

Université de Montréal

**Analyse par spectrométrie de masse des antibiotiques  
vétérinaires liés à l'élevage porcin**

par

Morgan Sollic

Département de Chimie  
Faculté des Arts et Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D.)  
en Chimie  
option Analytique

août, 2015

© Morgan Sollic, 2015

## Résumé

---

L'élevage des porcs représente une source importante de déversement d'antibiotiques dans l'environnement par l'intermédiaire de l'épandage du lisier qui contient une grande quantité de ces molécules sur les champs agricoles. Il a été prouvé que ces molécules biologiquement actives peuvent avoir un impact toxique sur l'écosystème. Par ailleurs, elles sont aussi suspectées d'engendrer des problèmes sanitaires et de contribuer à la résistance bactérienne pouvant mener à des infections difficilement traitables chez les humains. Le contrôle de ces substances dans l'environnement est donc nécessaire.

De nombreuses méthodes analytiques sont proposées dans la littérature scientifique pour recenser ces composés dans plusieurs types de matrice. Cependant, peu de ces méthodes permettent l'analyse de ces contaminants dans des matrices issues de l'élevage agricole intensif. Par ailleurs, les méthodes analytiques disponibles sont souvent sujettes à des faux positifs compte tenu de la complexité des matrices étudiées et du matériel utilisé et ne prennent souvent pas en compte les métabolites et produits de dégradation des antibiotiques. Enfin, les niveaux d'analyse atteints avec ces méthodes ne sont parfois plus à jour étant donné l'évolution de la chimie analytique et de la spectrométrie de masse. Dans cette optique, de nouvelles méthodes d'analyses ont été développées pour rechercher et quantifier les antibiotiques dans des matrices dérivées de l'élevage intensif des porcs en essayant de proposer des approches alternatives sensibles, sélectives et robustes pour quantifier ces molécules.

Une première méthode d'analyse basée sur une technique d'introduction d'échantillon alternative à l'aide d'une interface fonctionnant à l'aide d'une désorption thermique par diode laser munie d'une source à ionisation à pression atmosphérique, couplée à la spectrométrie de masse en tandem a été développée. L'objectif est de proposer une analyse plus rapide tout en atteignant des niveaux de concentration adaptés à la matrice étudiée. Cette technique d'analyse couplée à un traitement d'échantillon efficace a permis l'analyse de plusieurs antibiotiques vétérinaires de différentes classes dans des échantillons de lisier avec des temps d'analyse courts. Les limites de détection atteintes sont comprises entre 2,5 et 8,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  et sont

comparables avec celles pouvant être obtenues avec la chromatographie liquide dans une matrice similaire.

En vue d'analyser simultanément une série de tétracyclines, une deuxième méthode d'analyse utilisant la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) a été proposée. L'utilisation de la HRMS a été motivée par le fait que cette technique d'analyse est moins sensible aux faux positifs que le triple quadripôle traditionnel. Des limites de détection comprises entre 1,5 et 3,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ont été atteintes dans des échantillons de lisier en utilisant un mode d'analyse par fragmentation.

L'utilisation de méthodes de quantifications ciblées est une démarche intéressante lorsque la présence de contaminants est suspectée dans un échantillon. Toutefois, les contaminants non intégrés à cette méthode d'analyse ciblée ne peuvent être détectés même à de fortes concentrations. Dans ce contexte, une méthode d'analyse non ciblée a été développée pour la recherche de pharmaceutiques vétérinaires dans des effluents agricoles en utilisant la spectrométrie de masse à haute résolution et une cartouche SPE polymérique polyvalente. Cette méthode a permis l'identification d'antibiotiques et de pharmaceutiques couramment utilisés dans l'élevage porcin.

La plupart des méthodes d'analyse disponibles dans la littérature se concentrent sur l'analyse des composés parents, mais pas sur les sous-produits de dégradation. L'approche utilisée dans la deuxième méthode d'analyse a donc été étendue et appliquée à d'autres classes d'antibiotiques pour mesurer les concentrations de plusieurs résidus d'antibiotiques dans les sols et les eaux de drainage d'un champ agricole expérimental. Les sols du champ renfermaient un mélange d'antibiotiques ainsi que leurs produits de dégradation relatifs à des concentrations mesurées jusqu'à 1020  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Une partie de ces composés ont voyagé par l'intermédiaire des eaux de drainage du champ ou des concentrations pouvant atteindre 3200  $\text{ng L}^{-1}$  ont pu être relevées.

**Mots-clés** : Antibiotiques vétérinaires, désorption thermique par diode laser, chromatographie liquide, spectrométrie de masse, spectromètre de masse à haute résolution

## Abstract

---

Swine production is a major source of antibiotic release into the environment via manure spreading on agricultural fields. It has been shown that these biologically active compounds may have a toxic impact on ecosystems. Moreover, they are also suspected to cause health problems and contribute to bacterial resistance that could lead to difficult-to-treat infections in humans. Therefore, control of these substances in the environment is necessary.

Several analytical methods are proposed in the scientific literature to identify these compounds in various matrices. However, few of these methods allowed the analysis of these contaminants in matrices derived from intensive livestock farming. Furthermore, the analytical methods available are often subject to false positives, given the complexity samples and the equipment used and do not take into account the metabolites and degradation products of antibiotics. Finally, concentration levels reached with these methods are sometimes outdated since the evolution of analytical chemistry and mass spectrometry. In this context, new analytical methods have been developed to investigate and quantify the antibiotics derived from swine husbandry to propose alternative, sensible, selective and robust approaches to quantify these molecules.

A first analytical method has been proposed based on an alternative sample introduction technique using the laser diode thermal desorption interface with an atmospheric pressure chemical ionization source coupled to tandem mass spectrometry. The objective was to provide a simpler and faster analysis while reaching levels suitable for the studied matrix. This alternative sample introduction method coupled with an efficient sample processing allowed the analysis of several classes of veterinary antibiotics in swine manure in a short analysis time. Detection limits ranged between 2.5 and 8.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and are comparable with those obtained with liquid chromatography in a similar matrix.

In order to simultaneously analyze a series of tetracyclines, a second analytical method using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (HRMS) was proposed. The use of HRMS was motivated by the fact that this mass spectrometer is less



sensitive to false positive than the traditional triple quadrupole. Detection limits between 1.5 and 3.6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  have been achieved in swine manure using a fragmentation analysis mode to avoid false positives.

Targeted screening methods are interesting approaches when contaminants are suspected to be present in a sample. However, a non-included contaminant in this targeted analysis method could not be detected even at a high concentration. In this context, a non-target compound screening method focused on veterinary pharmaceutical compounds in swine manure was developed using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. A polymeric SPE cartridge was used to collect polar compounds including pharmaceuticals prior analysis. This method allowed the identification of antibiotics and pharmaceuticals commonly used in swine farming.

Most of the analytical methods available in the literature focus on parent compounds, regardless degradation products. The approach used in the second method of analysis was applied and extended to other classes of antibiotics to measure concentrations of several antibiotic residues in soils and drainage waters of an experimental agricultural field. Field soil contained a mixture of antibiotics and their related degradation products with concentrations measured up to 1020  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Some of these compounds have migrated through the field via drainage waters wherein concentrations up to 3200  $\text{ng L}^{-1}$  were observed.

**Keywords :** Veterinary antibiotics, laser diode thermal desorption, liquid chromatography, mass spectrometry, high-resolution mass spectrometry

# Table des matières

---

<b>Résumé.....</b>	<b>ii</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>xii</b>
<b>Liste des tableaux supplémentaires.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>xv</b>
<b>Liste des figures supplémentaires.....</b>	<b>xviii</b>
<b>Liste des abréviations, sigles et acronymes.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>xxvi</b>
<b>Chapitre 1. Les antibiotiques.....</b>	<b>1</b>
1.1 Description générale.....	2
1.2 Aperçu historique .....	2
1.3 Les antibiotiques dans le domaine vétérinaire .....	4
1.3.1 Adaptation de l'utilisation des antibiotiques dans le domaine vétérinaire .....	4
1.3.2 Utilisation des antibiotiques vétérinaires dans le domaine agricole .....	5
1.3.2.1 Utilisation générale .....	5
1.3.2.2 Utilisation générale dans l'élevage du porc .....	6
1.3.3 Consommation des antibiotiques vétérinaires dans le monde.....	7
1.4 Classification, utilisation et mode d'action .....	8
1.4.1 Les $\beta$ -lactamines.....	10
1.4.1.1 Généralités.....	10
1.4.1.2 Les pénicillines.....	12
1.4.1.3 Les céphalosporines .....	12
1.4.1.4 Mode d'action .....	12
1.4.1.5 Utilisation.....	12

1.4.2	Les tétracyclines .....	13
1.4.2.1	Généralités.....	13
1.4.2.2	Mode d'action .....	15
1.4.2.3	Utilisation.....	15
1.4.3	Les sulfamides.....	15
1.4.3.1	Généralités.....	15
1.4.3.2	Mode d'action .....	17
1.4.3.3	Utilisation.....	17
1.4.4	Les Macrolides .....	17
1.4.4.1	Généralités.....	17
1.4.4.2	Mode d'action .....	19
1.4.4.3	Utilisation.....	19
1.4.5	Les quinolones.....	19
1.4.5.1	Généralité .....	19
1.4.5.2	Mode d'action .....	20
1.4.5.3	Utilisation.....	20
1.4.6	Les lincosamides .....	21
1.4.6.1	Généralité .....	21
1.4.6.2	Mode d'action et utilisation .....	21
1.4.7	Les diaminopyrimidine.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.5	Les antibiotiques vétérinaires comme contaminants émergents .....	23
1.5.1	Les contaminants émergents .....	23
1.5.2	Les antibiotiques vétérinaires dans l'environnement .....	25
1.5.2.1	Sources de contamination .....	25
1.5.2.2	Mobilité des antibiotiques vétérinaires dans l'environnement.....	28
1.5.2.3	Présence dans les sols et sédiments.....	34
1.5.2.4	Présence dans les eaux de surfaces et souterraines .....	36
1.5.3	Devenir des antibiotiques dans l'environnement .....	38
1.5.3.1	Métabolites et produits de dégradation .....	38
1.5.3.2	Dégradation dans les sols et le lisier de porc .....	40
1.5.3.3	Dégradation dans les eaux de surfaces et souterraines.....	41

1.5.4	Résistance bactérienne et toxicité des antibiotiques liée à l'activité agricole .....	43
1.5.4.1	Résistance bactérienne .....	43
1.5.4.2	Effet et toxicité .....	46
1.5.4.3	Impact des produits de dégradation .....	47
1.6	Enjeux de l'utilisation des antibiotiques vétérinaires .....	51
<b>Chapitre 2. Analyse des antibiotiques vétérinaires .....</b>		<b>52</b>
2.1	Mise en contexte .....	53
2.2	Extraction des antibiotiques vétérinaires contenus dans des matrices biologiques et environnementales .....	53
2.2.1	Méthodes d'extractions instrumentales .....	59
2.2.2	Extraction par sonication .....	60
2.2.3	Extraction sur phase solide .....	61
2.3	Méthodes de séparation et d'introduction d'échantillons .....	62
2.3.1	La chromatographie liquide .....	62
2.3.2	Méthode alternative d'introduction d'échantillons, la désorption thermique par diode laser .....	64
2.4	La spectrométrie de masse .....	67
2.4.1	Description générale .....	67
2.4.2	L'ionisation ESI et APCI .....	68
2.4.3	Le triple quadripôle .....	70
2.4.4	La spectrométrie de masse à haute résolution .....	73
2.4.5	L'Orbitrap .....	74
2.4.6	Le Q-Exactive .....	76
2.5	Problématiques et objectifs des travaux de recherche .....	78
2.6	Structure de la thèse .....	80
<b>Chapitre 3. Analyse de la triméthoprime, lincomycine, sulfadoxine et tylosine dans le lisier de porc par désorption thermique par diode laser-ionisation chimique à pression atmosphérique-spectrométrie de masse en tandem.....</b>		<b>82</b>
3.1	Introduction .....	84

3.2	Materials and methods.....	86
3.2.1	Chemicals, reagents and stock solutions .....	86
3.2.2	Swine manure .....	86
3.2.3	Extraction and clean-up.....	87
3.2.4	LDTD-APCI-MS/MS.....	88
3.2.5	Validation of LDTD-APCI-MS/MS method.....	89
3.3	Results and discussion.....	90
3.3.1	Manure characteristics.....	90
3.3.2	Manure extraction method development.....	91
3.3.3	Sample clean-up and elution .....	94
3.3.4	LDTD-APCI parameters optimization .....	95
3.3.5	Method validation .....	101
3.4	Conclusions .....	104
3.5	Acknowledgements .....	105
3.6	Supplementary materials .....	107
<b>Chapitre 4. Performance quantitative de la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution Q-Exactive pour l'analyse de tétracyclines dans une matrice complexe .....</b>		
<b>115</b>		
4.1	Introduction .....	117
4.2	Materials and methods.....	121
4.2.1	Chemicals and reagents.....	121
4.2.2	Swine manure .....	121
4.2.3	Extraction and SPE parameters .....	122
4.2.4	LC parameters .....	123
4.2.5	HRMS parameters .....	123
4.2.6	Data analysis and method validation.....	126
4.3	Results and discussion.....	130
4.3.1	Extraction and clean-up development .....	130
4.3.2	LC parameters optimization .....	131
4.3.3	HRMS parameters optimization.....	132

