



HAL
open science

Mise au point d'une méthode de dépistage des antibiotiques dans le miel par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

David Renaud

► **To cite this version:**

David Renaud. Mise au point d'une méthode de dépistage des antibiotiques dans le miel par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. *Chimie analytique*. 2012. anses-00750916

HAL Id: anses-00750916

<https://anses.hal.science/anses-00750916>

Submitted on 12 Nov 2012

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.



Mise au point d'une méthode de dépistage des antibiotiques
dans le miel par chromatographie liquide couplée à la
spectrométrie de masse en tandem.



Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
(Anses)

La Haute Marche
35302 fougères

Remerciement

Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères à Estelle DUBREIL, tutrice de ce stage, pour sa disponibilité et sa gentillesse durant ces six mois de stage. Merci pour tout ce que tu m'as appris.

Je remercie également Pascal SANDERS directeur de l'ANSES, du site de Fougères et toute l'unité RMV. Surtout je remercie tous les techniciens qui ont fait preuve de pédagogie pour m'avoir apporté leurs conseils.

Estelle et toutes les personnes du laboratoire qui m'ont accueillis et m'ont permis de réaliser un stage constructif dans la joie et la bonne humeur.

Sommaire

Introduction.....	4
1. Généralités	5
1.1. Contexte	5
1.1.1. Apiculture	5
1.1.2. Traitement antibiotiques.....	7
1.2. Rappels théoriques.....	8
1.2.1. Les antibiotiques	8
1.2.2. Couplage LC/MS-MS.....	10
1.2.2. Extraction	13
2.-Matériels et méthodes.....	17
2.1. Analyse LC/MS-MS	18
2.2. Méthode.....	20
2.2.1. Préparation d'échantillons : protocole final d'extraction	20
2.2.2. Conditions LC-MS/MS.....	20
3. Résultats et discussion	21
3.1 Optimisation de la méthode LC-MS/MS.....	22
3.2. Comparaison de techniques d'extraction	24
3.2.1. Extraction SPE.....	24
3.2.2. Extraction QuEChERS.....	29
3.2.3. Extraction liquide-liquide	32
3.2.4. Extraction ASE	35
3.2.5. Choix du protocole	35
3.3. Evaluation de la méthode	38
3.3.1. Les effets matrice	38
3.3.2. Les limites de détection.....	40
Conclusion	43

Introduction

Le miel est sans aucun doute le produit naturel de la ruche employé depuis le plus longtemps par l'Homme pour l'aider à se soigner ou pour prévenir l'apparition de la maladie. Depuis, la médecine moderne a permis de mieux comprendre la façon dont le miel peut nous aider dans la vie de tous les jours. En outre, le miel nous offre un des paradoxes les plus merveilleux de la nature, il permet d'être au meilleur de sa forme et il est aussi agréable à déguster.

Cependant, comme tout être vivant, l'abeille est exposée aux maladies et aux épidémies. Les apiculteurs sont alors tentés d'utiliser des traitements plus ou moins efficaces (chauffage, substances médicamenteuses, etc) et parfois non autorisés pour lutter contre ces maladies. Les substances chimiques contenues dans les médicaments administrés aux abeilles, comme les antibiotiques, peuvent donc subsister à l'état de traces dans les aliments. Le danger potentiel que peut représenter ces résidus d'antibiotiques dans les denrées alimentaires est cependant maîtrisé. En effet, l'utilisation de ces substances chimiques est réglementée et contrôlée au sein de l'Union Européenne (1,2,3).

Ainsi, l'autorisation de mise sur le marché de médicaments vétérinaires, comme les antibiotiques par exemple, est régie par toute une procédure pour garantir la sécurité alimentaire. La firme pharmaceutique dépose donc un dossier de demande d'autorisation pour la commercialisation d'un antibiotique dans une certaine denrée et pour une espèce animale, après avoir réalisé les études nécessaires (toxicologique, pharmacologique, déplétion, etc...). Toutes ces démarches conduisent à la fixation de limites maximales de résidus (LMR), résultant de l'utilisation d'un médicament vétérinaire (en mg/kg ou µg/kg) légalement autorisé dans ou sur des denrées destinées à la consommation humaine. Les LMR sont ensuite fixées par la Commission Européenne (1), sur proposition des firmes pharmaceutiques, et après évaluation par des experts européens (CVMP) et nationaux comme l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses). Afin de respecter ces limites, un délai minimum entre la dernière administration d'un médicament et le moment où les animaux et leurs produits sont dirigés vers la consommation est nécessaire (4). Les autorités contrôlent le respect des limites maximales des résidus et du temps d'attente par le biais d'analyses et d'enquêtes.

C'est dans ces perspectives d'études et de contrôles que les 70 personnes du laboratoire de l'ANSES de Fougères participent activement à une meilleure connaissance de l'utilisation des médicaments vétérinaires et des désinfectants en étudiant les bienfaits et les risques dans la filière agro-alimentaire. Pour que les recherches soient complètes, le laboratoire concentre ces activités sur le dépistage des résidus de médicaments vétérinaires dans les denrées d'origines animales, l'efficacité antimicrobienne des antibiotiques et des désinfectants, la résistance à ces produits ainsi que sur l'évaluation de la toxicité génétique des contaminants alimentaires. De plus, l'Anses est le laboratoire national de référence pour les résidus de médicaments vétérinaires et de colorants ainsi que pour la résistance aux antibiotiques, et laboratoire européen de référence pour les résidus d'antibiotiques. Il contribue aux contrôles des désinfectants, à la bonne utilisation des médicaments vétérinaires, ainsi qu'à la surveillance de la résistance aux antibiotiques en France et en Europe (5). Le laboratoire de Fougères participe, par ses compétences en analyses, au contrôle vétérinaire ainsi qu'à l'élaboration et la validation de méthodes d'analyses.

Actuellement, peu de méthodes multi-classes de résidus d'antibiotiques dans le miel ont été mises en place (6,7), ce qui donne un double intérêt à ce stage. En effet, dans un premier temps, il est nécessaire de déterminer la méthode d'extraction/purification la plus fiable et la plus robuste comme cela a été publié pour les pesticides (8). Et dans un second temps, il est intéressant de réaliser un large screening multi-classes d'antibiotiques dans un maximum d'échantillons « terrains ». Les résultats permettraient d'avoir un aperçu des antibiotiques dépistés dans les miels, outre ceux recherchés lors des plans de contrôle nationaux (5).

Dans une première partie, les rappels théoriques nécessaires à la compréhension du contexte de l'utilisation des antibiotiques par les apiculteurs seront exposés. Ensuite, une présentation sera faite sur la chaîne chromatographique couplée à un spectromètre de masse en tandem, ainsi que sur les différentes techniques d'extraction. Les principaux paramètres de validation seront également abordés. Dans la dernière partie, les résultats obtenus tout au long du stage seront commentés.

1. Généralités

1.1. Contexte

1.1.1. Apiculture

Le miel

Le miel possède naturellement des propriétés de guérison inégalées. Suivant l'origine florale de celui-ci, les symptômes soignés sont différents. Par exemple le miel de lavande est idéal contre les maux de tête ou encore contre les blessures, les brûlures et les piqûres légères, le miel d'acacia est un régulateur intestinal. La composition du miel est soumise à de nombreux facteurs variables et non totalement maîtrisés tels que l'origine florale, la race des abeilles, les conditions météorologiques...

De ce fait, la composition du miel est complexe. De plus, le miel contient de nombreux éléments qui sont les suivants :

- Les glucides sont l'élément principal en grande quantité proche de 80% sous forme de fructose et de glucose. Le maltose, le saccharose et d'autres polysaccharides y sont également présents.
- L'eau est le constituant secondaire puisqu'elle est présente à hauteur de 17%. Le reste des composants sont en petites quantités comme les lipides sous forme de glycérides et d'acide gras.
- Des éléments minéraux sont présents, entre 0.2% et 1 % comme le potassium. Le miel est aussi une source d'appoint en vitamines.
- Divers composants sont également présents comme les protéides à moins de 1% du miel, des acides aminés libres, ou encore des acides organiques, libres ou combinés, et principalement l'acide gluconique.
- Il contient essentiellement les vitamines B1, B2, B3 (PP), B5, B6 et C et accessoirement les vitamines A, B8 (H), B9 et D. L'amylase, la gluco-invertase et la gluco-oxydases sont présents. Elles facilitent la digestion et sont responsables de certaines vertus du miel. Cet aliment contient également plusieurs facteurs antibiotiques bactériostatiques naturels.

La matrice du miel est composée d'un très grand nombre d'éléments vitaux, ce qui la rend complexe mais indispensable.

Les maladies

Cependant, tout être vivant est exposé aux maladies. L'apiculture n'y échappe pas. Une ruche contient des dizaines de milliers d'individus et de larves et est d'autant plus sensible à la contamination massive et immédiate. Les abeilles et leurs couvains peuvent être atteints de plusieurs maladies (9). La maladie du couvain la plus courante est tout d'abord la loque européenne. Cette maladie est causée par le *Bacillus pluton*, en général accompagnée de diverses bactéries secondaires telles que des streptocoques et des bacilles. Cette bactérie affecte les larves avant operculation. Au début de l'infection, la larve devient transparente puis jaune et finit brune à leur mort. Il est possible de repérer cette maladie par l'observation puisque les larves sont flasques et n'adhère plus aux cellules. Les opercules s'affaissent. La loque européenne atteint les colonies faibles et surtout en temps humide et froid. Cette maladie est contagieuse et doit être légalement déclarée en Préfecture. Il existe des traitements d'antibiotiques pour soigner la loque européenne à bases de tétracyclines (chlortétracycline et oxytétracycline) ou de sulfamide (sulfathiazol) (10).

La seconde maladie est la loque américaine. Cette affection est beaucoup plus grave. Elle est due à une bactérie, *Paenibacillus larvea* qui se présente sous deux formes (9). La première est la forme végétative qui effectue la croissance et la multiplication de cette bactérie, et la seconde est sa forme de résistance permettant la dissémination. Ainsi, les larves mortes et les écailles contiennent des millions de spores. La bactérie touche les trois castes. Cette maladie décime une colonie en quelques semaines parce qu'il n'y a plus le renouvellement des abeilles, c'est une maladie qui se propage dans les alvéoles du couvain. De plus, les larves mortes sont adhérentes aux parois, c'est pourquoi les abeilles ont des difficultés à l'éliminer. L'infestation est d'abord indétectable avant les premiers signes, ce qui rend la maladie encore moins décelable. Cette bactérie est résistante aux ultraviolets. Pour désinfecter, il est nécessaire de chauffer à 130°C ou de tremper dans du formol à 20% pendant 30 minutes. Cette maladie doit également être déclarée à la Préfecture. Pour soigner les abeilles, il existe des antibiotiques à base de tétracycline (10). La cire et le miel des cadres contaminés sont brûlés et enterrés.

Une autre des maladies est le couvain sacciforme (9). Il s'agit d'une maladie infectieuse qui n'atteint que le couvain. Elle est due à un virus, *Morator acetuae*, très peu résistant. Pour le neutraliser, un chauffage de 10 minutes à 60°C suffit. Cette maladie est repérable par un couvain en mosaïque des larves desséchées de couleur brune, et une diminution de la population. Il n'y a pas de traitement d'antibiotiques prescrits pour cette maladie. La guérison survient généralement spontanément.

La maladie suivante est la varroase (9,11), une maladie parasitaire grave et due à la prolifération d'un acarien, *Varroa jacobsoni*. La caractéristique de cette maladie est l'affaiblissement de la colonie car elle touche les abeilles à tous les niveaux du développement de la colonie. Cette maladie tue les nymphes ou provoque l'éclosion d'abeilles mal formées. Le traitement est à base d'insecticides comme l'apistan, l'apivar ou l'apiguard, mais il est possible de procéder à l'isothérapie à base de pénicillines.

Les maladies peuvent également toucher directement les abeilles au stade adulte. La première qu'il est possible de référencer est l'acariose due à un acarien, *Acaparis woodi* (9), qui s'infiltré dans les voies respiratoires jusqu'au thorax des ouvrières. Cette maladie est détectable par la présence de cadavres devant la ruche.

La nosebose est aussi une maladie de l'abeille adulte. Elle est due au développement d'un protozoaire, *Nosema apis*, sur les parois intestinales. Au début de l'infection, les abeilles sont agitées puis le ralentissement de leurs activités et des troubles intestinaux sont observés. Elles ne peuvent plus voler. Les abeilles contaminées finissent leur vie en groupe d'abeilles paralysées. Le traitement approprié à cette maladie est à base de fumagilline (9).

La dernière des maladies la plus répandue chez les abeilles adultes est l'amibiase puisqu'elle se développe souvent en parallèle de la nosebose, ce qui a pour effet d'accentuer sa gravité. Elle est due à une amibe, *Malpighamoeba mellificae* (9). Celle-ci se propage dans l'organe urinaire des abeilles. Pour cette maladie, il n'y a aucun remède connu, au mieux le traitement est préventif.

1.1.2. Traitement antibiotiques

Les antibiotiques et le miel

Durant cette dernière décennie, les chercheurs européens se sont attaqués au problème des antibiotiques dans le miel (5). En apiculture, les antibiotiques sont mélangés avec des sirops de sucre administrés aux abeilles ou pulvérisés sur la ruche, afin de lutter contre les maladies. Ainsi, des résidus peuvent être retrouvés dans les produits d'apiculture, tels que le miel ou la gelée royale, très prisée pour ses propriétés. Leurs analyses dénoncent l'utilisation fréquente de plusieurs familles d'antibiotiques. Sur le marché italien, parmi les substances analysées, les sulfamides sont les antibiotiques les plus employés suivis par les tétracyclines, la streptomycine, la tylosine dans les miels d'importation ainsi que le chloramphenicol. La présence de la famille des quinolones dans le miel chinois a été mise en évidence récemment. Il y eu quelques alertes négligeables sur les métabolites des nitrofuranes.

Règlementation

Les antibiotiques potentiellement présents dans le miel, ou une autre nourriture, sont inacceptables, car ils peuvent présenter un risque pour la santé humaine. La prise régulière d'antibiotiques, même en petites quantités, peut favoriser l'apparition de bactéries résistantes dans l'intestin. Ces bactéries résistantes peuvent être également d'origines animales, inoculées directement par le traitement antibiotique appliqué à l'animal puis transmis par ingestion par l'Homme des denrées animales (viande, lait, œufs, miel...) à des bactéries présente dans le tube digestif humain. De plus, une infection due à des germes résistants est plus difficile à combattre. La présence de résidus dangereux dans les denrées alimentaires d'origines animales est également susceptible de produire des effets toxiques immédiats comme des réactions d'hypersensibilité. Chez les personnes sensibles aux antibiotiques, cela peut provoquer des allergies ou à plus long terme, des effets cancérogènes.

En Europe, aucune autorisation de mise sur le marché d'un médicament vétérinaire ne peut être délivrée à moins qu'une limite maximale de résidus (LMR) n'ait été établie pour une espèce animale (3). Cependant, aucun antibiotique n'a de limite maximale de résidus pour le miel. Les études sont coûteuses et très compliquées chez les abeilles pour les firmes afin de déposer une autorisation. De plus, cette espèce mineure n'est pas très lucrative au niveau des ventes. La consommation moyenne de miel par personne et par an étant très basse, cela pourrait conduire à des LMR très hautes. L'autorisation de la présence d'aussi grandes quantités d'antibiotiques dans le miel aurait un impact négatif sur l'image que le consommateur a du miel, car celui-ci est perçu

comme un produit naturel et sain. Personne n'est alors en faveur de l'établissement de LMR pour des antibiotiques dans le miel.

Cependant, une réflexion entre les différents états membres de l'Union Européenne est en cours. En effet, les LMR ont été mises à jour pour des substances pharmacologiquement actives par la Commission Européenne (3). Et, pour la première fois, il a été présenté un mécanisme pour l'extrapolation de LMR d'une matrice à une autre (système en cascade). Actuellement, le manque d'harmonisation des limites et actions mises en œuvre par les divers pays de l'Union Européenne est considérable. Chaque État membre adopte une position différente sur cette question. Certains, comme l'Italie, interdisent n'importe quel résidu d'antibiotique (5). D'autres n'ont pas vraiment de plans de contrôle. Quelques pays ont mis des niveaux de tolérance s'étendant de 15 à 50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (la Belgique, le Royaume-Uni, l'Allemagne et l'Autriche). En Belgique, l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire (FASFC) a établi des seuils pour les tétracyclines, les sulfamides et la streptomycine. Au-delà, le miel doit être enlevé de la vente et détruit. Chaque résultat positif est noté. Pour d'autres antibiotiques (par exemple les fluoroquinolones), l'agence intervient seulement quand le seuil de 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ est dépassé, à l'exception des antibiotiques interdits (chloramphenicol et nitrofurans) (5).

Dans l'Union Européenne, un guide technique a été publié par les Laboratoires Européens de Référence (EU-RL). Le but de ce guide technique est d'améliorer et d'harmoniser des méthodes analytiques pour des substances pour lesquelles les LMR n'ont pas été fixées (3). Ce document sert simplement de guide technique dans lequel sont inclus les niveaux de détection recommandés pour les substances non autorisées. Afin de réaliser les plans de contrôle, les laboratoires de référence de chaque état membre de l'UE ont mis au point des méthodes d'analyses d'antibiotiques sur les matrices d'origines animales, dont le miel. Cependant, dans cette matrice complexe, nombreuses de ces méthodes ne s'opèrent que sur une seule famille (4,12-14). Les analyses multi-classes d'antibiotiques sont plus rares. Il est donc impératif d'étendre ce nombre (7,15). Les extractions sont différentes : certaines utilisent l'extraction en phase solide (SPE) (4,12,13), d'autres, l'extraction liquide-liquide (4,14), ou encore une méthode d'extraction QuEChERS, qui est une technique d'extraction récente puisqu'elle est apparue en 2001-2002, (16). Ces techniques seront expliquées par la suite.

1.2. Rappels théoriques

1.2.1. Les antibiotiques

Définition

Un antibiotique est une substance qui a la capacité de réduire (bactériostatique) ou d'interrompre (bactéricide) la multiplication des bactéries. C'est un composé chimique, élaboré sur la base d'un micro-organisme ou à partir de produits de synthèse. Les antibiotiques sont utilisés en médecine vétérinaire et humaine pour lutter contre des infections bactériennes et doivent être choisis en fonction de leur efficacité sur la bactérie et doivent être dépourvus de toxicité pour les autres cellules.

Les différentes classes

Il existe quatre modes d'action des antibiotiques : antibactériens à usage systémique pour combattre les maladies dues aux bactéries, anti-infectieux généraux, anticancéreux et anticoagulants. Les différents antibiotiques luttent contre les bactéries, et non pas contre les

virus, soit en arrêtant le développement, soit en détruisant la bactérie. Ils peuvent modifier la structure de la paroi cellulaire de la bactérie comme le font les pénicillines et les céphalosporines.

Les antibiotiques peuvent également perturber la production de la bactérie en interrompant la production de protéines nécessaire au renouvellement des bactéries. Ce mode d'attaque est celui des aminoglycosides, des macrolides et de tétracyclines. Mais les antibiotiques peuvent également entraver la production de l'ADN de la bactérie comme le font les quinolones.

De par sa mission de LNR pour les médicaments vétérinaires, le laboratoire de Fougères est notamment chargé de développer des méthodes d'analyse des résidus d'antibiotiques dans le miel. Ces méthodes seront ensuite transférées aux Laboratoires Vétérinaires Départementaux pour application lors des plans de contrôle. Dans ce contexte, l'objectif du stage est de mettre au point une méthode de dépistage avec un large panel d'antibiotiques de différentes familles (figure 1) (17) :

- ✓ Les tétracyclines, sont des antimicrobiens naturels (oxytétracycline, tétracycline, chlortétracycline) ou semi-synthèse (doxycycline). Elles sont peu solubles dans l'eau. En revanche, elles le sont dans les solvants organiques. Les tétracyclines possèdent un caractère amphotère à prédominance basique. Elles absorbent dans l'UV.
- ✓ Les quinolones, sont insolubles dans l'eau et au contraire soluble dans les solvants organiques. Elles ont un caractère amphotère acide. Ces antibactériens sont légèrement sensible à la lumière.
- ✓ Les β -lactams, sont caractérisés par leur noyau, amide interne, à quatre chaînons. Les β -lactams sont très instables en raison de l'hydrolyse basique ou acide de la fonction cycle tendu amide. Les β -lactams se divisent en deux familles : les pénicillines et les céphalosporines. Ces dernières présentent un caractère nettement acide et sont plus stables que les pénicillines due à un hétérocycle de cinq chaînons au lieu de quatre.
- ✓ Les sulfamides, sont un groupe d'antibactériens de synthèse le plus le plus important en nombre de composés. Elles sont ampholytes à prédominance acide.
- ✓ Les macrolides, sont des antibactériens d'origine naturelle (excepté la tilmicosine). Elles sont très solubles dans les solvants organiques. Les liaisons osidiques sont protégées de l'hydrolyse par groupements basiques exerçant un effet répulsif sur les molécules d'eau, ce qui leur donne une bonne stabilité.
- ✓ Les aminoglycosides, antibactériens d'origine naturelle très soluble dans l'eau. Ces composés sont fortement basiques et hydrophiles : extraction de la matrice et chromatographie difficiles.

