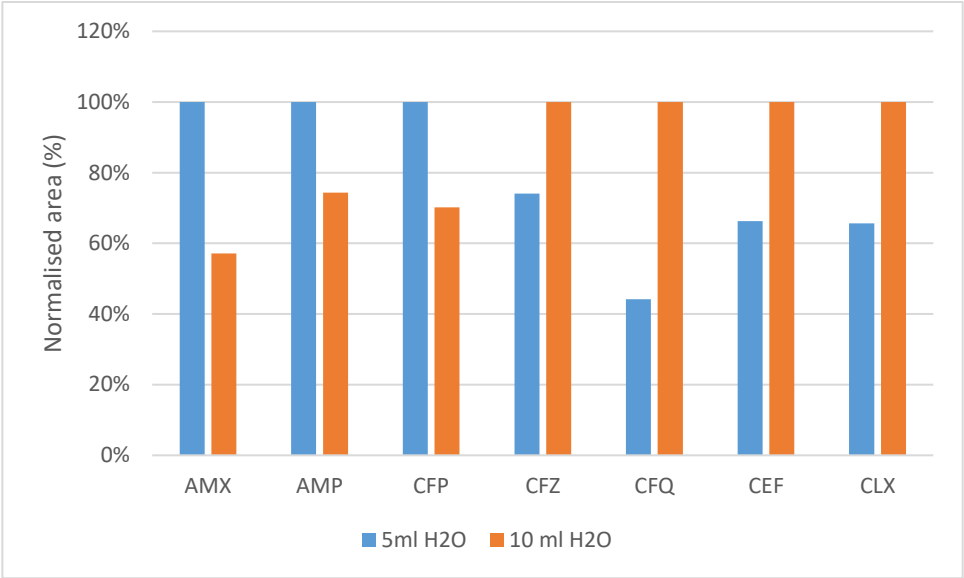
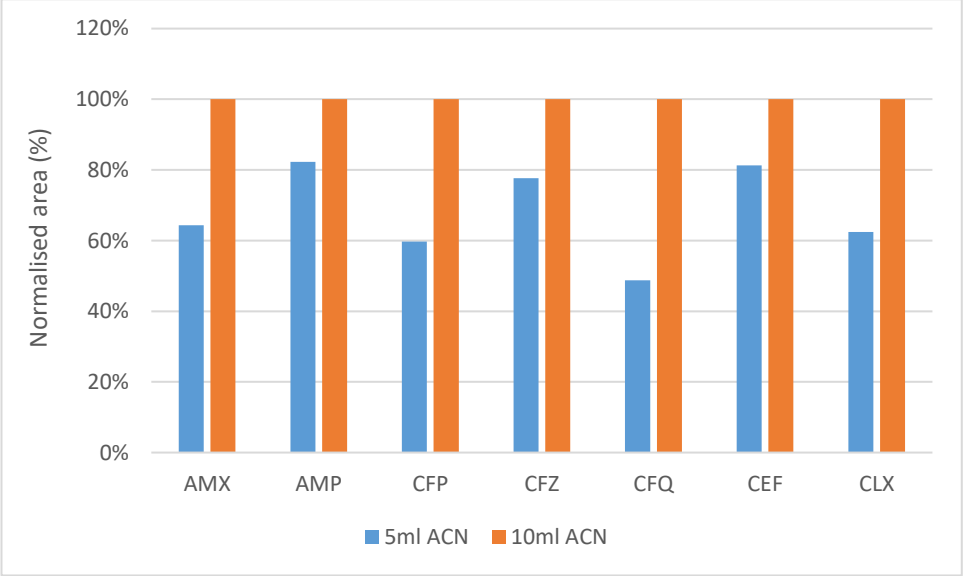


Fig. S3: A) aqueous volume selection and B) acetonitrile volume selection (500 mg sludge, H_2O+0.1M EDTA, normalised areas)



A



B

Table S1: MS/MS optimized parameters for beta-lactams analysis

Name	Corresponding Adducts	MRM Transitions (m/z)	Declustering Potential (Volts)	Collision Energy (Volts)	CXP (Volts)
AMP [a]	$[M+H]^+$	350 → 106	81	31	8
		350 → 160		19	28
AMX [a]	$[M+H]^+$	366 → 349	51	11	54
		366 → 114		23	14
AMX-DKP [c]	$[M+H]^+$	366 → 160	121	21	16
		366 → 207		13	6
CEF [b]	$[M+H]^+$	524 → 241	81	23	8
		524 → 125		75	16
CFP [c]	$[M+H]^+$	424 → 292	71	19	24
		424 → 152		33	10
CFQ [c]	$[M+H]^+$	529 → 134	26	25	10
		529 → 396		15	28
CFZ [b]	$[M+H]^+$	646 → 530	31	17	10
		646 → 143		45	18
CLX [a]	$[M+H]^+$	436 → 277	151	21	12
		436 → 160		19	14
AMP-d5	$[M+H]^+$	355 → 197	147	23	12
CEF-d3	$[M+H]^+$	527 → 244	216	25	12
CFP-d4	$[M+H]^+$	428 → 296	161	21	18

[a] Quantification using AMP-d5; b Quantification using CEF-d3; c Quantification using CFP-d4

Table S2: Physicochemical properties of beta-lactams in this study

Molecule	Formula	MM (g/mol)	pKa 1/2/3	logD (pH5)	logD (pH8)
AMX	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	365.4	3.2/7.2/9.5	-2.4	-3
AMX-DKP	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	365.4	2.7/9.4/11	-1.25	-2
AMP	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	349.4	3.2/7.2/11.9	-2	-2.8
CLX	$C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$	435.9	3.75/13.8	1	-1
CFP	$C_{17}H_{17}N_3O_6S_2$	423.5	3.4/5/11.5	-2.3	-4.5
CEF	$C_{19}H_{17}N_5O_7S_3$	523.6	2.5/3.5/10.7	-1.2	-2.5
CFQ	$C_{23}H_{24}N_6O_5S_2$	528.6	2.7/3.5/10.8	-3.25	-3.25
CFZ	$C_{25}H_{27}N_9O_8S_2$	645.7	3.2/9.5/11.0	-3	-4.5

logD at pH5 and pH8 computed with the ChemAxon LogD Predictor website (https://disco.chemaxon.com/calculators/demo/plugins/logd/)

III. Perspectives

L'ajout d'une étape de dispersion ayant permis une meilleure extraction des bêta-lactames dans les boues de STEP, il est nécessaire de continuer à développer cette méthode en ajoutant d'autres métabolites des bêta-lactames afin de réaliser un meilleur bilan des produits de transformation présents dans les boues.

Il serait également intéressant d'augmenter la portée de cette méthode en l'élargissant à d'autres familles d'antibiotiques afin de valider davantage l'effet de la dispersion sur l'augmentation des rendements d'extraction par la méthode QuEChERS.

L'augmentation de la sensibilité lors de l'acquisition serait également intéressante à mettre en place, en développant des méthodes de purification supplémentaires pour diminuer les effets de matrice ou en employant des méthodes d'analyses plus sensibles telles que la MRM^3 par exemple.

Chapitre 4 :

Apports de la MRM^3 pour la quantification d'antibiotiques dans des matrices complexes : Application à l'analyse des bêta-lactames dans les boues de STEP

I. Introduction

Dans des matrices complexes telles que les boues de station d'épuration, la quantification de composés à l'état de traces ou d'ultra traces peut s'avérer limitée lors de l'analyse par LC-MS/MS, principalement à cause des pertes de sensibilité liées aux effets de matrices. Une alternative envisageable est alors l'emploi de la quantification par LC-MS/MS/MS ou LC-MRM^3. Cette technique peut être employée sur des spectromètres de masse comprenant une trappe à ions linéaire en lieu et place du troisième quadripôle, permettant une étape de fragmentation supplémentaire, avec un gain de sensibilité et de spécificité.

Dans ce chapitre, le développement d'une méthode MRM^3 pour l'analyse des bêta-lactames dans des extraits de boues de stations d'épuration est présenté. L'optimisation des différents paramètres spécifiques à la MRM^3 a été réalisée, puis la méthode validée et ses performances comparées à la méthode LC-MS/MS présentée au chapitre précédent.

Ce développement fait l'objet d'une publication en cours de soumission.

II. Résumé des principaux résultats

Dans cette étude, 5 bêta-lactames (Ampicilline, Amoxicilline, Ceftiofur, Cefapirine, et Cloxacilline) et 3 étalons internes ont été considérés. L'optimisation de la détection en MRM^3 a été effectuée par infusion directe de chaque composé dans le spectromètre de masse. Les performances de la méthode LC-MRM^3 ont été évaluées et comparées à celles précédemment déterminées pour l'acquisition en LC-MRM.

Afin d'optimiser la fragmentation des composés en MRM^3, il est nécessaire de démarrer avec les paramètres MRM précédemment obtenus, puisque l'acquisition MRM^3 réside dans la fragmentation supplémentaire d'ions générés en MRM. Les principaux paramètres à optimiser en MRM^3 sont l'énergie appliquée pour la fragmentation (AF2 en V) ; la durée d'application (Ex. Time en ms) et la durée d'accumulation (LIT Time en ms).

Pour chaque analyte, l'optimisation a été menée de manière séquentielle, paramètre par paramètre. Premièrement, l'optimisation de la seconde fragmentation a été réalisée en augmentant l'énergie de fragmentation pour sélectionner un ion secondaire et le temps d'excitation afin de fragmenter totalement l'ion de première génération en ion secondaire. Pour

obtenir une détermination et une quantification précise, nous avons fait le choix de ne sélectionner et optimiser qu'un seul fragment par composé.

Le temps d'accumulation a ensuite été optimisé pour maximiser le signal de l'ion secondaire. L'intensité du signal augmente jusqu'à atteindre un palier. Le temps de début du palier est alors sélectionné, afin de maintenir le temps de cycle le plus faible possible.

L'emploi d'un temps d'accumulation fixe rend possible l'ajout d'une étape dite de « Q0-trapping » permettant une focalisation des ions formés dans la source avant leur introduction dans l'analyseur. Le meilleur transfert des ions va ainsi augmenter l'intensité des signaux détectés et potentiellement diminuer les limites de quantification. Une fois l'ensemble des paramètres optimisés, la méthode a été validée sur des extraits de boues de STEP afin d'évaluer ses performances. Les limites de quantification obtenues varient entre 0,8 $ng.g^{-1}$ pour le Ceftiofur et 14,7 $ng.g^{-1}$ pour la Cloxacilline. Le gain en sensibilité et en spécificité de la méthode a permis une réduction de moitié des limites de quantification de l'Amoxicilline, du Ceftiofur et de la Cefapirine, par rapport au mode MRM. Celles de l'Ampicilline et de la Cloxacilline sont cependant multipliées par deux, à cause de leurs transitions MRM^3 situées dans la partie basse de la zone de masse scannée, sujette à un bruit de fond plus important.

La répétabilité intra-jour de la méthode a été déterminée à 3 niveaux : 20 $ng.g^{-1}$, 100 $ng.g^{-1}$ et 200 $ng.g^{-1}$. Au niveau le plus bas, la variation maximale observée est celle de la Cloxacilline, à 24%. Aux autres niveaux, les variations intra-jour sont diminuées avec un maximum de 17% et 11%, respectivement. La précision inter-jours a été évaluée sur 5 jours, et les concentrations quantifiées ont été déterminées entre 98% et 113% de la valeur nominale à 20 $ng.g^{-1}$. Concernant les niveaux à 100 $ng.g^{-1}$ et 200 $ng.g^{-1}$, toutes les concentrations ont été déterminées à ±7% et ±2% des concentrations nominales, respectivement. La quantification par LC-MRM^3 est donc hautement précise dans des matrices complexes telles que les boues de station d'épuration.

Article 3: Advantages of MS/MS/MS (MRM^3) vs classic MRM quantification for complex environmental matrices: Analysis of Beta-lactams in WWTP Sludge

Alexandre Guironnet, Laure Wiest, Emmanuelle Vulliet

Univ Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 Rue de la Doua, F-69100, Villeurbanne, France

Corresponding author: emmanuelle.vulliet@isa-lyon.fr

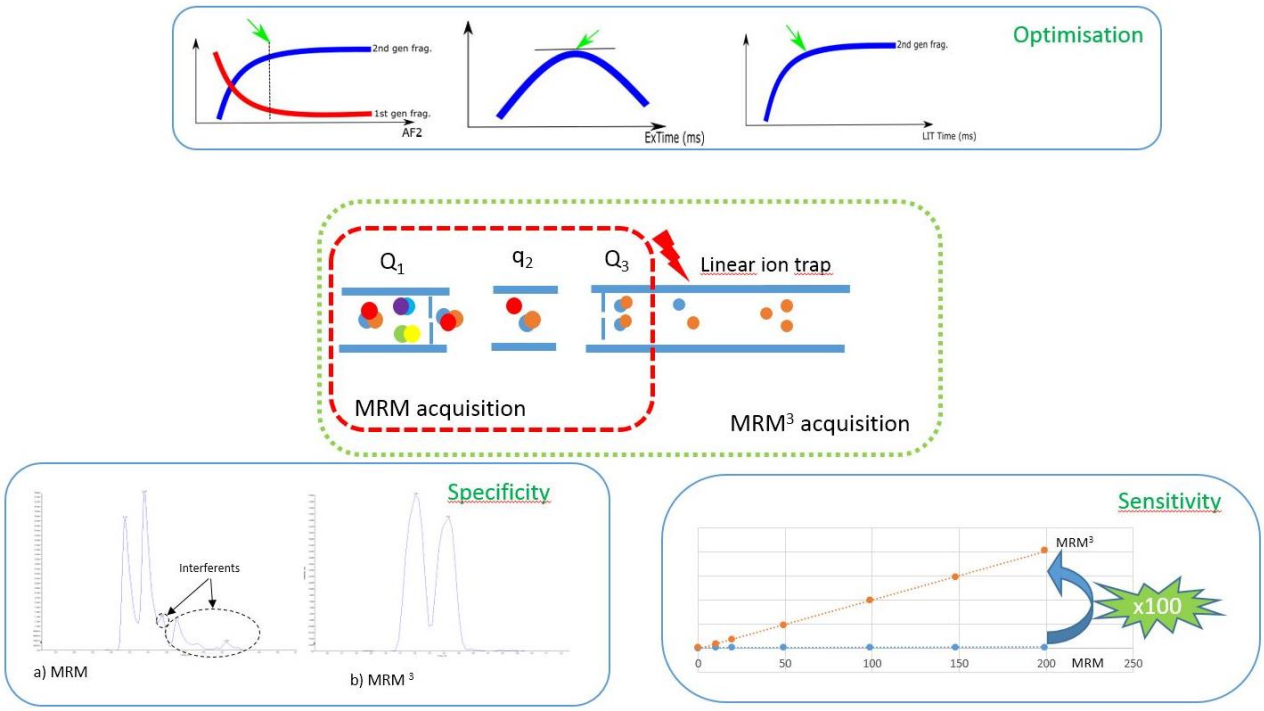
Highlights

- First use of MRM^3 acquisition for the quantification of beta-lactams in sludge
- Step-by-step optimisation of each compound fragmentation
- Comparison with MRM acquisition

Abstract

When dealing with complex matrices such as wastewater treatment plant (WWTP) sludge or animal manure, usual MRM quantification may lack enough sensitivity or accuracy due to the presence of numerous interfering compounds co-extracted from the matrix. To circumvent the sensitivity and specificity loss, the method development can be focus on sample extraction, purification or/and optimisation of the detection. In this study, we propose an optimisation of a method for the analysis of five beta-lactams (Amoxicillin, Ampicillin, Cefapirin, Ceftiofur, and Cloxacillin) in WWTP, with the use of a hybrid Quadrupole-Linear Ion Trap (LIT) spectrometer, enabling triple stage MS acquisition, namely MRM^3, in place of the usual MS/MS detection. The optimisation of various parameters such as the secondary fragmentation energy, excitation, and accumulation times of the secondly generated ion are described. The method was then validated and enabled quantification limits between 0.8 and 14.7 ng.g^{-1} associated with accurate quantification (between 98% and 113%). This method is the first to report the use of MRM^3 acquisition in an environmental matrix as complex as sludge.

Graphical Abstract



Keywords: MS/MS/MS, solid matrix, quantification, antibiotics, environment

1. *Introduction*

For decades, LC-MS/MS with acquisition in Multiple Reaction Monitoring (MRM) has been widely used for the targeted quantification of small exogenous molecules (typically < 600 Da) such as pesticides or antibiotics in all sorts of matrices either biological (urine, blood, plasma…), food related (milk, honey, fruits, and vegetables…) or environmental (wastewaters, sediments…). Through the selection of parent ion, fragmentation and filtering of 1st generation ion, the MRM mode showed a significant reduction of detection interferences, increase in specificity compared to previously used Single Ion Monitoring (SIM) and good linearity associated with low quantification limits most of the time. However, in highly complex matrices such as wastewater sludge, the removal of interfering compounds might not be complete, leading to higher detection and quantification limits. Nowadays, some triple quadrupoles mass spectrometers are equipped with a linear ion trap (LIT) in place of the third quadrupole. This development enables filtering and trapping of ions previously generated in the collision cell.

These ions can then be further fragmented and accumulated in the LIT before detection, enhancing the specificity and sensitivity. With this dual stage fragmentation, this MS-based strategy is called MRM cubed (MRM^3).

MRM^3 has been mainly employed to analyse biological matrices, for proteomic applications. For instance, MRM^3 was employed by Lemoine *et al.* (Fortin et al. 2009; Lemoine et al. 2012; Jaffuel et al. 2013; Jeudy et al. 2014; Simon et al. 2014) for proteins and biomarkers determination and quantification in biofluids. Quantification limits enhancements and highly specific detection of the various analytes were reported to the point that sample preparation may be eased or even removed. Specific detection of pork and horse protein markers (von Bargen et al. 2013; von Bargen, Brockmeyer, et Humpf 2014) was reported, with diminution of the quantification limits by a factor comprised between 2 and 100 compared to MS/MS. Onorato *et al.* (2008) used MRM^3 for quantification of a glycemic biomarker in patient urine and reported accurate measurement of the marker within 8% of the theoretical value. Some methods using MRM^3 determination were also described for quantification of small molecules in plasma (Shi et al. 2011; Mičová et al. 2012; Szeitz et al. 2014; Wright et al. 2015; Campbell et al. 2018; Ren et al. 2019) or in foodstuff for which this mode was used for allergens quantification ((Korte et al. 2016; Korte et Brockmeyer 2016; Lv et al. 2020).

Considering environmental matrices, the use of MRM^3 is rare. Sordet *et al.* developed the MRM^3 acquisition for determination of X-ray contrast agents in wastewaters (2018) or different emerging micropollutants in a crustacean (2016). In this last study, the gain in sensitivity allowed them to detect both inter-samples variations and small uptake variations across consecutive days in the micro invertebrate. Finally, in another study related to an environmental species, Smith *et al.* (2009) used an ion-trap mass spectrometer for the determination of 6 drugs in fish species with MRM^3, to improve the specificity as the major MRM transition corresponded to a water loss.

To the best of our knowledge, MRM^3 has never been considered before for traces analysis in wastewater sludge, or similar highly complex matrices. Sludges have high content of organic matter and contain numerous exogenous contaminants; the analysis of traces represents a real challenge. In the current study, we developed an LC-MRM^3 method for the quantification of five beta-lactams (Amoxicillin, Ampicillin, Cefapirin, Ceftiofur, and Cloxacillin) extracted from wastewater treatment plant sludge. Beta-lactams are antibiotics widely used in the management and treatment of bacterial infections. They are known to be easily degraded in the

environment resulting in the need of quantification at trace level. The aim of this work was to optimise MRM^3 acquisition to enable sensitive and accurate quantification of the beta-lactams selected in a complex matrix such as WWTP sludge and to compare performances in MRM and MRM^3.

2. *Experimental*

2.1. *Chemicals*

Ampicillin (AMP) trihydrate, Amoxicillin (AMX) trihydrate, and Cloxacillin (CLX) were bought from TCI Europe (Zwijndrecht, Belgium). Ceftiofur (CEF) and Cefapirin (CFP) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). CEF-d3, AMP-d5 and CFP-d4 were bought from TRC (Toronto, Canada). All standards purities were superior to 97%. The structure of each beta-lactam is reported in Fig.S1. Solutions (1 mg.mL^{-1}) of each beta-lactam were prepared by dissolving about 10 mg powder, accurately weighted in 10 mL of acetonitrile (ACN) in glass Wheaton and were stored at -18°C for 3 months. Each standard purity was taken in account for accurate concentration determination. Quantification solutions of each analyte (500 ng.mL^{-1}) were prepared by diluting each stock solutions in water/ACN (1/1, v/v). Water (LC-MS grade) was obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France), ACN (LC-MS grade) from Honeywell (Seelze, Germany) and formic acid (UPLC-MS grade) from Biosolve (Dieuze, France).

2.2. *Sample collection and preparation*

The sample collection and preparation were described in detail by Guironnet *et al.* (2021). Briefly, 500 mg of freeze-dried sludge was mixed with 2 g of EDTA-treated sand before dispersive-QuEChERS extraction was performed using the citrate buffer with 5 mL of 0.1 M EDTA and 10 mL of ACN. Additional SPE pass-through clean-up completed the sample preparation.

2.3. *LC-MS/MS/MS method*

The system used was an Agilent (Massy, France) 1290 Infinity Series equipped with a quaternary pump. The column was a Kinetex F5, 100×2.1mm, 1.7 µm from Phenomenex (Le Pecq, France). Optimized chromatographic conditions were as followed: a binary mobile phase was used with a flowrate set to 300 µL.min^{-1} for a run time of 13 min, with the column maintained at 50°C. Mobile phase A was an aqueous solution of 0.1% formic acid, and B was ACN with 0.1% formic acid. The separation was performed with the following gradient: 0 min: 3% B; 10-12 min: 100% B; 12-13 min: 3% B. An equilibration time of 3 min was realised before each injection, leading to a total run time of 16 min. The sample injection volume was 40 µL.

A 5500 QTrap from Sciex® (Les Ulis, France) was used in MS/MS/MS (MRM^3) mode with positive electrospray ionization. Source parameters are detailed in Table S1. MS/MS/MS detection was optimized by infusion of individual standard solutions at 100 ng.mL^{-1} in 50/50 H_2O/ACN with 0.1% formic acid, via syringe pump at a flow of 10 µL.min^{-1} and are presented in Table S2. Three key parameters needed to be optimised: the fragmentation energy used to generate the second-generation ion (AF2), the duration on which this energy is applied (excitation time) and the accumulation time of the previously generated ion (LIT time). Each parameter was optimised sequentially and manually. The final acquisition in MRM^3 mode was divided in four periods: from 0 to 2.5 min for AMX; between 2.5 min and 4.25 min for AMP, CFP, and their associated deuterated internal standards; from 4.25 to 6 min for CEF and CEF-d3; and after 6 min for CLX.

2.4. *Method validation*

All the parameters selected for method validation described in this part were determined and monitored in accordance with both the AOAC (AOAC International 2016) and the ICH (European Medicine Agency 2006) guidelines for environmental validation. The validation procedure was realised on five days. Limits of quantification (LOQ) for each of the selected analytes were determined by extracting a matrix-blank each day and injecting it ten times. Signal intensities of each blank were recorded and the associated average with standard deviation computed. The intensity corresponding to the LOQ was determined to be the sum of average blank intensity and ten times the standard deviation measured. The method linearity

for each molecule was determined by injection of six matrix-matched mixtures from 10 ng.g^{-1} to 200 ng.g^{-1}. Calibration curves and samples were spiked with a mixture of internal standards (IS) at 100 ng.g^{-1}. Internal calibration was done using the relation between A_{STD}/A_{IS} and C_{STD}/C_{IS}, with A_{STD} being the area of the standard, A_{IS} the area of the IS, C_{STD} and C_{IS} being the concentration of the standard and of the IS respectively. Intraday repeatability was based on 4 replicates; intermediate precision was evaluated on five days. Each day, a matrix-matched calibration curve was freshly extracted and injected, followed by three samples spiked at three concentration levels, namely 20 ng.g^{-1} (LOW), 100 ng.g^{-1} (MID) and 200 ng.g^{-1} (HIGH) also freshly extracted. For each analyte and each level, the concentration was computed with the calibration curve and the accuracy calculated with the mean of the replicates versus the nominal concentration. Intraday repeatability was determined for each level by calculating the relative standard deviation (RSD) of replicates and interday precision was determined by calculating the RSD on five days measurements.

3. *Results and discussion*

3.1. *Optimisation of MRM^3 parameters*

All discussions in this section use CEF as an example. Similar process was realised for all other molecules and their internal standard. The results of the optimisations are summarized in Table S2.

Firstly, each compound was infused at 100 ng.mL^{-1} in 50:50 water:ACN. As MRM^3 is the fragmentation of a 1st generation fragment ion, the first step consists in the optimisation of the MRM parameters, which was described in Guironnet *et al.* (2021). In case of CEF, the optimised MRM transition was *m/z*=524 (P) to *m/z*=241 (F). From this (F) ion, the parameters AF2 energy, excitation time, LIT time and Q0 trapping were sequentially optimised.

3.1.1. *AF2 energy*

The AF2 value describes the tension applied in the linear trap to fragment the ion generated by the MRM optimised method. When no tension was applied, no fragmentation was observed. Increasing fragmentation energy revealed three predominant second-generation ions F': *m/z*=166 (Frag1); *m/z*=197 (Frag2) and *m/z*=209 (Frag3), as seen in Figure 2.

With only 0.05 V applied, the (F) ion quantity was reduced to 28% of the overall ion presence, while Frag2 was major at 47% of the total (Figure 1). When increasing the voltage to 0.1 V, it was noted that the (F) ion was fully converted to Frag 1/2/3, with the ratio 50/37/13, switching the major ion to Frag1. Increase beyond 0.1V revealed slight increase of Frag1, between 1% and 3% for each 0.05 V added. Frag2 was decreased with the same rate, suggesting a conversion from Frag2 to Frag1 rather than an increase in the transformation from (F) to Frag1. Frag3 was rather stable representing in average 12% of the fragmentation products. The detailed evolution of the relative ratio of the fragments is presented in Figure 1 and potential chemical structures are proposed in Figure 2. To obtain accurate determination and no quantification overlap with the competing fragmentation reactions, the choice to follow and quantify only one fragment was made. Here, for the fragmentation of CEF, Frag1 was selected and optimised, with a fragmentation energy of 0.1 V.