4.3.4	Data analysis and method validation.....	136
4.4	Conclusions .....	141
4.5	Acknowledgements .....	141
4.6	Supplementary material.....	143
<b>Chapitre 5. Développement d'une approche de dépistage suspecté et non ciblé pour la détection de résidus d'antibiotiques vétérinaires dans une matrice biologique complexe par HRMS .....152</b>		
5.1	Introduction .....	154
5.2	Materials and methods.....	157
5.2.1	Chemicals and reagents.....	157
5.2.2	Extraction and sample clean-up .....	158
5.2.3	Swine manure sample.....	159
5.2.4	LC-HESI-HRMS parameters .....	159
5.2.5	SIEVE parameters .....	161
5.2.6	Data processing .....	162
5.2.7	Confirmation and validation.....	163
5.3	Results and discussion.....	164
5.3.1	Sample extraction and clean-up .....	164
5.3.2	Liquid chromatography, ionization and HRMS detection .....	165
5.3.3	Identification strategy and data processing .....	167
5.3.4	Confirmation and validation.....	169
5.3.5	Identified compounds .....	171
5.4	Conclusions .....	180
5.5	Acknowledgements .....	181
5.6	Supplementary materials .....	182
<b>Chapitre 6. Analyse d'antibiotiques vétérinaires dans les sols agricoles et les eaux de drainage d'un champ ayant reçu une fertilisation par lisier de porc .....193</b>		
6.1	Introduction .....	195
6.2	Materials and methods.....	200
6.2.1	Chemicals and reagents.....	200

6.2.2	Water, soil and manure samples.....	201
6.2.3	Extraction and sample clean-up .....	202
6.2.4	LC parameters .....	203
6.2.5	HRMS parameters .....	204
6.2.6	Degradation products .....	207
6.2.7	Method validation .....	207
6.3	Results and discussion.....	208
6.3.1	Validation .....	208
6.3.2	Degradation of TCs and formation of metabolites.....	212
6.3.3	Occurrence, mobility and efficiency of veterinary compounds. ....	218
6.4	Conclusions .....	222
6.5	Acknowledgements .....	223
6.6	Supplementary materials .....	224
<b>Chapitre 7.</b>	<b>Conclusions .....</b>	<b>236</b>
7.1	Conclusions .....	237
7.2	Perspectives .....	241
<b>Références.....</b>		<b>244</b>

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1-1.</b> Récapitulatif des différentes classes d'antibiotiques vétérinaires, leurs modes d'action, ainsi que la quantité utilisée en médecine vétérinaire en 2008 au Canada [26, 35-41].	9
<b>Tableau 1-2.</b> Concentrations d'antibiotiques vétérinaires rapportées dans les lisiers et autres rejets agricoles.	28
<b>Tableau 1-3.</b> Propriétés physicochimiques de plusieurs classes d'antibiotiques vétérinaires [66].	29
<b>Tableau 1-4.</b> $K_d$ et $K_{oc}$ de plusieurs classes d'antibiotiques vétérinaires.	32
<b>Tableau 1-5.</b> Concentrations d'antibiotiques vétérinaires retrouvées dans des sols de champs agricoles d'après plusieurs études.	35
<b>Tableau 1-6.</b> Concentrations d'antibiotiques vétérinaires trouvés dans des eaux superficielles et souterraines d'après plusieurs publications.	37
<b>Tableau 1-7.</b> Dégradation de différentes classes d'antibiotiques vétérinaires suivant la matrice.	42
<b>Tableau 1-8.</b> Exemples d'effet de l'exposition de différentes classes d'antibiotiques vétérinaires sur les sols, certains organismes, certains micro-organismes et plantes.	49
<b>Tableau 2-1.</b> Résumé de différentes techniques analytiques utilisées pour analyser les antibiotiques dans les eaux superficielles ou souterraines, les sols agricoles et le lisier de porc.	55
<b>Tableau 3-1.</b> Compounds physical parameters for SDX, LCM, TMP and TYL including molecular weight, $pK_a$ and $\log P$ [68, 206].	92
<b>Tableau 3-2.</b> Method validation parameters including linearity ranges, correlation coefficient ( $R^2$ ), sensitivity, the MLD, the MLQ and recoveries.	102
<b>Tableau 3-3.</b> Mean concentration (mean analysis $\pm$ SD, $n = 3$ ) of target analytes measured in freeze-dried manure samples including bias values and method interday/intraday precision ( $n = 10$ ).	103
<b>Tableau 4-1.</b> HRMS parameters of FS and PRM detection.	125



<b>Tableau 4-2.</b> Accuracy and precision parameters of target analytes measured at three different concentrations ( $\text{ng g}^{-1}$ ) in freeze-dried manure samples including bias values (% , $n = 5$ ) and method interday/intraday precision (RSD - % , $n = 5$ ).....	137
<b>Tableau 4-3.</b> Method validation parameters for FS and PRM modes including linearity ranges, coefficient correlation ( $R^2$ ), sensibility, the MLD, the MLQ and recoveries.....	138
<b>Tableau 5-1.</b> Description of the identified compounds of interest. ....	174
<b>Tableau 6-1.</b> HRMS parameters. ....	206
<b>Tableau 6-2.</b> Method validation parameters of target compounds in swine manure, soil and drainage water samples including coefficient correlation ( $R^2$ ), sensitivity, the MLD and the MLQ and recoveries. ....	211
<b>Tableau 7-1.</b> Récapitulatif des méthodes analytiques développées dans cette thèse comparées aux méthodes analytiques antérieures [142, 144-148, 220]. ....	238

## Liste des tableaux supplémentaires

---

<b>Tableau S3-1.</b> SRM optimal parameters for SDX, LCM, TMP and TYL analysis by LDTD-APCI-MS/MS in PI. ....	114
<b>Tableau S4-1.</b> Matrix effects in FS and PRM mode are the ratio of the response of the analytes obtained for spiked matrices after extraction to the response of the analytes recorded for the standard solution expressed as a percentage at 250 µg L <sup>-1</sup> ( <i>n</i> = 5). ....	151
<b>Tableau S5-1.</b> Example of identified compounds which were part of the matrix. ....	192
<b>Tableau S6-1.</b> List of inclusion of the data-dependant acquisition mode. This list included parent compounds of common veterinary antibiotics used in swine husbandry as well as degradation products of tetracyclines based on literature [277]. ....	231
<b>Tableau S6-2.</b> Recovery and matrix effect (% - <i>n</i> = 5) of target compounds at two concentrations (50 and 250 ng g <sup>-1</sup> in field soils, 50 and 250 µg L <sup>-1</sup> in swine manure and 50 and 250 ng L <sup>-1</sup> in drainage waters) in swine manure, field soils and drainage waters. ....	233
<b>Tableau S6-3.</b> Accuracy and precision parameters of target analytes measured in swine manure, field soils and drainage waters and method interday/intraday precision measured at two concentrations (50 and 250 ng g <sup>-1</sup> in field soils, 50 and 250 µg L <sup>-1</sup> in swine manure and 50 and 250 ng L <sup>-1</sup> in drainage waters), (RSD - %, <i>n</i> = 5). ....	234
<b>Tableau S6-4.</b> Summary of the concentrations found in the different samples analysed i.e. swine manure from 2013 experiment, soil from 2011 and 2013 experiment and drainage water from 2013 experiment. ....	235

## Liste des figures

---

<b>Figure 1-1.</b> Structures de quelques $\beta$ -lactamines utilisés couramment dans l'élevage porcin au Canada [42].	11
<b>Figure 1-2.</b> Structures de quelques tétracyclines utilisées couramment dans l'élevage porcin au Canada [42].	14
<b>Figure 1-3.</b> Structures de quelques sulfamides utilisés couramment dans l'élevage porcin au Canada [42].	16
<b>Figure 1-4.</b> Structures de quelques macrolides utilisés couramment dans l'élevage porcin au Canada [42].	18
<b>Figure 1-5.</b> Structures de l'acide nalidixique et d'une fluoroquinolone utilisée dans l'élevage porcin au Canada [42].	20
<b>Figure 1-6.</b> Lincomycine, seul lincosamide utilisé dans l'élevage porcin au Canada [42].	21
<b>Figure 1-7.</b> Triméthoprime, le seul diaminopyrimidine utilisé dans l'élevage porcin au Canada [42].	22
<b>Figure 1-8.</b> Explication de la voie d'entrée principale des antibiotiques dans l'environnement.	26
<b>Figure 1-9.</b> Épimérisation de la tétracycline [96].	39
<b>Figure 1-10.</b> Hydrolyse de la benzylpénicilline.	39
<b>Figure 1-11.</b> Oxydation des fluoroquinolones par $MnO_2$ [97].	39
<b>Figure 1-12.</b> Transmission des bactéries résistantes aux antibiotiques suivant différentes voies jusqu'aux humains adaptés de Khachatourians <i>et al.</i> [122].	45
<b>Figure 2-1.</b> Schéma de la LDTD-APCI adapté de Phytronix Technologies (Québec, Canada).	65
<b>Figure 2-2.</b> Diagramme de Daves <i>et al.</i> montrant la relation entre la température de vaporisation et la décomposition d'un composé non volatil et thermosensible d'après la théorie d'Arrhenius [163].	66
<b>Figure 2-3.</b> Structure générale d'un spectromètre de masse utilisé dans le cadre de cette thèse.	68

<b>Figure 2-4.</b> Mécanisme d'ionisation d'une molécule par APCI en mode positif adapté de De Hoffmann <i>et al.</i> et de Badjagbo <i>et al.</i> [168, 169].....	69
<b>Figure 2-5.</b> Schéma du mécanisme d'ionisation par nébulisation électrostatique en mode positif adapté de De Hoffmann <i>et al.</i> [168]. .....	70
<b>Figure 2-6.</b> Schéma d'un quadripôle hyperbolique adapté de De Hoffmann <i>et al.</i> [168].....	71
<b>Figure 2-7.</b> Schéma d'un triple quadripôle adapté de De Hoffmann <i>et al.</i> [168]. .....	72
<b>Figure 2-8.</b> Schéma de l'Orbitrap selon une coupe axiale adapté de Thermo Fisher Scientific.....	75
<b>Figure 2-9.</b> Schéma du Q-Exactive adapté de Thermo Fisher Scientific.....	77
<b>Figure 3-1.</b> Illustration of LDTD laser pattern for SDX, LCM and TMP method and TYL method. ....	89
<b>Figure 3-2.</b> Sample preparation and clean-up procedure for analysis of SFX, LCM, TMP and TYL. ....	93
<b>Figure 3-3.</b> Effect of laser power on peak area of target analytes spiked in matrix solution (SDX use the right y-axis scale, others compounds use the left axis-scale) ( $n = 6$ ). .....	96
<b>Figure 3-4.</b> Illustration of different LDTD laser patterns tested for the TYL method.....	98
<b>Figure 3-5.</b> Effect of laser pattern (presented in <b>Figure 3-4</b> ) on TYL peak area measured with $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ of target analyte in matrix solution ( $n = 6$ ). .....	98
<b>Figure 3-6.</b> Effect of solvent mixture on peak area of target analytes ( $n = 6$ ). .....	99
<b>Figure 3-7.</b> Effect of hold time in laser pattern and laser power on TYL peak area measured with $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ of target analyte ( $n = 6$ ). .....	101
<b>Figure 4-1.</b> Chemical structures of TCs and their degradation products (indicated by a star). .....	120
<b>Figure 4-2.</b> Isotopes of CTC for confirmation. ....	127
<b>Figure 4-3.</b> Optimization of MTW for TC and 4-ETC in FS mode.....	128
<b>Figure 4-4.</b> Mass accuracy stability of TCs measure in FS with lock mass ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ; $n = 3$ ). .....	129
<b>Figure 4-5.</b> Example of near-isobaric compounds which cause deviations of measured masses for DC in FS mode. ....	133

<b>Figure 4-6.</b> Chromatographic peaks of 4-ETC and TC in PRM mode (17 500 FWHM at $m/z$ 200) and FS mode (70 000 FWHM at $m/z$ 200) at 3 ng g <sup>-1</sup> .	139
<b>Figure 5-1.</b> Workflow of the non-target screening identification procedure.	162
<b>Figure 5-2.</b> Total ion chromatography obtained in FS mode of swine manure sample with example of SDZ and MD traces compared to the TIC.	167
<b>Figure 5-3.</b> Isotopic abundance pattern of CTC (A) and DEC (B) with ratio 3:1 between M and M+2 in swine manure sample.	171
<b>Figure 5-4.</b> Chemical structures of veterinary antibiotics, steroid and analgesic as well as matrix compounds found in swine manure sample.	173
<b>Figure 5-5.</b> Identification of MP from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energy); Summary of the mechanism of fragmentation proposed.	176
<b>Figure 5-6.</b> Identification of SDZ from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energy); Summary of the mechanism of fragmentation proposed.	179
<b>Figure 6-1.</b> Chemical structures of target compounds i.e. tetracyclines, $\beta$ -lactams, sulfonamides, lincosamides, diaminopyrimidines and macrolides. Tetracyclines and their respective degradation products were all presented in <b>Figure S6-1</b> .	196
<b>Figure 6-2.</b> Chromatographic separation of CTC and its degradation products with their fragmentation patterns, proposed structures of fragment ions and mass accuracy.	214
<b>Figure 6-3.</b> Chromatographic separation of DEC and its degradation products with their fragmentation patterns, proposed structures of fragment ions and mass accuracy.	215
<b>Figure 6-4.</b> Chromatographic separation of AMX and its degradation products with their fragmentation patterns, proposed structures of fragment ions and mass accuracy.	217
<b>Figure 6-5.</b> Distribution of veterinary antibiotic concentrations (ng g <sup>-1</sup> ) from different families as a function of depth sampling in 2011 and 2013 ( $n = 3$ ).	219
<b>Figure 6-6.</b> Concentrations of some TCs in swine manure ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) compared to their relative EC <sub>50</sub> [56].	221