Ces antibiotiques permettent d'obtenir une méthode multi-classe complète. Dans ce stage une des difficultés sera de trouver une technique d'extraction adaptée et efficace pour toutes ces molécules. Il est donc nécessaire de comparer les techniques d'extraction et d'en tester de plus récentes mis en place surtout pour les pesticides (6).

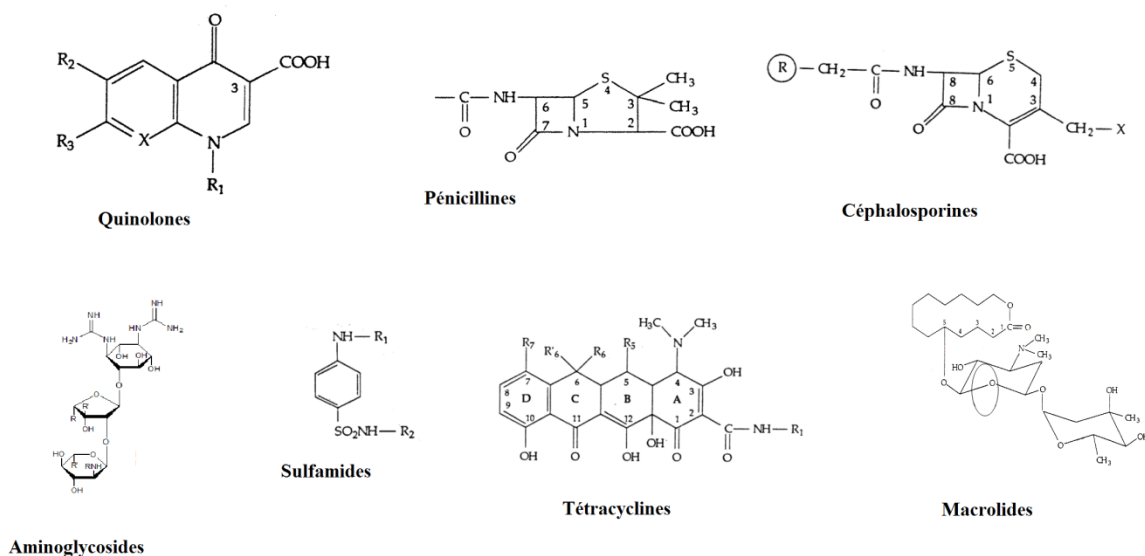


Figure 1 : Structure générale de chaque famille d'antibiotiques de l'étude.

1.2.2. Couplage LC/MS-MS

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est une technique de séparation des constituants d'un mélange en solution basée sur le partage des composés entre une phase mobile dans laquelle ils sont solubles, et une phase stationnaire qui s'exerce comme retardateur. Ainsi, cette séparation repose sur la différence d'affinité et d'interactions d'un constituant pour chacune des deux phases. Il existe plusieurs types de chromatographie selon le phénomène mis en jeu : de partage, d'adsorption, d'échanges d'ions et d'exclusion stérique... (18).

La chromatographie phase inverse avec un gradient d'élution est souvent utilisée pour l'analyse multi-résidus. Elle permet l'analyse de molécules avec des caractéristiques physico-chimiques divergentes. Les analytes sont séparés selon leur hydrophobie par partage entre les phases mobile et stationnaire. En général, une phase aqueuse composée d'eau et une phase organique comme du méthanol ou de l'acétonitrile sont mis en jeu dans la phase mobile. La phase stationnaire est souvent constituée de silice chimiquement modifiée par greffage de chaîne octadécyl C₁₈ ou alkyle C₈. Il existe également d'autres types de greffage comme aminopropyl, cyanopropyl, phényl ou d'autres types de phase stationnaire à base de polymères ou de carbone graphite poreux (18).

Le couplage de la chromatographie liquide avec un spectromètre de masse (SM) semble assurer la détection d'une large gamme de composés (19). En effet, l'intérêt de ce couplage réside dans la combinaison du pouvoir de séparation de la chromatographie, et celui d'identification et de confirmation de la spectrométrie de masse.

Le principe du spectromètre de masse repose sur l'application d'un champ électromagnétique sur une particule afin d'en déterminer le rapport masse sur charge (m/z) (20). L'identification des molécules d'intérêts s'effectue par la transformation des molécules en ions. Les éléments principaux d'un spectromètre de masse sont la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur (19,20). La source permet l'ionisation de l'échantillon à analyser ainsi que le transfert des ions vers l'analyseur.

La source utilisée est une source electrospray (ESI). C'est un processus d'ionisation doux qui transforme les ions majoritairement préformés en solution en ions en phase gazeuse. Le mécanisme n'est pas encore clairement défini. Cependant, il peut être décrit par l'écoulement de l'échantillon provenant de la colonne chromatographique entrant dans un capillaire de la source electrspray qui est porté à un potentiel électrique élevé de 3 à 5kV positif ou négatif. Lors de la transformation des ions, deux étapes entrent en jeu : la première est la formation d'un nuage de gouttelettes (figure.2) au bout de l'aiguille sous l'action du champ électrique appliqué à la sortie du capillaire (19,20).

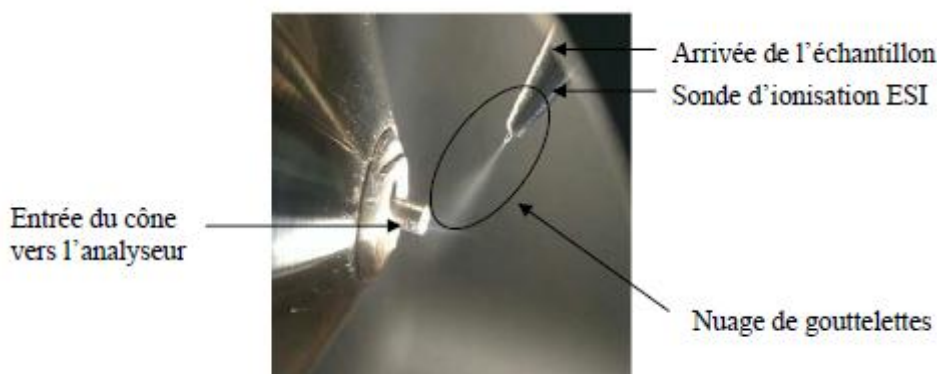


Figure 2 : Photographie d'une source électrospray représentant la formation du nuage de gouttelettes au bout de la sonde ESI grâce à un champ électrique.

L'évaporation du solvant est assistée par l'application d'un flux de gaz. Les ions de même polarité sont entraînés grâce à la haute tension vers la surface de la solution pour former un cône de Taylor.

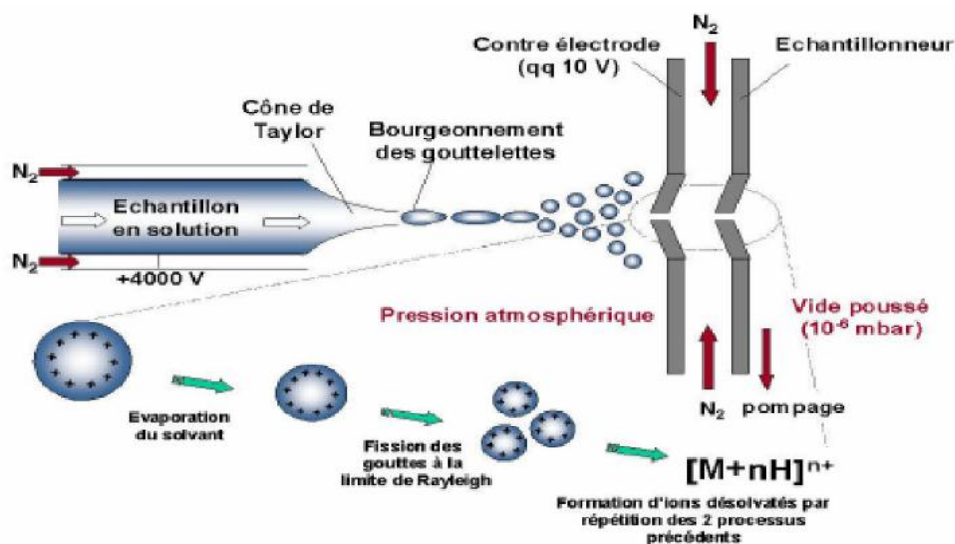


Figure 3: Principe de désolvatation de chaque gouttelette entraînant un rétrécissement de celle-ci et une augmentation de la charge superficielle jusqu'à division en gouttelettes plus petites et moins chargées.

La seconde étape est la désolvatation (figure 3). Celle-ci peut s'expliquer avec deux théories (19,20). La première théorie fait référence au modèle de charge résiduelle, dont le principe repose sur la formation de grandes gouttelettes nébulisées : lors du passage de la solution dans le capillaire sous haute tension, la solution est dispersée en spray de gouttelettes, l'évaporation du solvant entraîne le rétrécissement des gouttelettes et l'augmentation de leurs charges surfaciques.

Ensuite, la répulsion coulombienne dépasse la tension superficielle et induit la division des gouttelettes en plus petites faiblement chargées. Ceci est renouvelé jusqu'à obtention d'ions individuels. La seconde théorie sur la désolvation est l'évaporation des ions où il est considéré que des gouttelettes d'un diamètre inférieur à 20 nm peuvent émettre directement des ions sous forme gazeuse. La charge de l'ion dépend alors de la charge transférée lors de la désorption.

Pendant l'ionisation, la formation d'ions mono-chargés et multichargés $[M+nH]^{n+}$ est possible. Il arrive parfois que des ions majoritaires correspondant à des adduits soient formés par combinaison de l'ion moléculaire avec une impureté (par exemple du sodium $[M+Na]^+$).

Ce type d'ionisation en phase liquide permet l'analyse de molécules thermolabiles polaires à faiblement polaires avec de faibles et de haut poids moléculaires, mais il présente l'inconvénient d'être sensible aux effets matrices (20).

Les ions générés sont transférés de la source vers l'analyseur sans entrer en contact avec les parties solides de l'appareil car cela provoquerait leur neutralisation. Cette action est assurée par une série d'optiques ioniques qui combinent l'utilisation de tensions continues et radio fréquence ainsi qu'un gradient de vide. La sélection des ions est effectuée par des analyseurs quadripolaires et la détection est réalisée par le biais d'une dynode de conversion ainsi que d'un multiplicateur d'électrons.

L'optique ionique est constitué deux quadripôles carrés. La focalisation est basée sur l'application de radiofréquences sur les pôles opposés qui ont le même potentiel. Des radiofréquences identiques sont placées sur chaque couple de pôles avec un déphasage de 180° de manière à ce quand un couple est positif, l'autre est négatif et inversement (19,20). Les ions attirés par intermittence par chacun des couples de pole n'entrent pas en contact avec eux. La progression des ions vers Q1 s'effectue avec l'application de potentiel différentiel de signe opposé à celui des ions d'intérêt ainsi le potentiel du second multi-pole est inférieur à celui du premier ce qui permet la progression des ions Les tensions de tube Lens et de la lentille sont réglées pour une focalisation. Après leur formation, les ions sont accélérés et focalisés jusqu'à l'analyseur. L'analyseur du spectromètre est un filtre de masse constitué de quatre barres parallèles, idéalement hyperbolique nommé quadripôle (19). Deux potentiels, un continu et l'autre radiofréquence, sont appliqués entre les barres. Si les ions entrent en contact avec les barres ou sont éjectés alors ils ne sont pas détectés (figure 4). Le quadripôle utilise la stabilité des trajectoires pour la séparation des ions en fonction de leur masse sur charge.

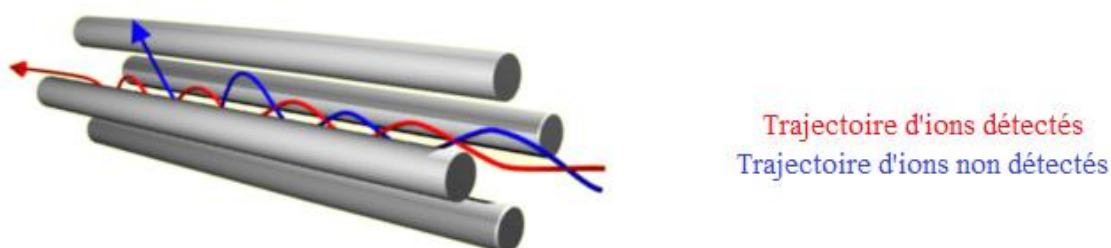


Figure 4: Trajectoires des ions dans un quadripôle, en bleu est celle des ions non détectés, car ceux-ci entrent en collision avec le quadripôle entraînant la neutralisation des ions et leur éjection. La trajectoire rouge est celle des ions détectés.

Lorsque les ions stables issus de la source d'ionisation ont été sélectionnés, ces ions parents ou précurseurs sont ensuite excités et menés à la fragmentation dans une cellule de collision, pour l'analyse des ions fils ou produits.

La détection s'effectue par un quadripôle, cela forme ainsi un triple quadripôle. Le premier et le troisième fonctionnent comme filtre de masse qui selon le mode choisi laissent passer tous les ions ou seulement ceux sélectionnés. Le second quadripôle qui correspond à la chambre de collision permet la fragmentation des ions isolés. Ces fragments sont ensuite analysés par le troisième quadripôle (19). Le couplage de la chromatographie liquide avec un spectromètre de masse en tandem a pour avantage d'avoir une grande sélectivité grâce à l'utilisation des deux filtres de masse (20).

Avec ce système, il existe différents modes d'acquisitions. Le balayage de plusieurs ions fragments nommé, multiple réaction monitoring (MRM), est le mode d'acquisition utilisé qui nécessite la mise en œuvre des trois quadripôles, celui-ci permet le suivi de transitions entre les ions parents et les ions fils. Ce mode est très sélectif et est souvent utilisé en analyse multi-résidus

Le couplage LC/MS-MS permet une bonne discrimination entre le signal des interférents du signal des molécules d'intérêts, ce qui a pour avantage de diminuer le bruit de fond entraînant un signal sur bruit amélioré, et donc des limites de détection plus faibles. Cela permet aussi une détection d'analytes sans avoir une séparation totale, diminuant le temps d'analyse.

Cependant, même si le signal des composés non ciblés est mis de côté lors de l'acquisition, ils peuvent interférer sur les réponses. En effet, il est indispensable de prendre en compte les effets de matrices et ce particulièrement lors d'analyse de matrices complexes tels que les aliments comme le miel. L'efficacité de l'ionisation des composés d'intérêt est modifiée en présence des autres composés. Ce phénomène est composé-dépendant et n'est pas toujours identique. Toutefois dans le but de minimiser les effets matrices, les solutions sont d'une part, un traitement approprié de l'échantillon permettant de supprimer un maximum d'interférents donnant ainsi un échantillon le plus propre possible, d'autre part l'adaptation des conditions chromatographiques afin d'obtenir une meilleure séparation.

Toutefois, malgré une sensibilité et sélectivité élevée et compte tenu des risques d'effets matrices, la LC/MS² ne permet pas de déterminer un grand nombre de molécules simultanément à l'état de traces dans des matrices complexes. Il est donc indispensable d'élaborer un traitement adéquat de l'échantillon intégrant l'extraction et la purification de l'extrait.

1.2.2. Extraction

La préparation de l'échantillon est identique pour chaque méthode : le miel est placé au bain marie afin de le liquéfier et de rendre la pesée plus aisée.

Afin d'obtenir une méthode fiable et robuste, quatre techniques ont été testées et comparées. La première de ces extractions est l'extraction en phase solide (SPE). Cette méthode d'extraction sur cartouche est de plus en plus mise en œuvre pour les échantillons liquides en raison de sa grande facilité d'utilisation (12). L'extraction liquide-solide est basée sur la distribution des composés entre la phase liquide (échantillon) et la phase solide (adsorbant choisi). C'est, en première approximation, un processus apparenté à celui de la chromatographie de partage qui utiliserait l'adsorbant comme phase stationnaire (21). Si le soluté présente une forte affinité vis-à-vis de l'adsorbant, il y reste totalement fixé au cours de la percolation de l'échantillon aqueux. Le soluté est ensuite résorbé par un petit volume de solvant éluant. La connaissance des mécanismes de rétention mis en jeu en chromatographie en phase liquide est donc directement transposable à cette technique d'extraction et facilite ainsi la mise au point de la méthode. Une extraction en phase solide se compose en quatre étapes (figure 5) (21).

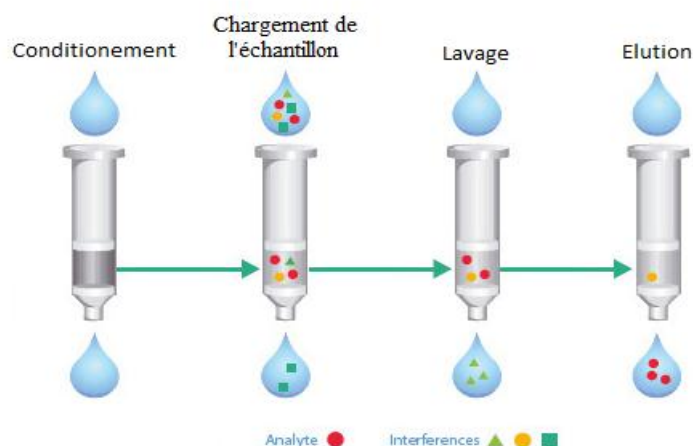


Figure 5: Représentation schématique des quatre étapes constituant une extraction en phase solide : le conditionnement permettant l'activation des sites actifs puis la rétention des analytes effectuée lors du chargement, ensuite le lavage de la cartouche supprimant le maximum d'interférents et le minimum de molécules d'intérêts, et enfin la récupération des analytes lors de l'élution.

La première étape est le conditionnement de la phase stationnaire. Cela permet de mouiller et d'activer les sites de rétention constituant le centre des interactions moléculaires. Cette action est effectuée par le biais d'un solvant organique, qu'il faut donc choisir en fonction du support utilisé. Généralement, pour des adsorbants hydrophobes, le méthanol est utilisé, puis un second solvant qui a les caractéristiques ioniques et de pH proche de celui de l'échantillon (21,22).

La seconde étape est le dépôt de l'échantillon. Le but est de provoquer une rétention quantitative des analytes d'intérêts sur la phase stationnaire. Cela élimine également un maximum d'interférents qui ne sont pas retenus. Sur cette étape, la vitesse est un paramètre important car si elle est trop rapide la rétention des analytes ne s'effectue pas et inversement si celle-ci est trop lente, l'élimination des interférents n'est plus aussi efficace. La vitesse d'écoulement de l'échantillon doit donc être modérée.

L'étape de lavage a pour but de supprimer les interférents faiblement retenus. Il faut choisir des solvants de faibles forces éluantes pour n'éluer que les interférents. Il est recommandé à la fin de cette étape d'assécher le support pour évaporer les traces de solvant de lavage. Cette étape améliore le rendement d'extraction. Cette action n'est pas systématique mais elle améliore nettement la propreté de l'extrait et donc contribue à une analyse de qualité.

L'étape finale est celle de l'élution. Pour cela, la recherche du solvant de plus faible force éluante capable d'entraîner tous les analytes est nécessaire pour éviter l'ajout d'interférents fortement retenus. Le choix du solvant est aussi guidé par sa facilité d'évaporation ou sa compatibilité avec la technique analytique suivante. Il doit néanmoins être le plus efficace possible et son volume doit être le plus faible possible de manière à obtenir un facteur de pré-concentration très important.