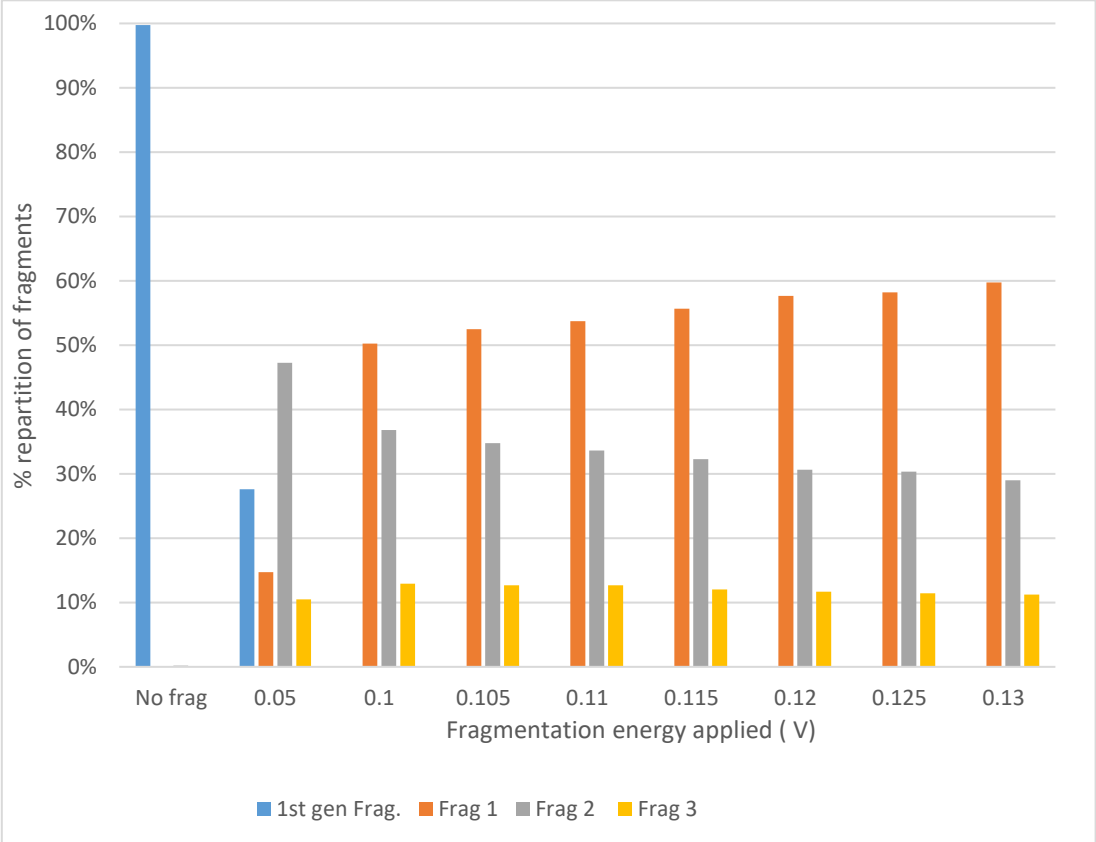


Figure 1 : Repartition of the second-generation fragments with the modification of the applied AF2 energy (25 ms frag, dynamic LIT time, no Q0)

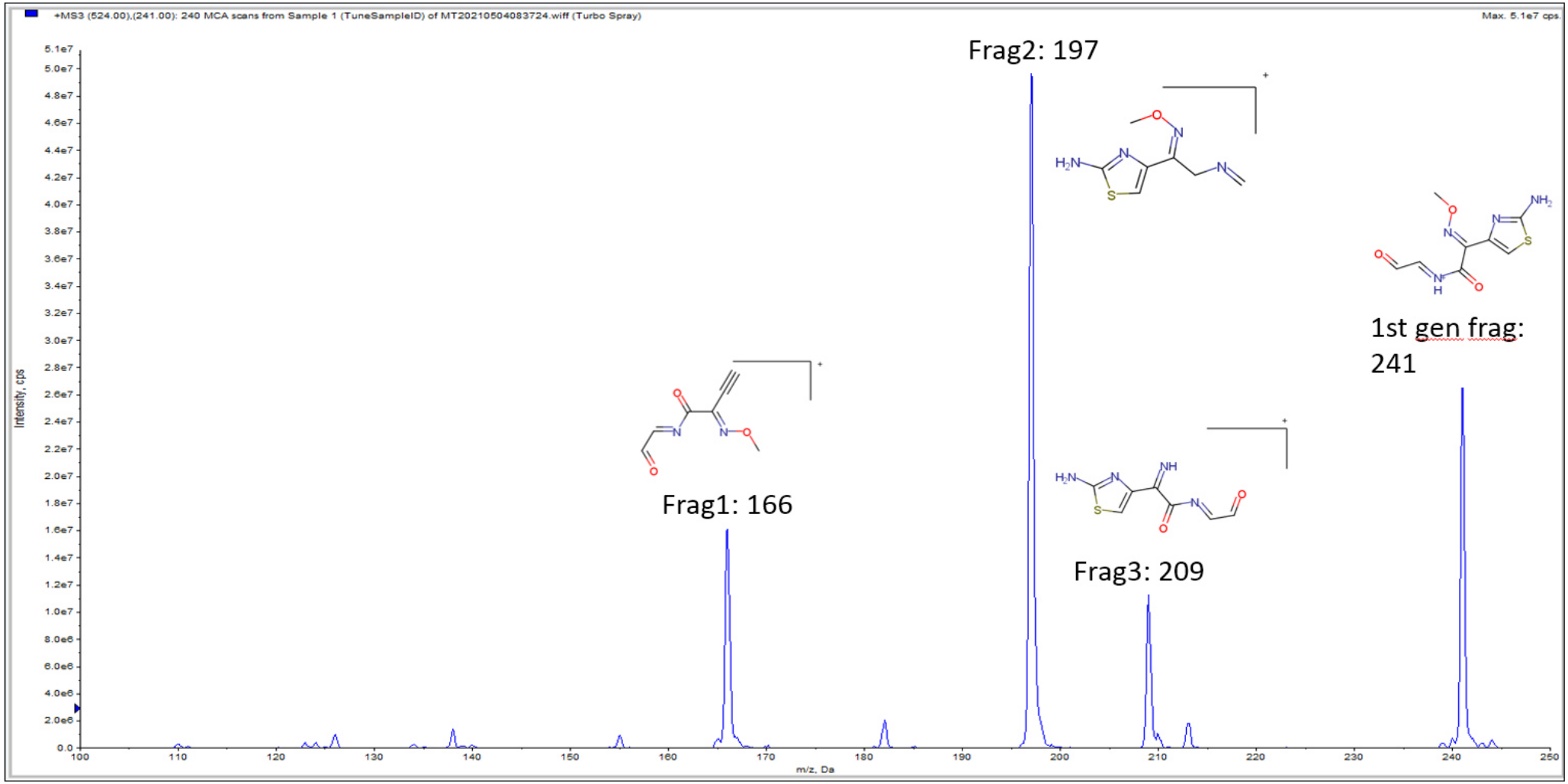


Figure 2 : CEF fragmentation pattern in MRM³ acquisition, Structure proposals from Metfrag (https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/)

3.1.2. *Excitation time*

After the selection of the fragmentation energy applied, the next parameter to be optimised is the application duration (in millisecond). With AF2 energy only applied for 1 ms, no fragmentation was noted (Figure 3). When fragmentation was applied for 5 ms, about a third of the 1st generation fragment was further fragmented to Frag1. Increasing the application length further to 10 ms, Frag1 ion became the major ion detected, with 98% of the overall total. With excitation of 25 ms or 50 ms, 1st generation fragment was fully fragmented to *m/z*=166. While both presented the same full fragmentation pattern, 25 ms of fragmentation was selected in order to maintain the cycle time as low as possible.

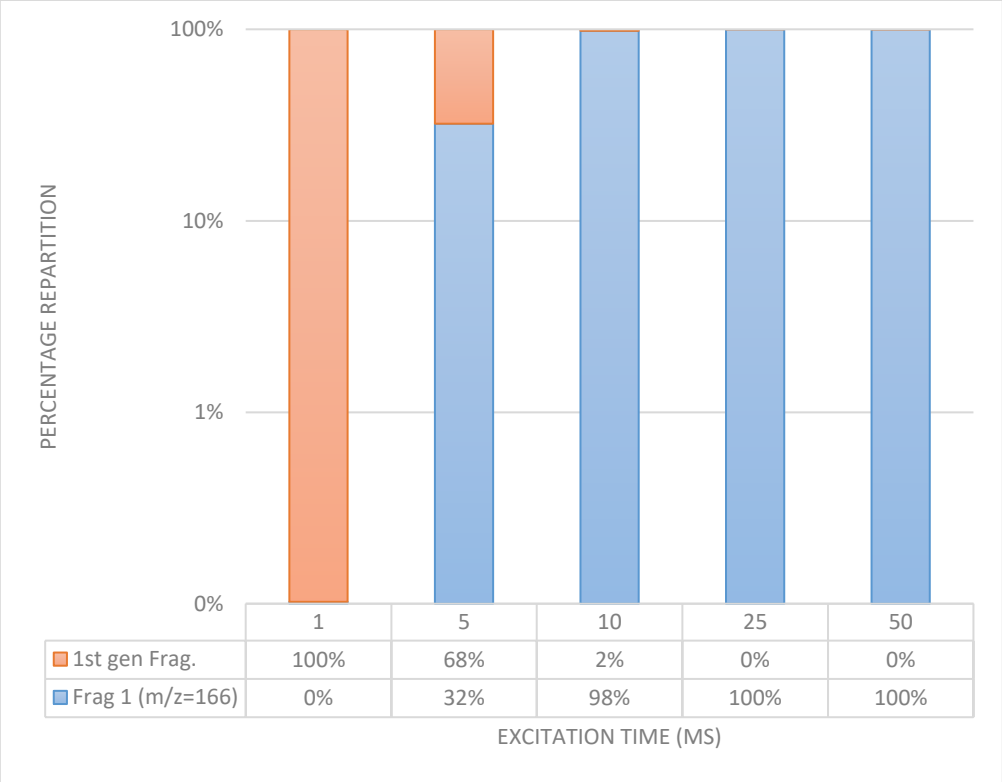


Figure 3: Repartition between 1st generation and 2nd generation fragments in function of the excitation time (AF2=0.1V, Dynamic LIT time)

3.1.3. *LIT time*

For increasing the sensitivity, accumulation of the newly formed 2nd generation fragment is enabled in the linear trap. Two modes are available for accumulation: dynamic or fixed. When dynamic LIT time is employed, accumulation time depends on the ion flux entering in the linear trap. While dynamic accumulation seems to be attractive, the cycle time will shift from one

analysis to another depending on the analyte concentration in the extract. The overall reproducibility and accuracy would then be reduced. To ensure the same cycle time throughout the analyses, a fixed LIT time is recommended in MRM³. With the 5500 QTrap, the LIT time can vary from 1 ms to 250 ms. When infusing CEF with increasing LIT time, an increase of Frag1 signal intensity is noted up to a threshold, as illustrated in Figure 4. For instance, when increasing the LIT time from 1 to 5 ms, the intensity of Frag1 was massively increased by almost 300%. Further increase to 10 ms then to 25 ms resulted in an increase of about 68% each time. With each LIT time increase up to 100 ms, the signal intensity was improved by a factor between 10 and 70%. Increase of the fill time beyond 100 ms reported only increases below 5% with each step, whereas the accumulation duration was effectively increased by a factor between 25% and 50%.

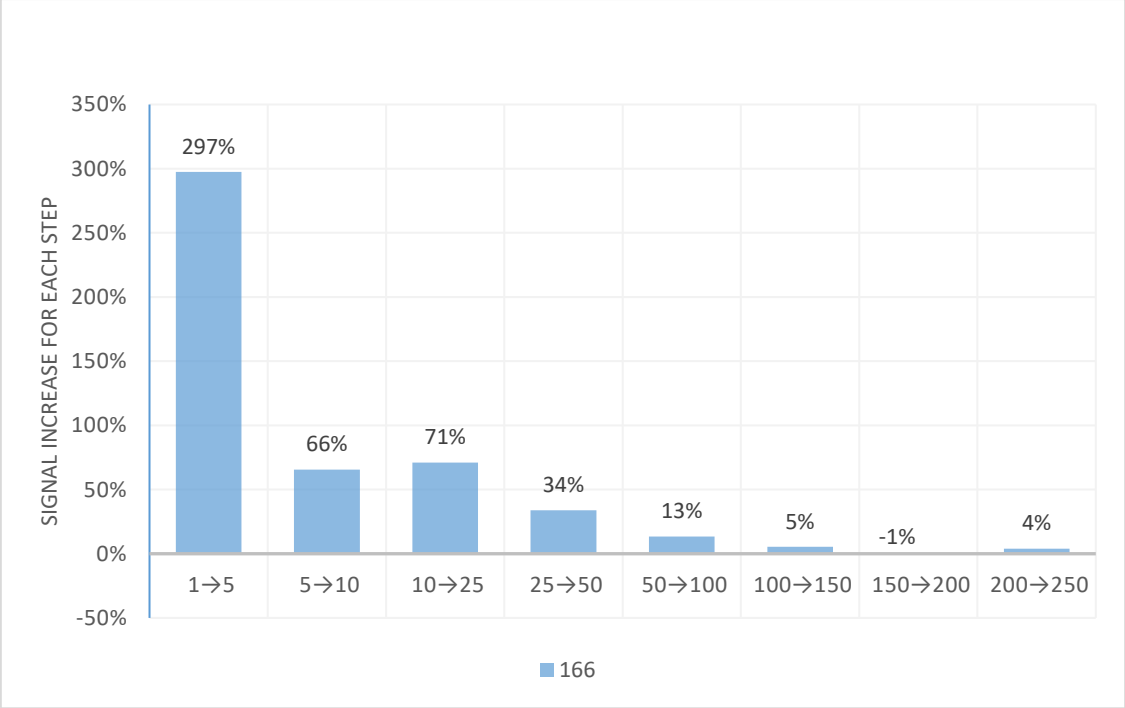


Figure 4: Signal increase noted for the second-generation fragment with the accumulation time increase (AF2=0.1V, 25 ms excitation time)

Albeit a signal improvement was noted when increasing the LIT time, the total cycle time also increased, thus reducing the number of points per chromatographic peak. It is now commonly accepted that good peaks should include between 15 and 25 points. A compromise between signal improvement and loss of peak points then needs to be achieved. For CEF, the optimised LIT time was 100 ms. In previous studies, Sordet *et al.* (2016, 2018) and Jaffuel *et al.* (2013) presented the LIT time as a non-compound related parameter to be fixed identical for all

compounds. In our study, we optimized the LIT time for each compound, and we noted that the optimum value was different, ranging from 100 to 250 ms (Table S2). Using fixed LIT time also enables the activation of the Q0 trapping parameter to further enhance the detection.

3.1.4. *Q0 trapping*

Q0 trapping enables further ion focalisation in the ion guide preceding the first quadrupole. By adding a focalisation layer, the ion transfer from the source to the analyser is magnified, thus tending to lower quantification limit. For CEF, adding the focalisation step resulted in a 10% signal gain in infusion. The enhancement of each compound after the Q0 trapping is demonstrated in Figure 5, from 10% for CEF up to 185% increase for CFP.

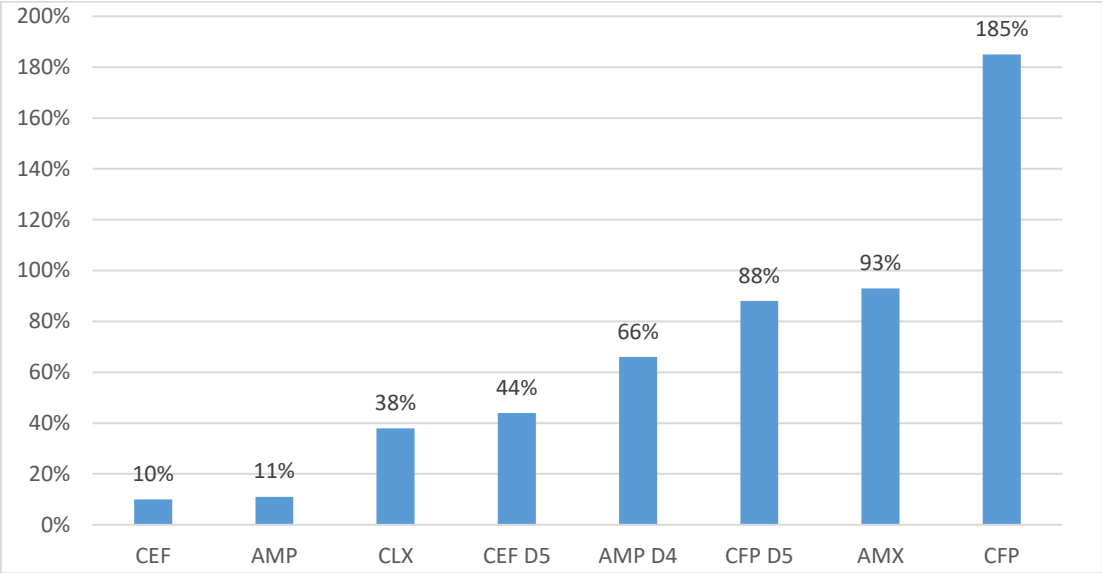


Figure 5: Enhancement with Q0 trapping enabled

3.1.5. *Overall enhancement*

When comparing the signal obtained right after the AF2 fragmentation with the optimised signal, major enhancement factors were observed. Regarding CEF, the intensity was multiplied by 36. For the other molecules optimised in this study and presented in Table 1, the lowest enhancement was for AMX with a factor of 4 and the highest was for CFP with a factor of 255.

Table 1 : Overall optimisation gains in MRM^{3}infusion acquisition

Analyte	Non-optimised MRM^3 infusion intensity (cps)	Final intensity (cps) with optimised MRM3 parameters	Overall optimisation factor
AMP	2.18E+08	1.00E+10	46
CEF	2.41E+08	8.73E+09	36
AMX	7.50E+08	2.90E+09	4
CFP	3.80E+06	9.70E+08	255
CLX	1.40E+07	1.80E+09	129

3.2.*Validation*

Validation was realised on 5 consecutive days on spiked sludge extracts. The results are compiled in Table 2.

3.2.1. *Quantification limits*

Validation of an analytical method based on MRM^3 acquisition can be complex, especially for quantification limits determination. As the second fragmentation adds specificity to the determination, background noise levels are significantly dropped. The assessment of the limits of quantification based on the determination of the concentration corresponding to a signal-to-noise ratio of 10 cannot be performed accurately. Limits of quantification were so determined based on the standard deviation and the averaged intensity of blank sample extracts. With this method, quantification limits were determined to be between 0.8 ng.g^{-1} for CEF and 14.7 ng.g^{-1} for CLX. For AMX and CLX, the quantification limits were higher than 10 ng.g^{-1} due to the low overall response factor in MS of those two analytes, an effect already noted in the MRM mode. In the presented method, we decided to perform the MRM^3 acquisition with only one second generation ion. To potentially further reduce the achievable quantification limits and detect compounds in (ultra-)traces amounts, it may be useful to cumulate different secondary generation ions to reconstruct the MRM^3 chromatogram. For instance, the CEF MRM fragment

has generated three distinct ions at *m/z*=166, *m/z*=197 and *m/z*=209. We only acquired the signal of *m/z*=166, and addition of the others intensity may result in an increase of signal/noise ratio and then a decrease of the quantification limits. However, multiple simultaneous transitions acquisition would also result in a cycle time increase, lowering the number of points of each peak. Different combinations then need to be tested to achieve an optimum.

3.2.2. ***Intraday and intermediate precision***

Intraday repeatability was evaluated at three levels: 20 ng.g^{-1}; 100 ng.g^{-1} and 200 ng.g^{-1}. At the lowest level, the maximum %RSD observed was for CLX with 24%. At the two other levels, intraday variations diminished to a maximum of 17% and 11%, respectively. For interday precision, quantification was realised between 98% and 113% for the 20 ng.g^{-1} level, with the maximum quantification error for AMX. For mid-level and high-level, quantification accuracy is further reduced to ±7% and ±2% for all molecules. Quantification with MRM^3 mode is therefore highly accurate in complex matrices such as wastewater sludge.

Table 2: Method validation results in LC-MRM^3 mode: linearity, LOQs, and precision at 3 different concentrations (a: intraday n=4; b: interday n=5 days

	Retention time (min) (%RSD^b)	**LOQ (ng.g^{-1})**		**Linearity**		**20 ng.g^{-1}**		**100 ng.g^{-1}**		**200 ng.g^{-1}**	
		MRM^3	MRM	**Range (ng.g^{-1})**	**R^2**	**Mean (%RSD)^a**	**Accuracy (%RSD)^b**	**Mean (%RSD)^a**	**Accuracy (%RSD)^b**	**Mean (%RSD)^a**	**Accuracy (%RSD)^b**
AMP	3.4 (1.1)	5.9	2.4	10-200	0.994	19.1 (15)	98 (15)	90.1 (17)	108 (12)	190.3 (6)	101 (6)
CEF	5.0 (1.0)	0.8	1.9	10-200	0.998	21.4 (11)	104 (12)	93.6 (3)	9+9 (8)	194.9 (1)	100 (1)
AMX	2.0 (3.1)	11.9	17.4	10-200	0.990	20.6 (17)	113 (13)	94.5 (10)	104 (12)	199.3 (11)	99 (10)
CFP	3.0 (1.3)	3.8	8.7	10-200	0.992	24.5 (17)	103 (10)	93.6 (4)	97 (9)	195.6 (10)	102 (4)
CLX	6.5 (0.8)	14.8	7.7	10-200	0.985	18.2 (25)	104 (6)	88.7 (10)	102 (11)	181.5 (7)	99 (5)

3.3. *Comparison with MRM*

As shown in section 3.1, the use of MRM^3 highly increased the signal compared to the widely used MRM. This signal increase resulted in both sensitivity and specificity enhancement, thus allowing the lowering of the quantification limits.

3.3.1. *Sensitivity*

As shown in section 3.1.3, significant increase in signal during infusion was observed. Gains were also compared after coupling with liquid chromatography (chromatograms in Figure S2). At a minimum, the signal for AMP was increased by a factor 12, whereas the signal of CEF was multiplied by 123 (Table 3) when the compounds were in solvent. Regarding matrix extracts, gains were also noted but were lower than in solvent. For instance, in CEF calibration curves (Figure 6), the slope of the MRM^3 calibration was multiplied by an average factor of 95 compared to MRM slope. This may be explained by the matrix input, from which the extracted interferents create negative matrix effects reducing the positive effect obtained with the MRM^3 optimisation. Lower overall gains were observed for the subgroup of penicillins (AMP, AMX and CLX), maybe due to the m/z of 114 of the final fragment, which is at the low end of the mass range. It is also worth noticing that both in MRM and MRM^3, they exhibit a lower response factor. These lower factors may also be explained by their lower structural stability, the 4 atoms ring being better stabilized in cephalosporins with the associated six atoms ring and a double bond, whereas, in penicillins, it is only stabilized with a 5 atoms ring.

Table 3 : Sensitivity gain (computed with slopes ratio between MRM^3 and MRM) in LC-MRM^3 mode for both solvent and sludge extract

Analyte	Signal intensity gain in solvent	Signal intensity gain in sludge extract
AMX	29	6
AMP	12	6
CEF	123	95
CFP	79	63
CLX	52	3

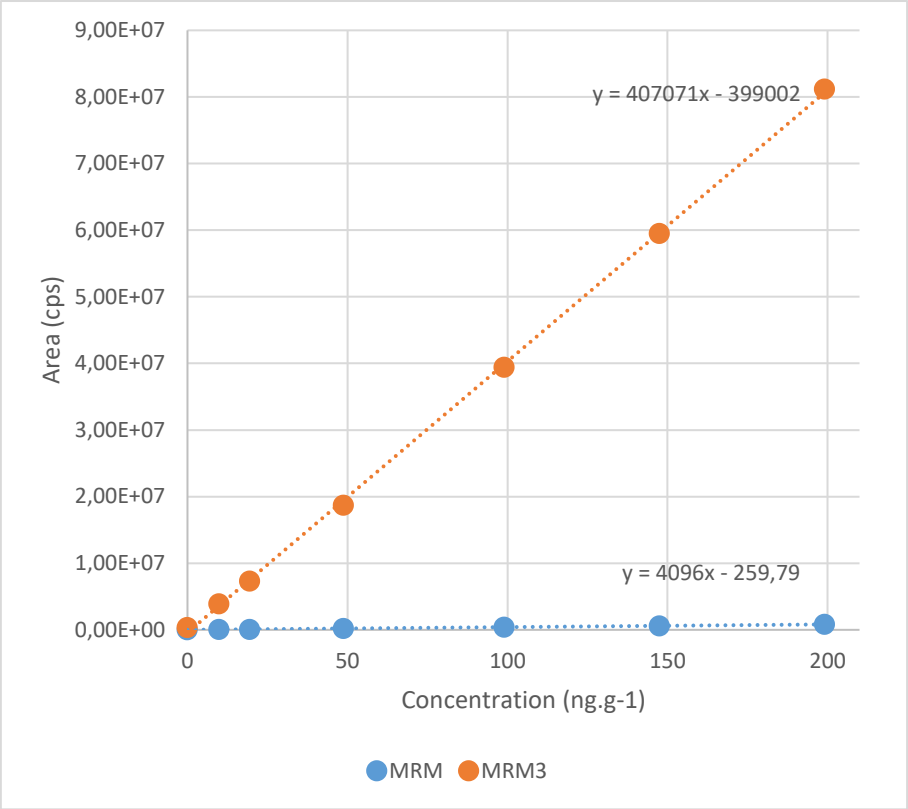


Figure 6: Comparison of MRM and MRM³ calibration curves of Ceftiofur in sludge extracts

To conclude, even if the gain in intensity is limited in matrix, the increase in slope allows better detection of concentration variations in-between samples. Ultimately, better quantification accuracy will then be achieved.

3.3.2. ***Specificity***

With the addition of a second fragmentation, the specificity of the detection is enhanced in MRM³ acquisition. Extracted matrix interferents that co-eluted with the analytes increased the noise in the MRM acquisition, as shown with the signal of the internal standard for ampicillin in Figure 7a. In this chromatogram, we can observe a shoulder at the end of the peak, and small peaks eluting right after the internal standard. In MRM³ (Figure 7b), the removal of both the shoulder and a lowering of the noise after the eluting compound were observed. The noise diminution may also be partially explained with the signal increase brought by the MRM³ acquisition. The use of MRM³ can bring better quantification accuracy by being more specific compared to MRM.

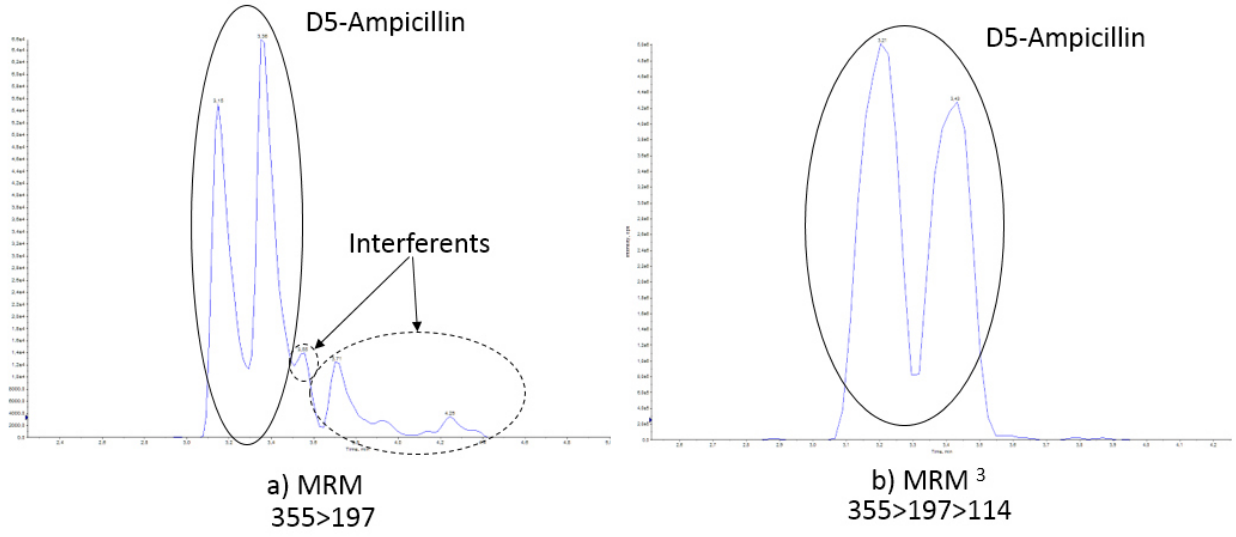


Figure 7 : Extracted chromatogram of D5-Ampicillin in sludge extract: a) MRM transition, b) MRM^3 transition

3.3.3. ***LOQ enhancement***

Combining sensitivity and specificity enhancements led to lowering the quantification limits achievable in WWTP sludge. When comparing the reached quantification limits between MRM and MRM^3 acquisition, two tendencies emerged. For AMX, CEF and CFP, the quantification limits were reduced by a factor of 2. In this case, the use of optimised MRM^3 method led to a sufficient increase of signal and lowering of the noise to allow a gain to detect smaller analytes concentrations. In contrast, LOQ of AMP and CLX were increased by a factor 2. It is worth noting that both their second-generation transitions are the same, following the fragmentation of the ion *m/z*=160 to *m/z*=114, whose hypothetical structures are presented in Figure S3 (Fragmentation of CPF and CEF are reported in Figure S4 and S5). This transition was the one with the smallest mass difference of 46 Da. This additional loss of sensitivity and higher limits of quantification can be explained by an increase of the background noise of these transitions, due to relatively low fragment ion masses (less than 200 Da) and a neutral loss of only 46. This phenomenon may be further heightened by the accumulation time in the trap.

4. *Conclusions*

Our study was oriented towards the analysis in WWTP sludge of beta-lactams, widely used antibiotics known to be easily degraded in environmental samples and thus requiring highly selective and sensitive analysis. We developed a step-by-step optimisation method to evaluate the enhancement brought by the MRM^3, compared to the classical MRM. We showed a gain in sensitivity for all the analytes, with higher slopes of each calibration curve, allowing better detection of concentration variations in-between samples. The use of MRM^3 also enabled better detection specificity with the removal of interfering matrix compounds.

During the optimisation, we noted different behaviours depending on the analyte. Penicillins showed lower enhancements than cephalosporins, with lower MS-response factors. This optimisation led to attain quantification limits between 0.8 ng.g^{-1} and 14.7 ng.g^{-1}, which were, for most of them, below the quantification limits achieved by the LC-MRM method previously developed. For AMP and CLX, higher LOQs were achieved in MRM^3, due to their fragmentation pattern located in the low mass range, revealing the need for specific optimisation to really lower the LOQs achievable. At the 3 different validation levels, quantification was accurately realised within 10% of the nominal value for the lowest level and up to 1% variation at the highest. The method developed therefore proved to be robust and enough sensitive to attain LOQ in accordance with environmental quantification. To the best of our knowledge, this is the first method to apply MRM^3 quantification of small molecules in a complex environmental solid matrix. MRM^3 would then be useful to quantify small molecules at low concentration in environmental matrices.