## Liste des figures supplémentaires

---

<b>Figure S3-1.</b> Schematic representation of the LDTD-APCI source.....	108
<b>Figure S3-2.</b> Stability of TYL measure between pH 2-11. The acidic solution is the McIlvaine buffer at different pH. The basic solution is composed of NH <sub>4</sub> OH. The quantity of TYL was expressed in % compared to the initially doped concentration (500 µg L <sup>-1</sup> ).....	109
<b>Figure S3-3.</b> Effect of deposition volume on peak area of target analytes in spiked matrix solution (SDX use the right y-axis scale, others compounds use the left x-axis-scale) ( <i>n</i> = 6).....	110
<b>Figure S3-4.</b> Effect of carrier gas flow on peak area of target analytes in spiked matrix solution ( <i>n</i> = 6).....	111
<b>Figure S3-5.</b> Sample peak shape results of SFX, LCM, TMP and [ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP obtained using LDTD-APCI-MS/MS of 250 µg L <sup>-1</sup> standards.....	112
<b>Figure S3-6.</b> Sample peak shape results of TYL and SPI obtained using LDTD-APCI-MS/MS of 250 µg L <sup>-1</sup> standards.....	113
<b>Figure S4-1.</b> LC gradient.....	144
<b>Figure S4-2.</b> Effect of sheath gas on peak area.....	145
<b>Figure S4-3.</b> PRM fragmentation mass spectra of target compounds acquired with respective NCE. Major products ions used for quantitation appear in bold.....	146
<b>Figure S4-4.</b> Tetracyclines fragmentation with increasing HCD percentage in collision cell.....	147
<b>Figure S4-5.</b> Recoveries of target compounds at 250 ± STD ng g <sup>-1</sup> ( <i>n</i> = 3) four different cartridges.....	148
<b>Figure S4-6.</b> Evolution of the number of acquisition per chromatographic peak (4-ETC and TC) in PRM mode relative to the resolving power.....	149
<b>Figure S4-7.</b> Evolution of the number of acquisition per chromatographic peak (4-ETC) in FS mode relative to the resolving power.....	150
<b>Figure S5-1.</b> LC gradient.....	183

- Figure S5-2.** Number of acquisition point across the chromatographic peak for 4-ETC and TC. ....184
- Figure S5-3.** Chemical structures of compounds from the matrix: (A) 9-((1S,3R)-3-(Hydroxyamino)cyclopentyl)-9H-purin-6-amine, (B) Guanine, (C) Ethynyl(methyl)diphenylsilane, (D) 1-((E)-Amino((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)methylene)urea. ....185
- Figure S5-4.** Identification of acetaminophen (APAP) from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); Summary of the mechanism of fragmentation proposed. ....186
- Figure S5-5.** Identification of lincomycin (LCM) from swine manure sample included: chromatographic separation of the reference standard and of the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); Summary of the mechanism of fragmentation proposed. ....187
- Figure S5-6.** Identification of chlortetracycline (CTC) from swine manure sample included: chromatographic separation of reference standard and of the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); proposed fragmentation structure of  $C_7H_8NO_3$  ( $m/z$  154.08680) according to the literature [266]. ....188
- Figure S5-7.** Identification of tetracycline (TC) from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); proposed fragmentation structure of  $C_7H_8NO_3$  ( $m/z$  154.05041) according to the literature [266]. ....189
- Figure S5-8.** Identification of demeclocycline (DEC) from swine manure sample included: chromatographic separation of reference standard and of the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); proposed fragmentation structure of  $C_7H_8NO_3$  ( $m/z$  154.05041) according to the literature [266]. ....190
- Figure S5-9.** Identification of amoxicillin (AMX) from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample;

fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); Summary of the mechanism of fragmentation proposed. ....	191
<b>Figure S6-1.</b> Chemical structures of tetracyclines and their respective degradation products. ....	226
<b>Figure S6-2.</b> LC gradient. ....	227
<b>Figure S6-3.</b> Degradation of chlortetracycline (CTC) in soil, in surface water and in HPLC grade water compared to CTC standard. Chlortetracycline degradation products i.e. 4-epiisochlortetracycline (4-EICTC) and isochlortetracycline (ICTC) seem to form more rapidly in surface water than in soil. ....	228
<b>Figure S6-4.</b> Test of different filters for drainage waters filtration according with target compounds ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) recoveries ( $n = 3$ ).....	229
<b>Figure S6-5.</b> Example of chromatographic separation of target compounds i.e. amoxicillin (AMX), lincomycin (LCM), tetracycline (TC), doxycycline (DC), demeclocycline (DEC) and chlortetracycline (CTC) and degradation compounds i.e. 4-epitetracycline (4-ETC), 4-epidemeclocycline (4-EDEC), 4-epiisochlortetracycline (4-EICTC) and isochlortetracycline (ICTC) into drainage water and swine manure compared to certified standards separation in methanol. ....	230



## Liste des abréviations, sigles et acronymes

---

Les mots ou nom de la langue anglaise sont indiqués en italique. Certains termes n'apparaissent qu'en anglais car ceux-ci n'ont pas été utilisés en français dans ce manuscrit.

4-EATC	<i>4-epianhydrotetracycline</i>
4-ECTC	<i>4-epichlortetracycline</i>
4-EDEC	<i>4-epidemeclocycline</i>
4-EKCTC	<i>4-epiketochlortetracycline</i>
4-EICTC	<i>4-epiisochlortetracycline</i>
4-ETC	<i>4-epitetracycline</i>
ACN	Acétonitrile ( <i>acetonitrile</i> )
ACTC	<i>Anhydrochlortetracycline</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGC	<i>Automatic gain control</i>
AHC	<i>Animal Health of Concern</i>
AMX	<i>Amoxicillin</i>
ATC	<i>Anhydrotetracycline</i>
APCI	Ionisation à pression atmosphérique ( <i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> )
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAP	<i>Acetaminophen</i>
ARN	Acide ribonucléique
ASE	Extraction accélérée par solvant ( <i>accelerated solvent extraction</i> )
C18	Phase stationnaire à base d'octadécylsilane ( <i>octadecyl carbon bonded silica chain stationary phase</i> )
C8	Phase stationnaire à base d'octasilane ( <i>octa carbon bonded silica chain stationary phase</i> )
CAS	<i>Chemical abstract service</i>

CE	<i>Collision energy</i>
CFT	<i>Ceftiofur</i>
CTC	<i>Chlortetracycline</i>
CV	<i>Coefficient of variation</i>
d-SPE	Extraction sur phase solide dispersive
dd-H <sub>2</sub> O	Eau distillée et désionisée ( <i>distilled-deionized water</i> )
DAD	Détecteur à barrette de diode ( <i>diode array detector</i> )
DC	<i>Doxycycline</i>
DDA	Acquisition par données dépendantes ( <i>data-dependant acquisition</i> )
DEC	<i>Demeclocycline</i>
EC <sub>10</sub>	Concentration effective à 10% ( <i>ten percent effective concentration</i> )
EC <sub>50</sub>	Concentration effective à 50% ( <i>half maximum effective concentration</i> )
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ESI	Ionisation par nébulisation électrostatique ( <i>electrospray ionisation</i> )
EtAc	<i>Ethyl acetate</i>
EC	<i>European Commision</i>
FLD	Fluorométrie ( <i>fluorescence detection</i> )
FS	Balayage complet ( <i>full scan</i> )
FWHM	<i>Full width at half maximum</i>
GC	Chromatographie gazeuse ( <i>gas chromatography</i> )
HCD	<i>High energy collision cell</i>
HESI	<i>Heated electrospray ionisation</i>
HLB	<i>Hydrophilic lipophilic balance</i>
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance ( <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HRMS	Spectrométrie de masse à haute résolution ( <i>high-resolution mass spectrometry</i> )
IS	Standard interne ( <i>internal standard</i> )

IRDA	Institut de Recherche et de Développement en Agro-environnement ( <i>Research and Development Institute for the Agri-environment</i> )
IT	<i>Injection time</i>
ICTC	<i>Isochlortetracycline</i>
$K_d$	Coefficient de sorption ( <i>sorption coefficient</i> )
KCTC	<i>Ketochlortetracycline</i>
$K_{oc}$	Coefficient de distribution carbone organique-eau
$K_{ow}$	Coefficient de distribution octanol-eau
LC <sub>50</sub>	Concentration létale à 50%
LC <sub>10</sub>	Concentration létale à 10%
LC	Chromatographie liquide ( <i>liquid chromatography</i> )
LCM	<i>Lincomycin</i>
LDTD	Désorption thermique par diode laser ( <i>laser diode thermal desorption</i> )
LD	Limite de détection
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOI	<i>Limit of identification</i>
log $D$	Logarithme du coefficient de distribution octanol-eau ( <i>octanol-water distribution coefficient</i> )
log $P$	Logarithme du coefficient de distribution octanol-eau ( <i>octanol-water partition coefficient</i> )
LD	Limite de détection
LQ	Limite de quantification
$m/z$	Ratio masse sur charge ( <i>mass to charge ratio</i> )
MAE	Extraction assistée par micro-ondes ( <i>microwave assisted extraction</i> )
MC	<i>Minocycline</i>
MeOH	Méthanol ( <i>methanol</i> )
MIC <sub>50</sub>	Concentration minimum pour qu'un antibiotique inhibe la croissance à 50 %

MLD	Limite de détection de la méthode ( <i>method limit of detection</i> )
MLQ	Limite de quantification de la méthode ( <i>method limit of quantification</i> )
MM	Masse moléculaire
MP	<i>Medroxyprogesterone</i>
MPA	<i>Medroxyprogesterone acetate</i>
MRM	Multiplés fragmentations sélective ( <i>multiple reaction monitoring</i> )
MS	Spectrométrie de masse ( <i>mass spectrometry</i> )
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem ( <i>tandem mass spectrometry</i> )
MTW	<i>Mass tolerance window</i>
MW	<i>Molecular weight</i>
NCE	<i>Normalized collision energy</i>
NIST	<i>National Institute of Standard and Technology</i>
OTC	<i>Oxytetracycline</i>
PEG	<i>Benzylpenicillin</i>
PI	<i>Positive ionization</i>
PICRA	Programme Intégré Canadien de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens
$pK_a$	Constante de dissociation d'un acide ( <i>acidic dissociation constant</i> )
PLE	Extraction par liquide pressurisée ( <i>pressurized liquid extraction</i> )
PRM	Suivi des réactions de fragmentation parallèle ( <i>parallel reaction monitoring</i> )
Q	<i>Quadrupole</i>
QqQ	Triple quadripôle ( <i>triple quadrupole</i> )
QTOF	Spectromètre de masse hybride quadripôle-temps de vol ( <i>hybrid quadrupole-time of flight mass spectrometer</i> )
QuEChERS	<i>Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe</i>
$R^2$	Coefficient de détermination ( <i>determination coefficient</i> )
RP	Pouvoir de résolution ( <i>resolving power</i> )

RSD	<i>Relative standard deviation</i>
S/N	<i>Signal to noise ratio</i>
SAX	Cartouche échangeuse anionique ( <i>strong anion exchange cartridge</i> )
SFE	Extraction par fluide supercritique ( <i>supercritic fluid extraction</i> )
SFX	<i>Sulfadoxin</i>
SFZ	<i>Sulfadiazine</i>
SIM	Suivi d'ion ciblé ( <i>single ion monitoring</i> )
SLE	Extraction solide liquide ( <i>solid liquid extraction</i> )
SMT	<i>Simeton</i>
SPE	Extraction sur phase solide ( <i>solid phase extraction</i> )
SPSS	<i>Statistical package for social science</i>
SRM	Suivi des réactions de fragmentation caractéristiques ( <i>selected reaction monitoring</i> )
STD	<i>Standard deviation</i>
TC	<i>Tetracycline</i>
TIC	<i>Total ion chromatogram</i>
TOF	Spectromètre de masse à temps de vol ( <i>time of flight mass spectrometer</i> )
$t_r$	<i>Retention time</i>
TMP	<i>Trimethoprim</i>
TYL	<i>Tylosin</i>
u	<i>Unified atomic mass unit</i>
UCS	<i>Union of Concerned Scientists</i>
US EPA	<i>United States Environmental Agency</i>
UV-Vis	Spectroscopie ultraviolet-visible ( <i>ultraviolet-visible spectroscopy</i> )

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier Professeur Sébastien Sauvé, mon directeur de recherche, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ma thèse dans son équipe. Sa confiance, son appui et ses conseils durant toutes ces années passées dans son équipe m'ont beaucoup aidé dans mon parcours scientifique, merci.

Je remercie ensuite toute l'équipe du Laboratoire de chimie analytique environnementale autant pour leurs aides et conseils que pour les bons moments passés ensemble. Ils ont été directement ou indirectement des personnes importantes dans l'aboutissement de ce projet. Je souhaite remercier en particulier Audrey Roy-Lachapelle, en tant que voisine de bureau et co equipi re de travail ; Paul Fayad pour ses conseils avisés et tous ces moments à nous raconter des histoires aussi insolites les unes que les autres ; Sung Vo Duy pour son soutien technique et scientifique ; Michel Boisvert pour sa camaraderie ; Guillaume Cormier, co equipier aussi bien au lab, au hockey ou en soirée ; Simon Comtois-Marotte pour m'avoir supporté tous les jours dans notre bureau et pour le café tous les matins. Merci aussi pour toutes ces bonnes soirées à la Station des Sports devant un match de hockey !

La recherche ne pourrait pas être possible sans matériel de qualité, je voudrais ainsi remercier les sociétés Thermo Fisher Scientific, Unity Lab Service et Phytronix Technologies pour le support technique en particulier Maroun El Khoury, André Pageau, Olivier Collin et Serge Auger. J'aimerais ensuite remercier Agriculture Canada et l'Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement (IRDA), en particulier Caroline Côté, Marc-Olivier Gasser et Mylène Généreux.

Un grand merci à toute ma famille, ma s eur et surtout ma mère et mon père pour avoir cru en moi et m'avoir toujours encouragé dans mes choix et dans mes (longues)  tudes. Et pourquoi ne pas remercier aussi mes amis d'enfance pour le soutien moral, Mathieu, Pierre, Pierre-Yves, Thomas, Nicolas, Thibault, Beef. Merci à vous tous de m'avoir toujours soutenu.