Tout comme en chromatographie, il faut adapter l'adsorbant en fonction des molécules d'intérêts (figure 6). Celui-ci doit être capable d'extraire toutes les molécules souhaitées avec un bon rendement, mais également obtenir que l'extrait soit propre. Il faut donc prendre en compte les différents paramètres déterminant la force de rétention tel que la polarité, la solubilité ou encore la présence de groupements fonctionnels (21). Le choix de cet adsorbant permet de définir une sélectivité spécifique aux composés d'intérêts ainsi qu'une capacité de charge suffisante à l'entière adsorption de ceux-ci.

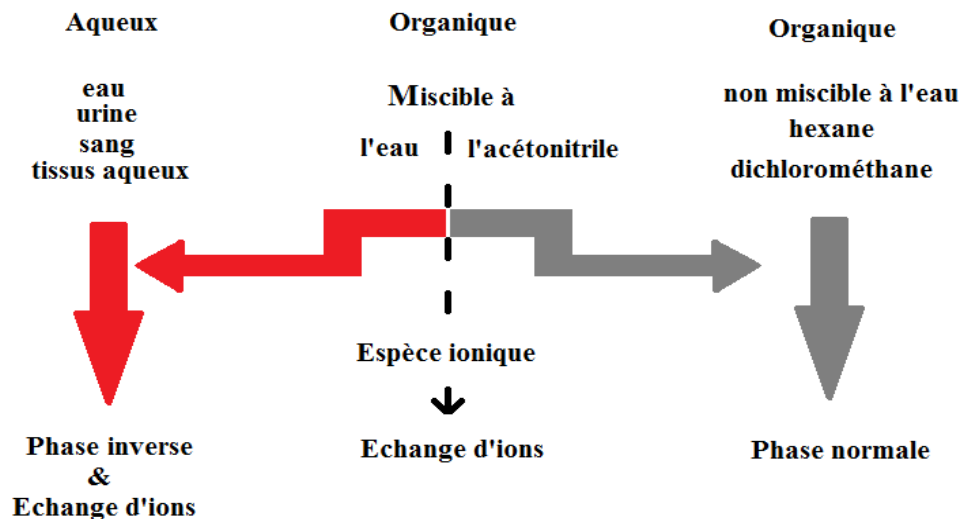


Figure 6: Représentation schématique des chemins en SPE. Il faut choisir la cartouche SPE adaptée en fonction des analytes et de la matrice, en prenant en compte les propriétés de l'échantillon, afin d'utiliser les cartouches de phase inverse et échangeuse d'ion pour un échantillon aqueux ou miscible à l'eau, ou utiliser les cartouches de phase normale pour un échantillon organique non miscible à l'eau.

Il existe deux grandes familles d'adsorbants, les polymères et les silices, qui possèdent des caractéristiques très différentes.

Les polymères sont très stables chimiquement et peuvent résister à des pH de 1 à 14. Par contre, ils sont faiblement sélectifs. Ils possèdent une grande capacité de charge du fait de leur surface spécifique et permettent la purification de nombreuses molécules ou de familles de molécules.

La seconde famille des silices restent les adsorbants de référence, très utilisés et représentant 90% du marché. Malgré leurs stabilités chimiques moins importantes que les polymères et leurs stabilités au pH compris entre 2 et 7,5, elles sont beaucoup plus sélectives. Dans cette famille quatre groupes se distinguent par leur mode de fonctionnement ainsi que par leur sélectivité. Les premières silices sont dites phases inverses. Les greffons hydrophobes fonctionnent selon les interactions de type Van der Waals (21). Elles permettent l'isolement de familles de composés polaires ou faiblement polaires. Lorsque les composés sont ionisables, l'ajout de tampon est possible.

Pour la purification des molécules dont la structure possède des groupements polaires, le solvant influe sur les interactions mises en jeu. Un solvant polaire favorise les interactions apolaires entre l'adsorbant et les composés.

Le troisième groupe est l'échange d'ions. Le mécanisme mis en œuvre est l'interaction ionique. Dans ce cas, le greffon crée une attraction forte avec des molécules. Cette interaction dépend essentiellement du pH et de la force ionique du contre-ion (23). Plus l'acide et la base appariés sont forts, plus la liaison est forte, ce qui peut poser problème pendant l'élution et l'obtention de bons rendements. Il existe deux types de greffons d'échange d'ions : les phases échangeuses d'anions qui sont généralement des amines quaternaires pour l'extraction d'acide faible portant une ou plusieurs charges négatives et les phases échangeuses de cations utilisées pour extraire tous les composés basiques faibles portant une ou des charge(s) positive(s) (24). Le dernier type de silices est dit mixte. C'est une des techniques les plus sélectives des adsorbants. Cette silice possède un double greffon, échange d'ion et chaîne carbonée hydrophobe, ce qui apporte une sélectivité supplémentaire.

Pour une approche simplifiée et moins coûteuse, la méthode QuEChERS est testée dans un second temps. Le nom est un mot-valise formé à partir de "Quick, Easy, Cheap, efficace, robuste and Safe" Cette technique est issue des travaux de recherches réalisés par le Ministère américain de l'agriculture pour les chimistes analytiques afin d'examiner les résidus dans les aliments. Des études sur les contaminants dans le miel comme les pesticides ou les insecticides utilisent cette méthode (8,15,25). Ce moyen d'extraction se compose de plusieurs étapes (figure 7).

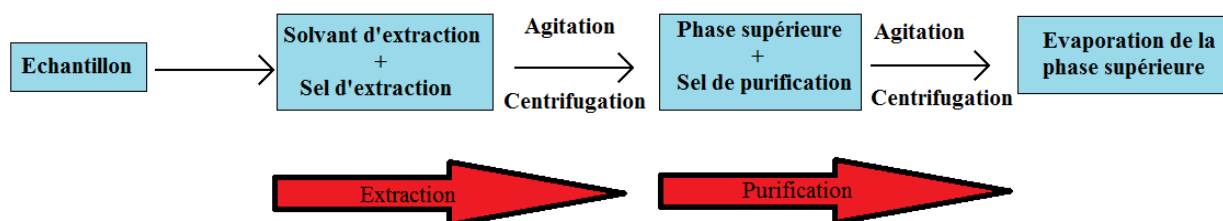


Figure 7: Représentation schématique des deux phases essentielles de l'extraction QuEChERS. La première phase composée des étapes d'ajout des solvants et sels d'extraction et la seconde du prélèvement de la phase supérieure et de l'ajout de sel de purification.

L'échantillon est d'abord dissout avec un solvant miscible à l'eau comme de l'acétonitrile puis extrait en présence de sels d'extraction permettant une meilleure séparation de phases. Afin d'améliorer l'extraction, il est possible d'utiliser des tampons ou des acides (16,26). Cela permet d'éviter la dégradation des molécules d'intérêts les plus sensibles. L'aliquote de la phase organique est récupéré puis purifiée en mélangeant l'aliquote avec un adsorbant. Des quantités précises de MgSO₄ et d'adsorbants pour éliminer l'eau en excès ainsi que les contaminants indésirables des extraits sont ajoutés. Après agitation et centrifugation, les extraits purifiés sont prêts à être analysés. Il est possible d'ajuster le pH de l'extrait purifié pour protéger les analytes. Les différents adsorbants ne possèdent pas les mêmes caractéristiques. Pour l'élimination des traces d'eau, le sulfate de sodium anhydre est préconisé. Pour les acides gras ou organique, les sucres et les pigments, l'utilisation de silice greffée amine primaire et secondaire est préférable. Alors que pour les interférents apolaires, l'emploi de la silice greffée C18 est meilleure. Le choix de l'adsorbant est donc important. Cette technique utilise des tubes prêts à l'emploi avec des quantités précises de produit d'extraction ou de purification. Cela présente de nombreux avantages comme la réduction de manipulations via les mélanges des sels et d'adsorbants évitant les contaminations et réduisant le temps d'expérience.

L'extraction liquide-liquide est la troisième méthode expérimentée. Cette technique est un procédé physique permettant la récupération ou la purification d'un composé en utilisant les différences de solubilités.

Les principales étapes de cette extraction sont d'abord l'extraction du soluté. Pour cela, l'utilisation d'un solvant non miscible à l'échantillon mais permettant la dissolution des analytes donne ainsi deux phases. Le soluté se répartit alors en fonction de son affinité propre pour l'une ou pour l'autre mettant en jeu un phénomène de partage. Après centrifugation, la séparation des deux phases est totale. Ensuite, il est possible d'effectuer un lavage pour retirer certaines impuretés extraites et ainsi améliorer la sélectivité du procédé. La dernière étape est la récupération des solutés. Celle-ci peut être faite par distillation, par évaporation ou par précipitation selon les propriétés des analytes et du solvant par exemple. Il est évident que cette extraction repose principalement sur le choix du solvant. Celui-ci doit avoir une capacité d'extraction très importante ainsi qu'une grande sélectivité vis-à-vis des solutés indésirables, mais il ne doit pas être soluble avec l'échantillon. Le solvant doit également posséder des caractéristiques physiques comme le temps de séparation ou une viscosité acceptable. La réunion de toutes ces conditions est souvent délicate.

Cependant, il est possible de recourir à des mélanges comme l'addition d'un diluant modifiant les propriétés physiques comme l'abaissement de la viscosité.

Une des contributions récentes et innovantes aux techniques d'extractions est l'extraction accélérée en solvant chaud pressurisé (PLE, Pressurised Liquid Extraction ou ASE, Accelerated Solvent Extraction) (27-29) (figure 8). La réduction des volumes nécessaires à l'extraction, l'efficacité de l'extraction et son automatisation sont les principaux avantages de cette technique. Pour ce quatrième type d'extraction, le facteur prépondérant est la nature du solvant. Après avoir chargé l'échantillon dans la cellule d'extraction, le reste de la manipulation est automatisée et s'effectue en plusieurs étapes. En règle générale, les études sont faites par alternance de mode statique et dynamique. Une fois la cellule remplie, celle-ci est placée dans le four, puis le solvant est ajouté et la cellule pressurisée. Lorsque les valeurs de pression et de température sont atteintes, l'étape d'extraction statique se poursuit durant laquelle les molécules d'intérêts vont passer de l'échantillon au solvant. A la fin de cette étape statique, le solvant est envoyé vers le flacon de récupération. Pour finaliser l'extraction, du solvant frais exempt d'analytes, est ajouté et récupéré dans le même flacon à l'aide d'une purge avec un gaz inerte comme de l'azote. Afin d'obtenir une extraction la plus efficace possible, le choix du solvant est crucial. Ce dernier doit solubiliser les composés souhaités tout en réduisant l'extraction des autres composants de la matrice. Le choix du solvant est étroitement lié aux propriétés physico-chimiques des composés, comme par exemple leur polarité, leur solubilité dans les différents milieux (28). Dans le cas où le solvant et les analytes ont une polarité proche, il est possible d'utiliser des mélanges de solvant de polarités différentes, ce qui rendrait l'extraction plus efficace.

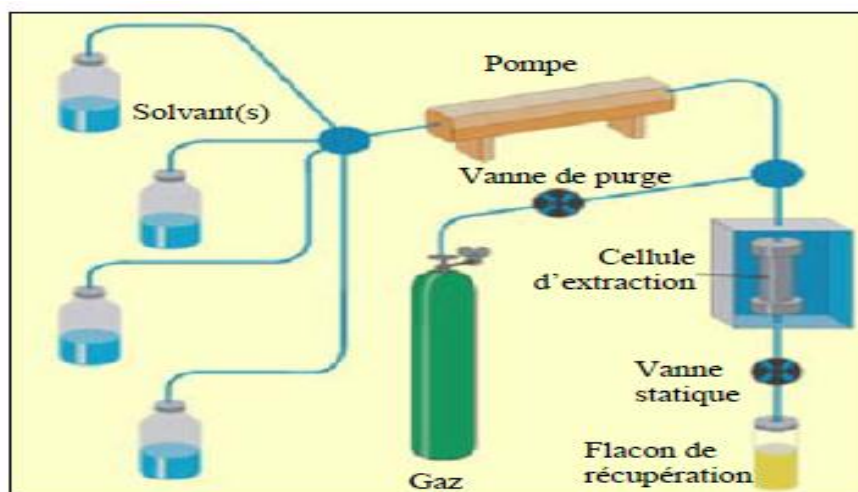


Figure 8 : Schéma d'un système d'extraction à solvant chaud pressurisé. Les solvants sont aspirés pour remplir la cellule contenant l'échantillon puis la cellule est chauffée et mise sous pression pour que les analytes passent de l'échantillon au solvant, qui est ensuite récupéré. La vanne statique se ferme lors de la mise sous pression et s'ouvre pour la récupération.

2.-Matériels et méthodes

Antibiotiques

La méthode vise à dépister de nombreux antibiotiques de huit familles différentes. Les sulfamides, les tétracyclines et les aminoglycosides sont des familles déjà utilisées contre les loques européennes et américaines. D'autres familles apparaissent dans les traitements pour les abeilles comme par exemple la pénicilline G, c'est pourquoi les familles des pénicillines, des céphalosporines, des quinolones, des lincosamides et des macrolides sont également étudiées. L'annexe 1 indique les 63 antibiotiques recherchés.

Les antibiotiques analysés appartiennent à plusieurs classes :

- Les pénicillines : pénicillines G et V, amoxicilline, ampicillines, oxacilline, cloxacilline, dicloxacilline et nafcilline.
- Les céphalosporines : céphalonium, ceftiofur, cefquinome, cephapirine, cephalosporine, cephoperazone et cephalexine.
- Les macrolides : tulathromarqueur, tulathromycine, néospiramycine, spiramycine, érythromycine, josamycine, tilmicomycine, tylosine, o-acétyltylosine et tylvalosine.
- Les sulfamides : sulfanilamide, sulfaguanidine, sulfadiazine, sulaméthoxazole, sulfathiazole, sulfamérazine, sulfamonométhoxine, sulfaméthoxyridazine, sulfaquinoxaline, sulfadoxine et sulfadiméthoxine.
- Les aminoglycosides : spectinomycine, gentamycine (C1a C1 C2) kanamycine, apramycine, streptomycine, dihydrostreptomycine néomycine et paromomycine.
- Les lincosamides : lincomycine.
- Les tétracyclines : tétracycline, doxycycline, oxytétracycline, et chlortétracycline,
- Les quinolones : acide nalidixique et oxolinique, fluméquine, ciprofloxacine, danofloxacine, enrofloxacine, marbofloxacine, sarafloxacine et dicloxacine.

✓ **Les solutions**

Pour les extractions, les 2 g de miel sont supplémentés avec une solution d'antibiotiques préparée à partir de solutions mères. Chaque antibiotique possède une solution mère réalisée à partir d'une poudre de matière première. La plupart des matières premières appelées aussi standards analytiques ont été fournis par Sigma Aldrich.

Ces solutions sont toutes à la concentration de 0.5 mg.ml^{-1} . La fabrication nécessite donc juste la pesée adéquate, calculée en fonction de la pureté de la poudre et de la dissoudre dans le solvant approprié, chaque solution mère est conservée au congélateur pour une question de stabilité. La solution de supplémentation est préparée à partir des solutions mères par une dilution appropriée, afin d'obtenir la concentration choisie dans le miel (annexe2).

✓ **Les échantillons**

Le miel utilisé pour la mise au point de l'extraction est en réalité un mélange de quatre miels de bio coopération d'origines florales différentes. Il est composé d'un miel de tournesol jaune et crémeux, d'un miel d'acacia jaune plus clair et de texture plus liquide ainsi que d'un miel marron de romarin et d'un miel liquide marron très foncé. Chaque protocole d'extraction est effectué avec 2 g de miel pour toutes les techniques comparées.

2.1. Analyse LC/MS-MS

Le spectromètre de masse TSQ vantage est couplé à une chromatographie haute performance (CLHP), qui permet d'effectuer des opérations CL-SM/SM. Il peut recevoir une sonde d'électro nébulisation H-ESI, pour travailler en mode ESI chaud ou froid, ou une sonde APCI. Le système peut fonctionner en détection mode positif ou négatif.

Plus en détail, l'appareillage se compose de :

✓ **Spectromètre de masse**

Les expériences ont été réalisées sur un spectromètre TSQ vantage qui se base sur la technologie Hyper Quad et une cellule unique à géométrie 90°. Cela permet un transfert d'ions et une sélectivité de masse très élevés ce qui entraîne une résolution, une sensibilité et une performance de qualité. La gamme de masse de cet appareil est de 10 uma à 1500 uma. Le spectromètre de masse opère sous un vide poussé (10^{-3} - 10^{-7} mbar) sans lequel les ions créés à la source rencontreraient de trop fréquentes collisions qui auraient un impact sur la focalisation du faisceau ionique. Le vide est maintenu par deux pompes primaires à palettes de types Edwards et une pompe hybride turbo moléculaires Leibold à trois étages (220/150/15). La première région de vide qui concerne le tube et la lentille skimmer, est connectée à la pompe rotatoire. Celle-ci assiste la seconde pompe, qui ne peut pas fonctionner seule contre la pression atmosphérique.

✓ **Chaîne LC :**

La pompe Accela est une pompe quaternaire. Le mélange est effectué à basse pression. Elle possède un dégazeur en ligne à membrane intégrée. La pompe possède un test de pression qui stoppe la machine en cas de fuite ou de suppression ainsi que d'un système de rinçage des joints. Les quatre solvants, totalement indépendants, peuvent être combinés aux choix permettant de travailler en mode en isocratique avec un débit de 0.1 à 1000 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ ou en mode gradient même rapide jusqu'à 25 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Pour cette méthode chromatographique de phases inverses, la colonne utilisée est une colonne Kinetex 50*2.1 mm 2.6 μm greffée C18. Elle être utilisé entre un pH de 1.5 à 10 en mode isocratique. Pour la granulométrie la contre pression supportée est de 600 bars. Un four mistral 880 est utilisé afin de conserver une température stable et optimale sur la colonne. Une large zone de plaque chauffante permet d'augmenter la température jusqu'à 90°C et le refroidissement Peltier de la descendre à 5°C.

✓ **Passeur :**

Le passeur THERMO PAL (CTC HTC PAL) est un robot XYZ avec seringue il permet l'injection, sur une gamme de 0.1 à 5000 μl avec une vitesse d'injection de 0.01 à 250 $\mu\text{l}\cdot\text{sec}^{-1}$, d'un échantillon liquide aussi bien CLHP qu'en U-CLHP jusqu'à la pression supportée de 1000 bars. Il possède un système de réfrigération des échantillons de 4 à 70°C. Il est piloté par le logiciel xcalibur ce qui permet une programmation des injections. Sa station de rinçage permet un lavage interne et externe de l'aiguille évitant toute contamination.

2.2. Méthode

2.2.1. Préparation d'échantillons : protocole final d'extraction

- Peser 2 fois 2 ± 0.04 g de miel exempt d'antibiotique.
- Ajouter 40 μ l de solution de sulfaphénazole à 1 μ g/ml (standard interne) à chacun des tubes.
- Agiter
- Ajouter 800 μ l d'eau aux blancs d'extraction et 600 μ l d'eau aux échantillons supplémentés. Agiter. Laisser les échantillons à l'obscurité pendant 15 minutes.