Acknowledgment

The authors thank the French Biodiversity Office (OFB) and the French RMC Water Agency for funding this study as part of the RISMEAU project (scientific partners: ISA, INRA, INSA, INSERM and ENTPE).

Supplementary Materials: Advantages of MS/MS/MS (MRM^3) vs classic MRM quantification for complex environmental matrices: Analysis of Beta-lactams in WWTP Sludge

Table S1: Source parameters for beta-lactams analysis

Source parameter	Parameter value
Curtain Gas	30 psi
Ionization Tension	5500 V
Temperature	600 °C
Nebulisation Gas	40 psi
Turbo Gas	60 psi
Entrance Potential	10 V

Table S2: MRM and MRM3 transitions with the optimised parameters

Molecule	MRM				MRM^3				
	Transition P→F (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)	F' (m/z)	AF2 (V)	Excitation time (ms)	LIT Time (ms)	Q0 trapping
AMX	366→349	51	11	54	114	0.11	25	100	Yes
AMP	350→160	81	19	28	114	0.10	10	100	Yes
CEF	524→241	81	23	8	166	0.10	25	100	Yes
CFP	424→292	71	21	24	152	0.11	10	200	Yes
CLX	436→160	151	19	14	114	0.10	10	200	Yes
AMP-d5	355→197	147	23	12	114	0.11	10	200	Yes
CEF-d3	527→244	216	25	12	166	0.11	25	250	Yes
CFP-d4	428→296	161	21	18	156	0.10	25	250	Yes

Figure S1: Structures of the targeted analytes

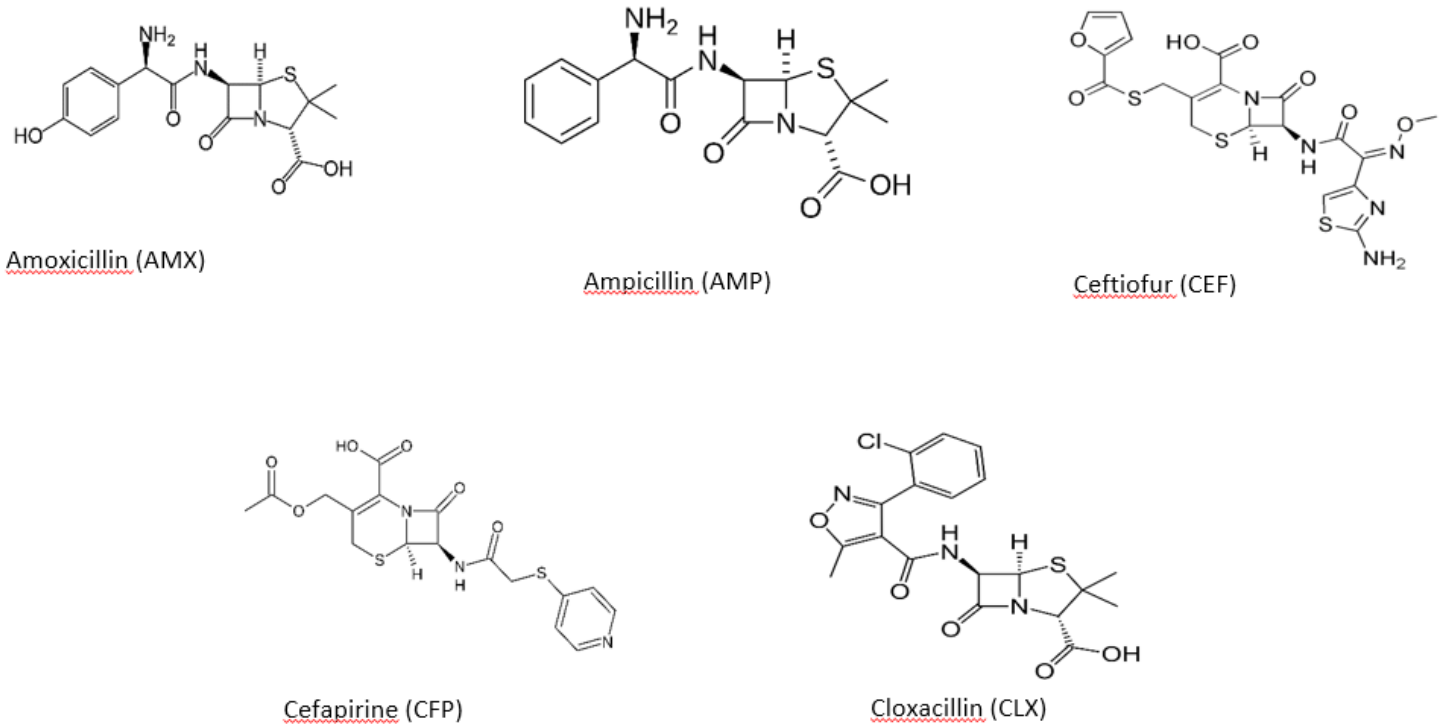


Figure S2a.: MRM extracted chromatogram of beta-lactams in sludge extract spiked at 200 ng.g^{-1}

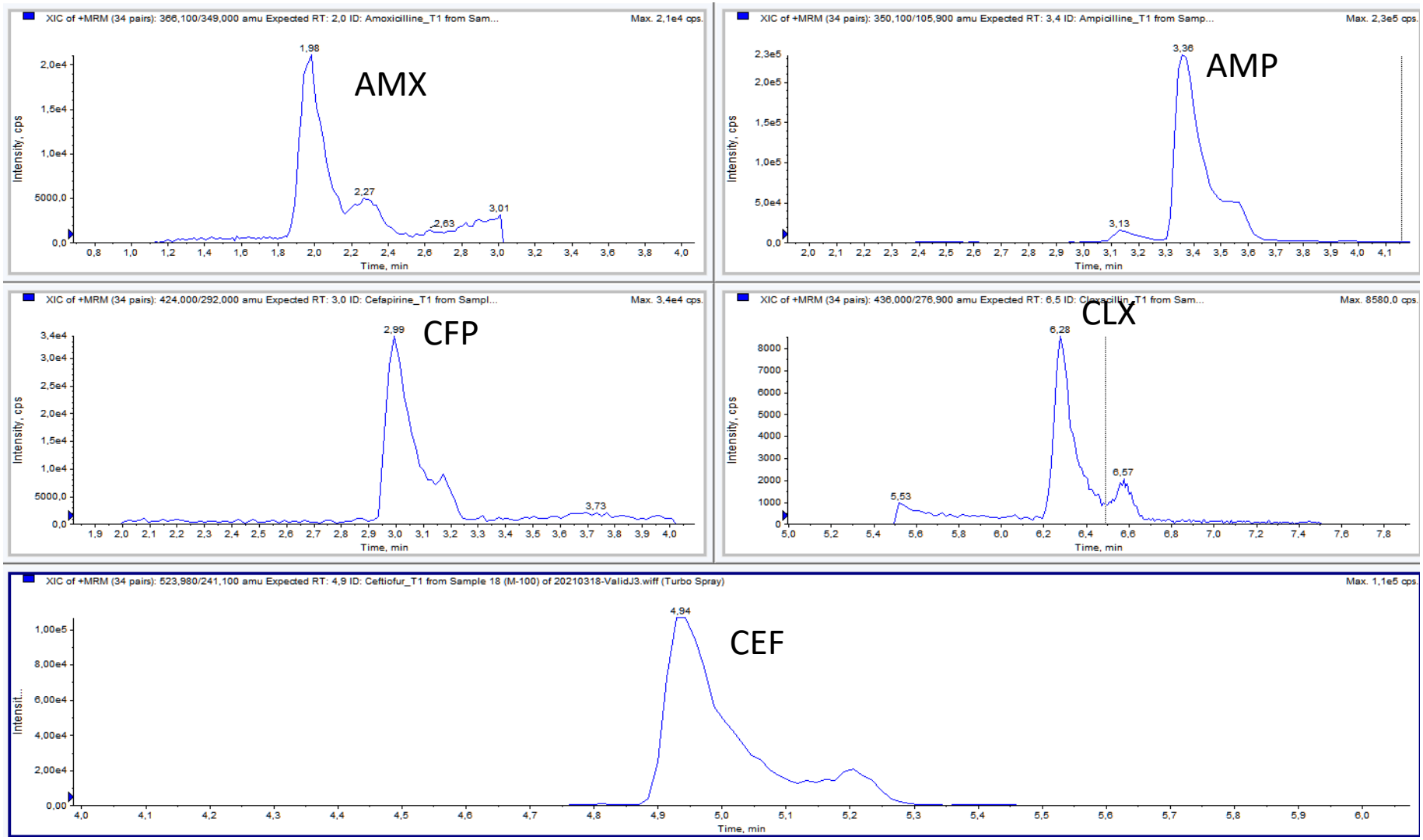


Figure S2b.: MRM³ extracted chromatogram of beta-lactams in sludge extract spiked at 200 ng.g^{-1}

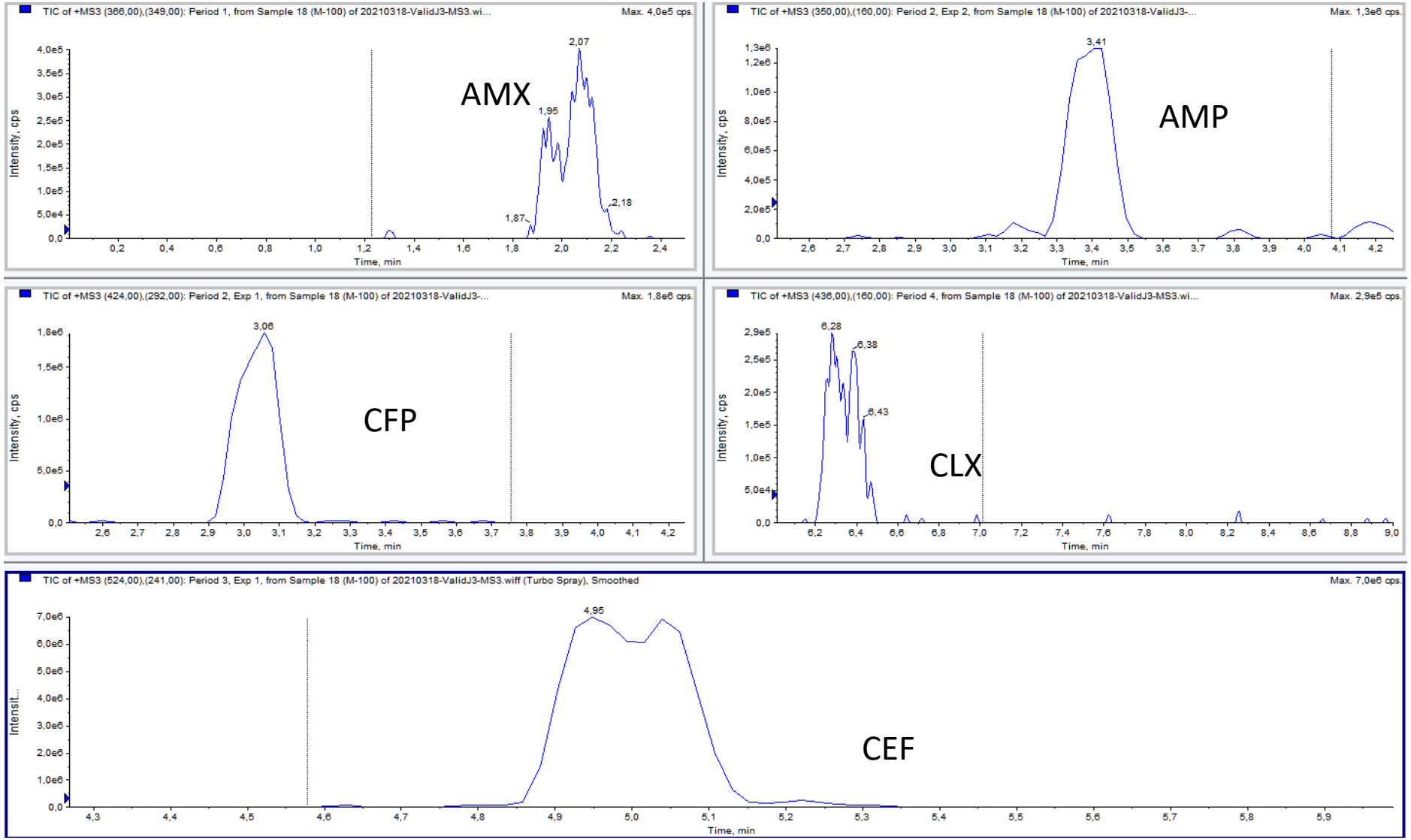


Figure S3: MRM^3 Fragmentation of AMP and CLOX (based on Zhang *et al.*, 2014)

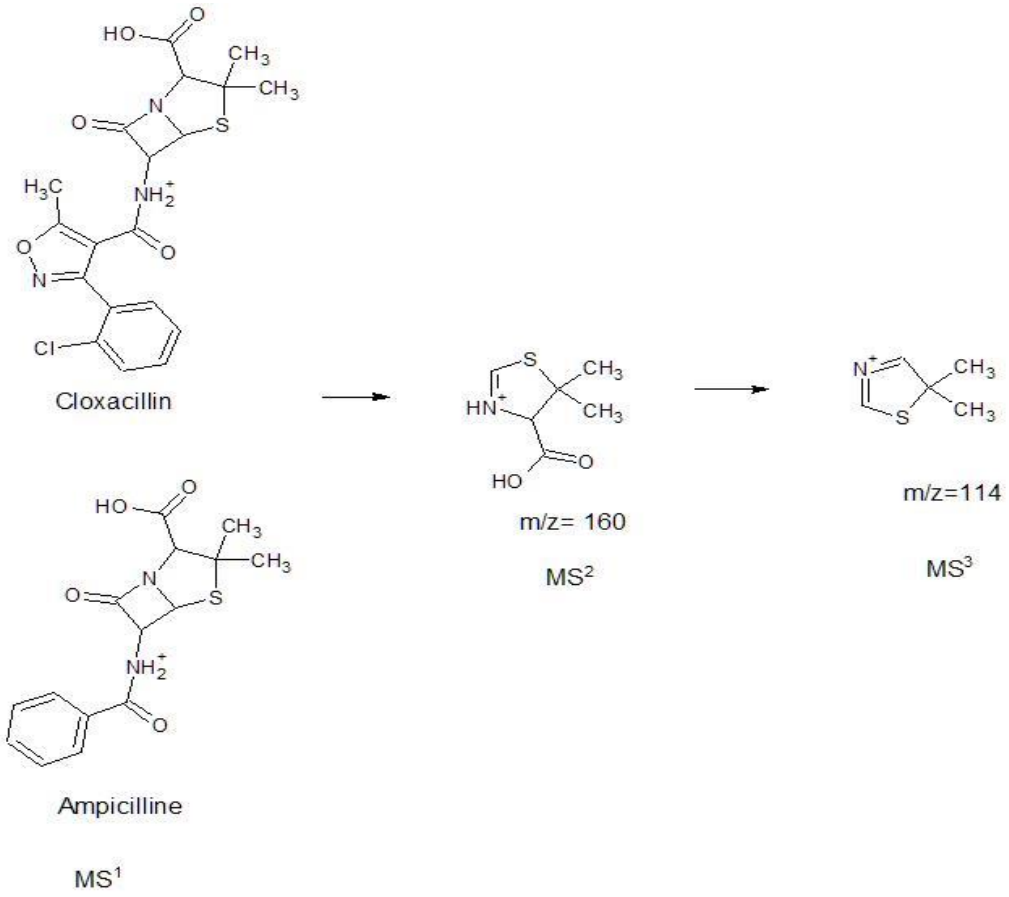


Figure S4: MRM³ fragmentation pattern of Cefapirine (Metfrag)

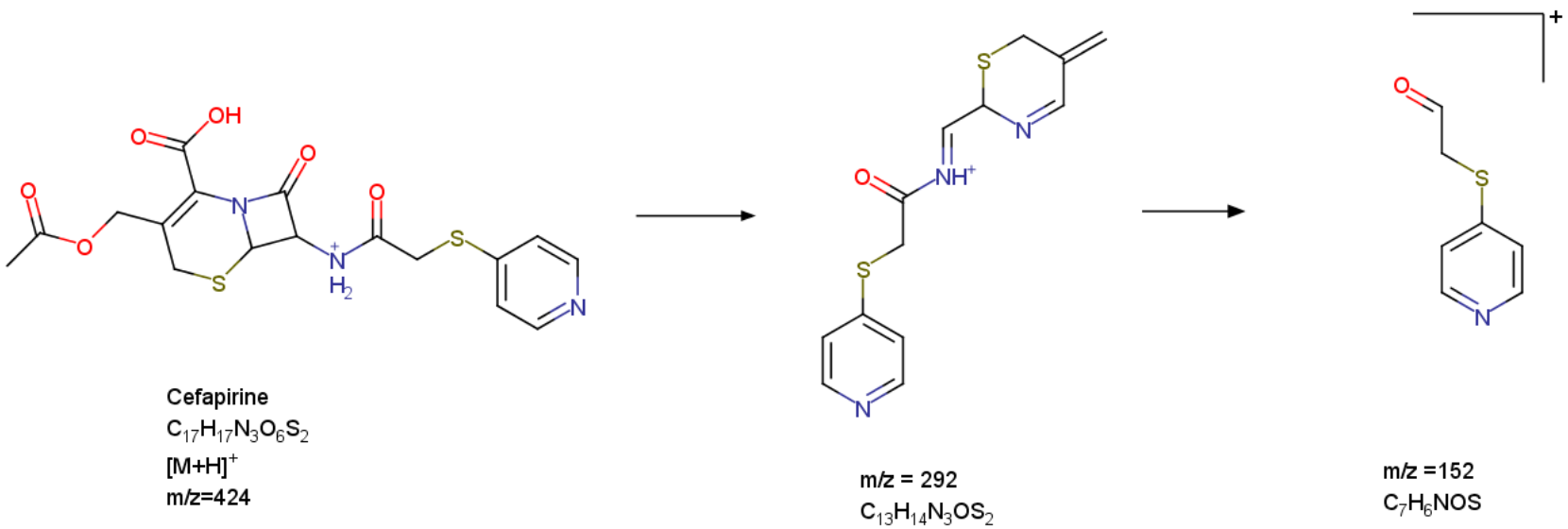
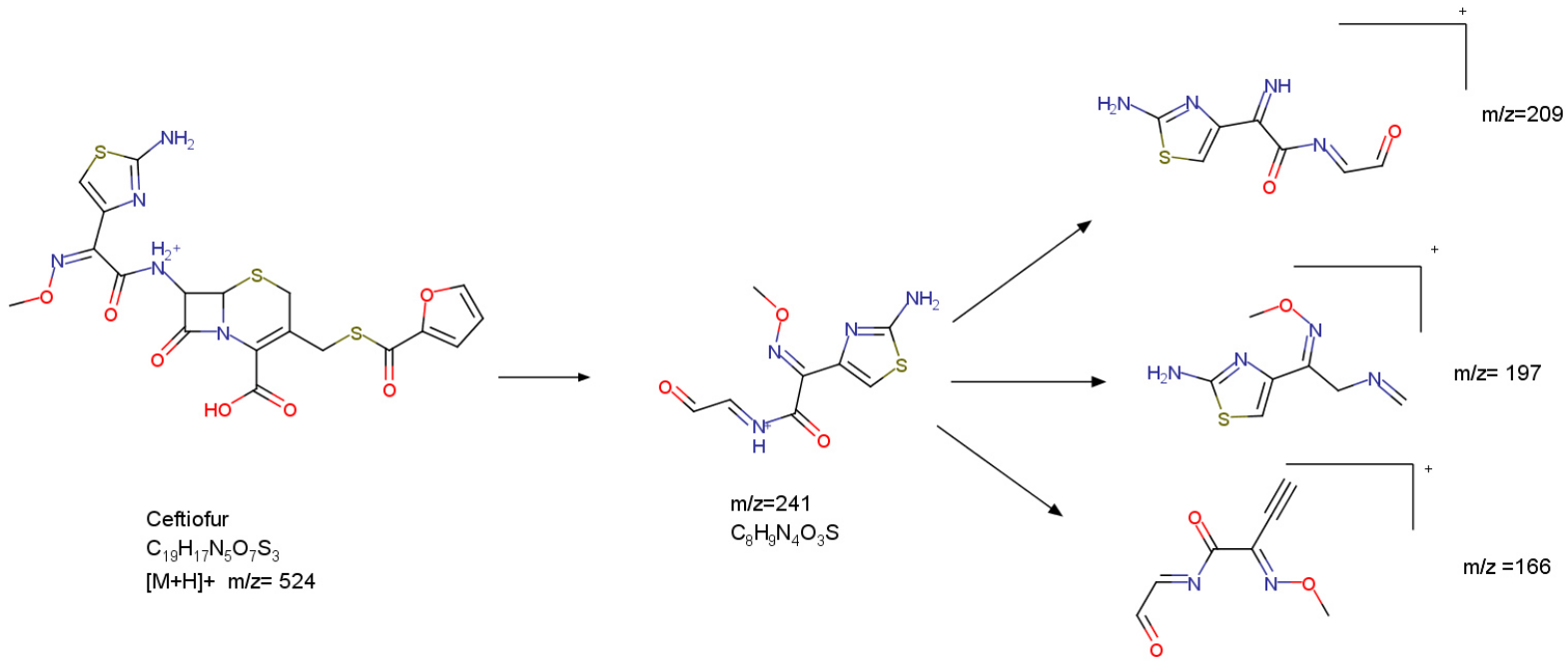


Figure S5: Ceftiofur fragmentation pattern (Metfrag)



III. Perspectives

Comme montré précédemment, la fragmentation MRM^3 ne conduit pas à un seul ion sur lequel l'optimisation peut être effectuée. Plusieurs fragments sont formés, surtout lorsque les fragments initiaux sont de masse relativement élevée (supérieure à 200 Da). Il peut donc être intéressant d'optimiser et d'acquérir les signaux générés par plusieurs fragments de seconde génération spécifiques à un analyte. Ainsi, les intensités de chaque fragment pourraient être additionnées et un tracé chromatographique complet reconstitué. Il serait cependant nécessaire d'optimiser plus finement les paramètres d'excitation pour la seconde fragmentation afin de conserver la présence des différents fragments tout en maximisant leurs intensités respectives.

Le développement de méthodes avec un plus grand nombre de composés permettrait également de réaliser des analyses de manière plus spécifique, ajoutant un niveau de certitude supplémentaire par rapport à l'analyse LC-MS/MS. La chromatographie en amont devra apporter suffisamment de séparation pour correspondre aux capacités de multiplexage réduites lors de l'acquisition en LC-MRM^3.

Concernant les molécules de très basse masse, qui ne peuvent pas être fragmentées deux fois, il peut être envisageable d'augmenter artificiellement leur masse en les dérivant afin d'obtenir des ions avec un m/z suffisamment haute pour pouvoir doublement les fragmenter. Cet agent dérivant doit réagir rapidement avec les analytes et former une liaison suffisamment stable pour ne pas être perdu lors de la première fragmentation. Un bon candidat pourrait être le chlorure de fluorénylméthoxycarbonyle (FMOC-Cl) bien connu en synthèse organique comme groupe protecteur des amines, ou le Dabcyl-cyclohexanedione, employé par Guillaubez *et al.* (2021) comme chromophore spécifique de peptides oxydés.

Chapitre 5 : Quantification d'antibiotiques dans des matrices solides environnementales après criblage de suspects

I. Introduction

Les antibiotiques employés dans la médecine humaine et vétérinaire n'étant que faiblement absorbés et assimilés dans les organismes, ils peuvent se retrouver excrétés dans l'environnement. Il est donc possible de les détecter dans les matrices liquides telles que les eaux de surface ou souterraines, et dans les matrices solides telles que les sols, les fumiers et les lisiers pour les molécules à usage vétérinaire et également les boues de stations d'épuration, principalement pour les antibiotiques employés en médecine générale. Face à leur diversité et le nombre potentiellement important de composés présents dans ces matrices, il est impossible de développer des méthodes d'analyses ciblées permettant de détecter l'ensemble des molécules avec des niveaux de sensibilité adéquats pour les quantifier à l'état de traces. Une priorisation de molécules jugées pertinentes est effectuée.

Les méthodes d'analyses dites « non-ciblées » permettent, quant à elles, de détecter un plus grand nombre de molécules, particulièrement grâce à l'emploi d'analyse par spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS), fournissant la masse exacte de chaque pic détecté. Afin de permettre l'attribution des signaux détectés, des méthodes de criblage de suspects peuvent être employées pour confronter chaque masse (et potentiellement temps de rétention) à une base de données ou une liste de masses exactes théoriques, et établir une liste des composés présents dans l'échantillon. Cependant, l'emploi de méthode de criblage reste limité par la préparation d'échantillons. En effet, il est nécessaire de réaliser des extractions les moins spécifiques possibles afin de pouvoir détecter une large gamme de composés, et des compromis sont donc à réaliser en ce qui concerne les rendements d'extraction et la sensibilité de la méthode. Dans la majorité des cas, l'analyse non ciblée n'est utilisée qu'à des fins d'identification (Bobeldijk et al. 2001; Ibáñez et al. 2008; Gómez et al. 2010; Bletsou et al. 2015; Majewsky, Glauner, et Horn 2015; Llorca et al. 2016; Singer et al. 2016; Pinasseau et al. 2019; Baesu et al. 2021; Qian et al. 2021) ,permettant par exemple de prioriser les analytes à quantifier ultérieurement par analyse ciblée (Riva et al. 2021; Wiest et al. 2021).

Dans cette partie, nous avons effectué une première étape de criblage de suspects à l'aide de deux bases de données (en HRMS et MS/MS), et deux méthodes d'extraction couvrant une large gamme de composés, afin de mettre en évidence les antibiotiques présents dans des boues de station d'épuration, des lisiers et des fumiers. Les composés suspectés ont été ensuite

confirmés ou infirmés par comparaison avec des standards analytiques. Une méthode d'analyse ciblée et une méthode d'extraction spécifique à ces composés ont finalement été développées.

II. Matériel et méthodes

1. *Standards et réactifs*

L'ensemble des standards utilisés sont d'une pureté minimale de 97% et ont été achetés chez différents fournisseurs (Merck ; LGC et Techlab principalement). Concernant les solvants utilisés, l'eau (LC-MS grade) a été fournie par Fisher Scientific (Illkirch, France), l'ACN (LC-MS grade et le MeOH (LC-MS grade) par Honeywell (Seelze, Germany). L'acide formique (UPLC-MS grade) a été acheté chez Biosolve (Dieuze, France). Les kits employés pour l'extraction QuEChERS proviennent de Agilent (Massy, France). Le détail de leurs compositions respectives peut être retrouvé dans le chapitre 3.

2. *Prélèvement et préparation des échantillons*

L'ensemble des échantillons sont issus du projet RISMEAU. Quatre types d'échantillons ont été prélevés dans les environs de la station d'épuration de Bellecombe, Haute-Savoie, France : du sol provenant du lieu d'expérimentation, des boues collectées dans les bassins de la station d'épuration puis séchées en serre, ainsi que des lisiers et fumiers prélevés dans diverses exploitations agricoles de la région procédant à de l'élevage bovin, principalement pour l'exploitation laitière. Les lisiers collectés étant majoritairement liquides, une première étape de centrifugation a été réalisée afin de séparer les phases liquide et particulaire. La totalité des phases solides a ensuite été lyophilisée et homogénéisée à l'aide d'un cryobroyeur.

3. *Criblage de suspects*

Afin de déterminer une liste de composés qui seront ensuite quantifiés avec une méthode d'analyse ciblée, une première étape de criblage de suspects a été effectuée. Pour ce faire, deux méthodes d'extraction ont été réalisées et les extraits ont été analysés avec deux méthodes d'analyses associées à des bases de données.

i. Extractions

Afin de couvrir une gamme de polarité la plus large possible, deux extractions ont été réalisées : une extraction assistée par des sels QuEChERS et une extraction assistée par ultrasons (UAE).

L'extraction QuEChERS est adaptée de Peysson et Vulliet (2013), qui présentent la détermination de 136 composés pharmaceutiques dans des boues de station d'épuration. Deux grammes de matrice sont extraits par 10 mL d'une solution aqueuse contenant 0,1 M d'EDTA et 10 mL d'acétonitrile à 1% d'acide acétique. 1 mL d'heptane est ensuite ajouté pour retirer les lipides et les composés les plus hydrophobes de l'échantillon. Un tampon QuEChERS Acétate (norme AOAC) est ajouté afin de réaliser la séparation liquide/liquide par effet de salting-out. Le surnageant est prélevé et transféré dans un tube secondaire, puis est évaporé à sec.