Enfin, j'aimerais remercier Audrey une deuxième fois qui partage aussi bien ma vie au laboratoire que ma vie de tous les jours, merci pour ton aide et ton soutien.

*À ma famille,*

## **Chapitre 1. Les antibiotiques**

---



## 1.1 Description générale

Les antibiotiques, encore appelés antimicrobiens, antibactériens ou anti-infectieux, sont des molécules utilisées dans le but de traiter ou de prévenir une infection bactérienne. Ces substances sont soit d'origine naturelle comme la benzylpénicilline (pénicilline G) qui est sécrétée par un champignon microscopique *Penicillium notanum*, soit d'origine semi-synthétique comme l'amoxicilline qui est synthétisée à partir de l'acide 6-aminopénicillanic qui est produit par les champignons *Penicillium* ou complètement synthétique comme les quinolones dérivés de l'acide nalidixique synthétisé en laboratoire. Enfin, les antibiotiques peuvent être d'origine naturelle et synthétique comme la chlortétracycline qui est sécrétée par la bactérie *Streptomyces aureofaciens* et qui peut aussi être fabriquée par synthèse chimique. Ces composés ont le pouvoir de tuer ou d'inhiber la croissance d'une bactérie ou d'un champignon de manière sélective en empêchant le bon fonctionnement des processus vitaux du micro-organisme visé sans toutefois être nocif pour les cellules de l'hôte [1]. Les antimicrobiens, dans un terme plus large, englobe toutes substances capables de tuer des micro-organismes. Ainsi, les antibiotiques, les antifongiques, les antiviraux et les antiparasites sont des antimicrobiens. Les antiseptiques comme l'hypochlorite de sodium ne sont pas des antibiotiques. Ils ont la capacité de tuer une grande quantité de germes (bactéries, champignons, virus), cependant leurs modes d'action ne sont pas sélectifs. C'est cette sélectivité qui caractérise les antibiotiques [1-3]. Le terme antibiotique était originellement réservé aux composés ayant des propriétés antibactériennes produits par des micro-organismes, ainsi qu'aux substances actives créées de façon semi-synthétique, cette définition s'est maintenant élargie aux composés de synthèse [4]. Ces molécules ayant des propriétés antibactériennes sélectives seront appelées antibiotiques dans ce manuscrit.

## 1.2 Aperçu historique

Les antibiotiques sont probablement la chimiothérapie la plus utilisée dans l'histoire de la médecine, ainsi on ne compte pas le nombre de vies que cette découverte a pu contribuer à

sauver [1]. Ces composés ont permis de contrôler un grand nombre de maladies infectieuses qui étaient les principales causes de mortalité humaine. Contrairement à ce qu'on peut penser, l'ère des antibiotiques n'est pas limitée à l'époque moderne. La première utilisation d'antibiotiques répertoriés date d'il y a 5300 ans [5]. Les études effectuées sur la momie d'un homme des glaces retrouvée en 1991 proche du glacier de Val Senales en Italie ont montré que celui-ci utilisait de la résine d'un champignon (*Piptoporus betulinus*) qui contient un puissant laxatif pour lutter contre les parasites intestinaux [5]. À une époque plus proche, des traces de tétracycline ont été trouvées sur des restes de squelette humain provenant d'un ancien peuple nubien soudanais et datant de 350 à 500 de l'ère commune [6]. Un autre exemple d'utilisation d'antibiotique a été répertorié sur des ossements découverts à l'oasis Dakhlet en Égypte provenant de la période romaine. Les échantillons retrouvés ont montré que la tétracycline a été incluse dans le régime alimentaire de ce peuple dans un but se protéger contre les infections [7].

L'ère commune des antibiotiques a débuté vers le début du XX<sup>ème</sup> siècle et est associée avec les noms d'Alexandre Fleming et de Paul Ehrlich. Ce dernier est considéré comme le père fondateur de la chimiothérapie actuelle et voulait développer une *magic bullet* qui peut sélectivement éliminer les micro-organismes responsables de l'infection sans toutefois être nocif pour l'hôte. Pour cela, il étudia l'effet des pigments d'aniline sur des souches bactériennes et ses recherches menèrent à la découverte en 1909 d'un composé organoarsenical nommé Salvarsan capable de traiter la syphilis [8]. Peu après la 1<sup>ère</sup> Guerre Mondiale, Flemming effectua des recherches sur des agents bactériens, du fait qu'il avait été témoin d'un grand nombre de soldats morts, victimes de septicémie. En 1928, il fit la découverte de la pénicilline par accident, en observant une moisissure issue d'un champignon du genre *Penicillium* capable de produire une substance pouvant tuer les bactéries. Après avoir appelé cette substance pendant longtemps *mould juice*, il finit par la nommer pénicilline en 1929 [9]. Le premier antibiotique synthétique fut découvert par Gerhard Domagk en 1935 qui prouva l'efficacité des composés soufrés contre certaines infections à streptocoque. Ainsi, le Prontosil ou chlorhydrate de sulfamidochrysoïdine est le premier antibiotique sulfamidé [10]. Quelques années plus tard, en 1943, Albert Schatz fit la découverte de la streptomycine isolée à partir d'une souche d'actinobactérie. C'est le premier antibiotique à large spectre découvert

qui est efficace contre le bacille du tubercule et contre les bactéries Gram négatives comme *Escherichia coli* [11].

Ces découvertes ont ouvert l'ère moderne des antibiotiques et ont déclenché chez les compagnies pharmaceutiques le développement d'antibiotiques de synthèse et naturels. La découverte des antibiotiques est certainement une des découvertes les plus importantes pour la médecine moderne et a permis de faire progresser l'espérance de vie de plus de dix ans depuis 1950 [1, 12]. De nombreuses autres classes d'antibiotiques sont apparues par la suite sur le marché ayant différents mécanismes d'actions et pouvant s'attaquer à un plus grand nombre de bactéries. Le marché mondial des antibiotiques incluant la consommation humaine et vétérinaire est estimé entre 100 000 et 200 000 tonnes annuellement [8].

### **1.3 Les antibiotiques dans le domaine vétérinaire**

#### **1.3.1 Adaptation de l'utilisation des antibiotiques dans le domaine vétérinaire**

La production à grande échelle de la pénicilline pendant la 2<sup>ème</sup> Guerre Mondiale a permis de rendre ces antibiotiques disponibles aux vétérinaires. L'utilisation des antibiotiques pour soigner les mammites chez les bovins par exemple se révéla beaucoup plus efficace que les traitements utilisés auparavant [13]. Juste après la guerre, la streptomycine fut ajoutée pour la première fois à la nourriture destinée aux poulets dans le but d'améliorer leur croissance [14]. Peu après, Thomas H. Jukes qui cherchait une source de vitamine B<sub>12</sub> peu coûteuse comme supplément de régime pour des poulets utilisa à la place la chlortétracycline, antibiotique récemment développé pour l'utilisation humaine. L'utilisation de ce composé permit aux poulets de gagner du poids très rapidement et de réduire la quantité de nourriture consommée [15]. L'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance a par la suite été adaptée très rapidement à l'élevage du bétail et des porcs [16, 17]. Plus tard, l'incorporation d'autres classes antibiotiques à large spectre à des doses inférieures aux doses thérapeutiques a montré qu'ils avaient un effet similaire sur les animaux. Ainsi, les

antibiotiques à larges spectres permettent à la fois de guérir des maladies endémiques et d'améliorer l'efficacité alimentaire, permettant de faire grossir l'animal plus rapidement [13].

L'utilisation des antibiotiques par les éleveurs pour traiter les animaux a rapidement augmenté par la suite pour protéger le cheptel contre les maladies d'une part, mais aussi d'un point de vue économique pour protéger leur investissement. Par ailleurs, le coût relativement bas des antibiotiques a rendu leur utilisation presque systématique [13].

## **1.3.2 Utilisation des antibiotiques vétérinaires dans le domaine agricole**

### **1.3.2.1 Utilisation générale**

Aujourd'hui, les antibiotiques représentent un outil très important pour l'élevage du bétail. Utilisés à des doses sous-thérapeutiques dans certains pays, ils permettent d'améliorer le taux de croissance et l'efficacité alimentaire, mais permettent aussi de réduire la mortalité au sein du cheptel et d'améliorer les performances reproductives. À des doses intermédiaires, ils vont prévenir l'animal contre des maladies. Enfin, à des doses thérapeutiques, ils vont guérir l'animal de maladies ou d'infections [18, 19].

Les antibiotiques sont particulièrement utilisés dans l'élevage des porcs et des poulets, mais sont également utilisés pour traiter les bœufs, les vaches laitières, les moutons, les animaux domestiques et sont également répandues en aquaculture [13, 19, 20]. Ils sont principalement administrés par voie orale pour être absorbés par le tube digestif et permettre de prévenir ou de traiter des maladies infectieuses déjà bien établies chez l'animal. Dans le cas de grands groupes d'animaux, les antibiotiques sont plutôt administrés par la nourriture ou par injection. L'utilisation d'antibiotiques dans le traitement et dans la prévention de maladies bactériennes dans la production de bétail suit les mêmes règles que celles appliquées à la médecine humaine, mais à plus grande échelle. En effet, si une partie du cheptel présente des signes cliniques d'infections, la totalité doit être traitée pour éviter la prolifération de la maladie [13].

### 1.3.2.2 Utilisation générale dans l'élevage du porc

Aux différentes étapes de leur vie, les porcs vont recevoir une quantité différente d'antibiotiques pour prévenir certaines maladies, soigner l'animal de diverses infections ou encore comme additifs nutritionnels comme expliqués précédemment [21]. Les porcs reçoivent une plus grande quantité d'antibiotiques lorsqu'ils sont jeunes et plus vulnérables aux maladies [21]. Une étude menée aux États-Unis a estimé que 70 à 80% des jeunes porcs élevés recevaient des antibiotiques et que 50 à 60% des porcs adultes seraient traités avec ces mêmes composés [21]. Toutefois, la quantité d'antibiotiques administrés aux porcs en fin de vie est limitée pour éviter des concentrations de résidus trop importante dans la viande [22]. Tous les antibiotiques utilisés dans l'élevage des porcs permettent d'inhiber ou de stopper la croissance de certains micro-organismes. La structure moléculaire ainsi que le spectre bactérien des antibiotiques utilisés peuvent varier énormément. C'est pourquoi ils sont souvent utilisés en combinaison pour accroître leurs performances et cibler un spectre plus large de bactéries et de micro-organismes. Par ailleurs, certains antibiotiques vont être mieux absorbés par l'animal que d'autres, ce qui va influencer leur pouvoir bactériostatique et bactéricide. C'est-à-dire qu'ils sont capables de ralentir, effet bactériostatique, ou d'inhiber complètement la croissance bactérienne, effet bactéricide [1]. Les antibiotiques les plus utilisés dans l'élevage des porcs sont la chlortétracycline et la tylosine [19]. Plusieurs classes d'antibiotiques comme les céphalosporines, les sulfamides et les tétracyclines sont utilisées pour traiter ou pour prévenir la pneumonie qui est une maladie répandue chez le porc [23]. La gentamicine et la néomycine de la famille des aminosides sont utilisées pour traiter la diarrhée aiguë causée par *Escherichia coli* et *Clostridium perfringens*, un autre problème récurrent chez le porc [23]. Enfin, la dysenterie et l'iléite porcine causée respectivement par *Serpulina hyodysenteriae* et *Lawsonia intracellularis* peuvent être traitées par la lincomycine, la tiamuline et certains autres macrolides [23].

### 1.3.3 Consommation des antibiotiques vétérinaires dans le monde

L'utilisation des antibiotiques dans un but de mettre l'animal sur le marché plus rapidement et à moindre coût a fait augmenter significativement la quantité d'antibiotiques produite dans le monde. L'obtention d'informations sur la vente et l'usage des antibiotiques est parfois difficile étant donné la controverse que cela peut créer. Une étude provenant de l'*Animal Health Institute* (AHI – Washington, DC) estime que 9,3 millions de kg d'antibiotiques ont été utilisés en 1999 dans le domaine agricole aux États-Unis. Environ 8 millions de kg auraient été utilisés dans un but thérapeutique, alors que 1,3 million de kg seraient utilisés comme facteur de croissance [19]. Toutefois, une autre étude datant de 2001 faite par un groupe américain de scientifiques indépendants, l'*Union of Concerned Scientists* (UCS – Cambridge, MA), a révélé que les États-Unis utiliseraient environ 11,2 millions de kg d'antibiotiques par année pour des soins non thérapeutiques dans la production de bétail, ce qui représente 70% de leur production totale [19, 24, 25]. Le pourcentage d'utilisation d'antibiotiques comme facteur de croissance au Canada est globalement comparable aux États-Unis. La consommation d'antibiotiques vétérinaires au Canada en 2008 s'élève à environ 1,6 million de kg [26]. Au Danemark, la consommation totale d'antibiotiques en 1997 était supérieure à 150 000 kg et plus de 100 000 kg étaient utilisés comme facteur de croissance [27]. Dans l'Union Européenne, l'utilisation d'antibiotiques dans l'élevage d'animaux est soumise à une directive (70/524/EEC) qui limite les quantités d'antibiotiques dans la nourriture animale à un niveau qui n'altère pas la santé humaine et la santé de l'animal [28]. Depuis 1999, l'Union Européenne a décidé de bannir l'usage d'antibiotiques à des doses sous-thérapeutiques pour faire grossir l'animal plus rapidement [29]. Il a été rapporté qu'avant 1999, le total de 5 millions de kg d'antibiotiques utilisés par année, 3,5 millions de kg avaient été utilisés dans un but thérapeutique et 1,5 million avaient été utilisés comme additif alimentaire et facteur de croissance [30, 31]. Le Japon a aussi interdit l'utilisation d'antibiotiques comme facteur de croissance. Leur utilisation comme additif alimentaire est permise seulement avec l'accord du ministère de l'Agriculture [19].