Extraction à l'HFBA

- Ajouter 1 ml de tampon de Na_2HPO_4 0.1M et pH8 et dissoudre le miel par agitation
- Ajouter 80 μ l de HFBA puis 2 ml d'ACN
- Vortexer et agiter à l'agitateur rotatif pendant 10 min
- Placer 2 min aux ultrasons
- Centrifugation à 14000g pendant 5 min à 5°C
- Transférer la phase supérieure dans un tube à évaporer
- Ajouter 10 μ L d'ammoniaque à 25% environ et ajuster à pH 7
- Evaporer sous flux d'azote à 45°C
- Reprendre par 600 μ L d'acétate d'ammonium à 0.05M
- Filtration sur filtres à seringues (0.45 μ m)
- Injection

Extraction sur SPE STRATA-X (reversed 3cc/60mg)

- Conditionner les cartouches par 2 ml de Méthanol, suivi par 4 ml d'eau déminéralisée en 2 fois
- Ajouter 10 ml d'eau dans les échantillons, mettre au bain-marie (environ 50°C, 5 min) et vortexer 10 sec jusqu'à dissolution
- Transférer le surnageant sur la cartouche en filtrant sur filtre papier
- Utiliser une pompe à vide pour accélérer le débit environ 1 goutte/8sec (utilisée si besoin)
- Rincer avec 3 x 3 ml d'eau
- Sécher la cartouche 2 min sous vide (environ 10 Hg de mercure)
- Insérer les tubes de récupération
- Eluer avec 2 x 3 ml de Méthanol
- Evaporer à sec sous flux d'azote à environ 40°C
- Reprendre par 600 μ L d'acétate d'ammonium à 0.05M
- Filtration sur filtres à seringues (0.45 μ m)
- Injection

2.2.2. Conditions LC-MS/MS

Conditions chromatographiques :

- Colonne Kinetex (Phenomenex) 50*2.1 mm, 2.6 μ m
- Volume d'injection : 10 μ l
- Température de colonne : 25°C
- Température du passeur : 10°C
- Gradient (figure 9, tableau 1):

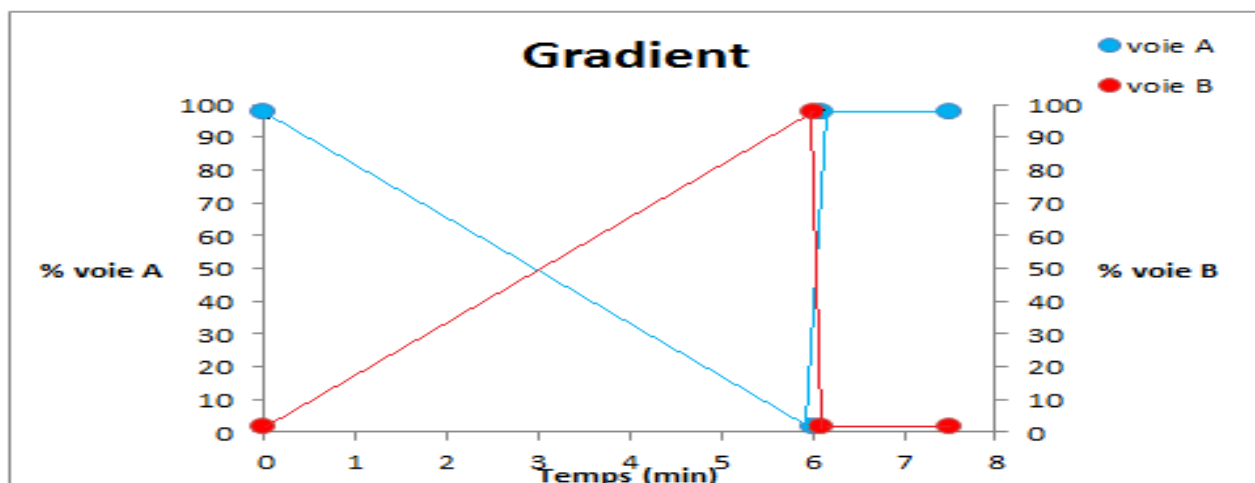


Figure 9 : Représentation graphique du gradient d'élution binaire entre l'eau acidifiée par 0.1% d'acide pentafluoropropionique et 0.5% d'acide formique (voie A) et l'acétonitrile acidifié dans les mêmes conditions (voie B).

Tableau 1: Récapitulatif du gradient optimisé pour une injection de 10 µl de solution standard pour la séparation des composés. Ce tableau donne le pourcentage de chaque voie de phase mobile.

N°	Temps(s)	A%	B%	C%	D%	Débit (µl.min ⁻¹)
1	0,00	98	2	0	0	400
2	6,00	2	98	0	0	400
3	6,10	98	2	0	0	400
4	7,50	98	2	0	0	400

Une fois les paramètres de la méthode optimisés, comme cela vient d'être évoqué, il est nécessaire d'étudier les moyens d'extraction et de purification de la matrice miel afin d'avoir des analyses fiables et robustes.

3. Résultats et discussion

Comme cela a été évoqué précédemment, ce stage se déroule en deux parties. La première est la détermination de l'extraction-purification la plus complète et pertinente. La seconde partie consiste à effectuer un screening, afin d'évaluer la méthode et d'avoir une idée sur les antibiotiques utilisés par les apiculteurs outre ceux recherchés. Pour une question de lisibilité, seulement les résultats d'un antibiotique par famille seront exposés. Mais avant, une explication sur l'optimisation de la méthode d'analyse est nécessaire.

3.1 Optimisation de la méthode LC-MS/MS

Pour que la méthode soit optimisée dans des conditions idéales, il est nécessaire de calibrer l'appareil. Suivant le manuel d'utilisation, cette calibration doit être effectuée tous les deux mois. Cela consiste à régler l'appareil suivant des données références pré-établies, afin d'obtenir un enregistrement et une reproduction fiable, c'est-à-dire une justesse sur les masses recherchées. Pour cela, la polytyrosine est infusée et sert de référence car tous les paramètres sont connus. Lors de cette infusion, le système de lentilles, les quadripôles ainsi que la résolution sont recalés par rapport aux valeurs de références.

D'un point de vue séparation des composés, la mise au point d'un gradient permet la séparation de substances de masses molaires différentes d'une série homologue comme les composés d'une même famille. Le gradient utilisé est binaire (tableau 1 et figure. 9). Celui-ci a été mis au point avec une injection de 10µl de solution standard contenant tous les analytes entre 0.25 à 2 ppm suivant les réponses des composés.

Lors de la mise au point de la détection de nouvelles molécules, il est nécessaire d'optimiser certains paramètres. Ceux-ci peuvent être classés en deux catégories :

- Les paramètres spécifiques aux molécules étudiées, comme par exemple l' "énergie de collision" à déterminer individuellement. Elle correspond à la tension appliquée au second quadripôle, qui engendre la fragmentation d'un ion parent donné en ions fils par collision avec des molécules ionisées du gaz de collision. De plus, la tension appliquée au système de lentilles "Tube Lens offset" ou "S Lens" en amont des quadripôles est importante. Ces Tube Lens permettent la focalisation des ions vers le "skimmer" en fonction du rapport masse sur charge.

- Les paramètres identiques pour toutes les molécules, comme la pression des différents gaz (tableau 2). Il est donc impératif de trouver les conditions optimales pour l'ensemble des analytes. De plus, ces paramètres définissent la qualité du spray à la sortie de l'aiguille de la sonde et influent sur l'efficacité de l'ionisation :

- ✓ la tension appliquée à l'aiguille "spray voltage" est indispensable en mode ESI pour obtenir l'ionisation. Celle-ci dépend de la phase mobile et varie en fonction de sa force ionique.
- ✓ la pression du gaz rideau "ion sweep gas" provoque la cassure des liaisons faibles et des turbulences.
- ✓ le "sheath gas" traduit par gaz séchant et ionisant assiste l'ionisation et crée le spray.
- ✓ l' "aux gas", pression du gaz auxiliaire qui aide l'ionisation et assèche la source.
- ✓ la "pression du gaz de collision", par défaut de 1.5mTorr (2.10⁻⁶ bar)
- ✓ la "température du capillaire". En effet, l'application de haute température participe à la désolvation. Il est important d'y faire attention lors d'étude de molécules thermolabiles. Elle aide aussi à la désolvatation et influe sur l'énergie cinétique des ions. Si elle est trop élevée, les molécules risquent de se fragmenter.

Tableau 2 : Récapitulatifs des paramètres fixes optimisés utilisés lors des analyses des échantillons.

Tension de l'aiguille	3000 V
Pression du " ion sweep gas"	4 mTorr
Pression du "sheath gas"	55 mTorr
Pression du gaz auxiliaire	20 mTorr
Pression du gaz de collision	1.5 mTorr
Température du capillaire	275°C

La détermination des ions précurseurs et des ions produits des molécules est effectuée en parallèle des paramètres individuels (figure 10.). Pour trouver l'ion majoritaire, il faut infuser une solution de chaque composé à 1 mg.L⁻¹ ou plus si le signal du composé est insuffisant. L'infusion consiste à injecter la solution directement dans la source sans passer par la colonne de l'HPLC. Elles sont injectées par l'intermédiaire d'une seringue placée sur le bloc d'infusion. Grâce à l'interface « tune plus » du menu instrument Setup, il est possible de visualiser le spectre MS et le spectre MS² en entrant différentes énergies de collisions. Ainsi, les ions produits sont déterminés ainsi que l'énergie de collision optimale pour obtenir 10 % d'ion parent sur le spectre MS². Cette étape est effectuée sans colonne chromatographique et avec l'utilisation d'un Tee pour insérer la phase mobile en même temps, afin de se rapprocher des conditions d'acquisition.

La méthode utilisée est inspirée d'une méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le muscle et le lait par CL/SM-SM (30). Elle utilise une phase mobile acidifiée entraînant de meilleurs signaux : en voie A de l'eau acidifiée avec 0.1% de l'acide pentafluoropropionique et 0.5% d'acide formique, et en voie B de l'acétonitrile acidifié de la même manière que la voie A. Toutes les molécules donnent un signal en mode positif et conduisent donc à un ion moléculaire [M+H]⁺.

Sulfamérazine

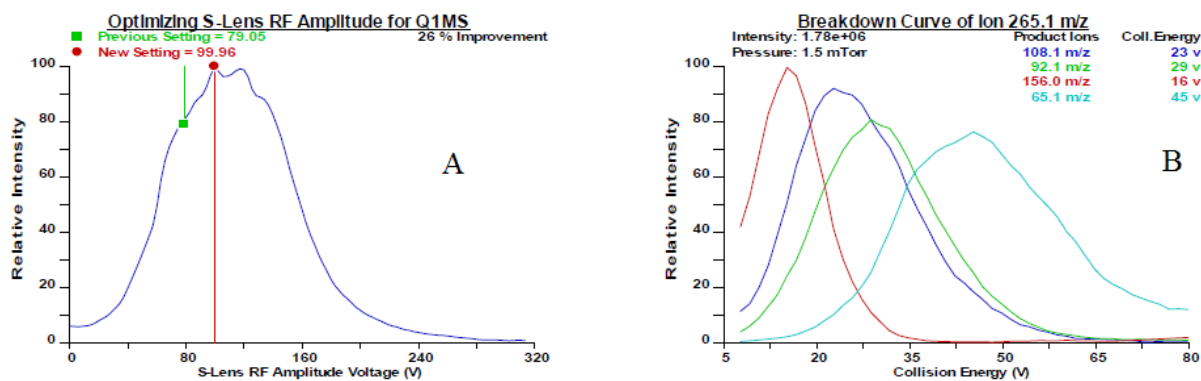


Figure 10 : Optimisation des paramètres individuels de la molécule de Sulfamérazine (S Lens, énergie de collision, les ions parent et les ions fils). L'optimisation de la tension appliquée au système de lentille(S-Lens)(A). En vert la valeur initiale et en rouge la valeur optimisée, ici la différence est de 26% (A). L'optimisation des ions produits et des énergies de collision associées (B). Sur ces résultats le choix des ions de masse sur charge 156.6 et 108.1 semblent être pertinents (B).

Le tableau 3 donne les ions de fragmentation et les ions parents d'une seule molécule par famille étudiée. La première transition est celle qui est prépondérante et la seconde transition sert de confirmation d'un point de vue réglementaire. L'annexe 1 donne le tableau complet de l'optimisation des 63 molécules d'intérêts.

Tableau 2 : Présentation d'une molécule par famille étudiée, donnant les paramètres individuels associés (les ions parents, les ions fils, les énergies de collision, le temps de rétention et le S Lens).

Familles	Analytes	1ère transition	CE (V)	S Lens	2ème transition	CE (V)	Tr (min)
Standard Interne	Sulfaphenazole (SI)	315/158,1	30	120	-	-	3.16
Sulfamides	Sulfadiazine	251/156	15	88	251/108,1	25	1.55
Quinolones	Sarafloxacin	386,1/299,1	27	114	386,1/368,2	21	2.90
Pénicilline	Pénicilline G	335,1/160	13	73	335,1/176	14	3.63
Céphalosporine	Cephapirine	424/152	23	105	424/124	40	2.31
Aminoglycosides	Dihydrostreptomycine	584,2/263,1	30	174	584,2/246,1	34	1.68
Lincosamides	Lincomycine	407,2/126,1	31	122	407,2/359,3	17	2.31
tétramycine	Chlortétracycline	479,1/444,2	20	114	479,1/462,1	16	3.03
Macrolides	Erythromycine	734,3/158	34	147	734,3/576,4	18	3.38

3.2. Comparaison de techniques d'extraction

Les différentes publications présentent des techniques d'extractions variées mais celles-ci ne concernent souvent qu'une famille d'antibiotiques ou de pesticides pour la matrice du miel. Le but de la méthode est de viser un grand nombre d'antibiotiques afin d'obtenir des analyses complètes et simplifiées lors des plans de contrôles. Le travail commence donc par adapter plusieurs protocoles issus de la bibliographie pour essayer d'obtenir une seule extraction.

3.2.1. Extraction SPE

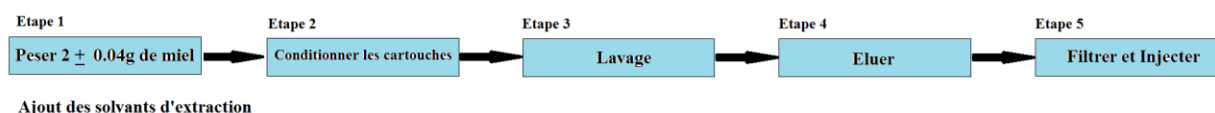


Figure 11 : Représentation schématique des cinq étapes constituant l'extraction en phase solide (SPE).

La première technique essayée est l'extraction en phase solide (SPE) (21). Dans les publications, l'utilisation des cartouches phase inverse (reversed phase) et des cartouches échanges d'ions sont récurrentes. Le point de départ est de définir laquelle de ces cartouches est la plus adaptée aux 8 familles d'antibiotiques étudiées en se basant sur les protocoles simples des fournisseurs. Les cartouches phase inverse de trois marques, Oasis HLB, Strata-x et Polyclean 302H ont été testées. Ensuite, les cartouches échangeuses d'ions ont été comparées à la meilleure des cartouches de phase inverse, en utilisant un protocole adapté. La cartouche échangeuse d'anions utilisée est conseillée pour les extractions basiques faibles et la cartouche échangeuse de cations pour les acides faibles. Dans le premier cas, l'ajout d'une base est recommandé par le fournisseur et dans l'autre cas l'ajout nécessaire est de l'acide. Le tableau suivant montre les résultats obtenus avec les différents types de cartouches et de fournisseurs.

Tableau 3 : Présentation des résultats des essais sur les différentes cartouches et fournisseurs testés des extractions, pour une molécule par famille, avec les protocoles de bases. Les rendements de ce tableau sont donnés en pourcentage.

Analytes	Strata-x	Oasis HLB	Polyclean 302H	Cation Weak	Anion Weak
Sulfanilamide (Sulfamides)	82	59	39	16	47
Sarafloxacin (Quinolones)	68	78	50	61	92
Oxacilline (Pénicillines)	59	28	88	57	95
Céphalonium (Céphalosporines)	129	61	42	67	237
Paromomycine (Aminoglycosides)	64	24	3	43	65
Lincomycine (Lincosamides)	120	84	63	107	76
Chlortétracycline (Tétracyclines)	81	57	69	85	70
Erythromycine (Macrolides)	220	250	65	64	104

Le tableau 4 donne le rendement des extractions. Le rendement d'extraction est le rapport entre la quantité d'un analyte dans un échantillon dopé au début de l'extraction (le supplémenté) et la quantité d'un analyte dans un échantillon dopé à la fin de l'extraction (le blanc d'extraction). Il n'est pas calculé par rapport à la quantité de l'analyte présente dans un standard en solution afin de s'affranchir de l'effet de matrice, parfois très important. Lorsque ceux-ci sont très supérieurs à 100%, cela signifie que les pics ne sont pas bien définis et donc que ce rendement n'a pas de signification (pic absent dans le supplémenté et dans le blanc d'extraction). Les rendements présentés sur le tableau 4 indiquent de meilleurs rendements, pour plusieurs familles, avec les cartouches échangeuses d'ions. Cependant l'absence de beaucoup de molécule est à prendre en compte (figure 12).

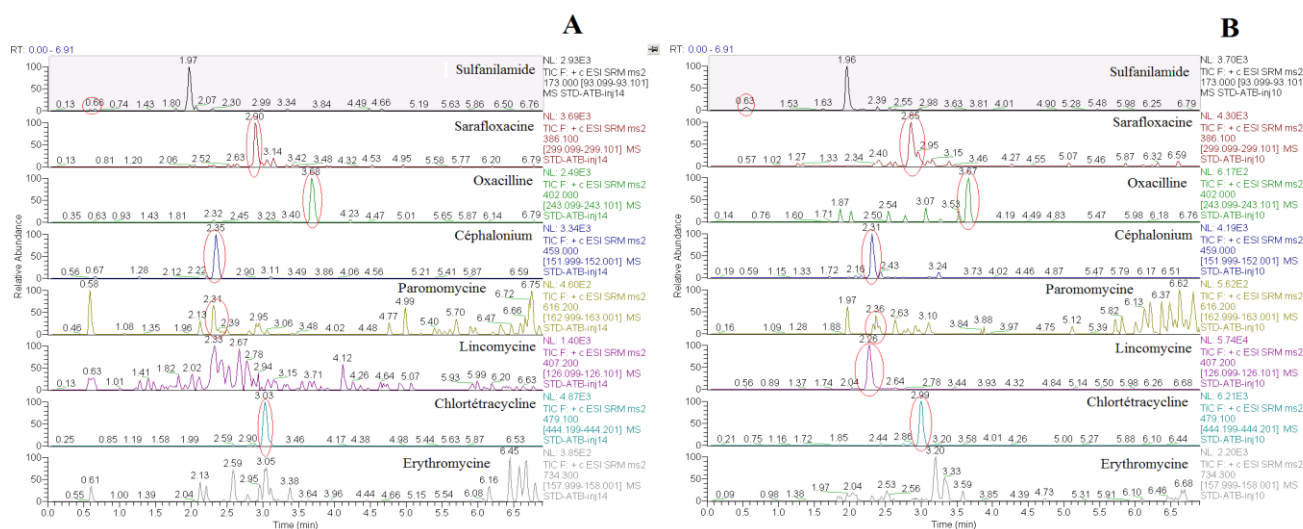


Figure 12 : Etude de l'influence de différents types de cartouches, échangeuse de cation (cation weak) (A) et de phase inverse Strata-x (B). La co-élution ou l'absence de l'érythromycine, la paromomycine et la lincomycine est observable sur le chromatogramme A de plus seule la famille des quinolones, des bêta-lactam et des tétracyclines sont extraites correctement et la sulfanilamide est présente en très petites quantités puisque son rendement est de 16 % (tableau 4) (A). Alors que sur le chromatogramme B la majorité des molécules d'intérêts sont présentes.

Les cartouches Strata-x et Oasis HLB sont celles qui extraient le plus d'analytes puisque seuls les aminoglycosides sont mal extraits, mais leurs rendements restent inférieurs à ceux des cartouches d'échanges d'ions. Le choix s'est effectué également à l'aide des chromatogrammes. Ceux de l'extraction avec la cartouche Oasis HLB sont plus bruiteux, c'est pourquoi la suite des essais SPE s'effectue avec des cartouches phase inverse Strata-x.

Après le choix de la cartouche utilisée, différents protocoles ont été testés afin d'augmenter les rendements d'extractions, ainsi que d'augmenter le nombre de molécules extraites. Dans certains protocoles, le conditionnement de l'échantillon est différent, il est possible d'acidifier ce dernier ou encore d'ajouter un tampon (6).

L'addition d'acide s'effectue dans le conditionnement de l'échantillon (Figure 11 étape 1) afin de pouvoir retenir les molécules ionisables avant une élution spécifique. L'acide phosphorique est ajouté à raison de 200µl en plus des 10ml d'eau pour dissoudre le miel.