La deuxième extraction sélectionnée est tirée de celle publiée par Gago-Ferrero *et al.* (2015). Les auteurs ont développé cette méthode pour extraire 148 composés pharmaceutiques dans des boues de station d'épuration. L'extraction est réalisée sur 100 mg de matrice, avec 2 mL d'une solution 50/50 MeOH/H_2O (pH 2,5 ; AF 0.5 % and 0,1 % EDTA). Le mélange est agité au vortex puis placé dans un bain à ultrasons maintenu à 50°C pendant 15 minutes. L'ensemble est centrifugé puis le surnageant est prélevé et transféré dans un tube secondaire. L'extraction est ensuite réitérée deux fois, en transférant à chaque fois le surnageant dans le même tube. L'ensemble des surnageants est finalement évaporé à sec. L'extraits sec est repris dans un mélange 95/5 H_2O/MeOH.

La combinaison des deux extractions multi-familles regroupe 230 composés différents, avec des rendements d'extraction moyens de 70%.

ii. Analyses

Base de données Quanpédia

La base de données Quanpédia est un recueil de méthodes LC-MS/MS développés par Waters pour l'analyse de différentes classes de composés. La méthode sélectionnée ici permet l'analyse de 160 composés à usage vétérinaire. Pour réaliser leur séparation, un système chromatographique UPLC H-Class de Waters a été utilisé. La colonne utilisée est une Acquity BEH C18 (100 x 2,1mm; 1,7µm) de Waters. La phase mobile employée est constituée de (A) : H_2O+0,05% acide formique et (B) MeOH. La colonne est maintenue à une température de

55°C, et la séparation suit le gradient présenté dans le Tableau 17 avec un débit constant de 400 $\mu L.min^{-1}$.

Tableau 17 : Gradient utilisé dans la méthode Quanpédia

Temps (min)	%B
0	8
1	8
3,5	20
8	70
10	99
13,5	8
15	8

Le système chromatographique est couplé à un spectromètre de masse Xevo TQ-S doté d'un analyseur à triple quadripôles, avec un guide d'ion StepWave. Le mode d'acquisition sMRM (Schedule Mutiple Reaction Monitoring) a été employé pour la détection en MS/MS, avec une source d'ionisation par electrospray (ESI) alternant modes positif et négatif. Les paramètres de la source sont compilés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Paramètres de source Xevo Quanpédia

Paramètres	**Valeurs**
Tension de capillaire	2,8 kV
Température de source	150°C
Gaz de désolvatation	Azote, 900 L/h, 450°C
Gaz de nébulisation	7 bars

Chaque composé est associé à une transition MRM (ion parent → ion fils) et à une fenêtre d'acquisition centrée autour du temps de rétention du composé. Le logiciel employé pour l'acquisition et le retraitement des données est MassLynx V4.1 (Waters)

Base de données TASQ

Le système chromatographique utilisé est un système UHPLC Ultimate 3000 Thermo couplé à un analyseur quadripôle-temps de vol (Q-ToF) Maxis Plus (Bruker). Les logiciels utilisés pour l'acquisition des données sont Hystar 4.1 pour le contrôle du système chromatographique et OtofControl 4.1 pour le contrôle de l'analyseur. Pour le retraitement des données, le logiciel Target Analysis for Screening and Quantification (TASQ) (Bruker) v1.4 a été utilisé. TASQ 1.4 est une combinaison de trois bases de données (TargetScreener HR 3.1 Tox, TargetScreener HR 3.1 Pesticides et TargetScreener HR 3.1 Vet Drugs) pour un total d'environ 3000 pesticides, composés pharmaceutiques et vétérinaires. Les acquisitions ont à chaque fois été réalisées en modes positif et négatif pour assurer la détection d'un maximum de composés possiblement présents dans les extraits. La séparation est réalisée sur une colonne Intensity Solo C18-2 (100 x 2,1 mm, 1,8µm ; Bruker) maintenue à 40°C avec un volume d'injection de 5 µL. En mode positif, les phases mobiles sont composées de : (A) 99/1 Eau/MeOH additionné de 5 mM de formate d'ammonium et de 0,01% d'acide formique, et (B) MeOH additionné de 5 mM de formate d'ammonium et de 0,01% d'acide formique. En mode négatif, les phases mobiles sont constituées de (A) 99/1 Eau/MeOH avec 5 mM d'acétate d'ammonium et (B) MeOH avec 5 mM d'acétate d'ammonium. Dans les deux modes, le gradient d'élution employé est décrit dans le Tableau 19.

Tableau 19: Gradient d'élution utilise pour le criblage TASQ en mode positif et en mode négatif

Temps (min)	**Débit (µL.min^{-1})**	**%B**
0,0	200	4
0,1	200	4
1,0	200	18,3
2,5	223	50
14,0	400	99,9
16,0	480	99,9
16,1	480	4
19	480	4
19,1	200	4
20,0	200	4

L'analyseur Q-ToF est équipé d'une source d'ionisation par electrospray (ESI) opérant avec les paramètres suivants : tension de capillaire de ±3600 V, pression de nébulisation de 3 bars (N_2), un débit de gaz séchant de 9 $L.min^{-1}$ (N_2) et une température de séchage réglée à 200°C. L'ensemble des paramètres d'acquisition est détaillé dans la publication de Wiest *et al.* (2021).

Le temps de rétention étant le premier critère d'identification d'une molécule lors d'une comparaison de bases de données, il est nécessaire de vérifier sa concordance par l'injection de solutions de contrôle (QC) tout au long de la séquence analytique. Dans cette étude, la solution de QC est constituée d'un mélange de standards de molécules marquées et non marquées, étant réparties sur l'ensemble du chromatogramme, à 100 $ng.mL^{-1}$ dans une solution 99/1 Eau/MeOH. Cette solution est injectée une première fois en début de séquence, puis lorsque la moitié des échantillons a été injectée, et enfin à la fin de la séquence.

4. *Analyse ciblée*

i. Extraction

L'extraction sélectionnée est basée sur la méthode QuEChERS. Un gramme de matrice est pesé dans un tube à centrifuger de 50 mL. 5 mL d'une solution d'eau contenant 0,1 $mol.L^{-1}$ d'EDTA et 1% d'acide acétique sont ajoutés puis le mélange est agité par vortex pendant 30 s. 10 mL d'ACN sont ensuite ajoutés et le tube agité à nouveau par vortex pendant 30 s. 5 mL d'heptane sont ajoutés pour retirer les lipides et autres composés hydrophobes présents dans l'extrait. Le mélange de sels QuEChERS « Veterinary Drugs » est ajouté et le tube est rapidement agité à la main pendant 30 s, suivie par 30 s d'agitation par vortex. Les extraits sont ensuite centrifugés à 10 000 RPM pendant 5 minutes afin de séparer les différentes phases. Les 10 mL d'ACN sont prélevés et transvasés dans un tube annexe. Finalement, l'extrait est évaporé à sec sous un flux d'azote, puis conservés au congélateur à -20°C jusqu'à analyse.

Les rendements d'extraction ont été déterminés dans des boues de STEP en calculant le rapport d'aires entre un extrait de matrice dopée à 50 $ng.g^{-1}$ avant extraction et un extrait dopé après extraction.

ii. Analyse

La quantification ciblée a ensuite été réalisée à l'aide d'un couplage UPLC-MS/MS. Pour la séparation chromatographique, un système 1290 Infinity d'Agilent (Massy, France) équipé d'une pompe quaternaire a été utilisé. La séparation est réalisée avec une colonne HSS T3 (150 x 2,1 mm, 2,5µm ; Waters) maintenue à 50°C. En mode positif, la phase aqueuse (A) est de l'eau + 0,1% AF. En mode négatif, la phase A est constituée d'eau avec 1 mM de fluorure d'ammonium. Dans les deux modes d'acquisition, la phase organique (B) est du méthanol. Le gradient employé dans les deux modes est le suivant : 99% de A durant 2 min, de 99% à 70% de A en 3 min, puis de 70% à 0% de A en 12 min, et enfin 100% de B pendant 2 min.

Un spectromètre de masse à triple quadripôles (5500 QTrap, Sciex) est couplé à l'UPLC, et l'ensemble des transitions MRM sont présentées en Annexe B. La source ESI est maintenue à 500°C avec une tension de capillaire de 5500V en mode positif et -4500V en mode négatif.

Les limites de quantification ont été déterminées à partie de courbes de calibration en matrice extraite, comme étant les plus faibles concentrations ayant un rapport Signal/Bruit égal à 10.

III. Résultats et discussion

1. *Criblage de suspects et établissement de liste de molécules*

Pour établir une liste de molécules pertinentes qui seront ensuite quantifiées par LC-MS/MS, une première approche par criblage de suspects a été menée. Différentes matrices ont été extraites pour effectuer ce criblage : sol ; une boue prélevée dans la STEP, et des lisiers et fumiers prélevés chez des agriculteurs aux alentours de la STEP.

Deux bases de données ont été sélectionnées. Les critères d'identification ont été fixés (Soulier *et al.*, 2021, Figure 14) afin d'obtenir un niveau de confiance 2 (possible nom de la molécule). Avec la base de données Quanpédia, l'identification d'un composé est réalisée par la détection d'une transition MRM et la correspondance du temps de rétention mesuré à celui de la base de données. Avec la base de données TASQ, pour chaque molécule, plusieurs paramètres sont recensés: le temps de rétention, la masse exacte et le profil isotopique du parent ainsi que la masse exacte de différents fragments et leurs profils isotopiques. A la suite de l'exploitation des données, 45 molécules ont été suspectées dans la base de données TASQ et 110 composés

suspectés dans la base de données Quanpédia. Malgré le plus grand nombre de composés dans la base de données TASQ, peu de composés ont été suspectés par rapport à l'emploi de Quanpédia. Ceci peut principalement s'expliquer par la plus faible sensibilité du Q-ToF par rapport au Xevo-TQS, d'un facteur entre 10 et 100, causant une perte de détection pour les molécules à de faibles concentrations dans l'échantillon ou faiblement extraites. La préparation devant être la plus générique possible pour le criblage, aucune purification n'a été appliquée sur les extraits. Dans des matrices complexes telles que les boues de STEP, les extraits présentent un fort effet de matrice, limitant également la détection de certains composés. Seuls les composés présents en fortes concentrations tels que les tensioactifs, peuvent être identifiés, comme montré dans l'étude de Bergé *et al.* 2018. De plus, dans le cas de l'analyse HRMS, l'ensemble des fragments présents dans la base de données ont été obtenus expérimentalement, mais uniquement par injection du standard analytique dans du solvant. En fonction de la matrice analysée, les fragments ne seront pas forcément présents dans les mêmes proportions. Les composés concernés ne sont pas détectés avec un niveau de confiance suffisant. Il serait alors nécessaire d'employer des méthodes d'analyse de fragments *in silico* afin d'obtenir une formule brute avec plusieurs noms possibles de molécules (niveau de confiance 3).

La détection en analyse ciblée, en suivant des transitions MRM, est plus spécifique, moins susceptible d'être sensible aux effets de matrices générés en source. Cependant, une autre problématique a été soulevée par l'utilisation de la base de données Quanpédia: une seule transition par composé est entrée dans la base de données. Généralement, il est nécessaire de suivre au moins deux transitions MRM pour confirmer l'identité d'un composé. Le ratio entre ces deux transitions est également un indicateur clé d'un composé, en le comparant au ratio obtenu lors de l'injection du standard analytique, afin de confirmer sa présence.

Un premier tri parmi les composés suspectés a été effectué pour conserver les antibiotiques et composés à usage vétérinaire. L'établissement d'une liste initiale de composés à quantifier s'est basé sur le respect de trois critères :

- Le composé a été retrouvé dans les boues de STEP et un des intrants agricoles
- Dans une même matrice, le composé a été détecté à la fois dans les deux extraits issus des deux méthodes d'extraction différents
- Les pics chromatographiques présentent une aire élevée.

À la suite des deux criblages de bases de données effectués, une liste de 33 composés a ainsi été établie, provenant principalement de la base de données Quanpédia (Tableau 20).

Tableau 20 : Liste initiale de composés sélectionnés suite au criblage de suspects (en rouge : composés non confirmés par injection d'un standard analytique)

2-quinoxalinecarboxylic acid	Levamisole	Ronidazole
Albendazole 2-aminosulfone	Nitrofurazone	Sulfaquinoxline
Bêta-trenbolone	Ofloxacine	Sulfacetamide
Bromacil	Olaquindox	Sulfaguanidine
Chlorhexidine	Oxfendazole	Sulfamethoxazole
Chlormadione acetate	Oxibendazole	Sulfathiazole
Ciprofloxacine	Oxolinic acid	Sulfisozole
Diaveridin	Pirlimycin	Testostérone
Ethopabate	Pyrantel pamoate	Tétracycline
Flubendazole	Pyriméthamine	Thiabendazole
Kétoprofène	Progestérone	Triméthoprime

Les standards analytiques correspondant aux molécules identifiées niveau 2 ont été achetés et leurs paramètres MRM ont été optimisés par infusion sur le 5500 QTRAP. Afin de confirmer la présence des molécules, la méthode Quanpédia a été transposée sur le 5500 QTRAP, et les extraits de boues, de lisiers et de fumiers injectés lors du criblage ont été réinjectés non dopés et dopés à 100 $\mu g.L^{-1}$ en chacun des standards analytiques. La confirmation a été faite sur la base de la concordance des temps de rétention et de l'augmentation de l'aire du pic chromatographique en dopant les extraits, confirmant qu'il s'agit de la bonne transition observée. Ainsi, 16 composés n'ont pas été confirmés (en rouge dans le Tableau 20). A contrario, 17 composés ont été confirmés, parmi lesquels la ciprofloxacine et l'ofloxacine qui ont seulement été confirmées dans les extraits de boues, ou encore la tétracycline qui a été confirmée dans tous les extraits analysés. Ainsi, sur l'ensemble identifié dans les bases de

données, 45% des composés n'ont pas été confirmés par addition de standards. Ces résultats confirment donc qu'il est essentiel de confirmer grâce à l'injection de standards les molécules détectées lors des étapes de criblage, ainsi que d'appliquer des critères de sélection stricts afin de limiter le risque de faux-positifs. La liste initiale a donc été réduite aux 17 molécules confirmées.

Pour six d'entre elles (Flubendazole, Ofloxacine, Sulfamethoxazole, Tétracycline, Thiabendazole et Triméthoprime), un ou plusieurs de leurs principaux métabolites ont été ajoutés après examen de la littérature (De Ruyck et al. 2001; Brenner et al. 2011; L. Zhang et al. 2014; Wolford et al. 2012; Hess et al. 2013; Lumaret 2013; Vasquez et al. 2013; Maia et al. 2014; Kim et al. 2017; Usui et al. 2019; Goessens et al. 2020; Sefiloglu, Tezel, et Balcıoğlu 2021).

Au total, la liste finalisée contient 34 molécules : 17 confirmées issue de la liste 1 ; 7 autres composés ajoutés suite aux concertations avec les différents partenaires du projet RISMEAU (Doramectine, Eprinomectine, Erythromycine, Sulfoxaflor, Tébuconazole, et Triclosan) ainsi que 10 métabolites.

La liste complète est présentée dans le Tableau 21. Onze étalons internes ont enfin été ajoutés pour permettre le suivi des extractions et la quantification : Ciprofloxacine-d8 ; Kétoprofène-d4 ; Levamisole-d5 ; Methamidophos-d6 ; Ofloxacin-d3 ; Oxfendazole-d3 ; Sulfamethoxazole-d4 ; Sulfathiazole-d4 ; Tebuconazole-d9 ; Thiabendazole-d4 et Trimethoprim-d3.

Tableau 21 : Liste finale des composés sélectionnés dans le cadre de l'étude (noms et formules brutes)

Antibiotiques	
Ciprofloxacine	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$
Ofloxacin	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$
Desmethyl-ofloxacin	$C_{17}H_{18}FN_3O4$
Erythromycine	$C_{37}H_{67}NO_{13}$
Anhydroerythromycine	$C_{37}H_{65}NO_{12}$
Sulfaguanidin	$C_7H_{10}N_4O_2S$
Sulfamethoxazole	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$
Acetyl-sulfamethoxazole	$C_{12}H_{13}N_3O_4S$
3-Amino-5-methylisoxazole	$C_4H_6N_2O$
Sulfathiazole	$C_9H_9N_3O_2S_2$
Tétracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$
Epitetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_8$
Triméthoprime	$C_{14}H_{18}N_4O_3$
Hydroxy-triméthoprime	$C_{14}H_{18}N_4O_4$
Antiparasitaires	
Albendazole 2-aminosulfone	$C_{10}H_{13}N_3O_2S$
Doramectine	$C_{50}H_{74}O_{14}$
Eprinomectine	$C_{50}H_{75}NO_{14}$
Flubendazole	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$
Hydroxy-flubendazole	$C_{16}H_{12}FN_3O_4$
Levamisole	$C_{11}H_{12}N_2S$
Hydroxy-levamisole	$C_{11}H_{12}N_2OS$
Pyrantel pamoate	$C_{11}H_{14}N_2S$
Pyriméthamine	$C_{12}H_{13}ClN_4$
Thiabendazole	$C_{10}H_7N_3S$
5-Hydroxythiabendazole	$C_{10}H_7N_3OS$
Biocides	
Chlorhexidine	$C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$
Triclosan	$C_{12}H_7Cl_3O_1$
Pesticides	
Bromacil	$C_9H_{13}BrN_2O_2$
Méthamidophos	$C_2H_8NO_2PS$
Sulfoxaflor	$C_{10}H_{10}F_3N_3OS$
Tébuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O$
Hydroxy-tebuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O_2$

2. *Analyse ciblée et quantification*

i. Développement de la méthode d'analyse

La colonne HSS T3 (Waters) a été sélectionnée car elle est stable dans des conditions 100% aqueuse, ce qui permet de retenir les composés les plus polaires, notamment les métabolites. La longueur de la colonne a été fixée à 15 cm afin de permettre une grande capacité de séparation.

a. **Phases mobiles**

Acquisition en mode positif

Afin de favoriser l'ionisation des composés pour l'acquisition en positif, chaque phase aqueuse contient 0.1% d'acide formique. Trois additifs ont ensuite été testés : Acétate d'ammonium (NH_4OAc) ; Formate d'ammonium (NH_4OFA) et Fluorure d'ammonium (NH_4F), chacun à 10 mM. L'emploi d'acide formique seul a également été considéré. Pour chacun des tests, la phase organique employée était du méthanol. La Figure 16 présente le rapport en pourcentage entre les aires obtenues avec l'acide formique seul et celles obtenues après ajout des autres sels. Le bromacil et le sulfoxaflor voient leurs aires doublées ou triplées lorsque des sels d'ammonium sont ajoutés. De façon inattendue, l'ajout de NH_4F apporte un gain d'aires à des composés tels que le flubendazole, l'oxfendazole, le kétoprofène ou la tétracycline, là où l'ajout de NH_4OAc ou NH_4OFA réduit les signaux obtenus (Figure 16). Un gain de signal en ESI positif après l'ajout de NH_4F a également été observé par Pesek et Matyska (2015). Cependant, d'autres composés comme l'albendazole-2-aminosulfone, la chlorhexidine, le levamisole, ou encore les composés de la famille des fluoroquinolones (ciprofloxacine et ofloxacine) sont fortement négativement impactés par l'ajout de sels d'ammonium, jusqu'à 90% de diminution du signal par rapport à l'utilisation d'AF uniquement. Enfin, des composés tels que la pyriméthamine ou le thiabendazole ne sont que peu affectés par l'ajout de sels.

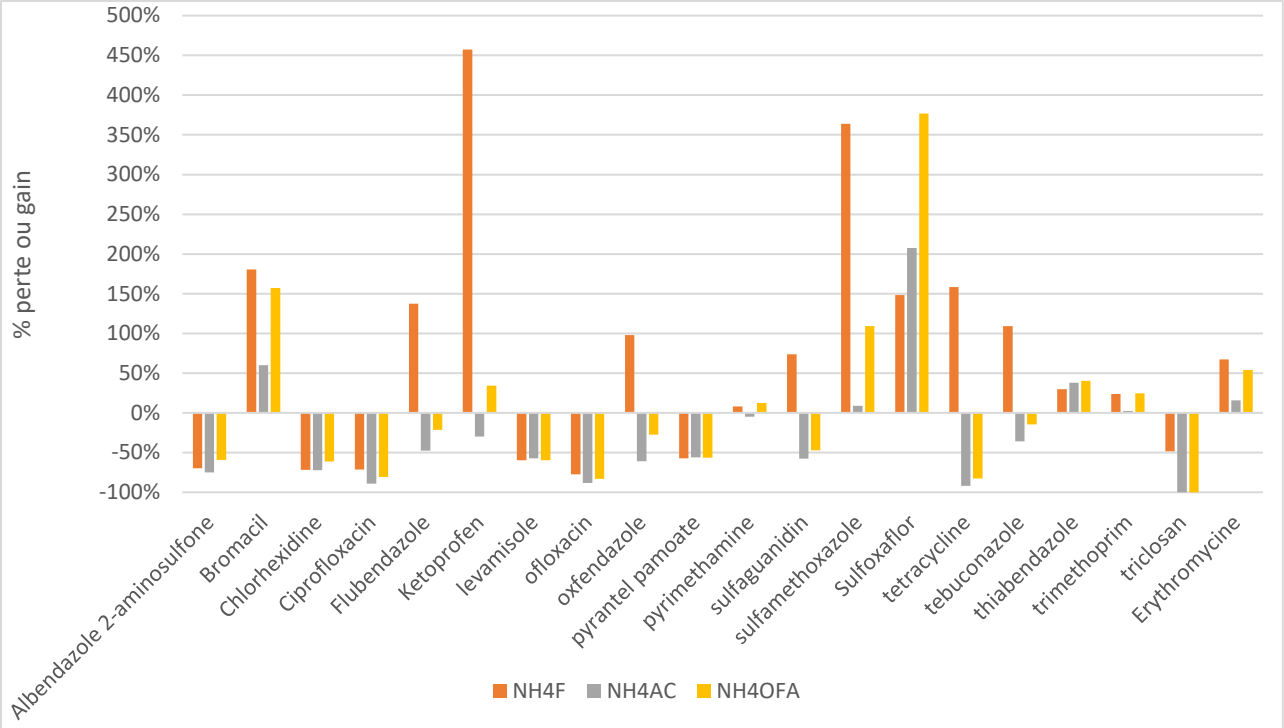


Figure 16 : Gains et pertes d'aires suivant le sel d'ammonium ajouté à la phase aqueuse à 10 mM par rapport à l'ajout d'acide formique seul.

Bien que l'ajout de NH_4F dans la phase aqueuse permette d'obtenir un signal plus important, il présente un risque de recombinaison avec l'AF pour former de l'acide fluorhydrique (HF) pouvant dégrader la silice des colonnes chromatographiques, impactant ainsi les performances de la méthode d'analyse.

Concernant la phase organique, l'emploi de méthanol se montre préférable à l'acétonitrile, apportant un signal plus élevé pour de nombreux composés (Figure 17). Par exemple, l'aire du kétoprofène est multipliée par 6 en employant du MeOH. L'ajout d'AF dans la phase organique n'apporte que peu de gain sur les aires et ne sera donc pas employé dans la suite du développement. Ainsi, les phases mobiles utilisées pour la séparation et l'acquisition en mode positif sont Eau+0,1%AF et MeOH. Un exemple de chromatogramme obtenu en mode positif est présenté en Annexe C.

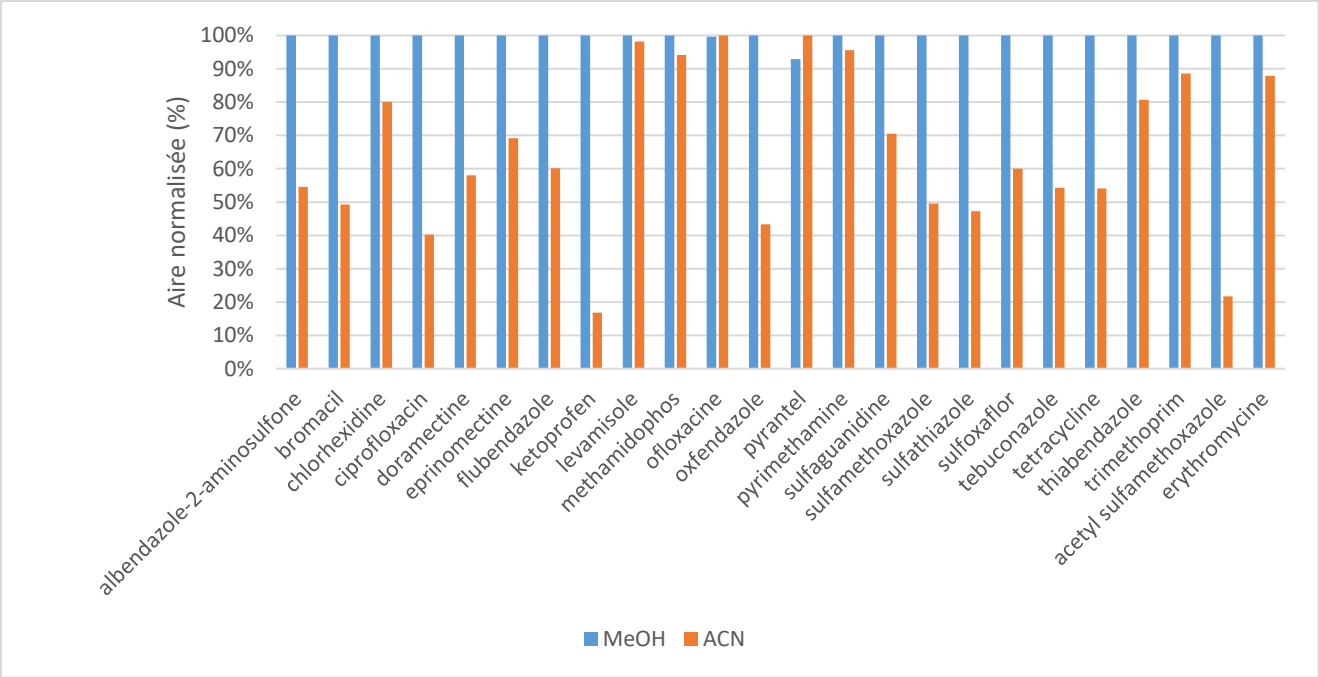


Figure 17 : Aires normalisées en fonction de la phase organique employée

Acquisition en mode négatif

En mode négatif, l'attention a également été portée sur l'utilisation de sels dans la phase mobile. Deux concentrations (1 mM et 10 mM) de NH_4OAc et de NH_4F ont été testées. En comparant les aires obtenues pour chaque composé avec les phases à 10 mM de sels, on note une réponse plus élevée en employant du NH_4F, comparé à NH_4OAc. Également, en diminuant la concentration à 1 mM, les aires sont augmentées de plus de 90% par rapport à 10 mM. Les aires obtenues avec 1 mM de NH_4F ont été multipliées par un facteur moyen de 50 (Figure 18) , contrairement à la réduction de concentration de NH_4OAc, qui a seulement apporté un facteur de gain moyen de 3. C'est donc la phase aqueuse additionnée avec 1 mM de NH_4F qui a été sélectionnée. La phase organique employée est également le méthanol.