Globalement, les antibiotiques sont utilisés de façon routinière à des doses thérapeutiques et sous-thérapeutiques, c'est-à-dire inférieures à 200 mg par kg d'aliments [32].

Ces pratiques ont mené à une augmentation importante de la consommation d'antibiotiques dans le monde depuis 40 ans qui est principalement liée au mode de vie des pays occidentaux [13, 19]. Les antibiotiques jouent donc aujourd'hui un rôle majeur dans l'agriculture moderne et dans l'élevage industriel. Ils sont plus utilisés pour faire prendre du poids à l'animal rapidement que pour guérir l'animal dans certains pays [19]. En plus des antibiotiques, l'animal reçoit un mélange varié de médicaments et d'additifs alimentaires comme des produits anesthésiques, des hormones stéroïdiennes et non stéroïdiennes, des anti-inflammatoires, des antiseptiques, des anti-parasitiques, des tranquillisants, des sédatifs et des suppléments nutritionnels [19, 33].

## 1.4 Classification, utilisation et mode d'action

Il existe une grande variété d'antibiotiques, ceux-ci diffèrent autant par leurs structures, leurs spectres bactériens ou encore leurs propriétés bactéricides et bactériostatiques [34]. Ces composés sont classés suivant leurs structures et les cibles bactériennes visées. Malgré le fait que les hommes et les porcs ont des maladies infectieuses en commun, tous les antibiotiques utilisés pour soigner les hommes ne sont pas nécessairement représentés dans le domaine vétérinaire. Par ailleurs, l'utilisation de ces composés biologiquement actifs est soumise à des lois différentes selon les pays. Ainsi, seuls les antibiotiques les plus utilisés dans l'élevage porcin au Canada seront présentés ici. Ils sont classés selon leur importance d'utilisation et les quantités rapportées se basent sur le rapport du Programme Intégré Canadien de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA) rédigé en 2008 [26]. Les  $\beta$ -lactamines, les tétracyclines, les macrolides, les lincosamides, les sulfamides et les quinolones sont les antibiotiques qui sont les plus utilisés et les plus mentionnés dans la littérature scientifique. Le **Tableau 1-1** résume les informations présentées dans cette section et rapporte les quantités d'antibiotiques utilisées en 2008.

**Tableau 1-1.** Récapitulatif des différentes classes d'antibiotiques vétérinaires, leurs modes d'action, ainsi que la quantité utilisée en médecine vétérinaire en 2008 au Canada [26, 35-41].

Classes	Composés les plus utilisés en médecine vétérinaire au Canada	Mode d'action	Quantité utilisée en 2008 (kg)
<b>β-lactamines</b>	Amoxicilline	Inhibiteur de la biosynthèse de la paroi cellulaire bactérienne	109 152
	Ampicilline		
	Ceftiofur		
	Benzylpénicilline		
<b>Tétracyclines</b>	Chlortétracycline	Inhibiteur de la biosynthèse des protéines bactériennes	680 601
	Déméclocycline		
	Doxycycline		
	Oxytétracycline		
	Tétracycline		
<b>Sulfamides</b>	Sulfachlorpyridazine	Inhibiteur de la métabolisation de l'acide folique	59 165*
	Sulfadiazine		
	Sulfadiméthoxine		
	Sulfadoxine		
	Sulfaéthoxyypyridazine		
	Sulfaguanidine		
	Sulfamérazine		
	Sulfaméthazine		
	Sulfanilamide		
	Sulfapyridine		
	Sulfathiazole		
<b>Macrolides</b>	Bacitracine A	Inhibiteur de la biosynthèse des protéines bactériennes	210 868 <sup>†</sup>
	Érythromycine		
	Tiamuline		
	Tilmicosine		
	Tulathromycine		
	Tylosine A		
<b>Quinolones</b>	Enrofloxine	Agis sur la duplication de l'ADN bactérien	411
<b>Lincosamides</b>	Lincomycine	Inhibiteur de la biosynthèse des protéines bactériennes	41 222
<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthoprime	Inhibition de la biosynthèse du cycle folique	59 165*

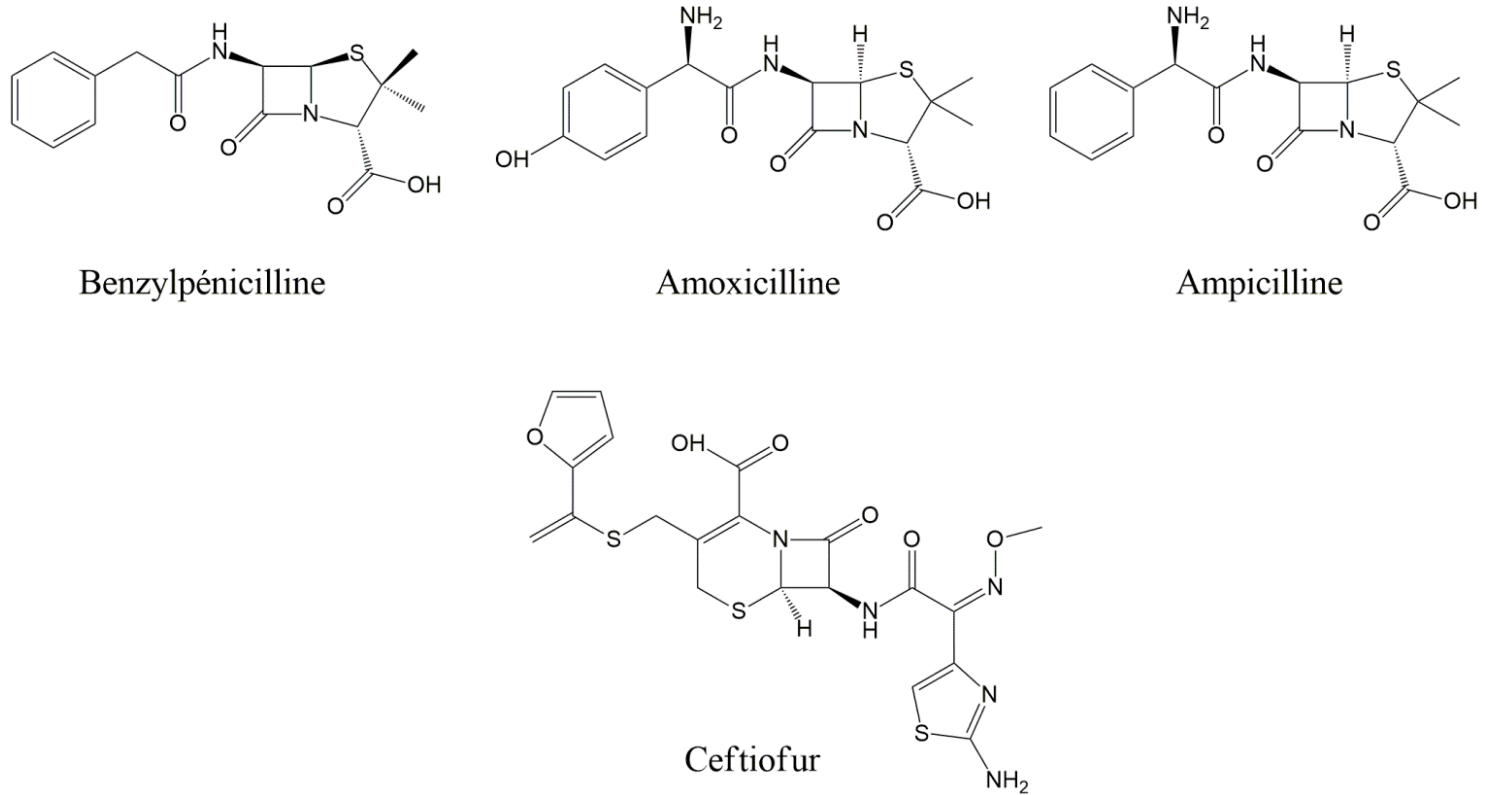
\*Triméthoprime et sulfamides, <sup>†</sup>Incluant pleuromutilines et bacitracines



## 1.4.1 Les $\beta$ -lactamines

### 1.4.1.1 Généralités

Les  $\beta$ -lactamines constituent un groupe très large et comprend certains antibiotiques parmi les plus connus. Ce groupe est divisé en plusieurs sous-parties telles que les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames et les inhibiteurs de la  $\beta$ -lactamase. Cependant, seules les pénicillines et les céphalosporines sont utilisées dans la médecine vétérinaire au Canada, ainsi, les autres sous-parties ne seront pas présentées [26]. Les structures des  $\beta$ -lactamines présentées à la **Figure 1-1** sont caractérisées par la présence d'un cycle à 4 atomes  $\beta$ -lactame qui est la partie active dans la molécule. Les pénicillines présentent en plus de ce cycle, un cycle à 5 atomes (thiazolidine) greffé sur le noyau  $\beta$ -lactame. Les céphalosporines, elles ont un cycle à 6 atomes (thiazine) [1].



**Figure 1-1.** Structures de quelques  $\beta$ -lactamines utilisés couramment dans l'élevage porcin au Canada [42].

#### 1.4.1.2 Les pénicillines

Les pénicillines sont synthétisées à partir d'une espèce de moisissure du genre *Penicillium* et sont utilisées dans le traitement d'infections bactériennes du genre Gram positif. Ces molécules dérivent de l'acide 6-aminopénicillanique [43]. La pénicilline est utilisée en médecine vétérinaire pour traiter les *Streptococcus pneumoniae*, bactérie responsable de provoquer des pneumonies [44, 45]. On distingue plusieurs pénicillines utilisées en médecine vétérinaire, néanmoins, la benzylpénicilline ou pénicilline G et l'amoxicilline sont les plus utilisées [13].

#### 1.4.1.3 Les céphalosporines

Les céphalosporines ont été isolées pour la première fois de cultures de *Cephalosporium acrenonium* en 1948 [46]. Il existe plusieurs générations de céphalosporines, mais la plus utilisée pour soigner les porcs est le ceftiofur qui fait partie de la 3<sup>ème</sup> génération des céphalosporines et est commercialisée par Pfizer.

#### 1.4.1.4 Mode d'action

Ces antibiotiques sont capables d'agir directement sur la biosynthèse de la paroi cellulaire des bactéries. Ainsi, ils vont inhiber les activités d'une enzyme membranaire, la transpeptidase qui est impliquée dans la fabrication de la paroi bactérienne, notamment la synthèse du peptidoglycane qui est un composant de l'exosquelette de la paroi cellulaire des bactéries [1, 36].

#### 1.4.1.5 Utilisation

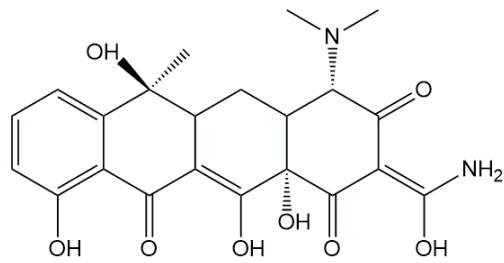
Généralement, les pénicillines sont actives sur les bactéries du groupe Gram positif et Gram négatif par exemple les *Bacillus anthracis* qui cause la maladie du charbon qui peut toucher les herbivores et certains carnivores, la *Cornybacterium diphtheriae* qui cause l'angine diphtérique ou encore la *Listeria monocytogenes* qui est responsable de la listériose

[45]. L'amoxicilline ou pénicilline A est une aminopénicilline qui a un spectre bactérien plus grand que la benzylpénicilline et est efficace contre les bactéries du genre *Staphylococcus* et certaines bactéries Gram négatif [1]. Cet antibiotique est actif sur les souches bactériennes Gram positif et Gram négatif comme *Staphylococcus epidermidis* qui cause la péritonite [1, 36, 45].

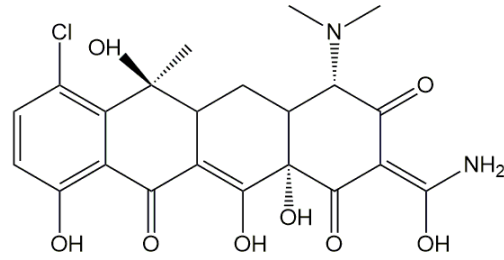
## 1.4.2 Les tétracyclines

### 1.4.2.1 Généralités

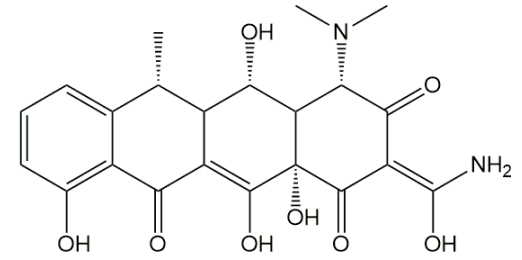
Les tétracyclines sont connues depuis 1948 avec la découverte de la chlortétracycline issue d'une culture de *Streptomyces aureofaciens* et ensuite de l'oxytétracycline provenant de *Streptomyces rimosus* [37]. Plus récemment, les tigécyclines ont été développées dans le but de pallier au déclin de l'efficacité des tétracyclines face à certaines bactéries. Ces dernières sont cependant encore très peu utilisées dans la médecine vétérinaire. Le terme *tetra* fait référence au système à 4 cycles caractéristique des tétracyclines. Ce squelette à 4 cycles est dérivé de 8 molécules de malonyl coenzyme A dérivé de l'acide malonique [38]. Une des particularités de la structure des tétracyclines présentées à la **Figure 1-2** est qu'elles possèdent un site permettant de chélater les ions divalents.