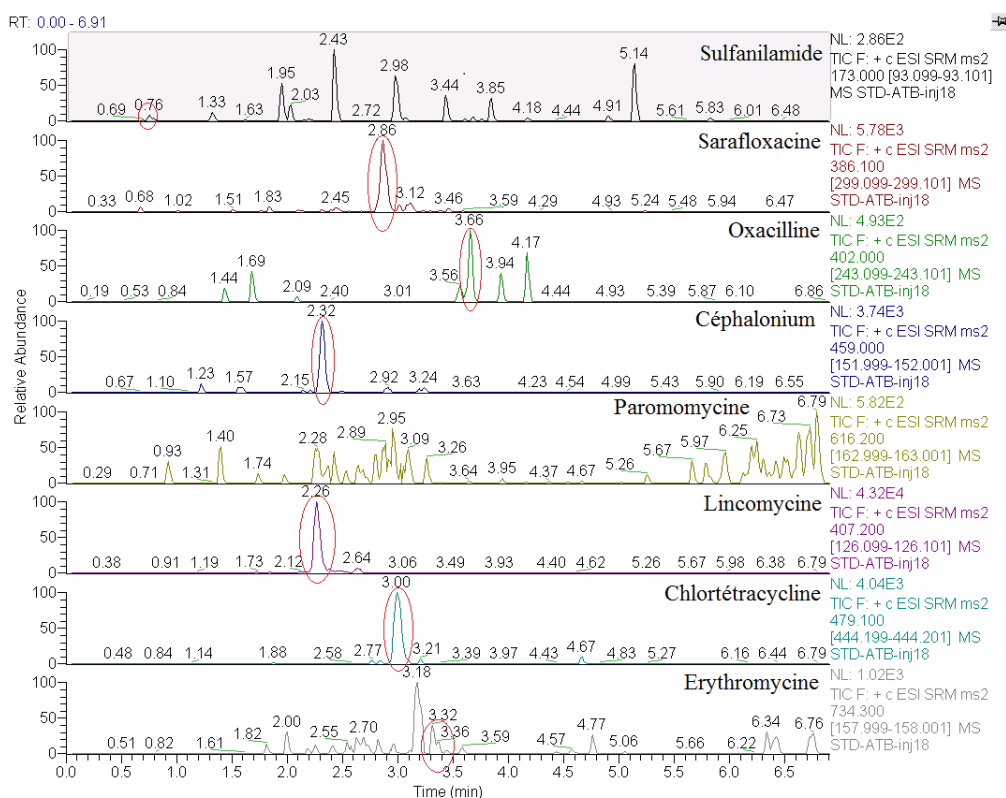


Figure 13 : Chromatogramme de l'extraction avec de l'acide phosphorique pendant le conditionnement de l'échantillon. La disparition de la famille des sulfamides et de la famille des macrolides est visible par ce chromatogramme. Le pic présent à la transition de l'érythromycine n'est pas au bon temps de rétention, 3.18 minutes au lieu de 3.38 minutes, elle donc absente.

La figure 13 présente les résultats de l'extraction acidifiée. Les signaux des molécules sont plus importants, mais la disparition de la plupart des sulfamides et des macrolides est flagrante. De plus les aminoglycosides ne sont toujours pas extraits. Malgré l'augmentation des signaux, l'extraction sans acide reste finalement plus adaptée.

Le protocole de la publication de J.L.M. Vidal et al. (6) utilise un tampon pour dissoudre l'échantillon (Figure 11 étape 1). De plus, l'élution de ce protocole est différente puisqu'en plus de 3 ml de méthanol suivit de 3 ml d'acétonitrile, l'élution s'effectue avec 3 ml d'ammoniaque à 0.04% dans le méthanol.

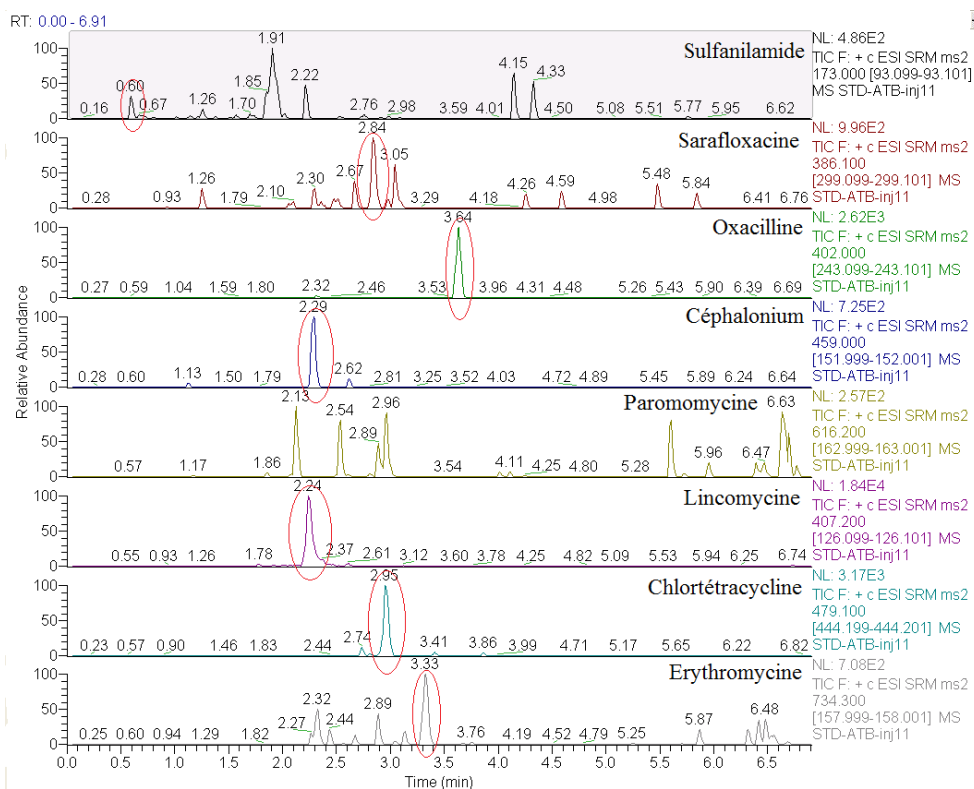


Figure 14 : Chromatogrammes de l'extraction utilisant un tampon. L'identification de toutes les familles hormis les aminoglycosides, comme pour les protocoles préalables est appréciable. Cependant une baisse des signaux et des rendements est observable avec l'utilisation du tampon.

L'utilisation du tampon entraîne une baisse des signaux par rapport au protocole de référence (figure 14). Par exemple, le signal en hauteur de pic pour la chlortétracycline diminue quasiment de moitié avec l'utilisation du tampon. Les rendements sont en général plus grands avec l'extraction de référence.

Afin de résoudre le problème d'extraction des aminoglycosides, un protocole à deux cartouches (31) est effectué. Les aminoglycosides sont divisibles en deux groupes en fonction de leur pH d'extraction. La première extraction s'effectue à pH 0.5 pour la néomycine, la paromomycines, les gentamycines (C1a, C1 et C2) et l'apramycine, et le second groupe s'extrait à un pH de 8.5 pour la dihydrostreptomycine, la streptomycine, la spectinomycine et la kanamycine. Le principe de cette expérience est de récupérer l'échantillon après son passage sur la première cartouche (étape 4), d'en modifier le pH, et de le transférer sur la seconde cartouche. Cette expérience entraîne une extraction des aminoglycosides, de manière variable suivant l'analyte puisque dans cette famille les rendements sont compris entre 10 et 92%. Une augmentation des rendements pour les familles des quinolones, des céphalosporines et des tétracyclines est observée, néanmoins avec une augmentation significative du bruit. Malgré cela, la détection des pénicillines n'est plus observable. Pour les macrolides, mise à part l'érythromycine, les rendements ne subissent pas d'évolution (95% et 97%). Quant aux sulfamides, ils sont extraits avec une baisse de signal. Cette extraction est donc intéressante car elle résout en partie le problème des aminoglycosides (tableau 5). Une extraction en deux parties pour extraire les antibiotiques avec des signaux et des rendements corrects est envisageable.

Tableau 4 : Présentation des rendements (%) de l'extraction à deux cartouches inspiré des travaux de W. Zhu.

Analytes	1 cartouche	2 cartouches
Sulfathiazole (Sulfamide)	65	35
Ciprofloxacin (Quinolone)	62	114
Cloxacilline (pénicilline)	80	0
Cefquinome (Céphalosporines)	66	88
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	13	56
Lincomycine (Lincosamide)	0	84
Chlortétracycline (Tétracycline)	42	107
Tulathromycine (Macrolides)	95	97

A la fin des essais d'extraction en phase solide, il ressort que les cartouches Strata-x de phase inverse sont les plus efficaces à l'étude.

Un essai sur des cartouches hydromatrix a également été effectué. Son principe est proche de l'extraction liquide-liquide puisque ces cartouches aident au partage de phases ; Il fonctionne sur le même principe que les cartouches SPE mis à part qu'il n'y a pas de conditionnement de celle-ci puisque ce n'est pas de la silice greffée mais du carbone C18. Il suffit donc de dissoudre le miel dans 10 ml d'eau et après une vive agitation, il faut additionner un peu de solution de chlorure de sodium avant de charger le mélange sur les cartouches. Les éluions au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et un mélange d'acétate d'éthyle et d'isopropanol (90/10) ont été comparées. Cependant, ces expériences ne sont pas concluantes.

Tableau 5: Comparaison de trois solvants d'extraction utilisés sur cartouche hydromatrix. Ces rendements (%) démontrent que la majorité des familles d'antibiotiques ne sont pas extraites puisque les rendements de quatre (ou cinq) des huit familles est quasiment néant.

Analytes	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	10% isopropanol
Sulfathiazole (Sulfamide)	23	23	18
Ciprofloxacin (Quinolone)	28	22	25
Cloxacilline (pénicilline)	19	36	0
Cefquinome (Céphalosporines)	0	0	0
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	0	0	0
Lincomycine (Lincosamide)	0	0	2
Chlortétracycline (Tétracycline)	18	20	15
Tulathromycine (Macrolides)	0	1	1

Le tableau 6 ci-dessus démontre que, quel que soit le solvant utilisé, les molécules ne sont peu voire pas extraites puisque les rendements sont compris entre 0 et 36%. Cette technique d'extraction est limitée étant donné le nombre de paramètres sur lesquels il est possible de varier.

En vue des résultats précédents, il semble que ce type de cartouches n'est en aucun cas adapté à l'extraction des antibiotiques d'intérêts.

3.2.2. Extraction QuEChERS

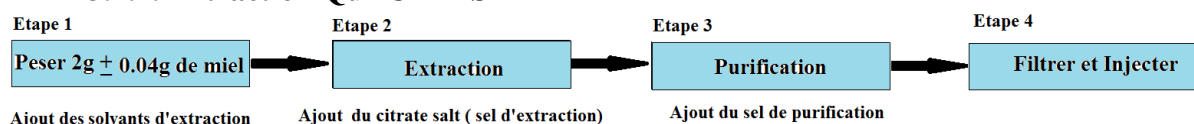


Figure 15 : Représentation schématique des quatre étapes constituant l'extraction QuEChERS.

Il est nécessaire de comparer différentes techniques d'extractions pour la suite des essais afin d'obtenir l'extraction la plus adaptée, efficace et fiable possible. La méthode récente d'extraction dite QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) est utilisée pour la matrice du miel mais essentiellement pour l'analyse des pesticides. Les protocoles publiés sont divers et variés.

Pour cette technique, différents paramètres ont été explorés. Tout d'abord les deux fournisseurs, Macherey et Agilent sont comparés avec les mêmes sels d'extraction (Figure 15 étape 2) et de purification (étape 3). Les résultats font ressortir de meilleurs rendements avec les kits Agilents. Cependant, beaucoup de molécules ne sont pas extraites comme les aminoglycosides ou les quinolones par exemple. Comme indiqué précédemment, les protocoles publiés sont très différents, c'est pourquoi il est important de comparer ceux qui semblent le plus adaptés ou adaptables aux molécules ainsi qu'à la matrice du miel. Afin de résoudre ce problème, l'essai du protocole mettant en jeu un tampon en plus d'acide formique (14) (Figure 15 étape 1) et permet une dissolution complète du miel entraîne une meilleure extraction.

Ensuite, le but est de confronter différents types de sel de purification proposés (Figure 15 étape 3) par l'entreprise Agilent. Le sel de purification permet d'éliminer l'eau et les interférents afin d'obtenir un échantillon concentré et le plus propre possible. Trois sels ont été évalués :

- ✓ le "*Fruit and Vegetable*", composé de 150mg PSA et de 900mg MgSO₄, recommandé pour les fruits et les légumes, est le kit valable pour la majorité des échantillons.
- ✓ le "*Fatty samples*", qui est un mélange de 150mg PSA, de 900mg MgSO₄ et 150mg C18 promettant l'élimination des interférents gras et de certains sucres.
- ✓ Enfin le dernier kit "*Hight pigment*" est prévu pour les analyses d'échantillons colorés, ce kit est un mélange de 150mg PSA, de 900mg MgSO₄ et 45mg carbone.

Les résultats (tableau 7) ne sont pas encourageants puisque la majorité des molécules ont été absorbés, soit lors de l'extraction, soit pendant l'étape de purification. Les rendements suivants obtenus avec les sels d'extraction visant à éliminer les interférents gras et les sucres ainsi que ceux acquis avec le kit pour les échantillons pigmentés sont quasiment nuls. De plus, les quelques macrolides extraits sont très bruiteux et donc peu exploitables. Quant à ceux obtenus avec le troisième kit (fruit and vegetable), seuls les sulfamides sont visibles mais les rendements sont peu élevés, de 25 à 63%.

Tableau 6 : Evaluation de l'influence du type de sel de purification utilisé en extraction QuEChERS rendu compte par les rendements (%).

Analytes	Fruit and Veg	Fatty samp	Hight pig
Sulfathiazole (Sulfamide)	42	14	15
Ciprofloxacin (Quinolone)	13	0	0
Cloxacillin (pénicilline)	3	1	2
Cefquinome (Céphalosporines)	0	0	0
Dihydrostreptomycine(aminoglycoside)	0	0	0
Lincomycine (Lincosamide)	6	3	5
Chlortétracycline (Tétracycline)	3	1	0
Tulathromycine (Macrolides)	1	0	3

L'influence du sel de purification est étudiée afin de savoir si celui-ci n'absorbe pas partiellement ou intégralement les molécules d'intérêts (tableau 8 et figure 16).

Tableau 7: Etude des effets de l'étape de purification et confirmation de l'hypothèse d'absorption de certains analytes par le sel de purification. Oservable par l'augmentation des rendements (%) de la manipulation sans purification pour la totalité des molécules extraites.

Analytes	Avec purification	Sans purification
Sulfathiazole (Sulfamide)	42	53
Ciprofloxacine (Quinolone)	13	59
Cloxacilline (pénicilline)	3	94
Cefquinome (Céphalosporines)	0	51
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	0	0
Lincomycine (Lincosamide)	6	66
Chlortétracycline (Tétracycline)	3	11
Tulathromycine (Macrolides)	1	113

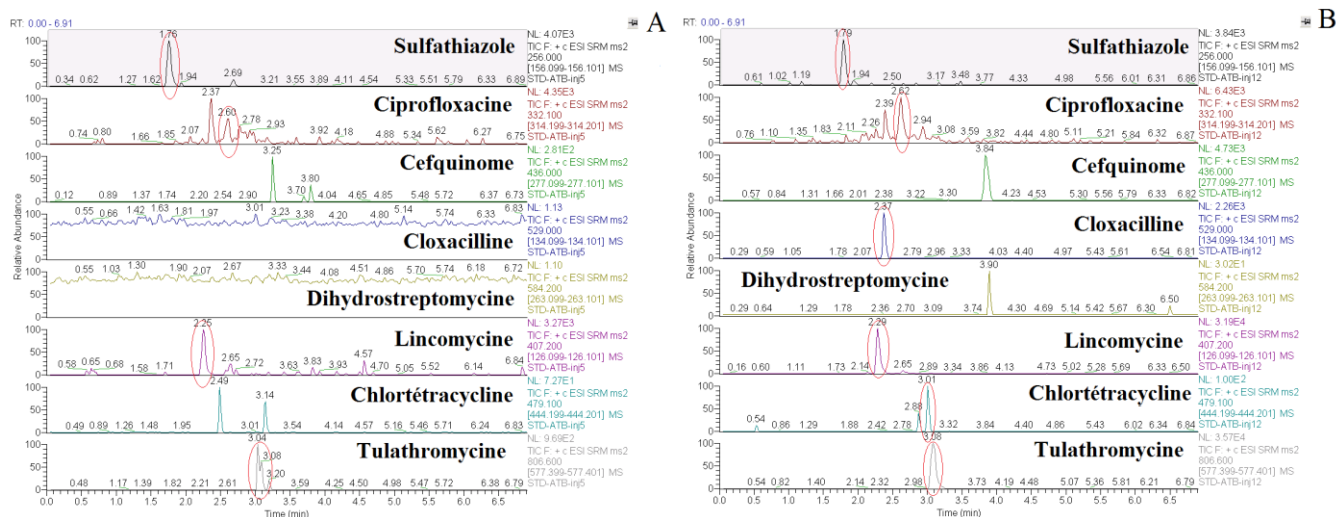


Figure 16 : Chromatogramme de l'extraction QuEChERS avec purification (A) et celui de l'extraction sans purification. Une nette augmentation des signaux est observable pour les familles des céphalosporines, des quinolones ainsi que pour les macrolides et la lincomycine. Une diminution est notée pour la famille des sulfamides.

Le tableau indique que le sel de purification élimine de nombreuses molécules, puisque mis à part la faible augmentation de rendement pour les sulfamides, l'essai sans l'étape 3 engendre une augmentation significative du rendement pour les quinolones, les lincosamides, les macrolides, les céphalosporines. Et malgré un rendement supérieur à 100% la famille des macrolides, est bien extraite. Cela peut provenir de la variabilité analytique ou de l'intégration. Cette technique d'extraction ne permet pas l'analyse d'aminoglycosides et des tétracyclines avec des rendements aussi faibles. Cela se confirme avec l'observation des chromatogrammes avec et sans purification (figure 16).

Afin d'améliorer cette technique, il est nécessaire de réaliser des essais sur le solvant d'extraction (étape 1) de l'échantillon tout en conservant les résultats précédents, c'est à dire en utilisant le sel d'extraction sans purification. Dans cette optique, différents solvants d'extraction sont comparés. Les essais de solvant sont l'eau, de l'acide acétique à 1% et un tampon d'acide d'éthyl diamine tétraacétique de sodium (Na_2DTA) (16,26). Le premier solvant d'extraction essayé est 8 ml d'acide acétique à 1% dans de l'acétonitrile (8,32). Cependant, l'état de charge des molécules provoqué par l'acidité ne permet pas une bonne extraction dans l'ensemble. Cela est peut-être également dû au fait que l'acide peut dégrader certains antibiotiques.

Ensuite, est testé le solvant le plus simple puisqu'il s'agit d'une simple dissolution à l'eau. Le troisième solvant s'appuie sur les travaux de Lombargo-Agui (16) et consiste à dissoudre le miel avec 8 ml de tampon. Un compromis entre l'eau et l'acide acétique est inséré dans les tests en conditionnant l'échantillon avec 2 ml d'eau et 6 ml d'acide dans un mélange d'acétonitrile à 80% et d'eau à 20% en volume (33). Un second compromis entre l'acide acétique et l'utilisation du tampon est mis en place. Ainsi, l'ajout de 6 ml d'acide acétique dans l'acétonitrile et de 4 ml de tampon de Na₂DTA est comparé avec les autres essais. Le tableau suivant donne les rendements de chaque extraction.

Tableau 8: Evaluation de la composition du solvant d'extraction, acide acétique (A), un mélange d'eau et d'acétonitrile (B), tampon d'acide d'éthyldiaminotétracétique de sodium (Na₂DTA) (C) puis deux compromis entre l'eau et l'acide acétique (D) ainsi qu'entre l'acide acétique et le tampon (E). Rendement en pourcentage.

Analytes	A	B	C	D	E
Sulfathiazole (Sulfamide)	15	15	0	40	63
Ciprofloxacin (Quinolone)	5	17	77	14	13
Cloxacilline (pénicilline)	0	0	130	13	3
Cefquinome (Céphalosporines)	0	0	64	0	0
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	0	0	0	0	0
Lincomycine (Lincosamide)	0	22	62	4	6
Chlortétracycline (Tétracycline)	0	2	55	1	3
Tulathromycine (Macrolides)	16	18	86	4	1

Les rendements indiquent que seul le tampon permet d'extraire cinq des huit familles de l'étude. Il semble que l'acétonitrile empêche l'extraction des céphalosporines, des pénicillines et de la lincomycine, plus solubles dans l'eau (tableau 9). Il en ressort que les quinolones et les tétracyclines sont extraites qu'en seule présence du tampon, à l'inverse des sulfamides qui sont absentes avec ce solvant d'extraction. Les macrolides sont extraits avec les trois premiers essais. Cependant, la meilleure extraction est avec le tampon puisque son rendement est 86% contre 16% et 18% pour l'acide acétique et l'eau combinée à l'acétonitrile (50/50). Par contre, dans tous les cas les aminoglycosides ne sont pas exploitables avec cette technique.