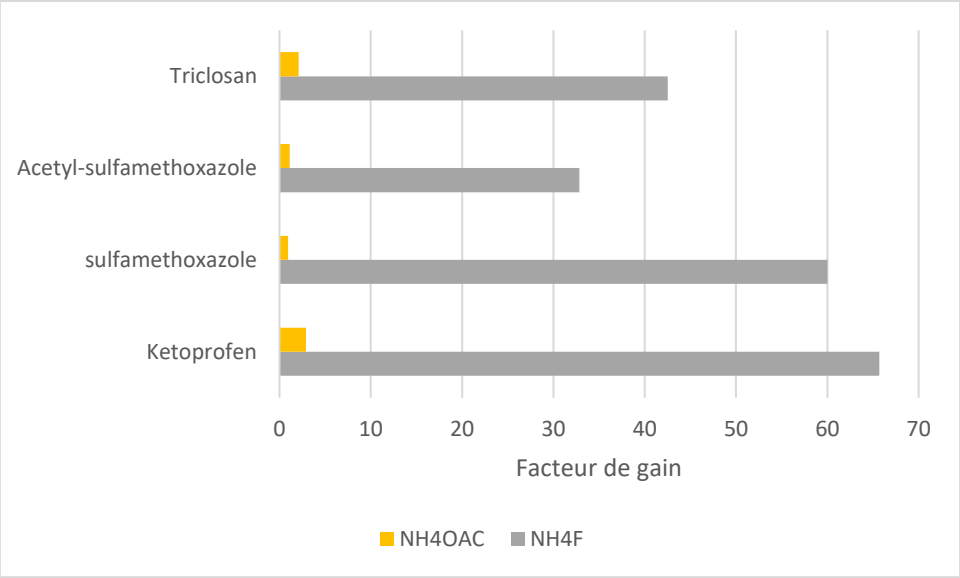


Figure 18 : Facteur de gain mesuré en passant de 10 mM à 1 mM de sels d'ammonium dans les phases mobiles

ii. Développement de la méthode d'extraction

Lors du criblage de suspects, il a été mis en avant que la méthode QuEChERS permettait d'extraire un plus grand nombre de composés. C'est cette méthode qui a donc été choisie et optimisée pour extraire la liste de composés précédemment établie. Pour chaque paramètre testé et optimisé dans cette partie, les données ont été normalisées par rapport au maximum pour chaque composé. Les développements détaillés ici ont été initiés sur les composés parents (24 molécules).

a. Choix des sels d'extraction QuEChERS

Quatre différents mélanges de sels d'extractions QuEChERS disponibles commercialement ont été testés : norme américaine AOAC, norme européenne EN, Original et Veterinary Drugs (VET). Les différences clés sont la nature et la quantité de sels, permettant de modifier le pH des solvants d'extraction : le mélange EN tamponne l'extrait à pH 5,5 tandis que l'emploi du mélange AOAC dans les boues apporte un pH basique (voir article du chapitre 3). Les deux autres méthodes d'extraction ne tamponnent pas les extraits. Le mélange VET permet d'employer des conditions d'extractions plus douces avec le remplacement du $MgSO_4$ par du Na_2SO_4. En effet, la réaction d'absorption de la phase aqueuse avec Na_2SO_4 est moins exothermique, limitant ainsi la dégradation de certains composés sensibles à la chaleur.

Pour tester les différents sels d'extraction QuEChERS, les extractions ont été réalisées sur 1 g de boue dopée à 100 ng.g^{-1} et extrait avec 5 mL d'une solution aqueuse contenant 0,1M EDTA et 10 mL ACN. Les 10 mL de surnageant ont été récupérés, évaporés à sec et repris dans 1 mL de phase mobile pour être ensuite analysés. Les aires normalisées sont représentées en Figure 19. Différentes tendances se dessinent : les rendements de certains composés comme le Flubendazole, l'Oxfendazole, la Pyriméthamine et le Thiabendazole varient très peu. Les aires de certains composés, tels que la Ciprofloxacine, l'Ofloxacine et la Tétracycline augmentent drastiquement lors de l'utilisation du mélange VET, phénomène déjà observé par Bourdat-Deschamps *et al.* (2014). Par exemple, l'Ofloxacine présente un signal 50 fois plus intense en remplaçant le mélange Acetate par le mélange VET. Au contraire, l'aire de l'Albendazole-2-aminosulfone est moins intense avec ce mélange de sels. Globalement, le mélange QuEChERS VET permet le meilleur compromis et la suite de l'optimisation a donc été réalisée avec ces sels.

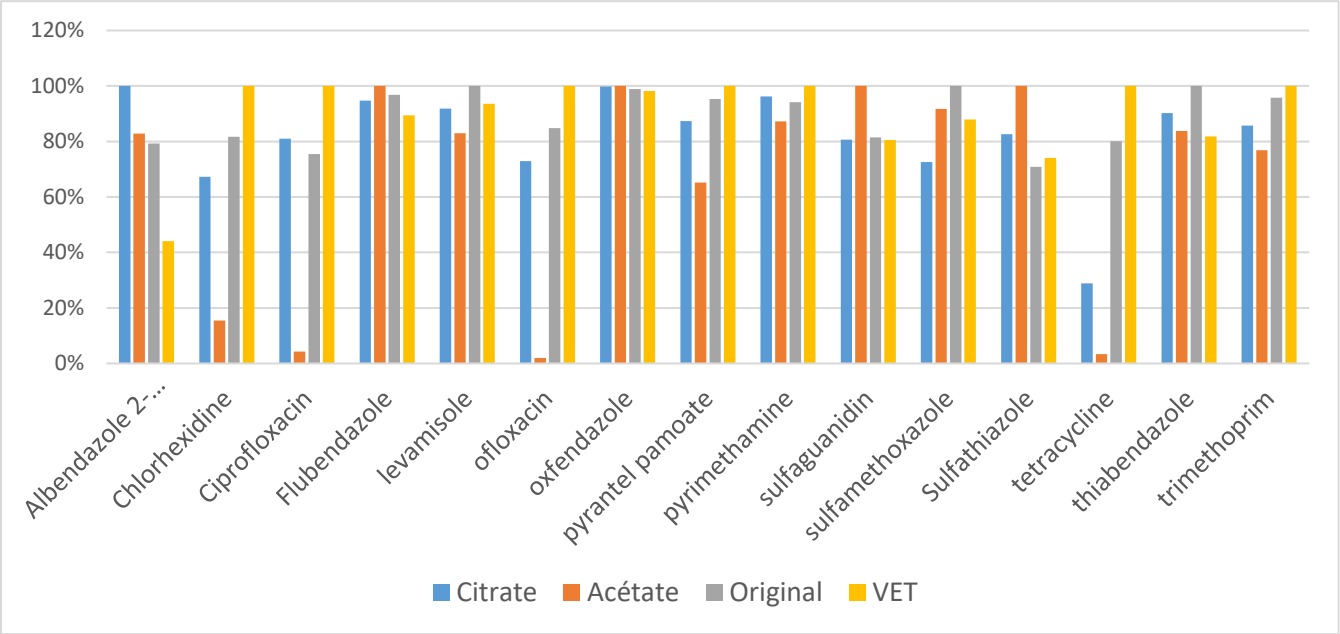


Figure 19 : Aires normalisées de différentes molécules en fonction du mélange de sels d'extraction QuEChERS utilisé (5 mL H_2O+0.1M EDTA, 10 mL ACN)

b. Choix du solvant d'extraction

Suite au choix des sels d'extraction QuEChERS, différents additifs au solvant ont été optimisés. Différentes solutions aqueuses ont été testées avec un volume de 5 mL : Eau + 0,1% d'acide

formique, Eau +0,1% d'acide formique + 0,1M d'EDTA et Eau + 0,1M d'EDTA + 1% d'acide acétique, inspiré de la publication de Peysson and Vulliet (2013).

On note un important gain de signal lorsqu'on utilise la phase aqueuse contenant 0,1M EDTA + 1% d'acide acétique (Figure 20), qui sera employée pour la suite de l'optimisation.

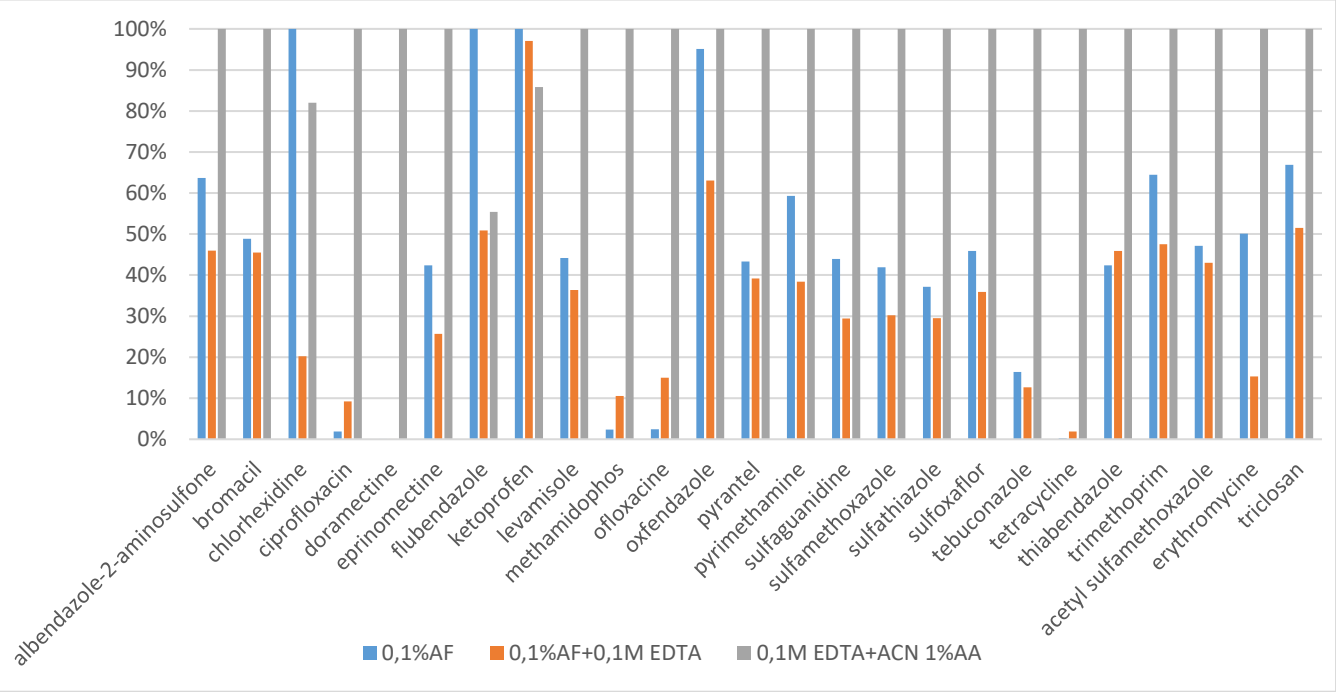


Figure 20 : Aire normalisée en fonction de la phase aqueuse employée

Les volumes ont ensuite été adaptés pour extraire 1 g de matrice : 5 ou 10 mL de chaque phase ont été testés. Pour la phase aqueuse, globalement, 70% des composés analysés présentent une aire plus grande lorsque l'extraction est réalisée avec seulement 5 mL de phase aqueuse (Figure 21). Par exemple, l'aire du levamisole est divisée par deux lorsque l'extraction est réalisée avec 10 mL. Ceci peut s'expliquer par deux phénomènes : le mélange de sels d'extraction QuEChERS ne contenant que 5 g de Na_2SO_4, l'intégralité des 10 mL d'eau n'est pas absorbé et l'effet de salting-out n'est pas complet, les molécules restant solubilisées dans la phase aqueuse et non transférées dans la phase organique. Il est également possible que l'apport de 10 mL avec 1% d'acide acétique initie une dégradation de certaines molécules, diminuant donc leur signal dans l'extrait. Pour la phase organique, le contraire a été observé (Figure 22). L'augmentation du volume d'ACN favorise l'extraction de 2/3 des composés. L'apport de phase organique

supplémentaire permet un meilleur transfert des composés de la phase aqueuse vers le solvant avec une plus grande solubilisation des analytes.

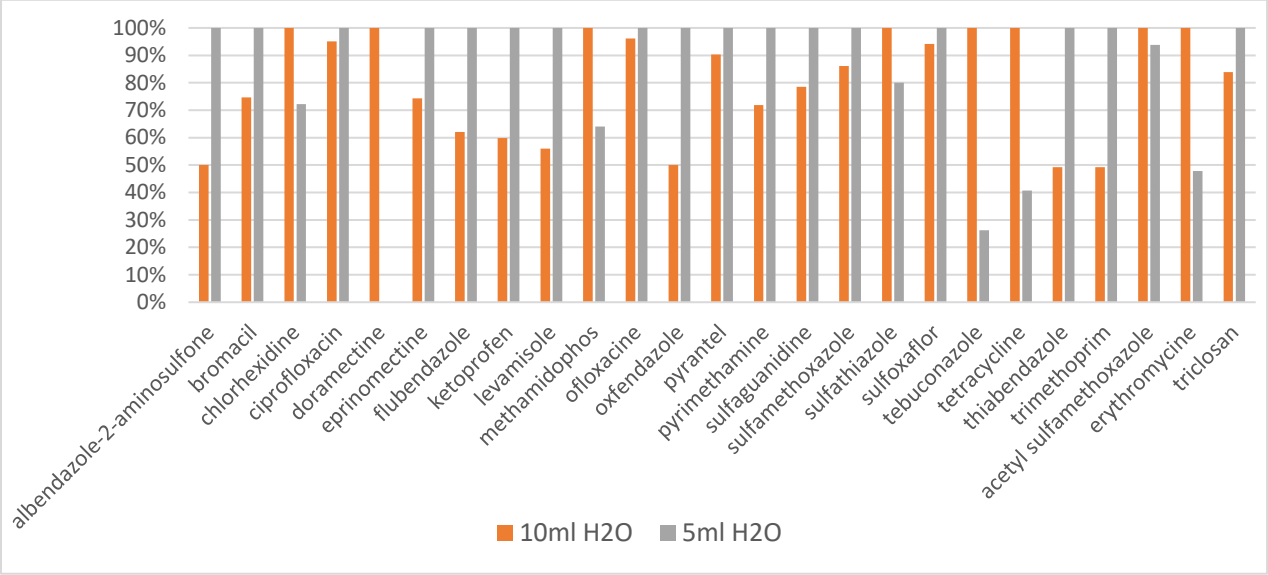


Figure 21 ; Aires normalisées (%) en fonction du volume de phase aqueuse utilisée lors de l'extraction

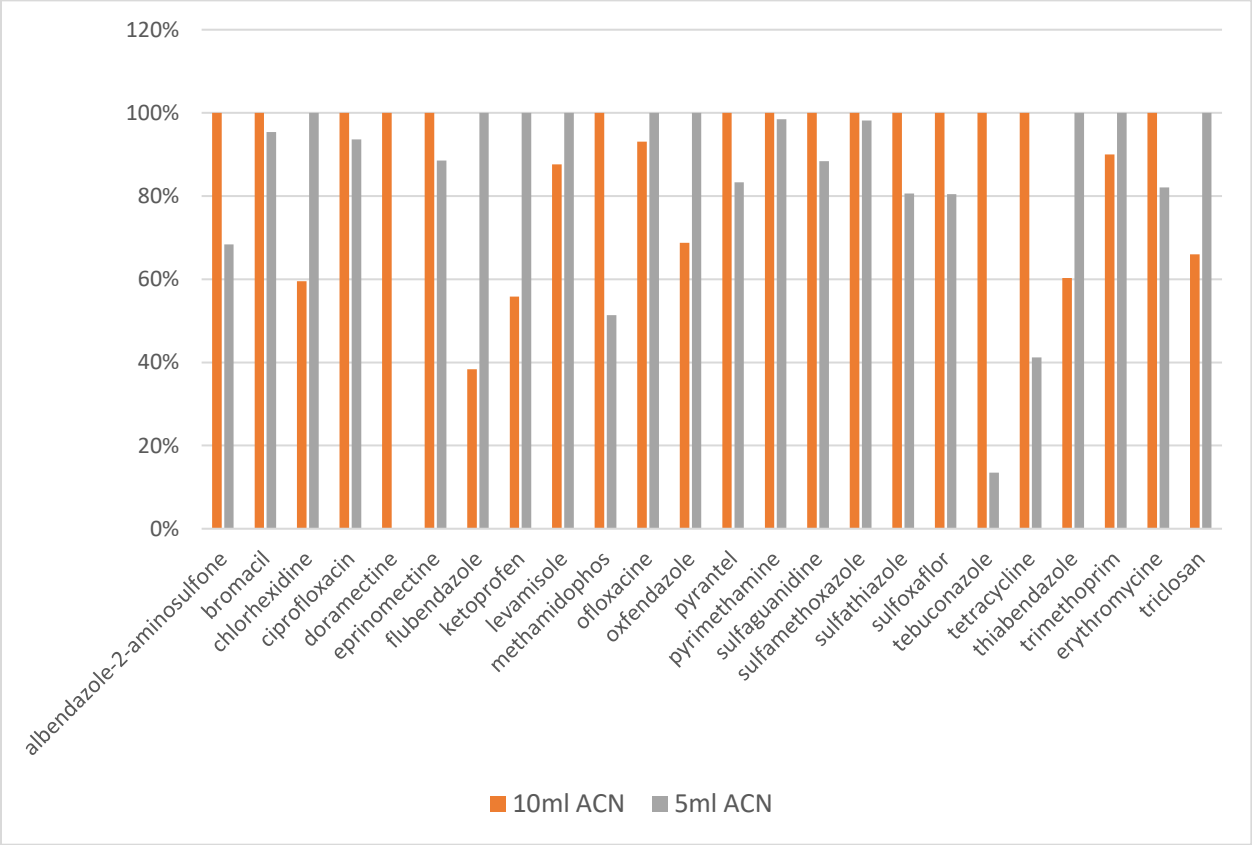


Figure 22 : Aires normalisées (%) en fonction du volume d'acétonitrile ajouté lors de l'extraction

Dans la méthode présentée par Peysson et Vulliet (2013), l'ajout d'acide acétique est effectué dans la phase organique. La comparaison avec l'ajout dans la phase aqueuse a été réalisée. Lors de l'utilisation d'acide acétique dans la phase aqueuse, les rendements d'extraction de 14 composés sont plus élevés que lors de l'ajout dans la phase organique (Figure 23). La phase aqueuse étant plus longuement en contact avec la matrice, l'extraction est favorisée par l'ajout d'acide. En combinant l'action de l'acide et l'ajout d'EDTA, les interactions analyte-matrice sont affaiblies et le transfert des analytes dans la phase liquide est amélioré.

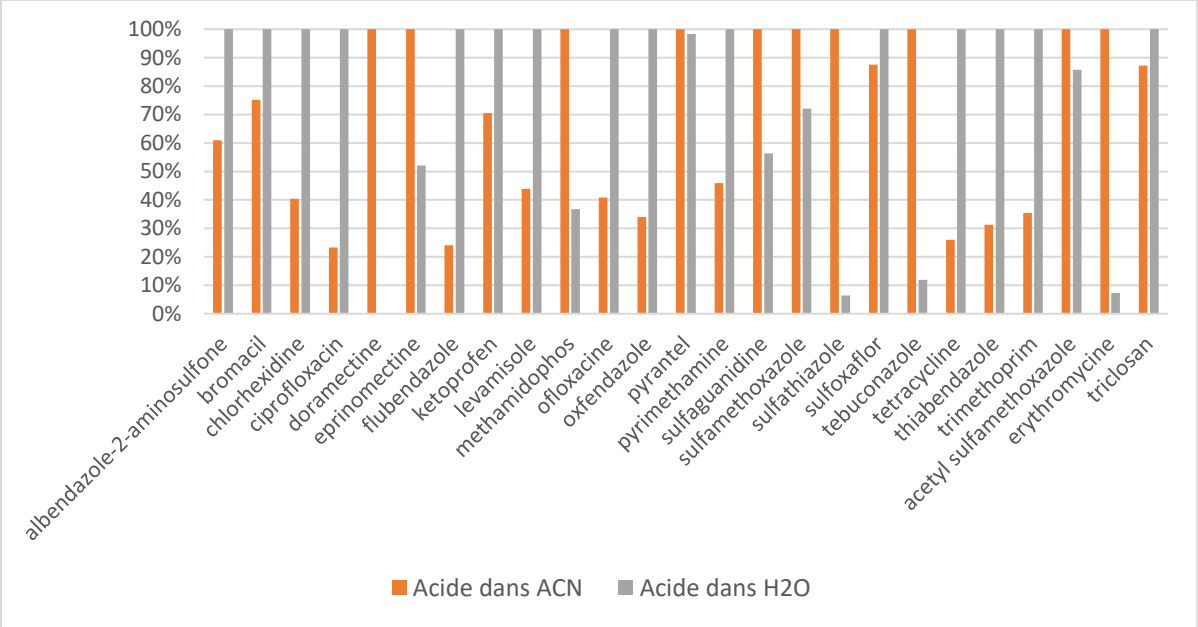


Figure 23 : Aires normalisées (%) en fonction de la phase où est additionné l'acide acétique

La combinaison de tous ces paramètres optimisés permet donc d'obtenir des rendements d'extraction plus élevés. L'extraction est donc réalisée avec 5 mL d'eau contenant 1% d'acide acétique et 0,1M d'EDTA et 10 mL d'acétonitrile.

c. Rendements d'extraction et limites de quantification

Les rendements d'extractions obtenus sont présentés en annexe A. Pour 80% des composés, les rendements d'extractions sont supérieurs à 50%. Seules les fluoroquinolones, les tétracyclines ainsi que leurs métabolites ont des rendements inférieurs à 50%. Ces molécules étant fortement complexées aux cations divalents présents dans la matrice (Carrasquillo et al. 2008; Ferhi et al. 2016), la possibilité d'extraction reste limitée. L'ajout d'EDTA permet la complexation des cations et aide ainsi à la récupération de ces composés dans la phase aqueuse. Ceci explique

également le gain réalisé lors de l'utilisation du mélange d'extraction QuEChERS VET (Figure 19). Dans celui-ci, le $MgSO_4$ habituellement utilisé comme asséchant est remplacé par du Na_2SO_4. Le magnésium divalent est alors remplacé par du sodium monovalent, évitant ainsi la complexation des fluoroquinolones et des tétracyclines(Bourdat-Deschamps et al. 2014).

Pour l'ensemble des molécules sélectionnées dans ce chapitre, les limites de quantification sont comprises entre 0,1 $ng.g^{-1}$ et 50 $ng.g^{-1}$ (Tableau 23). Dans la littérature, les composés vétérinaires les plus souvent quantifiés sont les fluoroquinolones et les tétracyclines. Le Tableau 22 recense quelques limites de quantifications des fluoroquinolones et des tétracyclines dans les boues de STEP. Les limites de quantification atteintes dans cette étude sont du même ordre que celles obtenues lors de l'analyse multi résidus de matrices solides environnementales.

Tableau 22 : Exemple de limites de quantification atteintes dans des boues de STEP avec des méthodes multi résidus

Exemples	Limites de quantification ($ng.g^{-1}$)	Références
Fluoroquinolones et tétracyclines (parmi 136 composés)	3,1 -33,6	(Gago-Ferrero et al. 2015)
Fluoroquinolones (parmi 42 composés)	23,81-47,92	(Riva et al. 2021)
Fluoroquinolones, tétracyclines, sulfonamides (Parmi 14 composés)	0,04-13,78	(Ajibola, Tisler, et Zwiener 2020)
Fluoroquinolones et tétracyclines (7)	0, 8-160	(Lillenberg et al. 2009)
Fluoroquinolones et tétracyclines (5)	5-20	(Salvia, Fieu, et Vulliet 2015)
Fluoroquinolones et tétracyclines (parmi 34 composés)	0,1-50	Cette étude

3. *Application*

Afin d'évaluer les capacités de la méthode, diverses matrices ont été extraites : 1 sol issu du site d'expérimentation, 6 boues issues de la station d'épuration de Bellecombe, 5 lisiers et 2 fumiers. Pour compenser quelques rendements faibles obtenus et les effets matrices inévitables, une quantification par ajouts dosés a été réalisée. Un premier ajout semi-quantitatif a été effectué pour cibler les concentrations des composés présents dans les différentes matrices. Les différents extraits ont ensuite été dopés à 50% et 100% de la concentration précédemment évaluée et la quantification a été réalisée. Les résultats et les limites de quantification sont rapportés dans le Tableau 23.

Dans le sol, la seule molécule quantifiée est la chlorhexidine à 15,6 $ng.g^{-1}$, proche de la limite de quantification de la méthode (12 $ng.g^{-1}$). Dans les boues de STEP, en moyenne, 16 composés ont été quantifiés dans les extraits, avec 11 molécules parents et 5 de leurs métabolites, à différents niveaux de concentrations. Dans les lisiers et fumiers, entre 3 et 7 composés ont pu être détectés, à de faibles niveaux de concentrations (principalement < 10 $ng.g^{-1}$).

Dans le cas où les molécules parentes ont été détectées à des concentrations supérieures à 10 $ng.g^{-1}$ (ofloxacine, tétracycline et flubendazole), leurs métabolites respectifs ont également pu être détectés. Dans le cas de la Tétracycline, la molécule est ainsi retrouvée à 50% sous sa forme épimérisée. Les métabolites de l'ofloxacine et du flubendazole ont été détectés à des concentrations correspondant à 5% et 14% des molécules parentes respectivement.

Tableau 23 : Limites de détection et quantification et concentrations dans les MAFOR

Composé	LOD-LOQ (ng.g^{-1})	Boues (n=6)	Lisiers (n=5)	Fumiers (n=2)
		Min-Moyenne-Max (ng.g^{-1})	Min-Moyenne-Max (ng.g^{-1})	Min-Moyenne-Max (ng.g^{-1})
3-amino-5méthylisoxazole	3.33-10	16,3 - 522,6 - 1495,6	10,3 - 16,9 - 25,9	55,9
Albendazole-2-aminosulfone	0.03-0.1	0,1 - 1 - 2,5	0,1 - 0,6 - 1,2	0,5
Chlorhexidine	4-12	1116,2 - 2350,6 - 5168,9	/	/
Ciprofloxacine	0.33-1	28,3 - 66,8 - 129	/	/
Diméthyldidecyl ammonium	165-500	22612 - 47846 - 98776	/	/
Desméthyl-ofloxacine	0,17-0.5	15,3 - 27,9 - 37,7	/	/
Epitétracycline	0,67-2	18,6 - 30 - 45,9	1,2 - 1,9 - 2,8	1,3 - 1,6 - 1,8
Flubendazole	0,27-0.8	3,2 - 19,0 - 42,3	/	/
Hydroxy-flubendazole	0,17-0.5	1,6 - 2,7 - 4,1	/	/
Kétoprofène	0,1-0.3	1 - 1,4 - 1,7	0,8 - 1,1 - 1,3	0,9
Levamisole	0,2-0.6	1,6 - 6,8 - 13,4	/	/
Ofloxacine	0,33-1	376,6 - 582,4 - 957,7	/	/
Pyrantel	0,03-0.1	1,3 - 4,1 - 9,9	0,1 - 0,8 - 2,0	0,2 - 1,7 - 3,3
Tétracycline	1,83-5.5	17,3 - 29,4 - 43,9	1,0 - 1,7 - 2,9	0,7 - 0,9 - 1,2
Thiabendazole	0,03-0.1	1,2 - 2,4 - 3,5	0,1	/
Triclosan	1,67-5	12,9 - 48,3 - 109,0	/	/

IV. Conclusion

La méthode développée dans ce chapitre permet la quantification de différents antibiotiques dans des matrices solides environnementales. Une première étape de criblage de suspects a été réalisée, comprenant respectivement 160 et 3000 composés, avec deux extractions précédemment développées et validées permettant d'extraire des composés avec une large gamme de polarité. Une première liste de composés d'intérêt a ainsi été établie avec les analytes détectés dans les différents extraits, qui ont ensuite été confirmés/infirmés par ajout des standards analytiques correspondants. Une liste réduite des molécules confirmées a finalement été dressée et certains de leurs métabolites disponibles commercialement ont été ajoutés. Au total, la liste est composée de 24 analytes et 10 métabolites. Une méthode d'extraction QuEChERS et d'analyse par LC-MS/MS a été développée et appliquée à 6 échantillons de boues, 5 lisiers et 2 fumiers. Dans les boues, 16 composés ont ainsi pu être quantifiés à des teneurs allant du $ng.g^{-1}$ pour le thiabendazole au $\mu g.g^{-1}$ pour des composés tels que la chlorhexidine. Tandis que dans les lisiers et fumiers, seulement quelques molécules ont été détectées et quantifiées à des concentrations de l'ordre du $ng.g^{-1}$.

V. Perspectives

Suite à l'emploi de méthodes de criblage de suspects, il a été mis en évidence un grand nombre de faux-positifs et donc la nécessité de confirmer l'intégralité des composés détectés afin de s'assurer réellement de leur présence. Dans le cas d'analyse de matrices complexes telles que les boues de STEP, l'emploi de bases de données s'est avéré limité. En effet, la faible sélectivité de la préparation d'échantillon nécessaire pour la détection d'un maximum de composés et la concentration des extraits entrainent l'apparition de forts effets de matrice, susceptibles d'inhiber la détection de certains composés. Il serait alors nécessaire de développer des extractions multi-étapes plus sélectives à un type de composés (acides et bases par exemple) avec une étape de purification et de recombiner ensuite les différents extraits pour permettre une détection et une identification d'un plus grand nombre de molécules.

La combinaison de différents types d'extractions (QuEChERS et ultrasons par exemple) peut également être une piste afin d'améliorer les rendements d'extraction qui restent faibles, comme pour les fluoroquinolones et les tétracyclines.