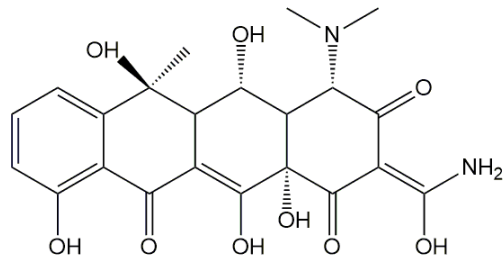
Tétracycline



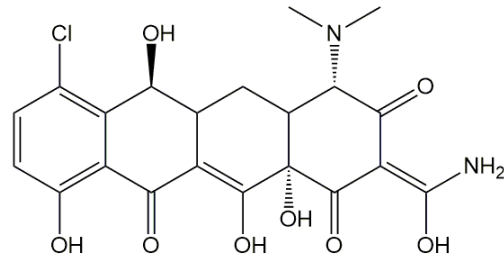
Chlortétracycline



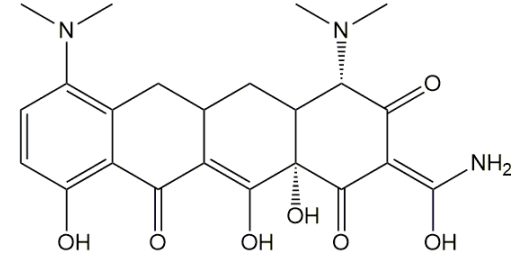
Doxycycline



Oxytétracycline



Déméclocycline



Minocycline

**Figure 1-2.** Structures de quelques tétracyclines utilisées couramment dans l'élevage porcin au Canada [42].

### 1.4.2.2 Mode d'action

Les tétracyclines sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines en bloquant l'attachement de l'acide ribonucléique (ARN) de transfert avec le site A du ribosome, elles sont principalement bactériostatiques. Une fois les tétracyclines attachées aux ribosomes, celles-ci empêchent les acides aminés de s'assembler pour former des protéines [1].

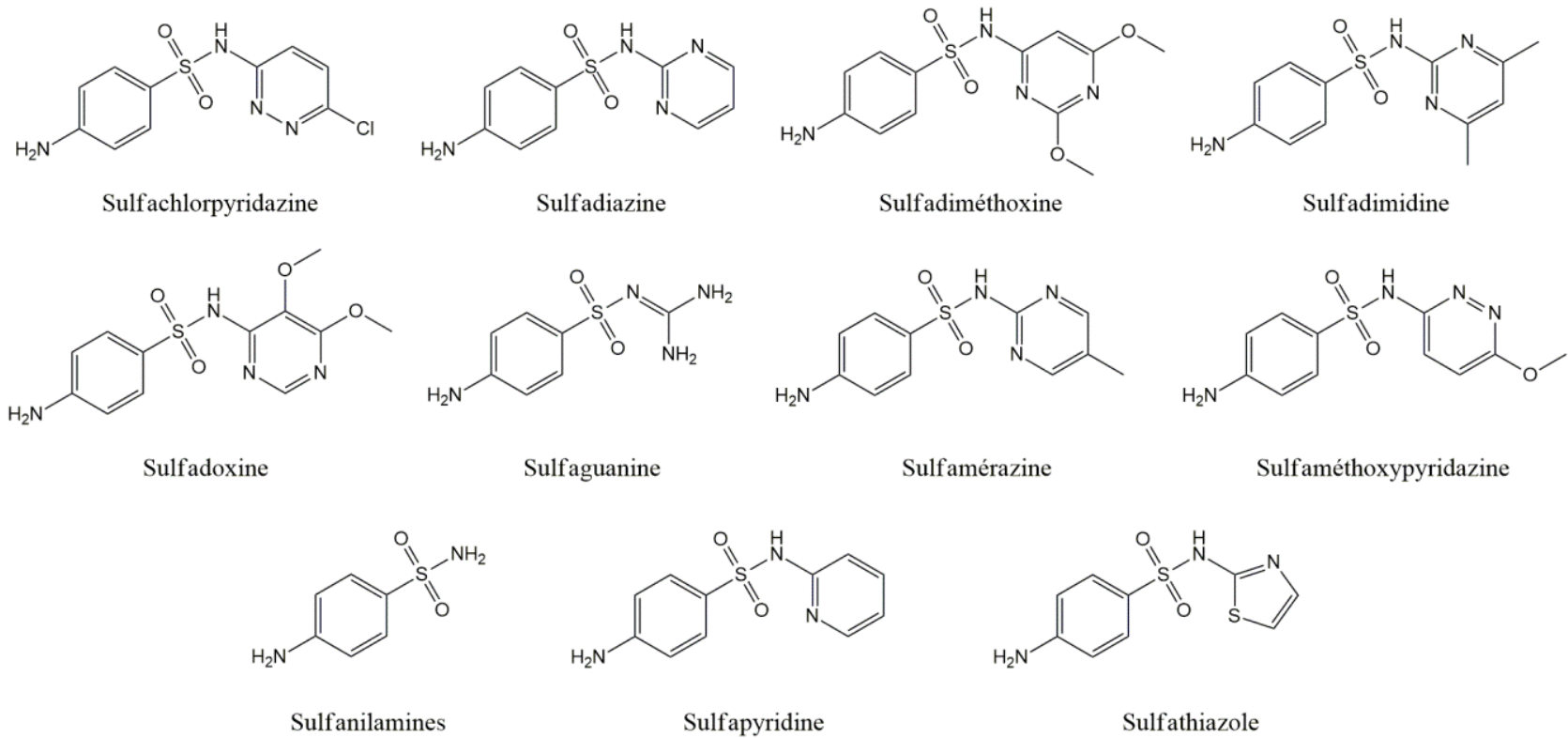
### 1.4.2.3 Utilisation

La tétracycline, la chlortétracycline et l'oxytétracycline sont les antibiotiques les plus utilisées en médecine vétérinaire et souvent ajoutées à la nourriture du bétail pour les maintenir en bonne santé et pour améliorer l'efficacité alimentaire. Elles sont particulièrement utiles dans le traitement des infections par certaines bactéries pathogènes intracellulaires telles que la *Chlamydia* et la *Mycoplasma pneumoniae* [45]. Elles sont aussi actives sur plusieurs infections comme la *Syphilis*, la *Leptospirose* et la maladie de *Lyme* ainsi qu'un grand nombre de bactéries Gram positif et Gram négatif comme *Escherichia coli* [37, 45].

## 1.4.3 Les sulfamides

### 1.4.3.1 Généralités

Les sulfamides sont les premiers antibiotiques de synthèse et le premier antibiotique sulfamidé synthétisé fut appelé Prontosil et créé en 1932. Ces antibiotiques sont formés d'un cycle benzénique, une amine et d'un groupement sulfamide ( $-\text{SO}_2\text{-NH}_2$ ) en conformation *para* [1]. Plusieurs sulfamides sont utilisés dans le domaine vétérinaire comme la sulfadoxine ou encore le sulfaméthoxazole (**Figure 1-3**). Cependant du fait de leur utilisation systématique depuis les années 1940, des souches bactériennes résistantes ont fait leur apparition, c'est pourquoi ces composés sont le plus souvent administrés en combinaison avec la triméthoprime [41].



**Figure 1-3.** Structures de quelques sulfamides utilisés couramment dans l'élevage porcin au Canada [42].

### 1.4.3.2 Mode d'action

Les sulfamides interfèrent avec la biosynthèse de l'acide tétrahydrofolique, une coenzyme dérivée de l'acide folique. Ils inhibent la synthèse de la dihydroperoate qui est un précurseur de cette coenzyme et agissent comme des compétiteurs à l'acide *para*-amino-benzoïque dans le cycle métabolique de l'acide folique qui est impliqué dans la synthèse des bases nucléiques constituant l'ARN [41].

### 1.4.3.3 Utilisation

Ces composés sulfamidés ont des propriétés bactériostatiques et vont donc limiter la prolifération bactérienne sans néanmoins tuer les bactéries visées. Par ailleurs, ils couvrent un large spectre de bactérie Gram positif comme *Staphylococcus aureus* responsable de diverses infections, ou encore de *Streptococcus pneumoniae* responsable de la pneumonie bactérienne et souvent rencontrée chez les porcs. Les sulfamides sont aussi actifs sur quelques bactéries du genre Gram négatif comme *Escherichia coli* qui est responsable d'infection urinaire [47].

## 1.4.4 Les macrolides

### 1.4.4.1 Généralités

Les macrolides représentent une classe d'antibiotiques apparus dans les années 1950. Macrolides est une abréviation de "antibiotique à macrolactone hétéroside" et sont formés d'un macrocycle oxygéné lié à un ou plusieurs résidus de désoxyoses. Par exemple, la tylosine est composée de 16 noyaux de lactone et 2 sucres neutres et est produite par des souches de *Streptomyces* [47]. Plusieurs structures de macrolides sont présentées à la **Figure 1-4**.





#### 1.4.4.2 Mode d'action

Les macrolides sont des inhibiteurs de la synthèse des protéines bactériennes. Ces molécules actives ont un mode d'action similaire aux tétracyclines. Elles bloquent la synthèse par encombrement stérique en se fixant sur le site P de la sous-unité 30S du ribosome. Cela a comme conséquence d'empêcher l'élongation de la chaîne peptidique et ainsi d'empêcher la synthèse des protéines [1].

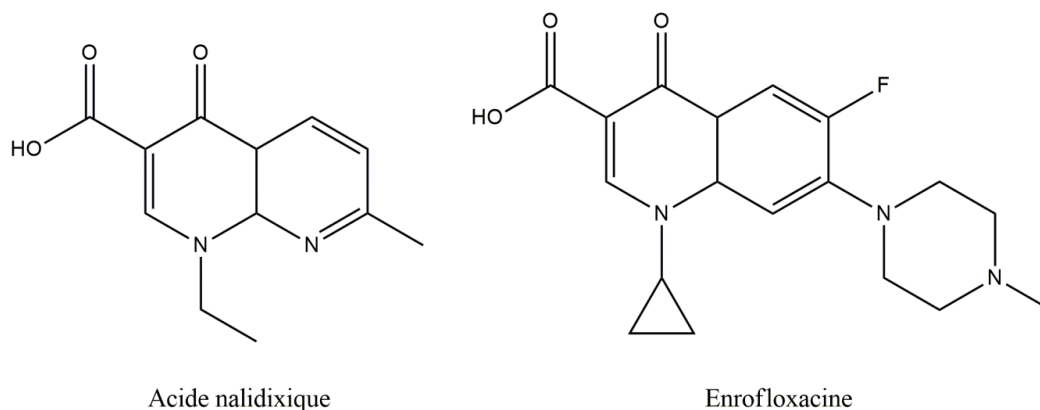
#### 1.4.4.3 Utilisation

Le macrolide le plus utilisé dans le domaine agricole est la tylosine. Ces antibiotiques sont utilisés pour prévenir et soigner les infections microbiennes, mais surtout comme facteur de croissance [19]. Les macrolides sont des antibiotiques à large spectre avec une activité antimicrobienne principalement contre les bactéries Gram positif notamment *Streptococcus pneumoniae* responsable d'infections pulmonaires [1]. Ces molécules sont aussi actives sur un nombre restreint de bactérie Gram négatif et sur certaines bactéries anaérobies [1, 47].

### 1.4.5 Les quinolones

#### 1.4.5.1 Généralité

Les quinolones forment ainsi une classe d'antibiotiques de synthèse dérivés de l'acide nalidixique dont la structure est présentée à la **Figure 1-5**. L'acide nalidixique a été isolé pour la première fois en 1960 par George Leshner [40]. Les fluoroquinolones forment un sous-groupe des quinolones et ont été introduites dans les années 1970 avec l'ajout de l'atome de fluor et du groupement pipérazine. Ces molécules sont capables de pénétrer plus facilement dans les cellules ce qui augmente considérablement leur pouvoir antibactérien [40].



**Figure 1-5.** Structures de l'acide nalidixique et d'une fluoroquinolone utilisée dans l'élevage porcin au Canada [42].

#### 1.4.5.2 Mode d'action

Leur capacité à traverser la membrane cellulaire leur permet d'agir directement sur la duplication de l'ADN bactérien. L'antibiotique va se fixer sur la chaîne d'ADN lors de la phase de duplication et inhibe ainsi la synthèse de l'ADN ce qui résulte en la mort de la cellule bactérienne (apoptose) [1].

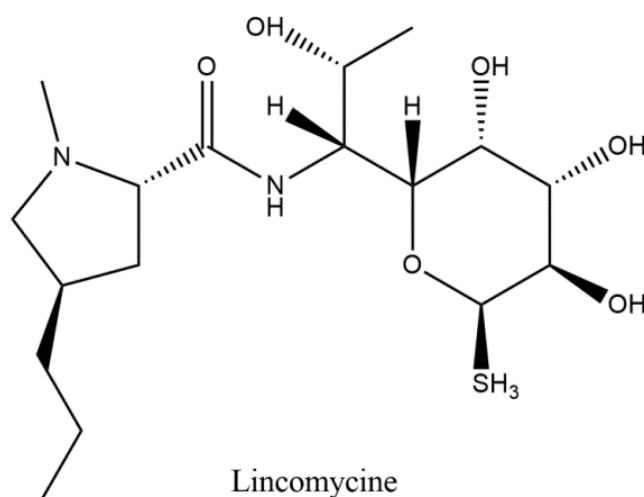
#### 1.4.5.3 Utilisation

Les quinolones sont très utilisées dans le domaine vétérinaire, en revanche l'utilisation massive des fluoroquinolones dans ce domaine a favorisé la sélection de souches bactériennes résistantes et a obligé plusieurs pays à bannir l'utilisation de ces antibiotiques [19]. Les quinolones sont actives sur des souches bactériennes Gram positif et Gram négatif comme *Corynebacterium diphtheriae* qui cause la diphtérie ou comme l'entérobactérie *Escherichia Coli*. Par ailleurs, les fluoroquinolones sont plus utilisées pour traiter les bactéries pathogènes à l'intérieur des cellules comme *Legionella pneumophila* et *Mycoplasma pneumonia* [40]. La fluoroquinolone la plus utilisée dans le domaine vétérinaire au Canada est l'enrofloxacin vendu sous le nom de Baytril® par Bayer AG (Leverkusen, Allemagne).