Afin de suivre le schéma de l'extraction à double cartouches, le pH a été incrémenté. Les pH 4 et 7 ainsi que 9 ont été comparés (étape 1) pour suivre l'idée de l'extraction à deux cartouches (31). Il en ressort que le pH possède une influence sur l'expérience. Les résultats de ce paramètre démontrent que les quinolones, les tétracyclines, les sulfamides et les macrolides sont mieux extraits à pH neutre. Les observations de la suite des expériences indiqueront que l'acide a des effets néfastes sur l'érythromycine. Cependant, les conclusions exposées sont correctes pour tous les autres macrolides. L'incrémentation du pH montre également que les céphalosporines sont peu influencés par ce paramètre tout comme le lincosamide. Il en ressort aussi que les pénicillines et les aminoglycosides ne sont pas visibles avec cette technique d'extraction (figure 17).

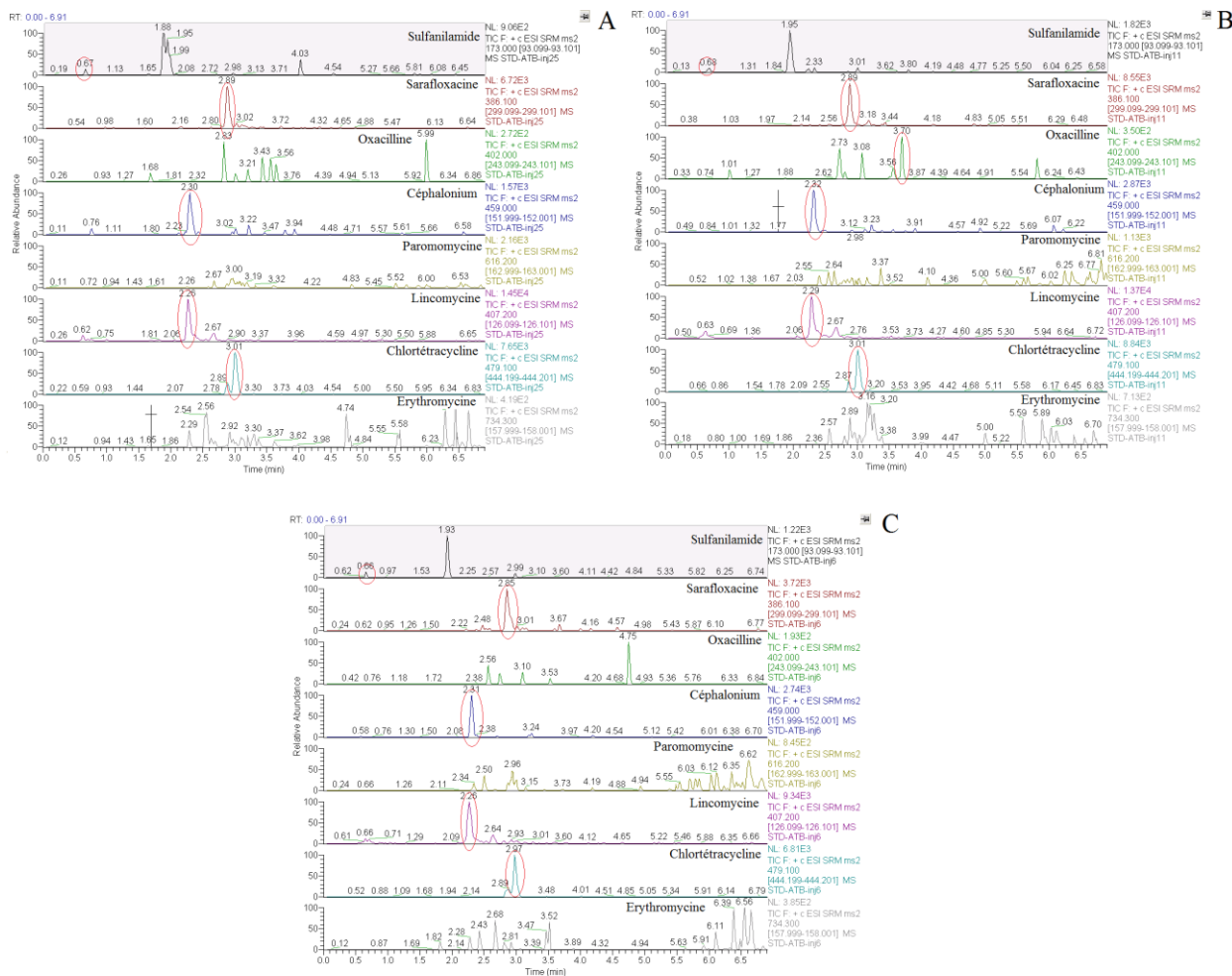


Figure 17 : Influence du pH sur l'extraction QuEChERS. Extraction à pH 9 (A), (B) à pH neutre et (C), extraction à pH acide. Les meilleurs signaux des familles des sulfamides, des quinolones et des macrolides sont à pH neutre. Alors que pour les céphalosporines et le lincosamide le pH n'a pas d'influence. L'extraction n'est pas observable pour les pénicillines et les aminoglycosides.

Dans les trois chromatogrammes, l'oxacilline et la paromomycine ne sont pas détectés. De plus, la sarafloxacin, le cephalonium, la chlortétracycline et la sulfanilamide, ainsi que la lincomycine sont visible. Le pH 7 donne des résultats légèrement meilleurs.

L'extraction QuEChERS la plus appropriée met en jeu le sel d'extraction *Fruit and Vegetable*, composé de 150mg PSA et de 900mg MgSO₄. Le sel de purification absorbant certaines molécules d'intérêts n'est pas utilisé lors de cette expérience et le conditionnement de l'échantillon est effectué avec un tampon d'acide d'éthyldiaminetétracétique de sodium (Na₂DTA).

3.2.3. Extraction liquide-liquide

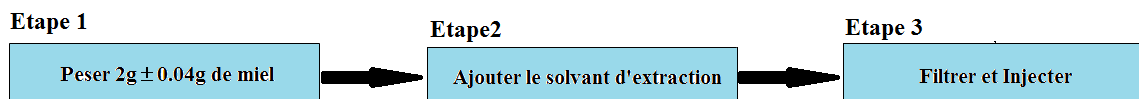


Figure 18 : Représentation schématique des trois étapes constituant l'extraction liquide-liquide.

Une autre méthode d'extraction simple et efficace est l'extraction liquide-liquide. L'inconvénient est que cette technique ne permet pas ou peu de purifier l'échantillon des interférents de la matrice. Etant donné que le principe de celle-ci est basé sur le partage entre deux solvants, il est donc impératif de commencer cette étude par un comparatif des différents solvants (figure 18, étape 2). Ceux utilisés ont tous en commun l'acétonitrile.

- ✓ Un mélange d'acide citrique et du même tampon que pour les extractions QuEChERS (aguilera luiz) (34).
- ✓ Le second solvant est un tampon dihydrogénophosphate de sodium (hammel),
- ✓ Le suivant reprend le même mélange avec l'ajout d'acide trichloroacétique (TCA) (14,32).
- ✓ Le quatrième mélange de solvant remplace le TCA par de l'acide pentafluoropropionique (PFPA) (7). Le dernier essai a été effectué qu'après avoir discuté des résultats des quatre premiers. Il met en jeu, en plus du mélange de solvant acétonitrile, de tampon et d'acide pentafluoropropionique, la glucuronidase. Cette enzyme permet habituellement de casser les liaisons protéiques des molécules liées à la matrice, ce qui a pour but de rendre plus propre les échantillons. L'objectif était de voir si elle peut casser les liaisons osidiques entre les sucres et les molécules (sulfamides liés par exemple).

Tableau 9: Evaluation de la composition du solvant d'extraction, mélange d'acétonitrile, d'acide citrique et du tampon précédant (A), un mélange de tampon, de dihydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) avec soit de l'acétonitrile (B), soit avec du TCA et de l'acétonitrile (C), soit de d'acide pentafluoropropionique (PFPA) (D), un mélange d'acétonitrile d'acide phosphorique et de PFPA combiné avec la glucuronidase (E). Rendement des extractions en pourcentage.

Analytes	A	B	C	D	E
Sulfathiazole (Sulfamide)	98	48	0	58	0
Ciprofloxacin (Quinolone)	47	0	0	83	0
Cloxaciline (pénicilline)	68	122	67	111	0
Cefquinome (Céphalosporines)	4	2	17	87	79
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	0	0	3	2	15
Lincomycine (Lincosamide)	32	8	21	83	70
Chlortétracycline (Tétracycline)	64	16	6	94	92
Tulathromycine (Macrolides)	23	15	122	95	73

Il semble que la combinaison de solvant d'extraction le plus efficace soit le mélange d'acétonitrile, de tampon dihydrogénophosphate de sodium et d'acide pentafluoropropionique, puisque celui-ci présente les rendements les plus hauts dans l'extraction des quinolones, des pénicillines, des tétracyclines, du lincosamides et des macrolides pour la majorité des molécules des familles citées (tableau 10). Mais il ne permet pas l'extraction des deux familles des céphalosporines et d'aminoglycosides. L'observation de ces deux rendements met en avant ce fait étant donné que celui de la dihydrostreptomycine est seulement de 2% et celui de la cefquinome est de 111%, ce qui est impossible. La vue du chromatogramme montre la présence de beaucoup de bruit ce qui rend l'intégration difficile et donc une confirmation délicate. L'enzyme n'apporte pas d'amélioration vu qu'en présence de celle-ci tous les rendements diminuent à l'exception des aminoglycosides qui subissent une légère augmentation. Cela est observable avec le passage de 2 à 15% du rendement de la dihydrostreptomycine.

Ainsi, le meilleur mélange de solvant d'extraction, c'est à dire le mélange d'acétonitrile, de tampon dihydrogénophosphate de sodium et d'acide pentafluoropropionique a été testé. Il convient donc de chercher à améliorer ce protocole. Lors de ce protocole le pH est ajusté à 7 juste avant l'évaporation. Il est donc impératif d'évaluer l'effet du pH, comme cela a été fait pendant les essais des méthodes précédentes (SPE et QuEChERS), en reprenant l'idée de W. Zhu

pour les aminoglycosides qui ne s'extrait pas toutes au même pH (31). C'est pourquoi quatre pH sont évalués 0.5 ; 5 ; 7 et 8.5.

Tableau 10 : Evaluation de l'effet du pH sur l'efficacité de l'extraction (rendements %)

Analytes	pH 0.5	pH 5	pH 7	pH 8.5
Sulfathiazole (Sulfamide)	60	22	58	28
Ciprofloxacin (Quinolone)	107	66	83	85
Cloxacilline (Pénicilline)	0	57	111	59
Cefquinome (Céphalosporines)	96	22	87	62
Dihydrostreptomycine (Aminoglycosides)	7	4	2	6
Lincomycine (Lincosamide)	51	34	83	49
Chlortétracycline (Tétracycline)	110	41	94	103
Tulathromycine (Macrolides)	118	71	95	95

Comme auparavant, le pH possède une influence (tableau 11). Il en ressort que le pH neutre reste le pH le plus adapté à l'extraction des antibiotiques ; mis à part les chromatogrammes des pénicillines très bruyants, dans ce cas un pH légèrement basique serait plus approprié. De plus, le rendement des sulfamides n'est pas optimal mais reste dans les meilleurs avec 58%.

Il semble intéressant d'observer l'effet de différents acides, c'est pourquoi l'acide pentafluoropropionique (PFPA) est comparé avec l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) et l'acide nonafluoropentanoïque (NFPA) qui sont plus lourds étant donné leurs chaînes carbonées plus longues.

Tableau 11: Influence du poids moléculaire de l'acide utilisé lors des extractions liquide-liquide (rendements %).

Analytes	PFPA	HFBA	NFPA
Sulfathiazole (Sulfamide)	58	66	7
Ciprofloxacin (Quinolone)	83	108	87
Cloxacilline (Pénicilline)	111	0	49
Cefquinome (Céphalosporines)	87	77	40
Dihydrostreptomycine (Aminoglycosides)	2	48	50
Lincomycine (Lincosamide)	83	82	30
Chlortétracycline (Tétracycline)	94	126	52
Tulathromycine (Macrolides)	95	21	37

Ce paramètre révèle des informations inattendues étant donné que pour la première fois les aminoglycosides sont extraits au plus bas rendement de 27 % pour la gentamycine C1 avec le NFPA (tableau 12). L'extraction HFBA est efficace pour cette famille. L'emploi de cet acide n'affecte pas les rendements des quinolones, des sulfamides, avec une petite amélioration, des céphalosporines et de la lincomycine. Les macrolides n'apprécient pas l'addition d'un acide plus lourd. Cela se constate par la chute de l'efficacité de l'extraction. Malgré un rendement de 126%, la chlortétracycline est extraite comme les autres antibiotiques de sa famille. Il est probable que la réponse du spectromètre ait été plus basse lors de l'analyse de l'échantillon supplémenté juste avant l'évaporation. Il convient donc de continuer l'étude avec l'emploi de l'acide heptafluorobutyrique.

Au final le protocole retenu met en jeu le tampon d'acide phosphorique de sodium à une concentration de 0.1 mol.L^{-1} et au pH de 8. Ce protocole préconise l'emploi d'acide heptafluorobutyrique (HFBA) et la neutralisation du surnageant avant l'évaporation.

3.2.4. Extraction ASE

La dernière technique d'extraction essayée est l'extraction accélérée en solvant chaud pressurisé (PLE ou ASE). Le laboratoire n'étant pas équipé de cette machine, les essais effectués sur cette technique sont réalisés à l'Institut en Santé Agro-Environnement (ISAE) de Combourg avec lequel l'Anses est en collaboration. Comme cela a été annoncé dans les rappels théoriques, le facteur prépondérant de cette extraction est le solvant (28). Les solvants les plus utilisés avec cette méthode ont été examinés :

- ✓ l'eau,
- ✓ un mélange d'eau et d'acétonitrile,
- ✓ un mélange d'eau et d'acétate d'éthyle
- ✓ et un mélange de TCA à 5% et d'acétonitrile

sont préparés afin de pouvoir faire tous les essais souhaités.

Le cycle s'appuie sur la publication de V. Carretero et al. Le cycle programmé est donc de 5 minutes de temps de chauffage à 70°C, et l'extraction statique commence au bout de 10 minutes. La pression est 1500 psi et le temps de purge à l'azote est d'une minute. Le cycle est un facteur secondaire, c'est pour cela que l'essai de deux cycles consécutifs est également mis en place. L'évaporation des solvants est effectuée dans le laboratoire de l'Anses. Les 40ml solvant récupérés représentent des quantités importantes et des tubes de grandes tailles, ce qui constitue un inconvénient car cela entraîne une division dans des tubes adaptés et une évaporation longue de plusieurs heures. De plus, la présence d'eau engendre des températures élevées nécessaires pour l'évaporation, ce qui a pour conséquence la caramélisation des échantillons. Ils deviennent donc non exploitables. Cette technique a pourtant des avantages liés à l'automatisation et souvent à une meilleure extraction.

Les contraintes de disponibilité et surtout celles subies lors de l'étape de l'évaporation indiquent que cette méthode d'extraction n'est pas idéale pour l'analyse d'antibiotiques dans le miel.

3.2.5. Choix du protocole

A la fin des tous ces recherches, un protocole par type d'extraction, à l'exception de la dernière méthode ASE, est obtenu.

Le meilleur protocole de la technique sur cartouche SPE est le suivant :

- ✓ Conditionnement des cartouches (Strata-X 60 mg, 3cc) : 2 ml de Méthanol, suivi par 4 ml d'eau déminéralisée en 2 fois.
- ✓ Ajouter 10 ml d'eau dans les échantillons.
- ✓ Mettre au bain-marie 5 minutes à environ 50°C et Vortexer 10 secondes afin d'avoir un miel complètement dissout.
- ✓ Chargement de l'échantillon : transférer le surnageant dans la cartouche en filtrant sur filtre papier (utilisation d'une pompe à vide pour accélérer le débit si nécessaire)
- ✓ Lavage : rincer avec 3 fois 3 ml d'eau.
- ✓ Séchage : sécher la cartouche 2 minutes sous vide, à l'aide d'une pompe environ 10 Hg de mercure pour éliminer les traces d'eau.
- ✓ Elution : 2 fois 3 ml de méthanol.
- ✓ Supplémenter les blancs afin de calculer les rendements.
- ✓ Evaporer à sec sous flux d'azote à 40°C.
- ✓ Reprendre les échantillons et les blancs par 400 µl de voie A de phase mobile.
- ✓ Filtrer sur filtres à seringues (0.45µm) puis injecter.

Quant au protocole QuEChERS le plus performant, il est obtenu avec le sel d'extraction fruits and vegetable et aucun sel de purification n'est utilisé.

- ✓ Conditionnement de l'échantillon : ajouter, au 2g de miel, 8 ml de tampon Na_2HPO_4 .
- ✓ Vortexer 30 secondes et agiter mécaniquement 10 minutes.
- ✓ Additionner " le citrate Quechers Salts " et agiter de suite à la main, pour éviter les agglomérats.
- ✓ Vortexer 10 secondes et agiter mécaniquement 10 minutes.
- ✓ Centrifuger 5 minutes (3000g, 4°C).
- ✓ Prélever la phase supérieure et insérée dans des tubes à évaporer.
- ✓ Supplémenter les blancs afin de calculer les rendements.
- ✓ Evaporer à sec sous flux d'azote à 40°C.
- ✓ Reprendre les échantillons et les blancs par 400 μl de voie A de phase mobile.
- ✓ Filtrer sur filtres à seringues (0.45 μm) puis injecter

Le protocole d'extraction liquide-liquide le plus adapté est le suivant :

- ✓ Ajouter 1 ml de tampon de Na_2HPO_4 à la concentration de 0.1M et à pH 8, ainsi que 80 μl HFBA et 2 ml acétonitrile.
- ✓ Vortexer et agiter mécaniquement pendant 10 minutes, puis placé 2 minutes aux ultrasons
- ✓ Centrifuger 5 minutes (14000g, 4°C).
- ✓ Prélever la phase supérieure et insérée dans des tubes à évaporer.
- ✓ Ajuster le pH avec de l'ammoniaque à 7.
- ✓ Supplémenter les blancs afin de calculer les rendements.
- ✓ Evaporer à sec sous flux d'azote à 40°C.
- ✓ Reprendre les échantillons et les blancs par 400 μl de voie A de phase mobile.
- ✓ Filtrer sur filtres à seringues (0.45 μm) puis injecter

Tableau 12: Comparaison des rendements (%) et des effets matrices (%) des protocoles les plus performants de chaque extraction évaluée.

Analytes	SPE		QuEChERS		Liquide-Liquide	
	Rendement	Effet matrices	Rendement	Effet matrices	Rendement	Effet matrices
Sulfathiazole	65	17	0	ND	66	14
Ciprofloxacine	62	89	77	128	108	84
Cloxacilline	80	74	130	9	0	ND
Cefquinome	66	60	64	118	77	148
Dihydrostreptomycine	13	49	0	18	48	ND
Lincomycine	0	44	62	58	82	43
Chlortétracycline	42	72	55	138	126	107
Tulathromicine	95	108	86	193	21	43

La comparaison des résultats obtenus entre les protocoles les plus efficaces et adaptés à l'analyse des antibiotiques informe que la SPE est appropriée pour la famille des pénicillines et des macrolides (tableau 13). L'extraction liquide-liquide est la plus efficace sur les aminoglycosides, puisque c'est la seule méthode qui permet leur extraction correctement, ainsi que les tétracyclines, la lincomycine, les céphalosporines et les quinolones (tableau 13).

L'extraction QuEChERS n'égale aucune de ces deux méthodes. De plus, les "effets matrices" de cette extraction sont très importants. Pour la famille des céphalosporines, l'effet matrice de la technique liquide-liquide est également grand et en moyenne plus élevé que pour la SPE. De plus, les rendements des sulfamides sont équivalents mais les chromatogrammes sont légèrement moins bruiteux avec la méthode sur cartouches.