L'ajout des produits de dégradation dans les bases de données permettrait également d'en déduire la présence de la molécule parente, même lorsque leurs concentrations ne sont plus détectables lors de l'analyse.

Conclusion générale

L'épandage de MAFORs en tant qu'engrais sur les sols agricoles entraine de nombreuses interrogations quant au transfert des polluants dans l'environnement. Parmi ces micropolluants, les antibiotiques font partie des plus problématiques puisqu'ils peuvent entrainer des phénomènes d'antibiorésistance.

Cette thèse avait pour but de mettre en place des **méthodes d'analyse de composés vétérinaires susceptibles d'être présents dans les matrices environnementales à l'état de traces ou d'ultra-traces.** Nous nous sommes principalement axés sur le développement de méthodes d'extraction et d'analyses pour deux familles d'antibiotiques : **les aminoglycosides et les bêta-lactames.** Ces composés sont à ce jour encore peu analysés dans l'environnement, du fait de leur complexité physicochimique.

Dans un premier temps, une méthode **d'analyse par chromatographie liquide d'appariement d'ions couplée à la spectrométrie de masse en tandem** a été développée pour l'analyse de **10 aminoglycosides dans des influents et effluents de STEP**, en optimisant le choix des sels d'appariement ainsi que les conditions chromatographiques. La nouveauté de ce développement réside dans **l'addition des sels d'appariement directement dans le vial d'injection** et non dans les phases mobiles comme réalisées usuellement. Les limites de quantification atteintes sont comprises entre 0,7 $ng.mL^{-1}$ et 460 $ng.mL^{-1}$. Différents tests d'extractions douces ont ensuite été réalisés afin d'extraire les aminoglycosides dans des matrices solides et ont montré la forte adsorption de ces composés sur les particules solides.

Dans un second temps, une méthode d'extraction fondée sur **la méthodologie QuEChERS** a été développée pour l'analyse de **7 bêta-lactames et un métabolite de l'amoxicilline dans des boues de station d'épuration. Une étape de dispersion de la matrice par ajout de sable a été optimisée et ajoutée avant de réaliser l'extraction assistée par des sels.** Ce développement a permis d'améliorer l'extraction des bêta-lactames tout en diminuant les effets de matrice générés. Une méthode d'analyse en UPLC-MS/MS a également été développée et validée. **Les limites de quantification atteintes avec la combinaison de la méthode**

d'extraction et de la méthode d'analyse sont comprises entre 1,9 ng.g^{-1} et 17,4 ng.g^{-1}. La méthode a ensuite été appliquée sur 8 boues de STEP dans lesquelles la céfapirine et l'amoxicilline-diketopipérazine ont été quantifiées en moyenne à 13,5 ng.g^{-1} et 3,8 ng.g^{-1} respectivement.

Une deuxième méthode d'acquisition pour l'analyse des bêta-lactames a été développée avec le **couplage LC-MRM^3**, afin d'augmenter la sensibilité. Après optimisation, les paramètres d'acquisition (choix du fragment de 2nde génération, durée et énergie de fragmentation, temps d'accumulation) permettent **d'atteindre des limites de quantification comprises entre 0,8 ng.g^{-1} et 14,7 ng.g^{-1}.** La méthode a été validée et il a été montré un gain de spécificité et de sensibilité, permettant **une quantification hautement précise** dans des matrices complexes comme les boues de station d'épuration.

Enfin, **des méthodes de criblages de suspects** ont été appliquées à différentes MAFORs afin d'identifier les composés vétérinaires présents. Une première liste de composés issue du criblage a été établie et la moitié des analytes suspectés ont pu être confirmés. **Différents métabolites ont été ajoutés** à la liste de molécules ciblées et des méthodes d'extraction et de quantification ont ensuite été développées pour l'analyse spécifique de ces composés**. Une extraction QuEChERS et une méthode d'analyse par LC-MS/MS ont été développées et appliqués à des boues, fumiers et lisiers.** Dans les boues, 16 composés ont été quantifiés à des teneurs entre le ng.g^{-1} et le µg.g^{-1} tandis que dans les effluents agricoles, seulement 7 composés ont été déterminés au niveau du ng.g^{-1}.

Grâce aux développements analytiques réalisés et aux résultats obtenus, cette thèse aura permis, dans le cadre du projet RISMEAU, d'améliorer l'évaluation des transferts de résidus médicamenteux dans l'environnement et d'apporter une meilleure compréhension des impacts liés à l'épandage de MAFORs sur les sols agricoles.

Bibliographie

Aceña, Jaume, Serena Stampachiacchiere, Sandra Pérez, et Damià Barceló. 2015. « Advances in Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry for Quantitative and Qualitative Environmental Analysis ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (21): 6289-99. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8852-6.

Adams, E., R. Schepers, L.W. Gathu, R. Kibaya, E. Roets, et J. Hoogmartens. 1997. « Liquid Chromatographic Analysis of a Formulation Containing Polymyxin, Gramicidin and Neomycin ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15 (4): 505-11. https://doi.org/10.1016/S0731-7085(96)01881-X.

Ajibola, Akinranti S., Selina Tisler, et Christian Zwiener. 2020. « Simultaneous Determination of Multiclass Antibiotics in Sewage Sludge Based on QuEChERS Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Analytical Methods* 12 (4): 576-86. https://doi.org/10.1039/C9AY02188D.

Aldeek, Fadi, Daniele Canzani, Matthew Standland, Mark R. Crosswhite, Walter Hammack, Ghislain Gerard, et Jo-Marie Cook. 2016. « Identification of Penicillin G Metabolites under Various Environmental Conditions Using UHPLC-MS/MS ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (31): 6100-6107. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b06150.

Alechaga, Élida, Encarnación Moyano, et M. Teresa Galceran. 2014. « Mixed-Mode Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Aminoglycosides in Meat ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (20): 4941-53. https://doi.org/10.1007/s00216-014-7912-7.

Alekseev, V. G. 2012. « Metal Complexes of Penicillins and Cephalosporins (Review) ». *Pharmaceutical Chemistry Journal* 45 (11): 679-97. https://doi.org/10.1007/s11094-012-0703-6.

Al-Khazrajy, Omar S. A., et Alistair B. A. Boxall. 2017. « Determination of Pharmaceuticals in Freshwater Sediments Using Ultrasonic-Assisted Extraction with SPE Clean-up and HPLC-DAD or LC-ESI-MS/MS Detection ». *Analytical Methods* 9 (28): 4190-4200. https://doi.org/10.1039/C7AY00650K.

Amelin, V. G., et D. S. Bol'shakov. 2019. « Rapid Determination of Aminoglycosides in Milk by Exact Ion Masses Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography–High Resolution Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry ». *Journal of Analytical Chemistry* 74 (S2): S24-32. https://doi.org/10.1134/S1061934819090156.

Anastassiades, Michelangelo, Steven J Lehotay, Darinka Štajnbaher, et Frank J Schenck. 2003. « Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce ». *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 86 (2): 412-31. https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412.

ANSES. 2017. « Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2016 ». https://www.anses.fr/fr/system/files/ANMV-Ra-Antibiotiques2016.pdf.

AOAC International. 2016. « Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements ». http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.

Aparicio, Irene, Julia Martín, Juan Luis Santos, José Luis Malvar, et Esteban Alonso. 2017. « Stir Bar Sorptive Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Determination of Polar and Non-Polar Emerging and Priority Pollutants

in Environmental Waters ». *Journal of Chromatography A* 1500 (juin): 43-52. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.007.

Argüeso-Mata, Manuel. 2021. « Determination of Antibiotics and Other Veterinary Drugs in the Solid Phase of Pig Manure ». *Chemosphere*, 9. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130039.

Arsand, Juliana Bazzan, Rodrigo Barcellos Hoff, Louise Jank, Lucas N. Meirelles, M. Silvia Díaz-Cruz, Tânia Mara Pizzolato, et Damià Barceló. 2018. « Transformation Products of Amoxicillin and Ampicillin after Photolysis in Aqueous Matrices: Identification and Kinetics ». *Science of The Total Environment* 642 (novembre): 954-67. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.122.

Arsand, Juliana Bazzan, Louíse Jank, Magda Targa Martins, Rodrigo Barcellos Hoff, Fabiano Barreto, Tânia Mara Pizzolato, et Carla Sirtori. 2016. « Determination of Aminoglycoside Residues in Milk and Muscle Based on a Simple and Fast Extraction Procedure Followed by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry and Time of Flight Mass Spectrometry ». *Talanta* 154 (juillet): 38-45. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.03.045.

Asakawa, Daichi, Masako Uemura, Takanori Sakiyama, et Testuo Yamano. 2018. « Sensitivity Enhancement of Aminoglycosides in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry by Post-Column Addition of Trace Sodium Acetate in Methanol ». *Food Additives & Contaminants: Part A* 35 (6): 1116-26. https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1388543.

Aydin, Egemen, et Ilhan Talinli. 2013. « Analysis, Occurrence and Fate of Commonly Used Pharmaceuticals and Hormones in the Buyukcekmece Watershed, Turkey ». *Chemosphere* 90 (6): 2004-12. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.074.

Aznar, Ramón, Beatriz Albero, Rosa Ana Pérez, Consuelo Sánchez-Brunete, Esther Miguel, et José L. Tadeo. 2018. « Analysis of Emerging Organic Contaminants in Poultry Manure by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Separation Science* 41 (4): 940-47. https://doi.org/10.1002/jssc.201700883.

Baesu, Anca, Gregory Ballash, Dixie Mollenkopf, Thomas Wittum, S. Mažeika Patricio Sulliván, et Stéphane Bayen. 2021. « Suspect Screening of Pharmaceuticals in Fish Livers Based on QuEChERS Extraction Coupled with High Resolution Mass Spectrometry ». *Science of The Total Environment* 783 (août): 146902. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146902.

Bajkacz, Sylwia, Ewa Felis, Elżbieta Kycia-Słocka, Monika Harnisz, et Ewa Korzeniewska. 2020. « Development of a New SLE-SPE-HPLC-MS/MS Method for the Determination of Selected Antibiotics and Their Transformation Products in Anthropogenically Altered Solid Environmental Matrices ». *Science of The Total Environment* 726 (juillet): 138071. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138071.

Balakrishnan, Vimal K., Kirsten N. Exall, et John M. Toito. 2014. « The Development of a Microwave-Assisted Extraction Method for the Determination of Sulfonamide Antibiotics in Sediments and Soils ». *Canadian Journal of Chemistry* 92 (5): 369-77. https://doi.org/10.1139/cjc-2013-0457.

Bargen, Christoph von, Jens Brockmeyer, et Hans-Ulrich Humpf. 2014. « Meat Authentication: A New HPLC–MS/MS Based Method for the Fast and Sensitive Detection of Horse and Pork in Highly Processed Food ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (39): 9428-35. https://doi.org/10.1021/jf503468t.

Bargen, Christoph von, Jörg Dojahn, Dietmar Waidelich, Hans-Ulrich Humpf, et Jens Brockmeyer. 2013. « New Sensitive High-Performance Liquid Chromatography–

Tandem Mass Spectrometry Method for the Detection of Horse and Pork in Halal Beef ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (49): 11986-94. https://doi.org/10.1021/jf404121b.

Barrey, Emily. 2014. « Aminoglycoside Analysis in Pork Muscle Using Molecularly Imprinted Polymer Cleanup and LC/MS/MS Detection ». *Reporter US* 32.2: 32.

Bauer, Anna, Jens Luetjohann, Sascha Rohn, Jürgen Kuballa, et Eckard Jantzen. 2018. « Ion Chromatography Tandem Mass Spectrometry (IC-MS/MS) Multimethod for the Determination of Highly Polar Pesticides in Plant-Derived Commodities ». *Food Control* 86 (avril): 71-76. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.007.

Bergé, A., A. Buleté, A. Fildier, R. Mailler, J. Gasperi, Y. Coquet, F. Nauleau, V. Rocher, et E. Vulliet. 2018. « Non-Target Strategies by HRMS to Evaluate Fluidized Micro-Grain Activated Carbon as a Tertiary Treatment of Wastewater ». *Chemosphere* 213 (décembre): 587-95. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.101.

Bergé, Alexandre, Barbara Giroud, Laure Wiest, Bruno Domenjoud, Adrianna Gonzalez-Ospina, et Emmanuelle Vulliet. 2016. « Development of a Multiple-Class Analytical Method Based on the Use of Synthetic Matrices for the Simultaneous Determination of Commonly Used Commercial Surfactants in Wastewater by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1450 (juin): 64-75. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.04.078.

Berrada, Houda, Juan C. Moltó, Jordi Mañes, et Guillermina Font. 2010. « Determination of Aminoglycoside and Macrolide Antibiotics in Meat by Pressurized Liquid Extraction and LC-ESI-MS ». *Journal of Separation Science* 33 (4-5): 522-29. https://doi.org/10.1002/jssc.200900682.

Berruga, M.I., A. Molina, R.L. Althaus, et M.P. Molina. 2016. « Control and Prevention of Antibiotic Residues and Contaminants in Sheep and Goat's Milk ». *Small Ruminant Research* 142 (septembre): 38-43. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.023.

Bessaire, Thomas, Claudia Mujahid, Andrea Beck, Adrienne Tarres, Marie-Claude Savoy, Pei-Mun Woo, Pascal Mottier, et Aurélien Desmarchelier. 2018. « Screening of 23 β-Lactams in Foodstuffs by LC–MS/MS Using an Alkaline QuEChERS-like Extraction ». *Food Additives & Contaminants: Part A* 35 (4): 662-74. https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1426891.

Bijleveld, Yuma, Timo de Haan, Jan Toersche, Sona Jorjani, Johanna van der Lee, Floris Groenendaal, Peter Dijk, et al. 2014. « A Simple Quantitative Method Analysing Amikacin, Gentamicin, and Vancomycin Levels in Human Newborn Plasma Using Ion-Pair Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Its Applicability to a Clinical Study ». *Journal of Chromatography B* 951-952 (mars): 110-18. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.035.

Black, Gabrielle P., Tarun Anumol, et Thomas M. Young. 2019. « Analyzing a Broader Spectrum of Endocrine Active Organic Contaminants in Sewage Sludge with High Resolution LC-QTOF-MS Suspect Screening and QSAR Toxicity Prediction ». *Environmental Science: Processes & Impacts* 21 (7): 1099-1114. https://doi.org/10.1039/C9EM00144A.

Bletsou, Anna A., Junho Jeon, Juliane Hollender, Eleni Archontaki, et Nikolaos S. Thomaidis. 2015. « Targeted and Non-Targeted Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Workflows for Identification of Transformation Products of Emerging Pollutants in the Aquatic Environment ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 66 (mars): 32-44. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.11.009.

Bobeldijk, I, J.P.C Vissers, G Kearney, H Major, et J.A van Leerdam. 2001. « Screening and Identification of Unknown Contaminants in Water with Liquid Chromatography and Quadrupole-Orthogonal Acceleration-Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 929 (1-2): 63-74. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01156-6.

Bogialli, Sara, Roberta Curini, Antonio Di Corcia, Aldo Laganà, Monica Mele, et Manuela Nazzari. 2005. « Simple Confirmatory Assay for Analyzing Residues of Aminoglycoside Antibiotics in Bovine Milk: Hot Water Extraction Followed by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1067 (1-2): 93-100. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.033.

Boja, Emily S., et Henry Rodriguez. 2011. « The Path to Clinical Proteomics Research: Integration of Proteomics, Genomics, Clinical Laboratory and Regulatory Science ». *Annals of Laboratory Medicine* 31 (2): 61-71. https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.2.61.

Bourdat-Deschamps, Marjolaine, Sokha Leang, Nathalie Bernet, Jean-Jacques Daudin, et Sylvie Nélieu. 2014. « Multi-Residue Analysis of Pharmaceuticals in Aqueous Environmental Samples by Online Solid-Phase Extraction–Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Optimisation and Matrix Effects Reduction by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Extraction ». *Journal of Chromatography A* 1349 (juillet): 11-23. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.006.

Braschi, I., S. Blasioli, C. Fellet, R. Lorenzini, A. Garelli, M. Pori, et D. Giacomini. 2013. « Persistence and Degradation of New β-Lactam Antibiotics in the Soil and Water Environment ». *Chemosphere* 93 (1): 152-59. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.016.

Bratkowska, D., N. Fontanals, P.A.G. Cormack, F. Borrull, et R.M. Marcé. 2012. « Preparation of a Polar Monolithic Stir Bar Based on Methacrylic Acid and Divinylbenzene for the Sorptive Extraction of Polar Pharmaceuticals from Complex Water Samples ». *Journal of Chromatography A* 1225 (février): 1-7. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.064.

Brenner, Carla G. B., Carlos A. Mallmann, Daniel R. Arsand, Francieli M. Mayer, et Ayrton F. Martins. 2011. « Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent ». *CLEAN - Soil, Air, Water* 39 (1): 28-34. https://doi.org/10.1002/clen.201000162.

Caballero-Casero, Noelia, Gabriela Castro, Michiel Bastiaensen, Celine Gys, Nik van Larebeke, Greet Schoeters, et Adrian Covaci. 2021. « Identification of Chemicals of Emerging Concern in Urine of Flemish Adolescents Using a New Suspect Screening Workflow for LC-QTOF-MS ». *Chemosphere* 280 (octobre): 130683. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130683.

Campbell, J. Larry, Bruce A. Collings, J.C. Yves Le Blanc, et James W. Hager. 2018. « A Novel MS^3 Experiment for Quantifying Ions with a Linear Ion Trap ». *Canadian Journal of Chemistry* 96 (7): 653-63. https://doi.org/10.1139/cjc-2017-0734.

Carrasquillo, Anthony J, Gregory L Bruland, Allison A Mackay, et Dharni Vasudevan. 2008. « Sorption of Ciprofloxacin and Oxytetracycline Zwitterions to Soils and Soil Minerals: Influence of Compound Structure ». *Environmental Science & Technology* 42: 7634-42. https://doi.org/10.1021/es801277y.

Caudron, E, S Baghriche, P Prognon, et D Pradeau. 2012. « Simultaneous Quantification of Gentamicin and Colistin Sulfate in Pharmaceuticals Using Ion-Pairing and Polarity

Gradient Chromatography with Low-UV Detection ». *Chromatographia* 76: 9. https://doi.org/10.1007/s10337-013-2478-7.

Cha, Jongmun, Shinwoo Yang, et Kenneth H. Carlson. 2015. « Occurrence of β-Lactam and Polyether Ionophore Antibiotics in Surface Water, Urban Wastewater, and Sediment ». *Geosystem Engineering* 18 (3): 140-50. https://doi.org/10.1080/12269328.2015.1010658.

Chen, Lei, Meng Mei, et Xiaojia Huang. 2017. « Development of Multiple Monolithic Fiber Solid-Phase Microextraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Sensitive Monitoring of Aminoglycosides in Honey and Milk Samples ». *Journal of Separation Science* 40 (21): 4203-12. https://doi.org/10.1002/jssc.201700795.

Cheng, Chang, Shaorong Liu, Deqing Xiao, et Steven Hansel. 2010. « The Application of Trichloroacetic Acid as an Ion Pairing Reagent in LC–MS–MS Method Development for Highly Polar Aminoglycoside Compounds ». *Chromatographia* 72 (1-2): 133-39. https://doi.org/10.1365/s10337-010-1614-x.

Chiaochan, Chayada, Urairat Koesukwiwat, Soparat Yudthavorasit, et Natchanun Leepipatpiboon. 2010. « Efficient Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Multiclass Analysis of Veterinary Drugs in Chicken Muscle ». *Analytica Chimica Acta* 682 (1-2): 117-29. https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.09.048.

Chiesa, Luca, Maria Nobile, Francesco Arioli, Domenico Britti, Natasa Trutic, Radmila Pavlovic, et Sara Panseri. 2015. « Determination of Veterinary Antibiotics in Bovine Urine by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Food Chemistry* 185 (octobre): 7-15. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.098.

Combes, Audrey, Saïda El Abdellaoui, Cédric Sarazin, Jérome Vial, Annick Mejean, Olivier Ploux, et Valérie Pichon. 2013. « Validation of the Analytical Procedure for the Determination of the Neurotoxin β-N-Methylamino-l-Alanine in Complex Environmental Samples ». *Analytica Chimica Acta* 771 (avril): 42-49. https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.016.

Costa Queiroz, Maria Eugênia, Israel Donizeti de Souza, et Camila Marchioni. 2019. « Current Advances and Applications of In-Tube Solid-Phase Microextraction ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 111 (février): 261-78. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.018.

Dasenaki, Marilena E., Christina S. Michali, et Nikolaos S. Thomaidis. 2016. « Analysis of 76 Veterinary Pharmaceuticals from 13 Classes Including Aminoglycosides in Bovine Muscle by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1452 (juin): 67-80. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.05.031.

De Ruyck, Hendrik, Els Daeseleire, Koen Grijspeerdt, Herman De Ridder, Roland Van Renterghem, et Gerard Huyghebaert. 2001. « Determination of Flubendazole and Its Metabolites in Eggs and Poultry Muscle with Liquid Chromatography−Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (2): 610-17. https://doi.org/10.1021/jf001094z.

Di Rocco, M., M. Moloney, T. O'Beirne, S. Earley, B. Berendsen, A. Furey, et M. Danaher. 2017. « Development and Validation of a Quantitative Confirmatory Method for 30 β-Lactam Antibiotics in Bovine Muscle Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1500 (juin): 121-35. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.022.

Díez, Cristina, Davy Guillarme, Aline Staub Spörri, Emmanuelle Cognard, Didier Ortelli, Patrick Edder, et Serge Rudaz. 2015. « Aminoglycoside Analysis in Food of Animal Origin with a Zwitterionic Stationary Phase and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Analytica Chimica Acta* 882 (juillet): 127-39. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.050.

Dinh, QuocTuc. 2017. « Fate of Antibiotics from Hospital and Domestic Sources in a Sewage Network ». *Science of the Total Environment*, 9.

Direction Générale de l'alimentation. 2012. « Plaquette Plan Ecoantibio ». https://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/130208plaqantibiofr_bd_cle0447e7-1.pdf.

Domingos Alves, Renata, Roberto Romero-González, Rosalía López-Ruiz, M. L. Jiménez-Medina, et Antonia Garrido Frenich. 2016. « Fast Determination of Four Polar Contaminants in Soy Nutraceutical Products by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (28): 8089-98. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9912-2.

Droge, Steven, et Kai-Uwe Goss. 2012. « Effect of Sodium and Calcium Cations on the Ion-Exchange Affinity of Organic Cations for Soil Organic Matter ». *Environmental Science & Technology* 46 (11): 5894-5901. https://doi.org/10.1021/es204449r.

El Hawari, Khaled, Samia Mokh, Samah Doumyati, Mohamad Al Iskandarani, et Eric Verdon. 2017. « Development and Validation of a Multiclass Method for the Determination of Antibiotic Residues in Honey Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Food Additives & Contaminants: Part A* 34 (4): 582-97. https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1232491.

ESVAC. 2011. « Trends in the Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in Nine European Countries, Reporting Period :2005-2009 ». 1.

———. 2019. « Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2017, Trends from 2010 to 2017 ». 9. ESVAC. https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac#annual-report-on-sales-of-veterinary-antibiotics-section.

European Centre for Disease Prevention and Control. 2021. « JIACRA-III-Antimicrobial-Consumption-and-Resistance-in-Bacteria-from-Humans-and-Animals.pdf ». https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/JIACRA-III-Antimicrobial-Consumption-and-Resistance-in-Bacteria-from-Humans-and-Animals.pdf.

European Medicine Agency. 2006. « Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ». *ICH*, 15.

———. s. d. « Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018, Trends from 2010 to 2018 ». 10th. https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf.

Ferhi, Sabrina, Marjolaine Bourdat-Deschamps, Jean-Jacques Daudin, Sabine Houot, et Sylvie Nélieu. 2016. « Factors Influencing the Extraction of Pharmaceuticals from Sewage Sludge and Soil: An Experimental Design Approach ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (22): 6153-68. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9725-3.

Fortin, T., A. Salvador, J. P. Charrier, C. Lenz, F. Bettsworth, X. Lacoux, G. Choquet-Kastylevsky, et J. Lemoine. 2009. « Multiple Reaction Monitoring Cubed for Protein Quantification at the Low Nanogram/Milliliter Level in Nondepleted Human Serum ». *Analytical Chemistry* 81 (22): 9343-52. https://doi.org/10.1021/ac901447h.

Francesquett, Janice Z., Tiele M. Rizzetti, Tito R.S. Cadaval, Osmar D. Prestes, Martha B. Adaime, et Renato Zanella. 2019. « Simultaneous Determination of the Quaternary Ammonium Pesticides Paraquat, Diquat, Chlormequat, and Mepiquat in Barley and Wheat Using a Modified Quick Polar Pesticides Method, Diluted Standard Addition Calibration and Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1592 (mai): 101-11. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.060.

Gago-Ferrero, Pablo, Viola Borova, Marilena E. Dasenaki, et Nikolaos S. Thomaidis. 2015. « Simultaneous Determination of 148 Pharmaceuticals and Illicit Drugs in Sewage Sludge Based on Ultrasound-Assisted Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (15): 4287-97. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8540-6.

Gajda, Anna, Ewelina Nowacka-Kozak, Malgorzata Gbylik-Sikorska, et Andrzej Posyniak. 2019. « Multi-Residues UHPLC–MS/MS Analysis of 53 Antibacterial Compounds in Poultry Feathers as an Analytical Tool in Food Safety Assurance ». *Journal of Chromatography B* 1104 (janvier): 182-89. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.11.020.

García-Galán, María Jesús, Silvia Díaz-Cruz, et Damià Barceló. 2013. « Multiresidue Trace Analysis of Sulfonamide Antibiotics and Their Metabolites in Soils and Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction Followed by Liquid Chromatography–Electrospray-Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1275 (février): 32-40. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.004.

Garcia-Rodríguez, Aida, Ester Sagristà, Víctor Matamoros, Clàudia Fontàs, Manuela Hidalgo, et Victòria Salvadó. 2014. « Determination of Pharmaceutical Compounds in Sewage Sludge Using a Standard Addition Method Approach ». *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 94 (12): 1199-1209. https://doi.org/10.1080/03067319.2014.921292.

García-Valcárcel, Ana Isabel, et José Luis Tadeo. 2009. « A Combination of Ultrasonic Assisted Extraction with LC–MS/MS for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Sludge ». *Analytica Chimica Acta* 641 (1-2): 117-23. https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.03.046.

Geis-Asteggiante, Lucía, Steven J. Lehotay, Alan R. Lightfield, Terry Dutko, Chilton Ng, et Louis Bluhm. 2012. « Ruggedness Testing and Validation of a Practical Analytical Method for >100 Veterinary Drug Residues in Bovine Muscle by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1258 (octobre): 43-54. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.020.

Gilart, Núria, P.A.G. Cormack, Rosa Maria Marcé, Francesc Borrull, et Núria Fontanals. 2013. « Preparation of a Polar Monolithic Coating for Stir Bar Sorptive Extraction of Emerging Contaminants from Wastewaters ». *Journal of Chromatography A* 1295 (juin): 42-47. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.067.

Gilart, Núria, Rosa Maria Marcé, Francesc Borrull, et Núria Fontanals. 2014. « New Coatings for Stir-Bar Sorptive Extraction of Polar Emerging Organic Contaminants ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 54 (février): 11-23. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.10.010.

Gilart, Núria, Núria Miralles, Rosa Maria Marcé, Francesc Borrull, et Núria Fontanals. 2013. « Novel Coatings for Stir Bar Sorptive Extraction to Determine Pharmaceuticals and Personal Care Products in Environmental Waters by Liquid Chromatography and

Tandem Mass Spectrometry ». *Analytica Chimica Acta* 774 (avril): 51-60. https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.010.

Gilbertson, Terry J., Rex E. Hornish, Prem S. Jaglan, K. Thomas Koshy, John L. Nappier, Gerald L. Stahl, Alex R. Cazers, Jean M. Nappier, et Marc F. Kubicek. 1990. « Environmental Fate of Ceftiofur Sodium, a Cephalosporin Antibiotic. Role of Animal Excreta in Its Decomposition ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38 (3): 890-94. https://doi.org/10.1021/jf00093a064.

Glinka, Marta, Wojciech Wojnowski, et Andrzej Wasik. 2020. « Determination of Aminoglycoside Antibiotics: Current Status and Future Trends ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 131 (octobre): 116034. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116034.

Goessens, T., S. Huysman, N. De Troyer, A. Deknock, P. Goethals, L. Lens, L. Vanhaecke, et S. Croubels. 2020. « Multi-Class Analysis of 46 Antimicrobial Drug Residues in Pond Water Using UHPLC-Orbitrap-HRMS and Application to Freshwater Ponds in Flanders, Belgium ». *Talanta* 220 (décembre): 121326. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121326.