## 1.4.6 Les lincosamides

### 1.4.6.1 Généralité

Les lincosamides forment une classe d'antibiotiques dont la lincomycine présentée à la **Figure 1-6** est un antibiotique très utilisé dans le domaine vétérinaire et le seul lincosamide utilisé pour traiter les porcs [26, 39, 42]. Ce composé est issu d'une culture de *Streptomyces lincolnensi*, un type de bactérie appelé actinobacteria. Ce composé semi-synthétique a été peu utilisé pour soigner les infections humaines. Cependant il est encore très utilisé dans le domaine vétérinaire [39].



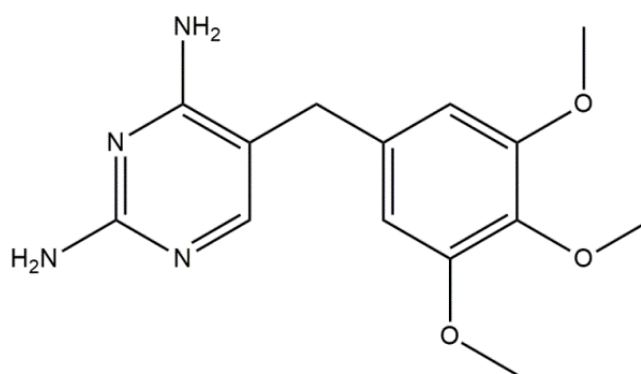
**Figure 1-6.** Lincomycine, seul lincosamide utilisé dans l'élevage porcin au Canada [42].

### 1.4.6.2 Mode d'action et utilisation

Les lincosamides ont le même mode d'action que les macrolides en inhibant la synthèse des protéines bactériennes. Ces molécules sont actives contre les mycoplasmes, le *Plasmodium* et les organismes protozoaires [35].

### 1.4.7 Les diaminopyrimidines

Les diaminopyrimidines constituent une classe d'antibiotiques formée de 2 groupes amines sur un cycle pyrimidique (**Figure 1-7**). Le triméthoprime est le seul antibiotique de cette classe utilisé pour la thérapie animale. Ce composé a des propriétés bactériostatiques grâce à sa capacité d'empêcher la biosynthèse du cycle folique en bloquant la transformation enzymatique de la coenzyme de folate, dihydrofolate en sa forme oxydée, le tétrahydrofolate [1]. Dans le domaine vétérinaire, le triméthoprime est tout le temps utilisé en combinaison avec les sulfamides pour former un mélange bactériostatique. Cette combinaison permet de bloquer 2 étapes nécessaires dans la biosynthèse de l'ADN et rend l'inhibition de la croissance bactérienne plus efficace [19].



Triméthoprime

**Figure 1-7.** Triméthoprime, le seul diaminopyrimidine utilisé dans l'élevage porcin au Canada [42].

## **1.5 Les antibiotiques vétérinaires comme contaminants émergents**

La surveillance et l'intérêt porté aux antibiotiques dans l'environnement sont relativement récents. La présence d'antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire a été rapportées par plusieurs études dans plusieurs compartiments : les sols ( $< \mu\text{g kg}^{-1}$ ), les eaux de surfaces ( $< \mu\text{g L}^{-1}$ ) ainsi que dans les eaux souterraines ( $< \mu\text{g L}^{-1}$ ) [19, 48, 49]. Ces molécules actives peuvent avoir un impact sur la faune et la flore des milieux proche des sources de contamination. Par ailleurs, l'exposition à long terme de ces molécules sur certains organismes même à de faibles quantités peut mener au développement d'une résistance par les micro-organismes. Suivant leurs structures, le devenir de ces contaminants peut varier et parfois former des sous-produits de dégradation qui peuvent avoir un potentiel toxique plus important que leurs molécules mères.

### **1.5.1 Les contaminants émergents**

Le développement de nouvelles techniques analytiques toujours plus performantes a permis de révéler la présence dans l'environnement de divers composés issus de l'activité humaine à des concentrations auparavant non détectables. De faibles concentrations de différentes hormones reproductives, stéroïdes, antibiotiques et autres produits pharmaceutiques ont pu être détectées dans les eaux de surfaces, les eaux souterraines ou encore dans les sols. Une grande partie de ces composés proviennent de produits consommés par l'homme ou sont liés à l'activité anthropique. Ces molécules forment un ensemble de composés organiques présents dans l'environnement qui n'avait pas été décelé ni étudié auparavant et qui fait face à un intérêt grandissant [50]. On désigne cet ensemble de contaminants comme émergent, car la consommation de certains composés est plus récente comme les drogues d'abus qui sont relativement nouvelles et se retrouvent maintenant dans l'environnement ou d'intérêt émergent, car plusieurs contaminants étaient présents dans l'environnement depuis longtemps, mais n'avait pas été détecté jusqu'à présent. Les progrès et

l'application de méthodes analytiques performantes comme la spectrométrie de masse dans le domaine environnemental ont permis de détecter ces contaminants à des niveaux ( $\text{ng L}^{-1}$ ) auparavant inatteignables.

L'utilisation des antibiotiques dans le domaine vétérinaire remonte aux années 1950, mais leur utilisation en plus grande quantité est plus récente et remonte aux années 1990 [19]. Cette utilisation grandissante a mené à un certain intérêt de la part des laboratoires d'analyse et de contrôle pour identifier ces antibiotiques vétérinaires dans l'environnement. Plusieurs études se sont alors concentrées sur la distribution et la présence de ces antibiotiques utilisés par les humains et administrés aux animaux dans l'environnement [27, 51, 52]. Ces composés qui font l'objet de plus d'attention ces dernières années ne sont donc pas émergents puisqu'ils sont utilisés depuis près de 60 ans maintenant, mais plutôt d'intérêt émergent du fait de l'évolution des techniques analytiques et l'intérêt porté sur le devenir de ces substances ces dernières années. Ainsi, ce que l'on trouve dans l'environnement dépend surtout de ce que l'on cherche [50].

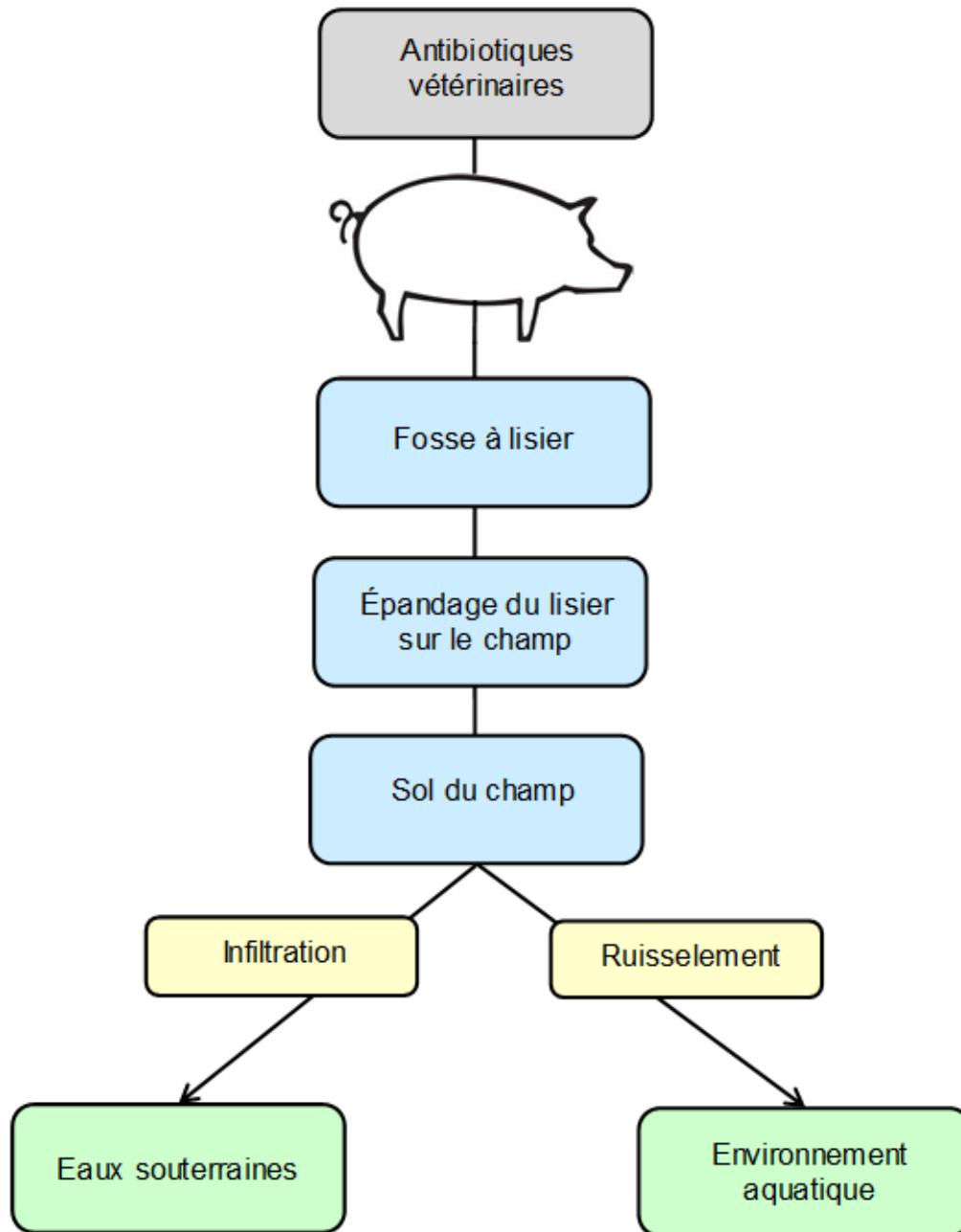
La toxicité de ces composés dans l'environnement est parfois mal connue, toutefois, il a été rapporté que plusieurs molécules actives comme les hormones, les stéroïdes et les antibiotiques peuvent avoir un impact important sur l'environnement ainsi que sur des organismes non visés [53]. Par exemple, les algues bleu-vert ou cyanobactéries semblent être sensibles à plusieurs antibiotiques utilisés dans la médecine vétérinaire comme l'amoxicilline, la spiramycine, les pénicillines ou encore les tétracyclines ( $\text{mg L}^{-1}$ ) [54]. Les antibiotiques auraient aussi un effet sur la faune vivant dans le sol comme les vers de terre ainsi que sur les plantes ( $\text{g kg}^{-1}$ ) [55]. Les tetracyclines ainsi que certain de leurs produits de dégradation peuvent affecter les bactéries présentent dans les sols et les boues ( $\text{mg L}^{-1}$ ) [56]. La toxicité des antibiotiques vétérinaires est expliquée plus en détail à la **section 1.5.4.2**.

## 1.5.2 Les antibiotiques vétérinaires dans l'environnement

### 1.5.2.1 Sources de contamination

Comme expliqué précédemment, les antibiotiques vétérinaires peuvent être utilisés pour plusieurs raisons par les éleveurs, pour soigner et protéger les animaux contre certaines maladies et comme additif alimentaire et promoteur de croissance permettant ainsi d'amener l'animal sur le marché plus rapidement [12, 13]. L'éleveur va alors ajouter à la nourriture de l'animal un large éventail de composés dont certains sont aussi utilisés dans la médecine humaine, provenant de diverses classes thérapeutiques, incluant les antibiotiques. L'Agence de santé publique du Québec rapporte que 1,76 million de kg d'ingrédients actifs ont été utilisés en 2009 au Canada pour traiter les animaux de la ferme et ceux de compagnie [57]. En revanche, on ne connaît en revanche pas la répartition consommée pour chaque espèce animale, mais certaines études affirment que l'élevage porcin, l'élevage de volailles et l'aquaculture représentent le plus grand consommateur d'antibiotiques en règle générale [57]. Nous nous limiterons aux données qui font référence à l'élevage porcin. La **Figure 1-8** récapitule la voie d'entrée principale des antibiotiques dans l'environnement.





**Figure 1-8.** Explication de la voie d'entrée principale des antibiotiques dans l'environnement.

Les antibiotiques vétérinaires utilisés pour l'élevage porcin peuvent rentrer dans l'environnement par plusieurs voies. Cependant, la manière la plus directe est l'épandage de lisier sur les champs destinés aux cultures à des fins de fertilisations. Lorsque l'animal reçoit

une dose d'antibiotiques par la nourriture, l'eau ou par injection, seulement une partie de la dose d'antibiotique va être absorbée par l'intestin de l'animal. Plusieurs études estiment que 30 à 90% du composé administré est rejeté par l'animal dans ses urines et excréments qui forment le lisier [19]. Toutes ces substances vont alors se retrouver sur le champ lors de l'épandage du lisier qui peut contenir jusqu'à  $0,35 \text{ mg kg}^{-1}$  de tétracycline d'après une étude [48]. Une autre étude rapporte des concentrations en tétracycline extrêmement élevées et avoisinant les  $14 \text{ mg kg}^{-1}$  dans le lisier sec [58]. Ces composés peuvent donc aussi bien être retrouvés à l'état de trace qu'à des concentrations élevées dans le lisier. A titre d'exemple le **Tableau 1-2** présente plusieurs concentrations de différentes classes d'antibiotiques retrouvés dans le lisier de porc et relevées par plusieurs études. Les eaux de lavage et les effluents des porcheries contiennent une quantité non négligeable de résidus de lisier et constituent aussi une voie importante d'entrée des antibiotiques dans l'environnement. Enfin, le stockage ou la mauvaise gestion des antibiotiques non utilisés ainsi que leur emballage serait aussi une source potentielle de pollution. Par ailleurs, une étude récente suggère que les antibiotiques vétérinaires pourraient atteindre l'environnement via les poussières présentes dans les bâtiments abritant les porcs. Ces poussières où seraient accrochés des antibiotiques et qui proviendraient de la nourriture et des excréments pourraient contenir plusieurs classes d'antibiotiques pour une concentration totale de  $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$  [59, 60].