Le choix d'une extraction unique est difficile étant donné le nombre important de molécules et par conséquent la variabilité des propriétés physico-chimiques. Il apparaît donc difficile de trouver un compromis pour toutes les molécules en une unique extraction. De plus, les méthodes SPE et Liquide-liquide présentent, toute les deux, des avantages dans des familles différentes. Il a donc été retenu :

- ✓ la SPE : pour les bêta-lactams, les macrolides et les sulfamides
- ✓ l'extraction liquide-liquide acidifiée : pour les familles des aminoglycosides, des quinolones, des lincosamides et des tétracyclines.

La suite de l'étude se dirige donc vers deux extractions. Afin d'avoir des conditions d'analyses optimales, un dernier test est effectué qui ne change pas l'efficacité de l'extraction mais la forme des pics. C'est pour cette raison que trois solvants de reprise avant l'injection sont évalués, l'acétate d'ammonium, l'eau déminéralisée et la phase mobile en voie A. Ce test est effectué car dans la famille des macrolides, seule l'érythromycine n'est pas aussi satisfaisant. Or le seul paramètre qui change entre la solution de supplémentation et l'injection est le solvant de reprise qui est acidifié.

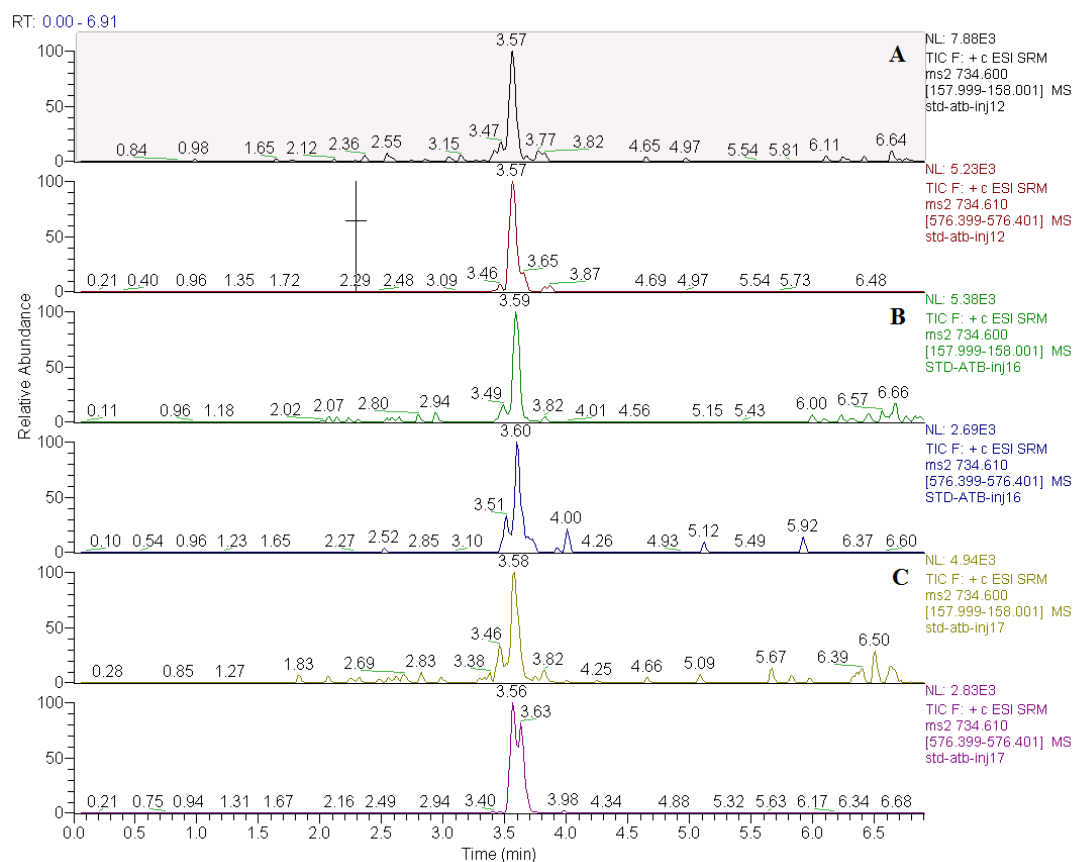


Figure 19: Evaluation de l'impact du solvant de reprise sur les deux transitions de l'érythromycine. L'acétate d'ammonium 0.05M (A), l'eau déminéralisée (B) et la phase mobile de la voie A (C).

Ce chromatogramme (figure 19) montre l'impact du solvant de reprise, après l'évaporation. Le solvant de reprise influe sur la stabilité des analytes et sur la forme des pics. L'acétate d'ammonium convient mieux que l'eau et la phase mobile. Cela s'observe par un pic à chaque transition mieux dessiné, ainsi que par l'absence de pics résiduels qu'il est possible de voir avec les deux autres solvants ou un dédoublement de pic (C). Cela se confirme également par un meilleur signal puisque le signal est de $7.88 \cdot 10^3$ avec l'acétate d'ammonium contre $5.38 \cdot 10^3$ et $4.94 \cdot 10^3$ pour respectivement l'eau et la phase mobile pour la première transition. Ce schéma est répété pour la seconde transition.

Après l'obtention d'un protocole optimal, il convient de procéder à l'évaluation de la méthode. Pour cela il est impératif de travailler sur les effets matrices, qui comme abordé précédemment (page 10), sont importants dans le miel. Il faut également connaître les limites de détection de chaque analyte, afin de prouver que la méthode est suffisamment sensible pour détecter tous les molécules cibles au niveau des concentrations recommandées. Enfin, il est nécessaire d'évaluer la sensibilité dans le but d'avoir moins de 5% de faux conforme en dépistage, critère exigé par la Décision CE/2002/657 (3). Pour cela, il faut calculer les CC_{β} de chaque antibiotique.

3.3. Evaluation de la méthode

3.3.1. Les effets matrice

L'évaluation commence par les effets de la matrice, le protocole de cet essai a été réalisé en se basant sur un article de W. A. Korfmacher (35).

L'objectif est d'obtenir un résultat qualitatif sur les effets matrices pour chaque molécule (est-ce que oui ou non il y en a un), et si possible quantitatif (quelle est l'ampleur de cet effet). L'effet matrice est un terme utilisé pour décrire tout changement de la réponse d'un analyte qui est le résultat d'une matrice spécifique de l'échantillon étudié. Cela peut être une réduction de réponse (suppression d'ions) ou un accroissement de réponse. Les effets de matrice en LC-MS/MS ont lieu principalement dans la source ESI.

La technique utilisée est l'infusion post-colonne. Les analytes sont infusés ensemble à une concentration constante de $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ à vitesse constante de $5 \mu\text{l}/\text{min}$ par une pompe seringue. Puis, un échantillon de solvant de reprise d'acétate d'ammonium est injecté pour obtenir une ligne de base qui sert de témoin. Ensuite, un extrait de miel (sans analyte) est injecté par le passeur avec la méthode LC-MS/MS habituelle : le Blanc de chaque extraction (SPE et Liquide-Liquide) (Korfmacher).

L'objectif est de connaître l'effet matrice au temps de rétention de l'analyte. Pour avoir une idée précise du temps de rétention des analytes avec le système de Tee, un standard à une concentration de $1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ est également injecté à la fin de la séquence, afin d'acquérir les temps de rétention et pour éviter d'éventuelles contaminations (figure 20).

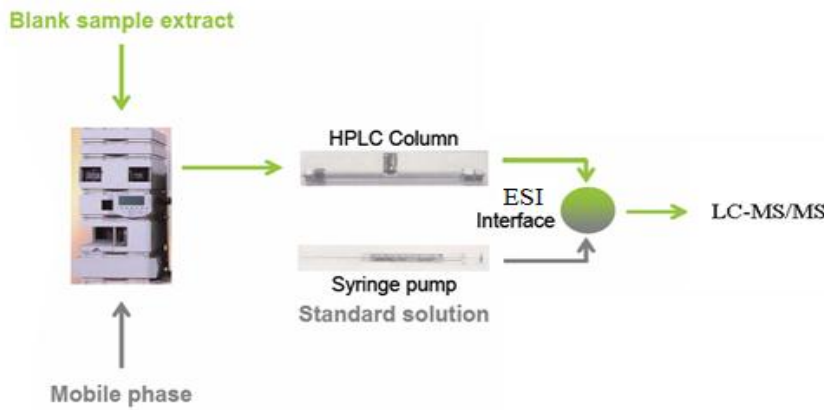


Figure 20 : Représentation schématique de la manipulation sur les effets matrices. Un séquence d'injection comprenant l'injection du solvant de reprise, pour obtenir une ligne de base, puis un miel ayant subi l'extraction SPE et un autre l'extraction liquide-liquide sans aucun analyte et enfin la solution de supplémentation. En parallèle l'infusion des antibiotiques est effectuée avant la source ESI.

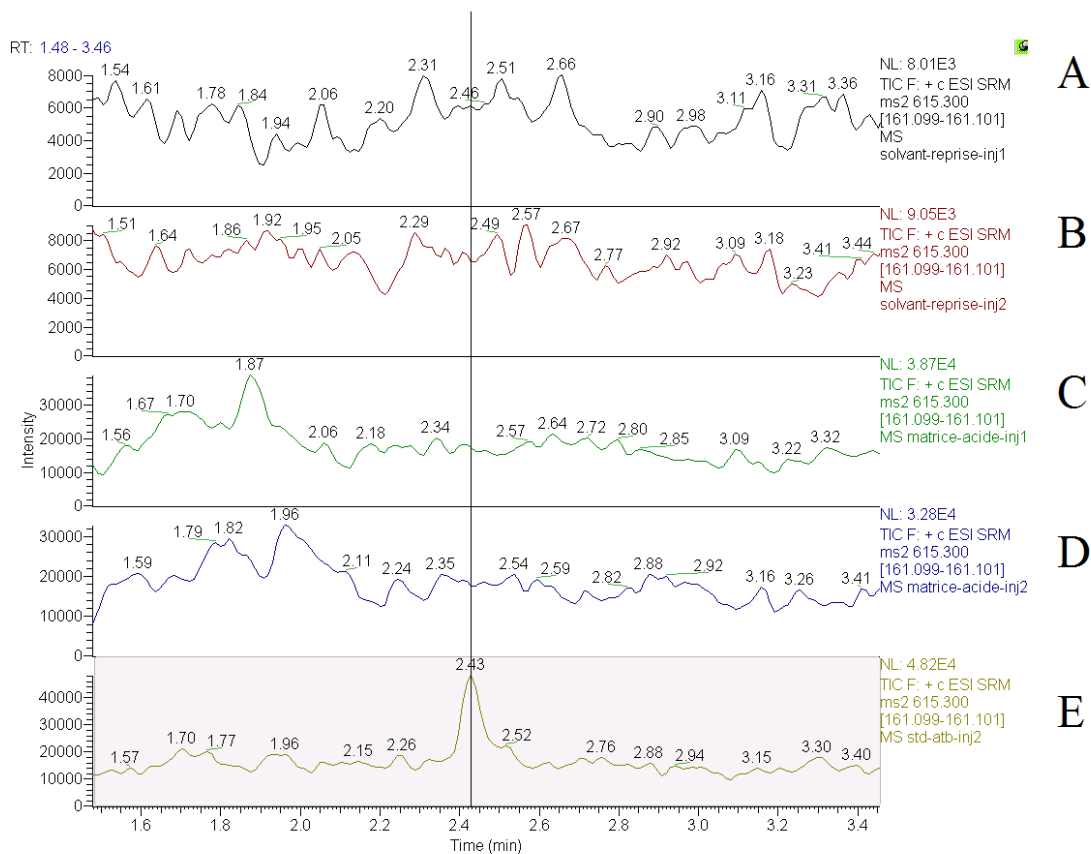


Figure 21 : Evaluation de l'effet matrice sur la néomycine. A et B représente les injections du solvant de reprise, cela permet d'avoir une ligne témoin. C et D matérialisent les injections des blancs démunis de tout analyte. E symbolise l'injection de la solution standard ce qui indique le temps de rétention.

Les deux premiers chromatogrammes indique une ligne de base moyenne à 6000 les deux suivant donnent un signal moyen à 20000 (figure 21). L'effet matrice sur cet analyte est positif, il y a donc un accroissement de la réponse. Ce travail est fait pour chaque analyte. L'effet matrice peut être également négatif engendrant une suppression d'ion.

3.3.2. Les limites de détection

Afin d'évaluer le protocole développé de cette méthode de dépistage, plusieurs paramètres de validation sont à déterminer : linéarité, limites de détection LOD, capacité de détection CC β .

Tout d'abord, **la linéarité** a été évaluée. En même temps, l'objectif était de réaliser un large screening de miels d'origine florale et géographiques différentes, afin d'avoir une idée sur les antibiotiques utilisés illégalement et retrouvés dans le miel. Pour cet essai, une gamme de concentration de 6 points du niveau 0 jusqu'à celui d'intérêt a été réalisée. La linéarité pour les molécules représentante de chaque famille est donnée ci-dessous (Tableau 14).

Tableau 13 : Evaluation de la linéarité de la réponses des molécules représentées par le coefficient de dertermination R².

Analytes	R ²	Niveau de supplémentation (ppb)
Sulfathiazole (Sulfamide)	0,9864	3-6.3-12.5-17.5-25
Ciprofloxacine (Quinolone)	0,7757	3-6.3-12.5-17.5-25
Cloxacilline (pénicilline)	0,9824	25-50-100-150-200
Cefquinome (Céphalosporines)	0,9609	25-50-100-150-200
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	0,9954	62.5-125-250-375-500
Lincomycine (Lincosamide)	0,9887	6.3-12.5-25-37.5-50
Chlortétracycline (Tétracycline)	0,9842	3-6.3-12.5-17.5-25
Tulathromycine (Macrolides)	0,9836	6.3-12.5-25-37.5-50

Les coefficients sont compris entre 0.7757 pour la ciprofloxacine et 0.9995 pour la kanamycine. Le screening des miels a permis d'analyser 51 miels déjà testés, soit par méthodes biologiques (limites de détection hautes) ou testés seulement pour une famille par exemple. Parmi ces miels, 5 miels sont suspectés ou assurément positifs. Les concentrations des 5 miels positifs trouvés avec cette méthode sont les mêmes qu'avec les méthodes biologiques, ce qui conforte le protocole développé. De plus, des miels présumés être négatifs sont trouvés positifs à des concentrations en-dessous des limites de détection des méthodes biologiques (tableau 15).

Tableau 14: Estimation des quantités d'antibiotique trouvée dans les miels positifs de l'analyse des miels destinés à la consommation.

	Analytes	Test microbiologique (ppb)	Méthode LC-MS/MS (ppb)
A	Tétracycline	34.4	32.4
	Doxycycline		
	Oxycycline		
	Chlortétracycline		
B	Apramycine	Suspicion	12,17
	Danofloxacine		4,33
	Tétracycline		2,37
C	Danofloxacine	Suspicion	2,95
	Apramycine		13,48
D	Tétracycline	10 (estimation)	25,43
E	Dihydrostreptomycine	43,3	68,1

Une autre expérience a permis de calculer les **limites de détection LOD**. La limite de détection d'une méthode est la plus basse concentration de l'antibiotique dans la matrice miel, qui est détectable par rapport au bruit de fond.

La limite de détection est calculée à partir des 20 échantillons blancs et d'un échantillon supplémenté à la concentration choisie grâce à la gamme de calibration. Pour chaque analyte, au temps de rétention plus ou moins 10%, la hauteur du bruit est enregistrée afin de calculer la valeur seuil T qui correspond à trois fois le niveau du blanc. La LOD est alors équivalente à 3 fois le bruit de fond, en équivalent concentration. A partir de ces données il est possible de calculer les limites de détection de chaque molécule d'intérêt.

La formule utilisée est la suivante :

$$\text{LOD} = \text{concentration de supplémentation} \times \frac{\text{seuil T}}{\text{réponse de l'antibiotique}}$$

Tableau 15: Estimation des limites de détection (LOD) à partir de la formule précédente. Limites sont données en $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Analytes	Transition 1	Transition 2
Sulfathiazole (Sulfamide)	2	19,2
Ciprofloxacine (Quinolone)	27	3,5
Cloxacilline (pénicilline)	27,8	24,6
Cefquinome (Céphalosporines)	9,8	61,1
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	4,2	13,2
Lincomycine (Lincosamide)	0,9	43,5
Chlortétracycline (Tétracycline)	1,1	2,2
Tulathromycine (Macrolides)	2,5	3,7

La valeur des limites de détection de chaque transition peuvent être similaire comme pour la cloxacilline où très éloignée (tableau 16). En effet, le signal de la 2ème transition peut être très faible et donc plus bruyant par rapport à la 1ère transition. Tout dépend de l'ionisation de la molécule. Parfois, une molécule va avoir deux transitions équivalentes en intensité et parfois il est très difficile d'obtenir 2 transitions correctes. La limite de détection retenue dans ce cas est donc celle de la transition la plus élevée. En effet, pour une méthode de dépistage, une seule transition d'identification peut suffire. La limite de détection la plus haute est de $432.2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour la sulfanilamide, pour la majorité des analytes cette limite de dépasse pas $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Enfin, les **capacités de détection $\text{CC}\beta$** ont été calculées.

Le $\text{CC}\beta$ correspond à la plus petite teneur en substance qui peut être détectée, identifiée et/ou mesurée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur β . Lorsqu'il n'y a pas de Limite autorisée comme dans le cas des antibiotiques dans le miel, le $\text{CC}\beta$ est la plus petite concentration que la méthode peut détecter dans un échantillon réellement contaminé, avec une certitude statistique de $1-\beta$. L'estimation du $\text{CC}\beta$ donne donc également l'estimation de la sensibilité pour chaque analyte au niveau d'intérêt.

Selon la décision 2002/657/EC (3), la capacité de détection pour les méthodes de screening est acceptable ($CC_{\beta} \leq MRL$ ou à la concentration recommandée) quand le taux de faux négatifs est inférieur à 5% au niveau d'intérêt, c'est-à-dire que la valeur seuil F, liée à la réponse moyenne, doit être supérieure à la valeur T, liée au bruit, soit $F_m > T$ (figure 22).

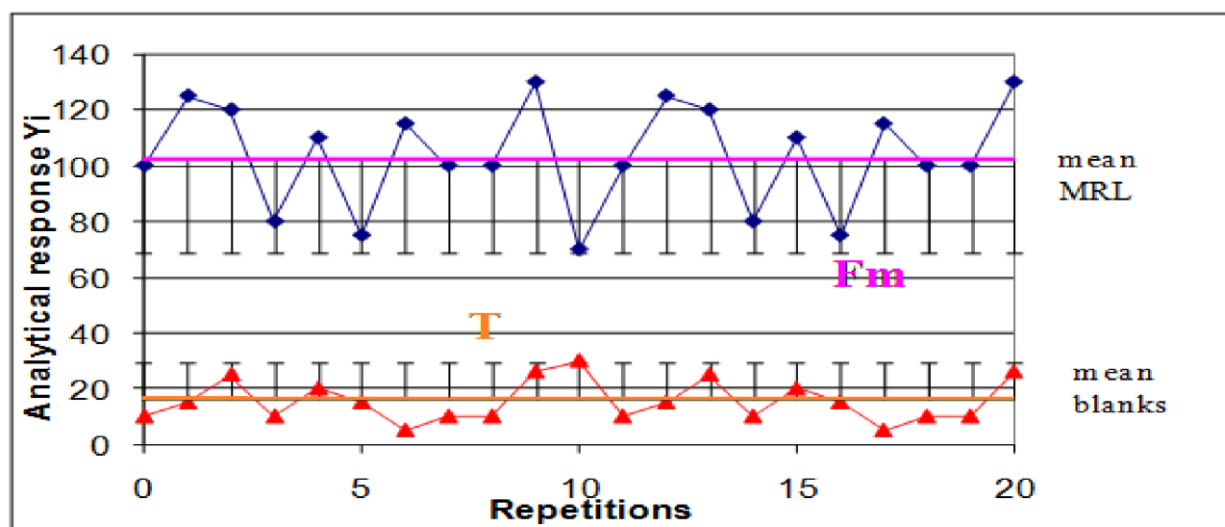


Figure 22: Représentation graphique de la valeur seuil des blancs T et la valeur seuil de réponse des échantillons supplémentés.