Gómez, M.J., M.M. Gómez-Ramos, O. Malato, M. Mezcua, et A.R. Férnandez-Alba. 2010. « Rapid Automated Screening, Identification and Quantification of Organic Micro-Contaminants and Their Main Transformation Products in Wastewater and River Waters Using Liquid Chromatography–Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry with an Accurate-Mass Database ». *Journal of Chromatography A* 1217 (45): 7038-54. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.070.

Gorissen, Brecht, Tim Reyns, Mathias Devreese, Patrick De Backer, Joris Van Loco, et Siska Croubels. 2015. « Determination of Selected Veterinary Antimicrobials in Poultry Excreta by UHPLC-MS/MS, for Application in Salmonella Control Programs ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (15): 4447-57. https://doi.org/10.1007/s00216-014-8449-5.

Goulas, Anaïs, Claire-Sophie Haudin, Valérie Bergheaud, Valérie Dumény, Sabrina Ferhi, Sylvie Nélieu, Marjolaine Bourdat-Deschamps, et Pierre Benoit. 2016. « A New Extraction Method to Assess the Environmental Availability of Ciprofloxacin in Agricultural Soils Amended with Exogenous Organic Matter ». *Chemosphere* 165 (décembre): 460-69. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.040.

Goulas, Anaïs, Nicolas Sertillanges, Khaled Brimo, Patricia Garnier, Valérie Bergheaud, Valérie Dumény, Pierre Benoit, et Claire-Sophie Haudin. 2019. « Environmental Availability of Sulfamethoxazole and Its Acetylated Metabolite Added to Soils via Sludge Compost or Bovine Manure ». *Science of The Total Environment* 651 (février): 506-15. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.100.

Gozlan, Igal, Adi Rotstein, et Dror Avisar. 2013. « Amoxicillin-Degradation Products Formed under Controlled Environmental Conditions: Identification and Determination in the Aquatic Environment ». *Chemosphere* 91 (7): 985-92. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.095.

Gremilogianni, Aikaterini M., Nikolaos C. Megoulas, et Michael A. Koupparis. 2010. « Hydrophilic Interaction vs Ion Pair Liquid Chromatography for the Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk Based on Mass Spectrometric Detection ». *Journal of Chromatography A* 1217 (43): 6646-51. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.059.

Gros, Meritxell, Sara Rodríguez-Mozaz, et Damià Barceló. 2013. « Rapid Analysis of Multiclass Antibiotic Residues and Some of Their Metabolites in Hospital, Urban

Wastewater and River Water by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1292 (mai): 173-88. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.072.

Grujić, Svetlana, Tatjana Vasiljević, et Mila Laušević. 2009. « Determination of Multiple Pharmaceutical Classes in Surface and Ground Waters by Liquid Chromatography–Ion Trap–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1216 (25): 4989-5000. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.059.

Guironnet, Alexandre, Laure Wiest, et Emmanuelle Vulliet. 2021. « Improvement of the QuEChERS Extraction Step by Matrix-Dispersion Effect and Application on Beta-Lactams Analysis in Wastewater Sludge by LC-MS/MS ». *Talanta*, octobre, 122923. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122923.

Guo, Chunna, Mingru Wang, Hui Xiao, Binbin Huai, Feng Wang, Guangfang Pan, Xiaoping Liao, et Yahong Liu. 2016. « Development of a Modified QuEChERS Method for the Determination of Veterinary Antibiotics in Swine Manure by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography B* 1027 (août): 110-18. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.05.034.

Gustavsson, Sven Åke, Jenny Samskog, Karin E. Markides, et Bengt Långström. 2001. « Studies of Signal Suppression in Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using Volatile Ion-Pairing Reagents ». *Journal of Chromatography A* 937 (1-2): 41-47. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01328-0.

Hammel, Yves-Alexis, Rayane Mohamed, Eric Gremaud, Marie-Hélène LeBreton, et Philippe A. Guy. 2008. « Multi-Screening Approach to Monitor and Quantify 42 Antibiotic Residues in Honey by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1177 (1): 58-76. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.112.

Han, R.W., N. Zheng, Z.N. Yu, J. Wang, X.M. Xu, X.Y. Qu, S.L. Li, Y.D. Zhang, et J.Q. Wang. 2015. « Simultaneous Determination of 38 Veterinary Antibiotic Residues in Raw Milk by UPLC–MS/MS ». *Food Chemistry* 181 (août): 119-26. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.041.

Han, Yongtao, Le Song, Pengyue Zhao, Yanjie Li, Nan Zou, Yuhong Qin, Xuesheng Li, et Canping Pan. 2016. « Residue Determination of Glufosinate in Plant Origin Foods Using Modified Quick Polar Pesticides (QuPPe) Method and Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry ». *Food Chemistry* 197 (avril): 730-36. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.021.

Herrera-Herrera, Antonio V., Javier Hernández-Borges, María M. Afonso, J. Antonio Palenzuela, et Miguel Ángel Rodríguez-Delgado. 2013. « Comparison between Magnetic and Non Magnetic Multi-Walled Carbon Nanotubes-Dispersive Solid-Phase Extraction Combined with Ultra-High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Sulfonamide Antibiotics in Water Samples ». *Talanta* 116 (novembre): 695-703. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.07.060.

Hess, Cornelius, Natalie Ritke, Sebastian Broecker, Burkhard Madea, et Frank Musshoff. 2013. « Metabolism of Levamisole and Kinetics of Levamisole and Aminorex in Urine by Means of LC-QTOF-HRMS and LC-QqQ-MS ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (12): 4077-88. https://doi.org/10.1007/s00216-013-6829-x.

Hidalgo-Ruiz, José L., Roberto Romero-González, José Luis Martínez Vidal, et Antonia Garrido Frenich. 2021. « Monitoring of Polar Pesticides and Contaminants in Edible Oils and Nuts by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Food Chemistry* 343 (mai): 128495. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128495.

Hirte, Kristin, Bettina Seiwert, Gerrit Schüürmann, et Thorsten Reemtsma. 2016. « New Hydrolysis Products of the Beta-Lactam Antibiotic Amoxicillin, Their PH-Dependent Formation and Search in Municipal Wastewater ». *Water Research* 88 (janvier): 880-88. https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.028.

Ho, Y.B., Mohamad Pauzi Zakaria, Puziah Abdul Latif, et Nazamid Saari. 2012. « Simultaneous Determination of Veterinary Antibiotics and Hormone in Broiler Manure, Soil and Manure Compost by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1262 (novembre): 160-68. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.09.024.

Hoff, Rodrigo Barcellos, et Tânia Mara Pizzolato. 2018. « Combining Extraction and Purification Steps in Sample Preparation for Environmental Matrices: A Review of Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) and Pressurized Liquid Extraction (PLE) Applications ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 109 (décembre): 83-96. https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.002.

Hu, Cong, Man He, Beibei Chen, et Bin Hu. 2015. « Simultaneous Determination of Polar and Apolar Compounds in Environmental Samples by a Polyaniline/Hydroxyl Multi-Walled Carbon Nanotubes Composite-Coated Stir Bar Sorptive Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography ». *Journal of Chromatography A* 1394 (mai): 36-45. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.046.

Huang, Xiaojia, Yulei Wang, Yi Liu, et Dongxing Yuan. 2013. « Preparation of Magnetic Poly(Vinylimidazole- *Co* -Divinylbenzene) Nanoparticles and Their Application in the Trace Analysis of Fluoroquinolones in Environmental Water Samples: Sample Preparation ». *Journal of Separation Science* 36 (19): 3210-19. https://doi.org/10.1002/jssc.201300355.

Huibers, P.D.T., V.S. Lobanov, A.R. Katritzky, D.O. Shah, et M. Karelson. 1997. « Prediction of Critical Micelle Concentration Using a Quantitative Structure–Property Relationship Approach ». *Journal of Colloid and Interface Science* 187 (1): 113-20. https://doi.org/10.1006/jcis.1996.4680.

Ianni, Federica, Lucia Pucciarini, Andrea Carotti, Giorgio Saluti, Simone Moretti, Vincenzo Ferrone, Roccaldo Sardella, Roberta Galarini, et Benedetto Natalini. 2018. « Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography of Aminoglycoside Antibiotics with a Diol-Type Stationary Phase ». *Analytica Chimica Acta* 1044 (décembre): 174-80. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.008.

Ibáñez, María, Juan V. Sancho, Félix Hernández, Daniel McMillan, et Ramesh Rao. 2008. « Rapid Non-Target Screening of Organic Pollutants in Water by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled to Time-of-Light Mass Spectrometry ». *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27 (5): 481-89. https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.03.007.

Jabot, Claire, Gaëlle Daniele, Barbara Giroud, Sylvie Tchamitchian, Luc P. Belzunces, Hervé Casabianca, et Emmanuelle Vulliet. 2016. « Detection and Quantification of Boscalid and Its Metabolites in Honeybees ». *Chemosphere* 156 (août): 245-51. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.04.135.

Jacobsen, Anne Marie, Bent Halling-Sørensen, Flemming Ingerslev, et Steen Honoré Hansen. 2004. « Simultaneous Extraction of Tetracycline, Macrolide and Sulfonamide Antibiotics from Agricultural Soils Using Pressurised Liquid Extraction, Followed by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1038 (1-2): 157-70. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.03.034.

Jafari Ozumchelouei, Elnaz, Amir Hossein Hamidian, Yu Zhang, et Min Yang. 2020. « Physicochemical Properties of Antibiotics: A Review with an Emphasis on Detection in the Aquatic Environment ». *Water Environment Research* 92 (2): 177-88. https://doi.org/10.1002/wer.1237.

Jaffuel, Aurore, Jerôme Lemoine, Catherine Aubert, Romain Simon, Jean-François Léonard, Jean-Charles Gautier, Olivier Pasquier, et Arnaud Salvador. 2013. « Optimization of Liquid Chromatography–Multiple Reaction Monitoring Cubed Mass Spectrometry Assay for Protein Quantification: Application to Aquaporin-2 Water Channel in Human Urine ». *Journal of Chromatography A* 1301 (août): 122-30. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.068.

Jeudy, Jeremy, Arnaud Salvador, Romain Simon, Aurore Jaffuel, Catherine Fonbonne, Jean-François Léonard, Jean-Charles Gautier, Olivier Pasquier, et Jerome Lemoine. 2014. « Overcoming Biofluid Protein Complexity during Targeted Mass Spectrometry Detection and Quantification of Protein Biomarkers by MRM Cubed (MRM3) ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (4): 1193-1200. https://doi.org/10.1007/s00216-013-7266-6.

Joseph, Arul, et Abu Rustum. 2010. « Development and Validation of a RP-HPLC Method for the Determination of Gentamicin Sulfate and Its Related Substances in a Pharmaceutical Cream Using a Short Pentafluorophenyl Column and a Charged Aerosol Detector ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51 (3): 521-31. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.002.

Kanu, A Bakarr. 2021. « Recent Developments in Sample Preparation Techniques Combined with High-Performance Liquid Chromatography: A Critical Review ». *Journal of Chromatography A* 1654 (septembre): 462444. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462444.

Katz, Jack M, et Stanley E Katz. 1983. « Microbial Assay Systems for Determining Antibiotic Residues in Soils ». *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 66 (3): 640-45. https://doi.org/10.1093/jaoac/66.3.640.

Kim, Sung-Woo, Md. Musfiqur Rahman, A. M. Abd El-Aty, Md. Humayun Kabir, Tae Woong Na, Jeong-Heui Choi, Ho-Chul Shin, et Jae-Han Shim. 2017. « Simultaneous Detection of Sulfoxaflor and Its Metabolites, X11719474 and X11721061, in Lettuce Using a Modified QuEChERS Extraction Method and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Residue Analysis of Sulfoxaflor and Its Metabolites in Lettuce ». *Biomedical Chromatography* 31 (6): e3885. https://doi.org/10.1002/bmc.3885.

Korte, Robin, et Jens Brockmeyer. 2016. « MRM3-Based LC-MS Multi-Method for the Detection and Quantification of Nut Allergens ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (27): 7845-55. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9888-y.

Korte, Robin, Jean-Marc Monneuse, Elodie Gemrot, Isabelle Metton, Hans-Ulrich Humpf, et Jens Brockmeyer. 2016. « New High-Performance Liquid Chromatography Coupled Mass Spectrometry Method for the Detection of Lobster and Shrimp Allergens in Food Samples via Multiple Reaction Monitoring and Multiple Reaction Monitoring Cubed ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64 (31): 6219-27. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02620.

Kumar, Praveen, Antoni Rubies, Ramon Companyo, et Francese Centrich. 2012. « Determination of Aminoglycoside Residues in Kidney and Honey Samples by Hydrophilic Interaction Chromatography-tandem Mass Spectrometry ». *J. Sep. Sci.* 35 (20): 8. https://doi.org/10.1002/jddc.20120344.

L'Assurance Maladie. 2011. « Les antibiotiques : pourquoi si on les utilise à tort, ils deviendront moins forts? », juin, 9.

Lehotay, Steven J, Collaborators:, Mary O'Neil, Josée Tully, Antonio Valverde García, Mariano Contreras, Hans Mol, et al. 2007. « Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study ». *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 90 (2): 485-520. https://doi.org/10.1093/jaoac/90.2.485.

Lehotay, Steven J., et Alan R. Lightfield. 2018. « Simultaneous Analysis of Aminoglycosides with Many Other Classes of Drug Residues in Bovine Tissues by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Using an Ion-Pairing Reagent Added to Final Extracts ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (3): 1095-1109. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0688-9.

Lemoine, Jérôme, Tanguy Fortin, Arnaud Salvador, Aurore Jaffuel, Jean-Philippe Charrier, et Geneviève Choquet-Kastylevsky. 2012. « The Current Status of Clinical Proteomics and the Use of MRM and MRM ^{3} for Biomarker Validation ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 12 (4): 333-42. https://doi.org/10.1586/erm.12.32.

Li, Bing, et Tong Zhang. 2010. « Biodegradation and Adsorption of Antibiotics in the Activated Sludge Process ». *Environmental Science & Technology* 44 (9): 3468-73. https://doi.org/10.1021/es903490h.

Li, Xiaolin, Wei Zheng, Michael L. Machesky, Scott R. Yates, et Michael Katterhenry. 2011. « Degradation Kinetics and Mechanism of Antibiotic Ceftiofur in Recycled Water Derived from a Beef Farm ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (18): 10176-81. https://doi.org/10.1021/jf202325c.

Li, Xinghua, Zhendong Yin, Yijing Zhai, Weijun Kang, Hongmei Shi, et Zengning Li. 2020. « Magnetic Solid-Phase Extraction of Four β-Lactams Using Polypyrrole-Coated Magnetic Nanoparticles from Water Samples by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Analysis ». *Journal of Chromatography A* 1610 (janvier): 460541. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460541.

Li, Yan-ni, Yan-yun Hu, Lei Ding, Dian-bing Zhou, et Wen-jun Chen. 2021. « Detection of Tetracycline Antibiotics in Water by Dispersive Micro-Solid Phase Extraction Using Fe_3O_4@[$Cu_3(Btc)_2$] Magnetic Composite Combined with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Chinese Journal of Chemical Physics* 34 (2): 238-48. https://doi.org/10.1063/1674-0068/cjcp2004046.

Lillenberg, Merike, Sergei Yurchenko, Karin Kipper, Koit Herodes, Viljar Pihl, Kalev Sepp, Rünno Lõhmus, et Lembit Nei. 2009. « Simultaneous Determination of Fluoroquinolones, Sulfonamides and Tetracyclines in Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization-Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1216 (32): 5949-54. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.029.

Liu, Cheng, Yingmin Liao, et Xiaojia Huang. 2016. « Preparation of a Boronic Acid Functionalized Magnetic Adsorbent for Sensitive Analysis of Fluoroquinolones in Environmental Water Samples ». *Analytical Methods* 8 (23): 4744-54. https://doi.org/10.1039/C6AY00903D.

Liu, Zihe, Yuancai Chen, et Yongyou Hu. 2020. « Simultaneous Separation and Determination of Seven Chelating Agents Using High-performance Liquid Chromatography Based on Statistics Design ». *Journal of Separation Science* 43 (4): 719-26. https://doi.org/10.1002/jssc.201900707.

Llorca, Marta, Daniel Lucas, Laura Ferrando-Climent, Marina Badia-Fabregat, Carles Cruz-Morató, Damià Barceló, et Sara Rodríguez-Mozaz. 2016. « Suspect Screening of Emerging Pollutants and Their Major Transformation Products in Wastewaters Treated with Fungi by Liquid Chromatography Coupled to a High Resolution Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1439 (mars): 124-36. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.077.

Locatelli, Marco Antonio F, Fernando F Sodre, et Wilson F Jardim. 2011. « Determination of Antibiotics in Brazilian Surface Waters Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry ». *Arch Environ Contam Toxicol*, 9.

Löffler, Dirk, et Thomas A. Ternes. 2003. « Analytical Method for the Determination of the Aminoglycoside Gentamicin in Hospital Wastewater via Liquid Chromatography–Electrospray-Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1000 (1-2): 583-88. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00059-1.

Lu, Xinbo, Huabin Xing, Baogen Su, et Qilong Ren. 2008. « Effect of Buffer Solution and Temperature on the Stability of Penicillin G ». *Journal of Chemical & Engineering Data* 53 (2): 543-47. https://doi.org/10.1021/je7006378.

Lucas, D. 2016. « Fungal Treatment for the Removal of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Veterinary Hospital Wastewater ». *Chemosphere*, 8. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.113.

Łukaszewicz, Paulina, Jolanta Kumirska, Anna Białk-Bielińska, Joanna Dołżonek, et Piotr Stepnowski. 2017. « Assessment of Soils Contamination with Veterinary Antibiotic Residues in Northern Poland Using Developed MAE-SPE-LC/MS/MS Methods ». *Environmental Science and Pollution Research* 24 (26): 21233-47. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9757-z.

Lumaret, Jean-Pierre. 2013. « Antiparasitics and Their Impact on Soil and Dung Fauna ». Présenté à International UBA Workshop « Pharmaceuticals in Soil,Sludge and Slurry », Dessay.

Lutz, F., et J. Alber. 2004. « Zur Bewertung von Arzneimittelrückständen im Festmist von Veterinärkliniken: Eine Literaturauswertung ». *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere* 32 (04): 180-90. https://doi.org/10.1055/s-0038-1623557.

Lv, Shencong, Henghui Wang, Yong Yan, Miaohua Ge, et Jian Guan. 2020. « Quantification and Confirmation of Four Aflatoxins Using a LC–MS/MS QTRAP System in Multiple Reaction Monitoring, Enhanced Product Ion Scan, and MS ^{3} Modes ». *European Journal of Mass Spectrometry* 26 (1): 63-77. https://doi.org/10.1177/1469066719866050.

Maia, Alexandra S., Ana R. Ribeiro, Catarina L. Amorim, Juliana C. Barreiro, Quezia B. Cass, Paula M.L. Castro, et Maria Elizabeth Tiritan. 2014. « Degradation of Fluoroquinolone Antibiotics and Identification of Metabolites/Transformation Products by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1333 (mars): 87-98. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.069.

Majewsky, Marius, Thomas Glauner, et Harald Horn. 2015. « Systematic Suspect Screening and Identification of Sulfonamide Antibiotic Transformation Products in the Aquatic Environment ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (19): 5707-17. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8748-5.

Malvar, José Luis, Juan Luis Santos, Julia Martín, Irene Aparicio, et Esteban Alonso. 2020. « Comparison of Ultrasound-Assisted Extraction, QuEChERS and Selective Pressurized Liquid Extraction for the Determination of Metabolites of Parabens and

Pharmaceuticals in Sludge ». *Microchemical Journal* 157 (septembre): 104987. https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104987.

Mandaric, Ladislav, Elena Diamantini, Elisa Stella, Karina Cano-Paoli, Jennifer Valle-Sistac, Daniel Molins-Delgado, Alberto Bellin, et al. 2017. « Contamination Sources and Distribution Patterns of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Alpine Rivers Strongly Affected by Tourism ». *Science of The Total Environment* 590-591 (juillet): 484-94. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.185.

Manzano-Sánchez, Lorena, José Antonio Martínez-Martínez, Irene Domínguez, José Luis Martínez Vidal, Antonia Garrido Frenich, et Roberto Romero-González. 2020. « Development and Application of a Novel Pluri-Residue Method to Determine Polar Pesticides in Fruits and Vegetables through Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry ». *Foods* 9 (5): 553. https://doi.org/10.3390/foods9050553.

Margoum, Christelle, Céline Guillemain, Xi Yang, et Marina Coquery. 2013. « Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Pesticides in Water Samples: Method Validation and Measurement Uncertainty ». *Talanta* 116 (novembre): 1-7. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.066.

Martín, Julia, Juan Luis Santos, Irene Aparicio, et Esteban Alonso. 2010. « Multi-Residue Method for the Analysis of Pharmaceutical Compounds in Sewage Sludge, Compost and Sediments by Sonication-Assisted Extraction and LC Determination: Liquid Chromatography ». *Journal of Separation Science* 33 (12): 1760-66. https://doi.org/10.1002/jssc.200900873.

Martínez-Piernas, A.B., P. Plaza-Bolaños, E. García-Gómez, P. Fernández-Ibáñez, et A. Agüera. 2018. « Determination of Organic Microcontaminants in Agricultural Soils Irrigated with Reclaimed Wastewater: Target and Suspect Approaches ». *Analytica Chimica Acta* 1030 (novembre): 115-24. https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.05.049.

Marzo, Antonio, et Lorenzo Dal Bo. 1998. « Chromatography as an Analytical Tool for Selected Antibiotic Classes: A Reappraisal Addressed to Pharmacokinetic Applications ». *Journal of Chromatography A* 812 (1-2): 17-34. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00282-9.

McCalley, David V. 2017. « Understanding and Manipulating the Separation in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography ». *Journal of Chromatography A* 1523 (novembre): 49-71. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.026.

Melton, Laura M., Michael J. Taylor, et Emily E. Flynn. 2019. « The Utilisation of Ion Chromatography and Tandem Mass Spectrometry (IC-MS/MS) for the Multi-Residue Simultaneous Determination of Highly Polar Anionic Pesticides in Fruit and Vegetables ». *Food Chemistry* 298 (novembre): 125028. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125028.

Menger, Frank, Gustaf Boström, Ove Jonsson, Lutz Ahrens, Karin Wiberg, Jenny Kreuger, et Pablo Gago-Ferrero. 2021. « Identification of Pesticide Transformation Products in Surface Water Using Suspect Screening Combined with National Monitoring Data ». *Environmental Science & Technology* 55 (15): 10343-53. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00466.

Merdoud, Ouarda, Claudio Cameselle, Mohamed Oualid Boulakradeche, et Djamal Eddine Akretche. 2016. « Removal of Heavy Metals from Contaminated Soil by Electrodialytic Remediation Enhanced with Organic Acids ». *Environmental Science: Processes & Impacts* 18 (11): 1440-48. https://doi.org/10.1039/C6EM00380J.

Mičová, K., D. Friedecký, E. Faber, et T. Adam. 2012. « Isotope Dilution Direct Injection Mass Spectrometry Method for Determination of Four Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Plasma ». *Talanta* 93 (mai): 307-13. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.038.

Ministère de l'agriculture,de l'agroalimantaire et de la forêt. 2017. « Ecoantibio^2 : Plan national de réduction des risque d'antibiorésitance en médecine vétérianire (2017-2021) ». https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecoantibio-2-2017-2021.

Mitchell, Shannon M., Jeffrey L. Ullman, Amy L. Teel, et Richard J. Watts. 2014. « PH and Temperature Effects on the Hydrolysis of Three β-Lactam Antibiotics: Ampicillin, Cefalotin and Cefoxitin ». *Science of The Total Environment* 466-467 (janvier): 547-55. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.027.

Mokh, Samia, Khaled El Hawari, Rania Nassar, Hélène Budzinski, et Mohamad Al Iskandarani. 2015. « Optimization of a Solid-Phase Extraction Method for the Determination of 12 Aminoglycosides in Water Samples Using LC–ESI–MS/MS ». *Chromatographia* 78 (9-10): 631-40. https://doi.org/10.1007/s10337-015-2877-z.

Mokh, Samia, Farouk Jaber, Abir Kouzayha, Hélène Budzinski, et Mohamad Al Iskandarani. 2014. « Optimization and Comparisons for Separation, Detection and Quantification of 12 Aminoglycosides Using 2 Chromatographic Conditions by LC-MS/MS ». *American Journal of Analytical Chemistry* 05 (14): 982-94. https://doi.org/10.4236/ajac.2014.514105.

Moreno-González, David, Ahmed M. Hamed, Ana M. García-Campaña, et Laura Gámiz-Gracia. 2017. « Evaluation of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry and Extraction with Molecularly Imprinted Polymers for Determination of Aminoglycosides in Milk and Milk-Based Functional Foods ». *Talanta* 171 (août): 74-80. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.062.

Nieto, Antonio, Francesc Borrull, Rosa Maria Marcé, et Eva Pocurull. 2007. « Selective Extraction of Sulfonamides, Macrolides and Other Pharmaceuticals from Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction ». *Journal of Chromatography A* 1174 (1-2): 125-31. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.068.

Oertel, R., V. Neumeister, et W. Kirch. 2004. « Hydrophilic Interaction Chromatography Combined with Tandem-Mass Spectrometry to Determine Six Aminoglycosides in Serum ». *Journal of Chromatography A* 1058 (1-2): 197-201. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.158.

Onorato, Joelle M., Robert A. Langish, Petia A. Shipkova, Mark Sanders, Jennifer Wang, Jae Kwagh, et Sanjoy Dutta. 2008. « A Novel Method for the Determination of 1,5-Anhydroglucitol, a Glycemic Marker, in Human Urine Utilizing Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography/MS3 ». *Journal of Chromatography B* 873 (2): 144-50. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.08.006.

Östman, Marcus, Richard H. Lindberg, Jerker Fick, Erik Björn, et Mats Tysklind. 2017. « Screening of Biocides, Metals and Antibiotics in Swedish Sewage Sludge and Wastewater ». *Water Research* 115 (mai): 318-28. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.011.

Padrón, M^a, Cristina Afonso-Olivares, Zoraida Sosa-Ferrera, et José Santana-Rodríguez. 2014. « Microextraction Techniques Coupled to Liquid Chromatography with Mass Spectrometry for the Determination of Organic Micropollutants in Environmental Water Samples ». *Molecules* 19 (7): 10320-49. https://doi.org/10.3390/molecules190710320.

Pérez, Rosa Ana, Beatriz Albero, Macarena Férriz, et José Luis Tadeo. 2017. « Analysis of Macrolide Antibiotics in Water by Magnetic Solid-Phase Extraction and Liquid

Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 146 (novembre): 79-85. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.013.

Perkons, Ingus, Iveta Pugajeva, et Vadims Bartkevics. 2018. « Simultaneous Screening and Quantification of Aminoglycoside Antibiotics in Honey Using Mixed-Mode Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectroscopy with Heated Electrospray Ionization ». *Journal of Separation Science* 41 (16): 3186-94. https://doi.org/10.1002/jssc.201800230.

Peru, Kerry M., Sandra L. Kuchta, John V. Headley, et Allan J. Cessna. 2006. « Development of a Hydrophilic Interaction Chromatography–Mass Spectrometry Assay for Spectinomycin and Lincomycin in Liquid Hog Manure Supernatant and Run-off from Cropland ». *Journal of Chromatography A* 1107 (1-2): 152-58. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.057.

Pesek, Joseph J., et Maria T. Matyska. 2015. « Ammonium Fluoride as a Mobile Phase Additive in Aqueous Normal Phase Chromatography ». *Journal of Chromatography A* 1401 (juillet): 69-74. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.010.

Peysson, William, et Emmanuelle Vulliet. 2013. « Determination of 136 Pharmaceuticals and Hormones in Sewage Sludge Using Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Extraction Followed by Analysis with Liquid Chromatography–Time-of-Flight-Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1290 (mai): 46-61. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057.

Pinasseau, Lucie, Laure Wiest, Aurélie Fildier, Laurence Volatier, Gary R. Fones, Graham A. Mills, Florian Mermillod-Blondin, et Emmanuelle Vulliet. 2019. « Use of Passive Sampling and High Resolution Mass Spectrometry Using a Suspect Screening Approach to Characterise Emerging Pollutants in Contaminated Groundwater and Runoff ». *Science of The Total Environment* 672 (juillet): 253-63. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.489.

Pinheiro, Paula, Sara Fateixa, Helena Nogueira, et Tito Trindade. 2018. « Magnetite-Supported Gold Nanostars for the Uptake and SERS Detection of Tetracycline ». *Nanomaterials* 9 (1): 31. https://doi.org/10.3390/nano9010031.

Psoma, Aikaterini K., Nikolaos I. Rousis, Eleni N. Georgantzi, et Nikolaos S. Thomaidis. 2021. « An Integrated Approach to MS-Based Identification and Risk Assessment of Pharmaceutical Biotransformation in Wastewater ». *Science of The Total Environment* 770 (mai): 144677. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144677.

Qian, Yuli, Xuebing Wang, Gang Wu, Liye Wang, Jinju Geng, Nanyang Yu, et Si Wei. 2021. « Screening Priority Indicator Pollutants in Full-Scale Wastewater Treatment Plants by Non-Target Analysis ». *Journal of Hazardous Materials* 414 (juillet): 125490. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125490.

Qiu, Jingli, Qingying Liu, Meiyu Zhang, Xuezhi Li, Jiahui Zhang, Renping Xiong, et Limin He. 2020. « Simultaneous Determination of Aminoglycoside Residues in Environmental Water Matrices by Lyophilization Combined with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ». *Analytical Letters*, mars, 1-17. https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1734606.

Rambla-Alegre, Maria, Josep Esteve-Romero, et Samuel Carda-Broch. 2012. « Is It Really Necessary to Validate an Analytical Method or Not? That Is the Question ». *Journal of Chromatography A* 1232 (avril): 101-9. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.050.

Ray, Partha, Katharine F. Knowlton, Chao Shang, et Kang Xia. 2014. « Development and Validation of a UPLC-MS/MS Method to Monitor Cephapirin Excretion in Dairy Cows

Following Intramammary Infusion ». Édité par Bernhard Kaltenboeck. *PLoS ONE* 9 (11): e112343. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112343.

Reemtsma, Thorsten, Urs Berger, Hans Peter H. Arp, Hervé Gallard, Thomas P. Knepper, Michael Neumann, José Benito Quintana, et Pim de Voogt. 2016. « Mind the Gap: Persistent and Mobile Organic Compounds—Water Contaminants That Slip Through ». *Environmental Science & Technology* 50 (19): 10308-15. https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03338.

Ren, Tianming, Zhi Zhang, John Paul Fawcett, Dong Sun, et Jingkai Gu. 2019. « Micro-Solid Phase Extraction and LC–MS3 for the Determination of Triptorelin in Rat Plasma and Application to a Pharmacokinetic Study ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 166 (mars): 13-19. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.12.039.

Riva, Francesco, Ettore Zuccato, Carlo Pacciani, Andrea Colombo, et Sara Castiglioni. 2021. « A Multi-Residue Analytical Method for Extraction and Analysis of Pharmaceuticals and Other Selected Emerging Contaminants in Sewage Sludge ». *Analytical Methods* 13 (4): 526-35. https://doi.org/10.1039/D0AY02027C.

Safarik, Ivo, Katerina Horska, Kristyna Pospiskova, et Mirka Safarikova. 2012. « Magnetic Techniques for the Detection and Determination of Xenobiotics and Cells in Water ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404 (4): 1257-73. https://doi.org/10.1007/s00216-012-6056-x.

Saluti, G., I. Diamanti, D. Giusepponi, L. Pucciarini, R. Rossi, S. Moretti, R. Sardella, et R. Galarini. 2018. « Simultaneous Determination of Aminoglycosides and Colistins in Food ». *Food Chemistry* 266 (novembre): 9-16. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.113.

Salvia, Marie-Virginie, Cécile Cren-Olivé, et Emmanuelle Vulliet. 2013. « Statistical Evaluation of the Influence of Soil Properties on Recoveries and Matrix Effects during the Analysis of Pharmaceutical Compounds and Steroids by Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Extraction Followed by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1315 (novembre): 53-60. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.056.

Salvia, Marie-Virginie, Maëva Fieu, et Emmanuelle Vulliet. 2015. « Determination of Tetracycline and Fluoroquinolone Antibiotics at Trace Levels in Sludge and Soil ». *Applied and Environmental Soil Science* 2015: 1-10. https://doi.org/10.1155/2015/435741.

Salvia, Marie-Virginie, Emmanuelle Vulliet, Laure Wiest, Robert Baudot, et Cécile Cren-Olivé. 2012. « Development of a Multi-Residue Method Using Acetonitrile-Based Extraction Followed by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Steroids and Veterinary and Human Drugs at Trace Levels in Soil ». *Journal of Chromatography A* 1245 (juillet): 122-33. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.034.

Sanchez-Cid, Concepcion, Alexandre Guironnet, Laure Wiest, Emmanuelle Vulliet, et Timothy M. Vogel. 2021. « Gentamicin Adsorption onto Soil Particles Prevents Overall Short-Term Effects on the Soil Microbiome and Resistome ». *Antibiotics* 10 (2): 191. https://doi.org/10.3390/antibiotics10020191.

Savoy, Marie-Claude, Pei Mun Woo, Pauline Ulrich, Adrienne Tarres, Pascal Mottier, et Aurélien Desmarchelier. 2018. « Determination of 14 Aminoglycosides by LC-MS/MS Using Molecularly Imprinted Polymer Solid Phase Extraction for Clean-Up ». *Food Additives & Contaminants: Part A* 35 (4): 674-85. https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1433332.

Schymanski, Emma L., Junho Jeon, Rebekka Gulde, Kathrin Fenner, Matthias Ruff, Heinz P. Singer, et Juliane Hollender. 2014. « Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence ». *Environmental Science & Technology* 48 (4): 2097-98. https://doi.org/10.1021/es5002105.

Sefiloglu, Feride Oyku, Ulas Tezel, et Işıl Akmehmet Balcıoğlu. 2021. « Validation of an Analytical Workflow for the Analysis of Pesticide and Emerging Organic Contaminant Residues in Paddy Soil and Rice ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69 (11): 3298-3306. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c06111.

Shi, Xiaowei, Man Liu, Mengmeng Sun, Qiao Wang, Weina Liu, et Deying Cao. 2011. « Development of a LC–ESI-MS3 Method for Determination of Nitrendipine in Human Plasma ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 56 (5): 1101-5. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.07.043.

Silva, Josiel José da, Bianca Ferreira da Silva, Nelson Ramos Stradiotto, Mira Petrovic, Pablo Gago-Ferrero, et Meritxell Gros. 2020. « Pressurized Liquid Extraction (PLE) and QuEChERS Evaluation for the Analysis of Antibiotics in Agricultural Soils ». *MethodsX* 7: 101171. https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.101171.

Simon, Romain, Jérôme Lemoine, Catherine Fonbonne, Aurore Jaffuel, Jean-François Léonard, Jean-Charles Gautier, Olivier Pasquier, et Arnaud Salvador. 2014. « Absolute Quantification of Podocin, a Potential Biomarker of Glomerular Injury in Human Urine, by Liquid Chromatography–Multiple Reaction Monitoring Cubed Mass Spectrometry ». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 94 (juin): 84-91. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.01.019.

Singer, Heinz P., Annika E. Wössner, Christa S. McArdell, et Kathrin Fenner. 2016. « Rapid Screening for Exposure to "Non-Target" Pharmaceuticals from Wastewater Effluents by Combining HRMS-Based Suspect Screening and Exposure Modeling ». *Environmental Science & Technology* 50 (13): 6698-6707. https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03332.

Smith, Shani, Charles Gieseker, Renate Reimschuessel, Christie-Sue Decker, et Mary C. Carson. 2009. « Simultaneous Screening and Confirmation of Multiple Classes of Drug Residues in Fish by Liquid Chromatography-Ion Trap Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1216 (46): 8224-32. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.077.

Sordet, Martin, Alexandra Berlioz-Barbier, Audrey Buleté, Jeanne Garric, et Emmanuelle Vulliet. 2016. « Quantification of Emerging Micropollutants in an Amphipod Crustacean by Nanoliquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry Using Multiple Reaction Monitoring Cubed Mode ». *Journal of Chromatography A* 1456 (juillet): 217-25. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.06.022.

Sordet, Martin, Audrey Buleté, et Emmanuelle Vulliet. 2018. « A Rapid and Easy Method Based on Hydrophilic Interaction Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry (HILIC-MS/MS/MS) to Quantify Iodinated X-Ray Contrast in Wastewaters ». *Talanta* 190 (décembre): 480-86. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.006.

Soulier, A., E. Jardé, B. Le Bot, L. Carrera, et A. Jaffrézic. 2016. « Veterinary pharmaceuticals: molecules to monitor in agricultural catchment ». *TSM*, 69-92. https://doi.org/10.1051/tsm/201611069.

Soulier, C., V. Boiteux, P. Candido, E. Caupos, M. Chachignon, G. Couturier, X. Dauchy, et al. 2021. « La spectrométrie de masse haute résolution pour la recherche de micropolluants organiques dans l'environnement: Screening of organic micropollutants

in environment by high resolution mass spectrometry ». *Techniques Sciences Méthodes* 6 (6): 43-54. https://doi.org/10.36904/tsm/202106043.

Speltini, Andrea, Michela Sturini, Federica Maraschi, Simona Viti, Davide Sbarbada, et Antonella Profumo. 2015. « Fluoroquinolone Residues in Compost by Green Enhanced Microwave-Assisted Extraction Followed by Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1410 (septembre): 44-50. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.093.

Subudhi, Bharat Bhusan, Nihar Ranjan Muduli, Prabhat Kumar Behera, Alok Kumar Moharana, et Rajanikanta Sahu. 2020. « Optimization of QuPPe Approach and Validation of Analytical Method for Estimation of Validamycin from Grain, Paddy Husk, and Soil by HPLC-ESI-MS/MS-Based Method ». *Environmental Monitoring and Assessment* 192 (1): 17. https://doi.org/10.1007/s10661-019-8006-y.

Svahn, Ola, et Erland Björklund. 2019. « Extraction Efficiency of a Commercial Espresso Machine Compared to a Stainless-Steel Column Pressurized Hot Water Extraction (PHWE) System for the Determination of 23 Pharmaceuticals, Antibiotics and Hormones in Sewage Sludge ». *Applied Sciences* 9 (7): 1509. https://doi.org/10.3390/app9071509.

Szeitz, András, Tuan-Anh T. Nguyen, K. Wayne Riggs, et Dan Rurak. 2014. « A Validated Assay to Quantitate Serotonin in Lamb Plasma Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Applications with LC/MS3 ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406 (20): 5055-59. https://doi.org/10.1007/s00216-014-7913-6.

Szekeres, Edina. 2017. « Abundance of Antibiotics, Antibiotic Resistance Genes and Bacterial Community Composition in Wastewater Effluents from Different Romanian Hospitals ». *Environmental Pollution*, 12.

Tang, Caiming, Yiyi Yu, Qiuxin Huang, et Xianzhi Peng. 2012. « Simultaneous Determination of Fluoroquinolone and Tetracycline Antibacterials in Sewage Sludge Using Ultrasonic-Assisted Extraction and HPLC-MS/MS ». *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 92 (12): 1389-1402. https://doi.org/10.1080/03067319.2010.535124.

Thiele-Bruhn, Sören. 2003. « Pharmaceutical Antibiotic Compounds in Soils – a Review ». *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166 (2): 145-67. https://doi.org/10.1002/jpln.200390023.

Tian, He, Jiaqi Wang, Yangdong Zhang, Songli Li, Jindou Jiang, Dali Tao, et Nan Zheng. 2016. « Quantitative Multiresidue Analysis of Antibiotics in Milk and Milk Powder by Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Quadrupole Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography B* 1033-1034 (octobre): 172-79. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.023.

Tlili, Ines, Giovanni Caria, Baghdad Ouddane, Ibtissem Ghorbel-Abid, Riadh Ternane, Malika Trabelsi-Ayadi, et Sopheak Net. 2016. « Simultaneous Detection of Antibiotics and Other Drug Residues in the Dissolved and Particulate Phases of Water by an Off-Line SPE Combined with on-Line SPE-LC-MS/MS: Method Development and Application ». *Science of The Total Environment* 563-564 (septembre): 424-33. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.101.

Tolmacheva, Veronika V. 2016. « Facile Synthesis of Magnetic Hypercrosslinked Polystyrene and Its Application in the Magnetic Solid-Phase Extraction of Sulfonamides from Water and Milk Samples before Their HPLC Determination », 8.

Tuc Dinh, Quoc, Fabrice Alliot, Elodie Moreau-Guigon, Joëlle Eurin, Marc Chevreuil, et Pierre Labadie. 2011. « Measurement of Trace Levels of Antibiotics in River Water Using On-Line Enrichment and Triple-Quadrupole LC–MS/MS ». *Talanta* 85 (3): 1238-45. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.013.

Usui, Noriko, Masahito Ohara, Masaya Ito, Atsushi Noda, Yoshihiko Ito, et Norio Hirayama. 2019. « Assessment of the Acute Toxicity of 16 Veterinary Drugs and a Disinfectant to Aquatic and Soil Organisms ». *Fundamental Toxicological Sciences* 6 (9): 333-40. https://doi.org/10.2131/fts.6.333.

Vasquez, M. I., E. Hapeshi, D. Fatta-Kassinos, et K. Kümmerer. 2013. « Biodegradation Potential of Ofloxacin and Its Resulting Transformation Products during Photolytic and Photocatalytic Treatment ». *Environmental Science and Pollution Research* 20 (3): 1302-9. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1096-5.

Wang, Hexing, Lingshuang Ren, Xin Yu, Jing Hu, Yue Chen, Gengsheng He, et Qingwu Jiang. 2017. « Antibiotic Residues in Meat, Milk and Aquatic Products in Shanghai and Human Exposure Assessment ». *Food Control* 80 (octobre): 217-25. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.034.

Wang, Xinran, Shupeng Yang, Yi Li, Jinzhen Zhang, Yue Jin, Wen Zhao, Yongxin Zhang, et al. 2018. « Optimization and Application of Parallel Solid-Phase Extraction Coupled with Ultra-High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Determination of 11 Aminoglycoside Residues in Honey and Royal Jelly ». *Journal of Chromatography A* 1542 (mars): 28-36. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.029.

Wang, Yan, Bingru Zhang, Tianlin Deng, et Fengting Li. 2017. « Reclamation of EDTA by Sodium Tetraethylenepentamine-Multi Dithiocarbamate after Soil Washing Process with EDTA ». *Environmental Earth Sciences* 76 (8): 311. https://doi.org/10.1007/s12665-017-6587-8.

Wang, Yuan, Shunli Ji, Feng Zhang, Feifang Zhang, Bingcheng Yang, et Xinmiao Liang. 2015. « A Polyvinyl Alcohol-Functionalized Sorbent for Extraction and Determination of Aminoglycoside Antibiotics in Honey ». *Journal of Chromatography A* 1403 (juillet): 32-36. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.032.

Wiest, Laure, Antoine Gosset, Aurélie Fildier, Christine Libert, Matthieu Hervé, Elisabeth Sibeud, Barbara Giroud, et al. 2021. « Occurrence and Removal of Emerging Pollutants in Urban Sewage Treatment Plants Using LC-QToF-MS Suspect Screening and Quantification ». *Science of The Total Environment* 774 (juin): 145779. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145779.

Wolford, Angela, Thomas S. McDonald, Heather Eng, Steven Hansel, Yue Chen, Jonathan Bauman, Raman Sharma, et Amit S. Kalgutkar. 2012. « Immune-Mediated Agranulocytosis Caused by the Cocaine Adulterant Levamisole: A Case for Reactive Metabolite(s) Involvement ». *Drug Metabolism and Disposition* 40 (6): 1067-75. https://doi.org/10.1124/dmd.112.045021.

World Organisation for animal health (OIE). 2019. « OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance ». https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/A_OIE_List_antimicrobials_July2019.pdf.

Wright, Michael J, Rebecca L Thomas, Phoebe E Stanford, et Andrea R Horvath. 2015. « Multiple Reaction Monitoring with Multistage Fragmentation (MRM3) Detection Enhances Selectivity for LC-MS/MS Analysis of Plasma Free Metanephrines ». *Clinical Chemistry* 61 (3): 505-13. https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.233551.

Xue, Ming, Haocheng Wu, Shaoying Liu, Xihui Huang, Quan Jin, et Ren Ren. 2020. « Simultaneous Determination of 44 Pharmaceutically Active Compounds in Water Samples Using Solid-Phase Extraction Coupled with Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412 (1): 203-22. https://doi.org/10.1007/s00216-019-02229-8.

Yang, Bixia, Lian Wang, Chunying Luo, Xixi Wang, et Chengjun Sun. 2017. « Simultaneous Determination of 11 Aminoglycoside Residues in Honey, Milk, and Pork by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry and Molecularly Imprinted Polymer Solid Phase Extraction ». *Journal of AOAC International* 100 (6): 1869-78. https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0399.

Yi, Xinzhu. 2019. « Occurrence and Distribution of Trace Levels of Antibiotics in Surface Waters and Soils Driven by Non-Point Source Pollution and Anthropogenic Pressure ». *Chemosphere*, 11. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.087.

Yi, Xinzhu, Stéphane Bayen, Barry C. Kelly, Xu Li, et Zhi Zhou. 2015. « Improved Detection of Multiple Environmental Antibiotics through an Optimized Sample Extraction Strategy in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (30): 9071-83. https://doi.org/10.1007/s00216-015-9074-7.

Zhan, Jia, Xue-jun Yu, Ying-ying Zhong, Zai-ting Zhang, Xiao-mei Cui, Jin-feng Peng, Rui Feng, Xiao-tao Liu, et Yan Zhu. 2012. « Generic and Rapid Determination of Veterinary Drug Residues and Other Contaminants in Raw Milk by Ultra Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography B* 906 (octobre): 48-57. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.08.018.

Zhang, Lei, Xian Long Cheng, Yang Liu, Miao Liang, Honghuan Dong, Beiran Lv, Wenning Yang, Zhiqiang Luo, et Mingmin Tang. 2014. « Identification of the Related Substances in Ampicillin Capsule by Rapid Resolution Liquid Chromatography Coupled with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2014: 1-15. https://doi.org/10.1155/2014/397492.

Zhang, Tong, et Bing Li. 2011. « Occurrence, Transformation, and Fate of Antibiotics in Municipal Wastewater Treatment Plants ». *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41 (11): 951-98. https://doi.org/10.1080/10643380903392692.

Zhang, Yanxia, Xia Xue, Shufang Su, Zhimou Guo, Jun Wang, Lisheng Ding, Yanming Liu, et Jianhua Zhu. 2018. « A Multi-Class, Multi-Residue Method for Detection of Veterinary Drugs in Multiple Meat Using a Pass-Through Cleanup SPE Technique and UPLC-MS/MS Analysis ». *Food Analytical Methods* 11 (10): 2865-84. https://doi.org/10.1007/s12161-018-1244-8.

Zhang, Zheng, Xiaolin Cao, Ziping Zhang, Jungang Yin, Dingnan Wang, Yanan Xu, Wei Zheng, Xinyi Li, Qingsong Zhang, et Liwen Liu. 2020. « Synthesis of Dummy-Template Molecularly Imprinted Polymer Adsorbents for Solid Phase Extraction of Aminoglycosides Antibiotics from Environmental Water Samples ». *Talanta* 208 (février): 120385. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120385.

Zhao, Yanfang, Ri Wu, Hao Yu, Jingkun Li, Lanqi Liu, Shanshan Wang, Xiangfeng Chen, et T.-W. Dominic Chan. 2020. « Magnetic Solid-Phase Extraction of Sulfonamide Antibiotics in Water and Animal-Derived Food Samples Using Core-Shell Magnetite and Molybdenum Disulfide Nanocomposite Adsorbent ». *Journal of Chromatography A* 1610 (janvier): 460543. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460543.

Zhou, Li-Jun, Guang-Guo Ying, Shan Liu, Jian-Liang Zhao, Feng Chen, Rui-Quan Zhang, Fu-Qiang Peng, et Qian-Qian Zhang. 2012. « Simultaneous Determination of Human and

Veterinary Antibiotics in Various Environmental Matrices by Rapid Resolution Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1244 (juin): 123-38. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.04.076.

Annexes

Annexe A : rendements des composés obtenus par extraction QuEChERS suite au criblage de suspects

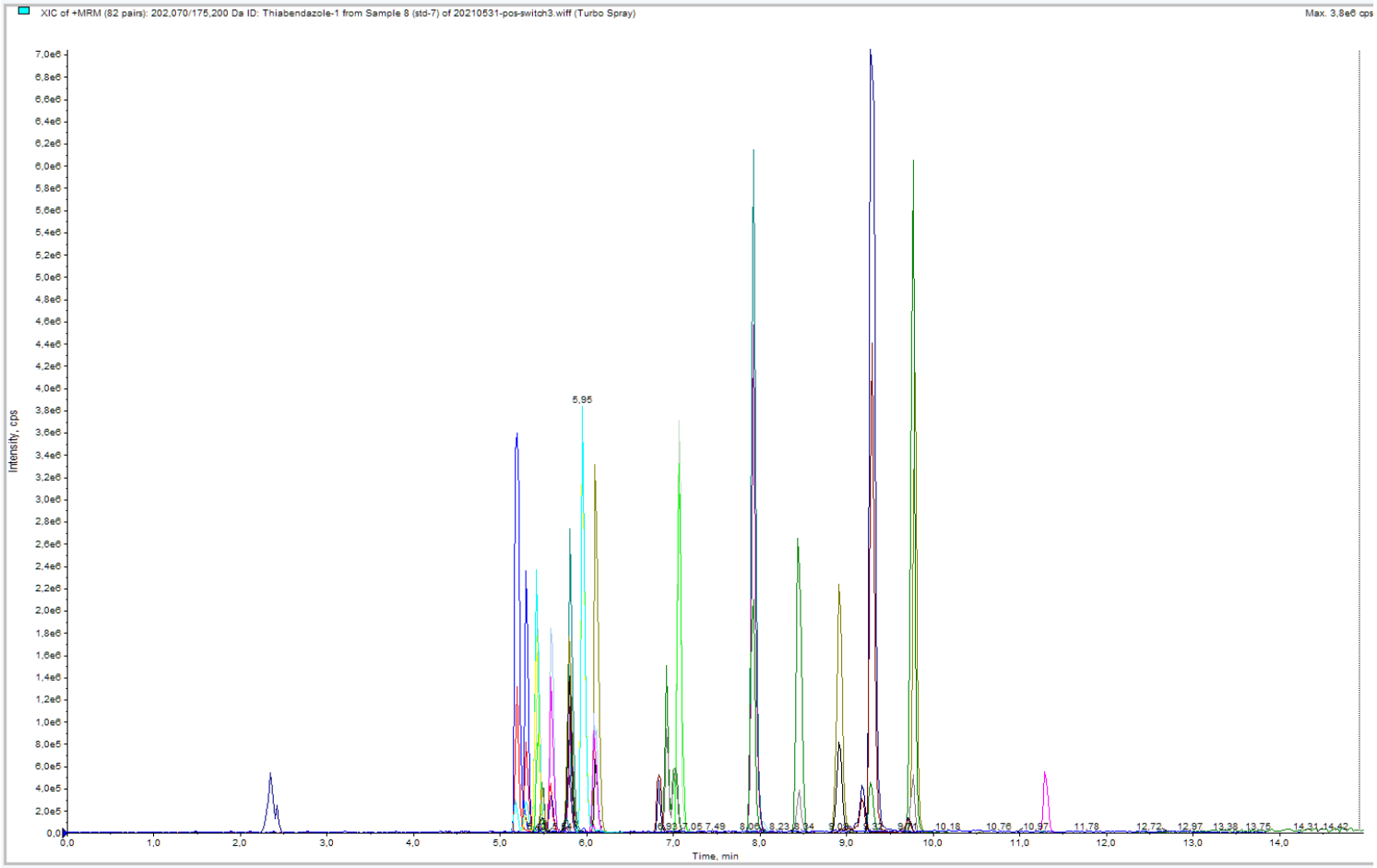
Composé	Rendement d'extraction (%)	Composé	Rendement d'extraction (%)	Composé	Rendement d'extraction (%)	Composé	Rendement d'extraction (%)
5-Hydroxythiabendazole	38%	Epitétracycline	40%	Oxfendazole	78%	Thiabendazole	65%
Acétyl-sulfamethoxazole	100%	Erythromycine	110%	Pyrantel	77%	Triclosan	88%
Albendazole-2-aminosulfone	60%	Flubendazole	77%	Pyriméthamine	80%	Triméthoprime	65%
Anhydroérythromycine	92%	Hydroxy-flubendazole	71%	Sulfaguanidine	70%		
Bromacil	71%	Hydroxy-levamisole	68%	Sulfaméthoxazole	70%		
Ciprofloxacine	31%	Kétoprofène	72%	Sulfoxaflor	84%		
Diméthyldidécyl ammonium	100%	Lévamisole	78%	Tébuconazole	80%		
Desmethyl-ofloxacin	25%	Ofloxacine	31%	Tétracycline	31%		

Annexe B : Paramètres de spectrométrie de masse des composés sélectionnés par criblage de suspects

Mode Positif	**[M+H]⁺ (m/z)**	**Fragments (m/z)**	**DP (V)**	**CE (V)**	**CXP (V)**		**[M+H]⁺ (m/z)**	**Fragments (m/z)**	**DP (V)**	**CE (V)**	**CXP (V)**
3,5 xylyl méthylcarbamate	180,2	123,4 95,6	56	15 19	12	Ofloxacine	362,1	318,2 261,1	176	27 35	12 22
3-amino-5-méthyl-isoxazole	100,3	45,1 72,6	96	25 13	10 32	Oxfendazole	316	159,1 191	146	45 31	10 18
4-hydroxy-levamisole	221,1	194,1 107,6	121	31 45	16 12	Promecarb	208,2	109,6 151,3	81	27 11	10 12
5-hydroxythiabendazole	218,1	191 147,3	86	35 43	10	Pyrantel	207,1	150,4 136 ,4	236	39 43	6 12
Acétyl-sulfamethoxazole	296	134,5 198	121	33 25	6 8	Pyriméthamine	249,1	233 177	246	41 41	24 18
Albendazole-2-aminosulfone	240	133,4 198,2	176	39 27	12 4	Sulfaguanidine	215	156 92,6	106	19 35	8 12
Anhydroérythromycine	716,3	558,3 158,3	121	21 37	16 12	Sulfaméthoxazole	254,1	156,3 188,2	136	21 19	10
Bromacil	261	295,1 187,6	106	25 37	10 14	Sulfathiazole	256	156,3 108,6	180	47 47	14 8
Chlorhexidine	253,1	170 153,3	166	21 35	10	Sulfoxaflor	278	174 154	81	17 39	14 18
Ciprofloxacine	332,1	314,2 231,1	176	31 49	14	Tébuconazole	308,1	70,1 125,4	81	39 65	4 16
Desméthyl-ofloxacin	348,1	304,1 261,2	126	25 37	16 30	Tétracycline	445	410,1 427,1	166	27 19	18
Doramectine	916	331,2 593,4	171	31 25	54 22	Thiabendazole	202,1	175,2 131,1	231	35 45	12 8

Epitétracycline	445,1	410,2 427,1	106	27 17	18 12	Triméthoprime	291	230,1 261,1	256	33 35	26 12
Eprinomectine	914	186,1 154,3	126	27 37	36 42						
Erythromycine	734,3	158,4 576	126	37 29	8 28						
Flubendazole	314	282,2 123,4	201	31 47	14						
Hydroxyflubendazole	316,1	284,2 160,3	116	31 47	16 10						
Kétoprofène	255	77 105	11	61 33	12						
Levamisole	205,1	178,1 123,4	171	29 39	14 16						
Méthamidophos	142,6	94,5 125,4	86	23 17	44 6						

Mode Négatif	**$[M-H]^-$ (m/z)**	**Fragments (m/z)**	**DP (V)**	**CE (V)**	**CXP (V)**
Acétyl-sulfamethoxazole	294	198 134	-15	-22 -36	5 1
Kétoprofène	253	208,9 171	-65	2 8	1 5
Pyrantel Pamoate	387	187 143	-80	-22 -54	1 -7
Sulfaméthoxazole	252	156 64	-80	-22 -56	3 -9
Triclosan	288,8	35 37	-80	-50 -52	-5

Etalons internes	$[M+H]^+$ (m/z)	Fragments (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Ciprofloxacine-d8-hcl	340,1	296,4	196	25	26
Erythromycine-C13-d3	738,4	162,1	121	45	8
Kétoprofène-d4	259,2	213,1	131	19	6
Levamisole-d5	210,1	183,1	46	33	8
Ofloxacine-d3	365,1	321,2	216	27	10
Oxfendazole-d3	319,1	159,4	126	45	10
Sulfaméthoxazole-d4	258,1	160,2	156	23	40
Sulfathiazole-d4	260	160,1	66	21	12
Thiabendazole-d4	206,1	179,1	171	37	10
Triméthoprime-d3	294	230,2	206	35	14

Annexe C : Exemple de chromatogramme obtenu en mode positif lors de l'analyse ciblée résultante du criblage de suspects