Si $F_m > T$ à la concentration de validation, alors la valeur de CC_{β} est inférieure à la limite maximale de résidus ou à la concentration recommandée. La méthode est donc dotée d'une sensibilité supérieure 95%.

Si $F_m < T$ à la concentration de validation, alors des études supplémentaires doivent être effectuées afin de déterminer l'écart entre le niveau d'intérêt et le CC_{β} . Il faut tester différentes concentrations au-delà de la LMR.

Tableau 16: Estimation de la capacité de détection. La validation de la méthode nécessite la supériorité de la valeur F_m devant celle de T. Comme c'est le cas pour tous les antibiotiques mis à part la ciprofloxacine.

Analytes	T	Fm	Fm / T	CC_{β} (ppb)
Sulfathiazole (Sulfamide)	$6.46 \cdot 10^2$	$4.48 \cdot 10^3$	$F_m > T$	$CC_{\beta} < 20$
Ciprofloxacine (Quinolone)	$2.25 \cdot 10^4$	$5.80 \cdot 10^3$	$F_m < T$	$CC_{\beta} > 20$
Cloxacilline (pénicilline)	$3.95 \cdot 10^2$	$1.27 \cdot 10^3$	$F_m > T$	$CC_{\beta} < 100$
Cefquinome (Céphalosporines)	$7.63 \cdot 10^2$	$9.37 \cdot 10^2$	$F_m > T$	$CC_{\beta} < 20$
Dihydrostreptomycine (aminoglycoside)	$3.75 \cdot 10^2$	$2.83 \cdot 10^3$	$F_m > T$	$CC_{\beta} < 100$
Lincomycine (Lincosamide)	$9.82 \cdot 10^3$	$1.49 \cdot 10^4$	$F_m > T$	$CC_{\beta} < 20$
Chlortétracycline (Tétracycline)	$5.71 \cdot 10^2$	$1.88 \cdot 10^3$	$F_m > T$	$CC_{\beta} < 20$
Tulathromicine (Macrolides)	$2.38 \cdot 10^3$	$4.48 \cdot 10^3$	$F_m > T$	$CC_{\beta} < 5$

Dans le cas de l'estimation de CC_{β} , seule la ciprofloxacine présente une valeur F_m inférieure à trois fois le niveau du bruit, il est donc nécessaire de réévaluer le niveau d'intérêt pour respecter les 5% de faux négatif pour la molécule sous-estimée. Ces résultats démontrent l'efficacité de la méthode mis au point (tableau 17).

Conclusion

Au cours de ce stage, l'objectif était de mettre au point une méthode de dépistage des antibiotiques dans le miel pour un usage de screening. Ce sujet s'inscrit dans le cadre de la mission du laboratoire de Fougères, laboratoire référent pour le contrôle des résidus d'antibiotiques dans le miel. Il est nécessaire que le laboratoire développe des méthodes appropriées pour réaliser les analyses requises des plans de contrôle nationaux. Mais le sujet est également important du point de vue recherche technique, par la maîtrise de la difficile matrice miel, et enfin au niveau européen. L'ensemble du travail et des résultats européens doit permettre de faire évoluer la réglementation. Des LMR devraient voir le jour afin d'aider les apiculteurs à lutter contre les maladies par une utilisation contrôlée de certains antibiotiques jugés efficaces.

Dans ce but, l'extraction en phase solide, l'extraction QuEChERS, puis liquide-liquide et l'extraction à solvant pressurisé ont été testées. Les recherches ont été effectuées les unes après les autres afin de bien dissocier l'efficacité de chacune d'elles, et l'influence des principaux paramètres pouvant améliorer les spectres. L'ensemble des résultats sur les 63 antibiotiques a été pris en compte. Le conditionnement de l'échantillon, le pH, le tampon et les acides utilisés ont ainsi été optimisés, afin d'obtenir une méthode de dépistage la plus efficace possible.

Les résultats de la comparaison des quatre techniques d'extraction montrent que les extractions QuEChERS et ASE ne sont pas adaptées à l'analyse des molécules d'intérêt. Cela illustre également que l'obtention d'une extraction unique est difficile avec un nombre aussi grand d'antibiotique appartenant à des familles aux propriétés physico-chimiques différentes. C'est pourquoi le choix de la méthode final s'est dirigé vers une extraction en deux parties, ce qui a permis d'obtenir une extraction optimale de tous les antibiotiques.

L'évaluation de la méthode effectuée, avec l'analyse de plusieurs miels destinés à la consommation, a permis d'évaluer les limites de détection pour les deux transitions de chaque antibiotique, et aussi de déterminer les CC_{β} . Ces résultats démontrent qu'aux niveaux d'intérêt déterminés, le risque d'obtenir un faux résultat négatif en routine, comme lors de plans de contrôle, est inférieur à 5%. Cependant, il reste des études supplémentaires doivent être effectuées pour certaines molécules comme pour la ciprofloxacine.

Le couplage LC-MS/MS apparaît comme la méthode de choix pour confirmer la présence de résidus médicamenteux dans la denrée du miel. Sa spécificité et sa sélectivité lui donne un avantage sur les méthodes microbiologiques.

De futurs travaux devraient finaliser la méthode et compléter la validation, ce qui permettrait d'étendre les recherches d'antibiotiques dans le miel, outre ceux déjà recherchés par les plans de contrôle, et ainsi contrôler l'utilisation des antibiotiques en apiculture.

Bibliographie

1. Règlement (UE) N° 37/2010 de la Commission, Journal Officiel de l'Union Européenne 2010 L15:1-72
2. Directive 96/23/CE du Conseil (Journal officiel 1996 L 125: 10
3. Règlement (CE) N° 470/2009 du Parlement Européen et du Conseil. Journal officiel de l'Union européenne, 2009 L152: 11-22

4. S. J. Adams, R. J. Fussell, M. Dickinson, S. Wilkins and M. Sharman. "Study of the depletion of lincomycin residues in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies and the effect of the shook swarm procedure". *analytica chimica acta* (2 0 0 9) 637: 315–320
5. J. L. M. Vidal, M. D. M. Aguilera-Luiz, et al. "Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009). 57(5): 1760-1767.
6. Y. A.Hammel, R. Mohamed, E. Gremaud M.H. Lebreton and P. A. Guy. "Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*. (2008). 1177(1): 58-76.
7. C. Blasco, P. Vazquez-Roig, M. Onghena, A. Masia and Y. Picó. "Analysis of insecticides in honey by liquid chromatography–ion trap-mass spectrometry: Comparison of different extraction procedures". *Journal of Chromatography A* (2011). 1218(30): 4892-4901.
8. <http://gauneau.marcel.pagesperso-orange.fr/Html/abemaladie.htm>
9. V. Gaudin, A. Rault and E. Verdon. Validation of a commercial receptor kit sulfacensor® Honey for the screening of sulfonamides in honey according to commission Decision 2002/657/EC. Food additives and contaminants: Part A Chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment. 2012 29(6): 942-950.
10. C. Benetti, N. Dainese, G. Biancotto, R. Piro and F. Mutinelli. "Unauthorised antibiotic treatments in beekeeping Development and validation of a method to quantify and confirm tylosin residues in honey using liquid chromatography–tandem mass spectrometric detection". *Analytica Chimica Acta* (2004) 520: 87–92
11. A. Kaufmann, S. Roth, B. Ryser, M. Widmer and D. Guggisberg. "Quantitative LC/MS-MS Determination of Sulfonamides and Some Other Antibiotics in Honey". *Journal of AOAC International* 2002 85(4) : 853-860
12. L. Verzeznassi, M.C. Savoy-Perroud and R.H. Stadler. Application of liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. *Journal of Chromatography* 2002 977: 77-87.
13. L. Wiest, A. Buleté, B. Giroud, C. Fratta, S. Amic, O. Lambert, H. Pouliquenb, C.Arnaudguilhem, Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2011 1218: 5743- 5756.
14. M. Lombardo-Agui, A.M. Garcia-Campana, L. Gamiz-Gracia and C. Cruces-Blanco. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta* 2012 93:193-199.
15. Livre antibiotiques

16. M. Morançais. Cours de chromatographie liquide de master ACBPI chap 3 XXX

17. Livre spectro

18. P. Janvier cours de spectrométrie de masse de master ACBPI chap XXX

19. L. Humbert, Extraction en phase solide (SPE) : théorie et applications. *Ann Toxicol Anal.* 2010; 22(2): 61-68.

20. C. Blasco and A. Masia. Comparaison of the Effectiveness of Recent Extraction Procedures for Antibiotic Residues in Bovine Muscle Tissues. *Journal of AOAC International* 2011 94(3):991-1003.

21. G. Stubbing and T. Bigwood. The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta* (2009) 637: 68-78.

22. M. Villar-Pulido, B. Gilbert-López, J. F. García-Reyes, N. R. Martos and A. Molina-Díaz. "Multiclass detection and quantitation of antibiotics and veterinary drugs in shrimps by fast liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry". *Talanta* (2011) 85: 1419–1427

23. R.P Lopes, R. C. Reyes, R. Romero-González, A. Garrido Frenich, J. L. Martínez Vidal. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta* 2012 89: 201- 208.

24. M. I. Lopez, J. S. Pettis, et al. "Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS." *J. Agric. Food Chem.* (2008). 56(5): 1553-1559.

25. M. Gaugain, M-P. Chotard-Soutif, M-P. Fourmond, S. Gautier, E. Dubreil et B. Roudaut. Méthode de dépistage des résidus d'antibiotiques dans le muscle et le lait par CL/SM-SM.

26. P. Mottier, Y. A. Hammel, E. Gremaud and P. A. Guy. "Quantitative High-Throughput Analysis of 16 (Fluoro) quinolones in Honey Using Automated Extraction by Turbulent Flow Chromatography Coupled to Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* (2008) 56:35-53

27. W. Zhu, J. Yang, W. Wei, Y. Liu, and S. Zhang. "Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps" *Journal of Chromatography A*, (2008) 1207: 29–37

28. J. L. Martinez Vida, M. Aguilera-Luiz, R. Romero-Gonzalez, And A. Garrido Frenich. "Multiclass Analysis of Antibiotic Residues in Honey by Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry". *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57: 1760–1767
29. S. Huq, M. Garriques and K.M.R. Kallury. "Role of zwitterionic structures in the solid-phase extraction based method development for clean up of tetracycline and oxytetracycline from honey. *Journal of Chromatography A*, 2006 1135: 12–18.
30. H. Yu, Y. Tao, D.Chen, Y.Wang and Z.Yuan, Development of an HPLC–UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of porcine, chicken and bovine with accelerated solvent extraction. *Food Chemistry* 2011 124: 1131–1138.
31. J. Wang Determination of Five Macrolide Antibiotic Residues in Honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 171-181.
32. V. Carretero, C. Blasco and Y. Pico, Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008 1209: 162-173.
33. A. Garrido Frenih, M. del Mar Aguilera-Luiz, J.L. Martinez Vidal and R. Romero-Gonzalez. Comparaisou of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2010 661: 150-160.
34. M. Gbylik, A. Posyniak, K. Mitrowska, T. Bladek and J. Zmudzki. Multiresidue determination of antibiotics in fish samples by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *NVRI* 57: 545-605.
35. M.M. Aguilera-luiz, J.L. Martinez Vidal, R. Romero-Gonzalez and A. Garrido Frenich. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 2008 1205: 10-16.
36. <http://www.delvaux-danze.be/main.html>.
37. <http://home.citycable.ch/apiland/antibiotiques.htm>

Liste des figures

Figure 23 : Structure générale de chaque famille d'antibiotiques de l'étude.

Figure 24 : Photographie d'une source électrospray représentant la formation du nuage de gouttelettes au bout de la sonde ESI grâce à un champ électrique.

Figure 25: Principe de désolvatation de chaque gouttelette entraînant un rétrécissement de celle-ci et une augmentation de la charge superficielle jusqu'à division en gouttelettes plus petites et moins chargées.

Figure 26: Trajectoires des ions dans un quadripôle, en bleu est celle des ions non détectés, car ceux-ci entrent en collision avec le quadripôle entraînant la neutralisation des ions et leur éjection. La trajectoire rouge est celle des ions détectés.

Figure 27: Représentation schématique des quatre étapes constituant une extraction en phase solide : le conditionnement permettant l'activation des sites actifs puis la rétention des analytes effectuée lors du chargement, ensuite le lavage de la cartouche supprimant le maximum d'interférents et le minimum de molécules d'intérêts, et enfin la récupération des analytes lors de l'élution.

Figure 28: Représentation schématique des chemins en SPE. Il faut choisir la cartouche SPE adaptée en fonction des analytes et de la matrice, en prenant en compte les propriétés de l'échantillon, afin d'utiliser les cartouches de phase inverse et échangeuse d'ion pour un échantillon aqueux ou miscible à l'eau, ou utiliser les cartouches de phase normale pour un échantillon organique non miscible à l'eau.

Figure 29: Représentation schématique des deux phases essentielles de l'extraction QuEChERS. La première phase composée des étapes d'ajout des solvants et sels d'extraction et la seconde du prélèvement de la phase supérieure et de l'ajout de sel de purification.

Figure 30 : Schéma d'un système d'extraction à solvant chaud pressurisé. Les solvants sont aspirés pour remplir la cellule contenant l'échantillon puis la cellule est chauffée et mise sous pression pour que les analytes passent de l'échantillon au solvant, qui est ensuite récupéré. La vanne statique se ferme lors de la mise sous pression et s'ouvre pour la récupération

Figure 31 : Représentation graphique du gradient d'élution binaire entre l'eau acidifiée par 0.1% d'acide pentafluoropropionique et 0.5% d'acide formique (voie A) et l'acétonitrile acidifiée dans les mêmes conditions (voie B).

Figure 32 : Optimisation des paramètres individuels de la molécule de Sulfamérazine (S Lens, énergie de collision, les ions parent et les ions fils). L'optimisation de la tension appliquée au système de lentille(S-Lens)(A). En vert la valeur initiale et en rouge la valeur optimisée, ici la différence est de 26% (A). L'optimisation des ions produits et des énergies de collision associées (B). Sur ces résultats le choix des ions de masse sur charge 156.6 et 108.1 semblent être pertinents (B).

Figure 33 : Représentation schématique des cinq étapes constituant l'extraction en phase solide (SPE).

Figure 34 : Etude de l'influence de différents types de cartouches, échangeuse de cation (cation weak) (A) et de phase inverse Strata-x (B). La co-élution ou l'absence de l'érythromycine, la paromomycine et la lincomycine est observable sur le chromatogramme A de plus seule la famille des quinolones, des bêta-lactam et des tétracyclines sont extraites correctement et la

sulfanilamide est présente en très petites quantités puisque son rendement est de 16 % (tableau 4) (A). Alors que sur le chromatogramme B la majorité des molécules d'intérêts sont présentes.

Figure 35 : Chromatogramme de l'extraction avec de l'acide phosphorique pendant le conditionnement de l'échantillon. La disparition de la famille des sulfamides et de la famille des macrolides est visible par ce chromatogramme. Le pic présent à la transition de l'érythromycine n'est pas au bon temps de rétention, 3.18 minutes au lieu de 3.38 minutes, elle donc absente.

Figure 36 : Chromatogrammes de l'extraction utilisant un tampon. L'identification de toutes les familles hormis les aminoglycosides, comme pour les protocoles préalables est appréciable. Cependant une baisse des signaux et des rendements est observable avec l'utilisation du tampon.

Figure 37 : Représentation schématique des quatre étapes constituant l'extraction QuEChERS.

Figure 38 : Chromatogramme de l'extraction QuEChERS avec purification (A) et celui de l'extraction sans purification. Une nette augmentation des signaux est observable pour les familles des céphalosporines, des quinolones ainsi que pour les macrolides et la lincomycine. Une diminution est notée pour la famille des sulfamides.

Figure 39 : Influence du pH sur l'extraction QuEChERS. Extraction à pH 9 (A), (B) à pH neutre et (C), extraction à pH acide. Les meilleurs signaux des familles des sulfamides, des quinolones et des macrolides sont à pH neutre. Alors que pour les céphalosporines et le lincosamide le pH n'a pas d'influence. L'extraction n'est pas observable pour les pénicillines et les aminoglycosides.

Figure 40 : Représentation schématique des trois étapes constituant l'extraction liquide-liquide.

Figure 41: Evaluation de l'impact du solvant de reprise sur les deux transitions de l'érythromycine. L'acétate d'ammonium 0.05M (A), l'eau déminéralisée (B) et la phase mobile de la voie A (C).

Figure 42 : Représentation schématique de la manipulation sur les effets matrices. Une séquence d'injection comprenant l'injection du solvant de reprise, pour obtenir une ligne de base, puis un miel ayant subi l'extraction SPE et un autre l'extraction liquide-liquide sans aucun analyte et enfin la solution de supplémentation. En parallèle l'infusion des antibiotiques est effectuée avant la source ESI.

Figure 43 : Evaluation de l'effet matrice sur la néomycine. A et B représente les injections du solvant de reprise, cela permet d'avoir une ligne témoin. C et D matérialisent les injections des blancs démunis de tout analyte. E symbolise l'injection de la solution standard ce qui indique le temps de rétention.

Figure 44: Représentation graphique de la valeur seuil des blancs T et la valeur seuil de réponse des échantillons supplémentés.

Liste des tableaux

Tableau 17: Récapitulatif du gradient optimisé pour une injection de 10 µl de solution standard pour la séparation des composés. Ce tableau donne le pourcentage de chaque voie de phase mobile.

Tableau 18 : Récapitulatifs des paramètres fixes optimisés utilisés lors des analyses des échantillons.

Tableau 19 : Présentation d'une molécule par famille étudiée, donnant les paramètres individuels associés (les ions parents, les ions fils, les énergies de collision, le temps de rétention et le S Lens).

Tableau 20 : Présentation des résultats des essais sur les différentes cartouches et fournisseurs testés des extractions, pour une molécule par famille, avec les protocoles de bases. Les rendements de ce tableau sont donnés en pourcentage.

Tableau 21 : Présentation des rendements (%) de l'extraction à deux cartouches inspiré des travaux de W. Zhu.

Tableau 22: Comparaison de trois solvants d'extraction utilisés sur cartouche hydromatrix. Ces rendements (%) démontrent que la majorité des familles d'antibiotiques ne sont pas extraites puisque les rendements de quatre (ou cinq) des huit familles est quasiment néant.

Tableau 23 : Evaluation de l'influence du type de sel de purification utilisé en extraction QuEChERS rendu compte par les rendements (%).

Tableau 24: Etude des effets de l'étape de purification et confirmation de l'hypothèse d'absorption de certains analytes par le sel de purification. Observables par l'augmentation des rendements (%) de la manipulation sans purification pour la totalité des molécules extraites.

Tableau 25: Evaluation de la composition du solvant d'extraction, acide acétique (A), un mélange d'eau et d'acétonitrile (B), tampon d'acide d'éthyldiaminetétracétique de sodium (Na_2DTA) (C) puis deux compromis entre l'eau et l'acide acétique (D) ainsi qu'entre l'acide acétique et le tampon (E). Rendement en pourcentage.

Tableau 26: Evaluation de la composition du solvant d'extraction, mélange d'acétonitrile, d'acide citrique et du tampon précédant (A), un mélange de tampon, de dihydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4) avec soit de l'acétonitrile (B), soit avec du TCA et de l'acétonitrile (C), soit de d'acide pentafluoropropionique (PFPA) (D), un mélange d'acétonitrile d'acide phosphorique et de PFPA combiné avec la glucuronidase (E). Rendement des extractions en pourcentage.

Tableau 27 : Evaluation de l'effet du pH sur l'efficacité de l'extraction (rendements %)

Tableau 28: Influence du poids moléculaire de l'acide utilisé lors des extractions liquide- liquide (rendements %).

Tableau 29: Comparaison des rendements (%) et des effets matrices (%) des protocoles les plus performants de chaque extraction évaluée.

Tableau 30 : Evaluation de la linéarité de la réponses des molécules représentées par le coefficient de détermination R^2 .

Tableau 31: Estimation des quantités d'antibiotique trouvée dans les miels positifs de l'analyse des miels destinés à la consommation.

Tableau 32: Estimation des limites de détection (LOD) à partir de la formule précédente. Limites sont données en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Tableau 33: Estimation de la capacité de détection. La validation de la méthode nécessite la supériorité de la valeur F_m devant celle de T . Comme c'est le cas pour tous les antibiotiques mis à part la ciprofloxacine.