**Tableau 1-2.** Concentrations d'antibiotiques vétérinaires rapportées dans les lisiers et autres rejets agricoles.

Classes	Composés	Concentrations	Références
<b>β-lactamines</b>	Benzylpénicilline	2,1-3,5 µg L <sup>-1</sup>	[61]
<b>Tétracyclines</b>	Chlortétracycline	68-1000 µg L <sup>-1</sup>	[61]
		0,9-1,0 mg kg <sup>-1</sup>	[58]
		1,4 mg kg <sup>-1</sup>	[48]
	Tétracycline/Oxytétracycline	25-410 µg L <sup>-1</sup>	[61]
	Tétracycline	14-41 mg kg <sup>-1</sup>	[58]
		0,35 mg kg <sup>-1</sup>	[48]
<b>Macrolides</b>	Érythromycine	2,5 µg L <sup>-1</sup>	[61]
<b>Sulfamides</b>	Sulfaméthazine	2,5-380 µg L <sup>-1</sup>	[61]
		0,1-8,7 mg kg <sup>-1</sup>	[62]
		0,2-7,2 mg kg <sup>-1</sup>	[48]
	Sulfadiméthoxine	2,5 µg L <sup>-1</sup>	[61]
<b>Lincosamides</b>	Lincomycine	2,5-240 µg L <sup>-1</sup>	[61]
		46-231 µg L <sup>-1</sup>	[63]

### 1.5.2.2 Mobilité des antibiotiques vétérinaires dans l'environnement

Une fois relâchés dans l'environnement, ces composés vont être transportés et distribués entre l'air, l'eau, les sols ou les sédiments suivant un nombre varié de mécanismes de transport. La sorption, le lessivage des sols et la dégradation sont les processus importants qui vont grandement influencer le déplacement de ces antibiotiques dans l'environnement proche de la source de contamination. Ces processus sont régis par les propriétés physicochimiques des molécules comme leurs structures, leurs tailles, leurs formes, leurs solubilités, leurs spéciations et leurs hydrophobicités [59, 64, 65]. Plusieurs paramètres physicochimiques des composés étudiés sont résumés dans le **Tableau 1-3** pour permettre de mieux comprendre leur mobilité dans l'environnement.

**Tableau 1-3.** Propriétés physicochimiques de plusieurs classes d'antibiotiques vétérinaires [66].

Classes	Antibiotiques	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Log <i>P</i> <sup>a</sup>	Log <i>D</i> (pH 5) <sup>a</sup>	p <i>K</i> <sub>a</sub>	Solubilité (g L <sup>-1</sup> ) pH 7 <sup>a</sup>	Références
<b>β-lactamines</b>	Benzylpéniciline	334,39	1,92±0,20	-0,61	2,45 <sup>a</sup>	1000	[67]
	Ceftiofur	523,56	1,66±0,85	-0,74	2,62 <sup>a</sup>	8,4	[67]
<b>Tétracyclines</b>	Tétracyclines	444,43	0,62±0,76	-1,94	3,3/7,8/9,6	0,19	[67-70]
	Chlortétracycline	478,87	1,32±0,78	-1,23	3,3/7,6/9,3	0,09	[67, 68]
	Oxytétracycline	460,43	0,48±0,78	-2,07	3,2/7,5/9,0	0,29	[67, 68]
	Déméclocycline	464,85	0,94±0,76	-1,61	3,4/7,4/9,4	0,15	[67, 68]
	Doxycycline	444,43	1,77±0,76	-0,78	3,0/8,0/9,2	0,04	[67, 68]
<b>Macrolides</b>	Érythromycine	733,89	1,91±0,84	-0,87	8,9	420	[67, 68]
	Tylosine	916,10	0,63±0,89	-1,61	3,3/7,5	260	[67, 68]
<b>Lincosamides</b>	Lincomycine	406,54	0,72±0,84	-2,22	7,8	1000	[67, 68]

<sup>a</sup>Valeurs estimées par le logiciel ACD/lab d'après SciFinder® [67, 71].

**Tableau 1-3.** Propriétés physicochimiques de plusieurs classes d'antibiotiques vétérinaires [66] (suite).

Classes	Antibiotiques	MM (g mol <sup>-1</sup> )	Log <i>P</i> <sup>a</sup>	Log <i>D</i> (pH 5) <sup>a</sup>	p <i>K</i> <sub>a</sub>	Solubilité (g L <sup>-1</sup> ) pH 7 <sup>a</sup>	Références
<b>Sulfamides</b>	Sulfanilamide	172,20	-0,67±0,22	-0,67	1,85/10,1 <sup>a</sup>	11	[67]
	Sulfadiazine	250,28	-0,07±0,25	-0,09	1,64/6,81 <sup>a</sup>	0,83	[67]
	Sulfadoxine	310,33	0,46±0,42	0,19	2,18/6,16 <sup>a</sup>	18	[67]
	Sulfadimidine	278,33	0,30±0,28	0,29	2,1/6,1	0,42	[67, 68]
	Sulfadiméthoxine	310,33	0,73±0,39	-0,69	3,0/6,21 <sup>a</sup>	7,4	[67]
	Sulfapyridine	249,29	0,47±0,32	0,43	1,9/5,6	0,85	[67, 68]
	Sulfaméthoxazole	253,28	0,66±0,41	0,63	1,39/5,81 <sup>a</sup>	2,8	[67]
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacin	331,34	1,63±0,83	-1,28	3,0/6,1/8,7/10	0,04	[67, 68]
	Enrofloxacin	359,39	2,31±0,82	0,03	3,9/6,2/7,6/9,9	2,1	[67, 68]
<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthoprim	290,32	0,59±0,39	-1,33	3,2	1,0	[67, 68]

<sup>a</sup>Valeurs estimées par le logiciel ACD/lab d'après SciFinder® [67, 71].

Le coefficient de sorption ( $K_d$ ) mesure le fractionnement solide-liquide lié à la sorption d'un contaminant à un solide et peut varier considérablement suivant la composition du sol ce qui va influencer la mobilité de l'antibiotique dans l'environnement. Le  $K_d$  représente le ratio entre de la concentration d'un composé adsorbé à un solide sur sa concentration dans la phase dissoute à l'équilibre. Le  $K_d$  des antibiotiques mesurés sur les sols et les sédiments peut varier de  $0,2 \text{ L kg}^{-1}$  pour le chloramphénicol sur des sédiments marins, à  $5610 \text{ L kg}^{-1}$  pour l'enrofloxacin sur des sols, ce qui indique que le chloramphénicol va donc être beaucoup plus mobile que l'enrofloxacin. Certains antibiotiques vont donc être adsorbés plus fortement sur certains solides que d'autres ce qui va influencer leur mobilité. Un autre paramètre à considérer est le coefficient de distribution carbone organique-eau ( $K_{oc}$ ) qui donne une indication sur l'affinité de la molécule à être adsorbée sur la matière organique. Le  $K_{oc}$  représente le rapport entre la quantité de composé adsorbée par unité de masse de carbone organique du sol sur sa concentration dans l'eau à l'équilibre. La matière organique étant omniprésente dans l'environnement, ce facteur peut avoir un impact significatif sur le déplacement et la répartition des antibiotiques entre la phase aqueuse et le solide. Enfin, la solubilité des antibiotiques est mesurée par le coefficient de distribution octanol-eau  $K_{ow}$  qui donne une indication sur la solubilité des composés dans l'eau. Le  $K_{ow}$  est défini par le rapport entre la concentration d'un composé dans l'octanol et sa concentration dans l'eau à l'équilibre. Par ailleurs, ce coefficient peut aussi être utilisé pour estimer, de façon indirecte, la sorption de substance organique dans un sol. Le  $K_{ow}$  est souvent exprimé sous sa forme logarithmique  $\log K_{ow}$  ou  $\log P$ . Le  $\log D$  sera préféré dans cette étude car il donne une mesure plus appropriée que le  $\log P$ . En effet, le  $\log D$  représente une mesure du  $\log P$  à un pH donné de la phase aqueuse en prenant en compte le  $pK_a$  du composé étudié. D'autres mécanismes, autres que l'hydrophobicité des composés étudiés peuvent aussi intervenir dans la mobilité des antibiotiques. La capacité à former des liaisons ioniques ou des liaisons hydrogène avec la surface des solides va aussi influencer leur mobilité [72]. L'eau étant le principal moyen de transport de ces composés, plus l'antibiotique est soluble dans l'eau, plus il aura de facilité à se déplacer. Tous ces coefficients sont dépendants du pH du milieu qui va influencer la sorption et la solubilité des composés. Le **Tableau 1-4** présente les  $K_d$  et les  $K_{oc}$  de plusieurs classes d'antibiotiques vétérinaires relatifs à différents types de matrices solides.

**Tableau 1-4.**  $K_d$  et  $K_{oc}$  de plusieurs classes d'antibiotiques vétérinaires.

Classes	Composés	Matrices	pH	$K_d$ (L kg <sup>-1</sup> )	$K_{oc}$ (L kg <sup>-1</sup> )	Références
<b>Tétracyclines</b>	Tétracyclines	Sol argileux/sablonneux	-	1 147 – 2 370	-	[19]
		Sol argileux	-	>400	4 000	[72]
	Chlortétracyclines	Sol argileux/sablonneux	-	1 280 - 2 386	-	[19]
	Oxytétracyclines	Sable	5,6-6,3	417 - 1 026	42 506 - 93 317	[73]
		Sol argileux/sablonneux	-	420 - 1 030	27 800 - 93 300	[73]
		Lisier de porc	9,0	83 - 77	195	[74]
			-	63 - 96	195	[74]
<b>Macrolides</b>	Tylosine	Lisier de porc	9,0	39 - 108	241 - 831	[75]
			-	26 - 295	110	[74]
		Sol argileux/sablonneux	-	66 - 92	-	[19]
			-	8 - 128	550 – 7 990	[73]
<b>Sulfamides</b>	Sulfachloropyridazine	Sol argileux/sablonneux	6,5-6,8	0,9 - 1,8	-	[76]
	Sulfadimidine	Sable/sol argileux/sablonneux	5,2-6,9	0,9 - 3,5	80 - 170	[77]
		Sol argileux/sablonneux	6,7-7,0	2,4 - 2,7	61 - 150	[78]
	Sulfamethazine	Sable/sol argileux/sablonneux	5,2-6,9	0,6 - 3,2	82 - 208	[19]
	Sulfapyridine	Sol argileux	6,9-7,0	1,6 - 7,4	101 - 308	[79]
		Sol argileux/sablonneux	6,7-7,0	3,1 - 3,5	80 - 218	[78]
	Sulfanilamide	Sol argileux/sablonneux	6,7-7,0	1,5 - 1,7	34 - 106	[78]
	Sulfadiazine	Sol argileux/sablonneux	6,7-7,0	1,4 - 2,8	37 - 125	[78]
	Sulfadiméthoxine	Sol argileux/sablonneux	6,7-7,0	2,3 - 4,6	89 - 144	[78]
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacin	Boue d'épuration	6,5	417	1 127	[80]
	Enrofloxacin	Sol argileux/sablonneux	4,9-7,5	260 - 5 612	16 510 - 99 980	[81]

L'ensemble de ces facteurs va influencer la mobilité des antibiotiques. Il est donc difficile de prévoir la mobilité des différentes classes d'antibiotiques dans l'environnement tant la structure des molécules et la composition du milieu sont différentes et aléatoires. Toutefois, certaines études commencent à établir des modèles mathématiques pour prédire la mobilité de certains composés dans l'environnement. Ces modèles se basent sur l'adsorption linéaire décrit par les différents coefficients de sorption  $K_d$  et de distribution  $K_{oc}$  et  $K_{ow}$ , ainsi que sur le potentiel de dégradation de 1<sup>er</sup> ordre des composés étudiés [82, 83]. Cependant ces modèles mathématiques ont peu été appliqués aux antibiotiques vétérinaires à ce jour. On peut toutefois citer plusieurs exemples qui ont été étudiés. Les tétracyclines ont une affinité avec les sols argileux riches en calcium, elles ont aussi tendance à se complexer avec les acides humiques accrochés à des particules [84-86]. De ce fait, une certaine quantité de tétracyclines va se retrouver dans les boues ou les sédiments et sera moins biodisponible [84]. Toutefois, le transport des tétracyclines peut être facilité par la sorption à de la matière organique dissoute mobile comme les colloïdes ou encore en se complexant avec  $Mg^{2+}$  ce qui rend l'oxytétracycline plus soluble et donc plus mobile [87]. L'adsorption de ces antibiotiques à un solide diminuerait fortement leur activité antimicrobienne, mais cela ne signifie pas qu'ils ont perdu tout leur potentiel d'activité [66, 88]. La mobilité des antibiotiques va donc aussi beaucoup dépendre du milieu dans lequel ils se retrouvent.

Plus généralement, les antibiotiques qui présentent une faible sorption avec les particules comme les sulfamides vont voyager plus facilement et plus rapidement et vont se retrouver rapidement dans les eaux de surface [64]. Au contraire, les composés ayant une forte sorption avec les particules du sol vont avoir plus de difficultés à être mobiles et seront encore présents dans les eaux de drainage issu du lessivage des sols, même plusieurs mois après l'application du lisier sur le champ [54].

Le transport des antibiotiques entre les différents compartiments de l'environnement a été démontré à plusieurs reprises. Kuchta *et al.* ont étudié le transport de la lincomycine dans une zone agricole après l'épandage de 60 000 à 95 000 L ha<sup>-1</sup> de lisier sur un champ expérimental. Des concentrations importantes (46 à 117 µg kg<sup>-1</sup>) en lincomycine ont été trouvées dans les sols du champ quelques jours après l'épandage. Par la suite, des traces de cet antibiotique ont été découvertes dans les eaux de surface (0,07 à 0,7 µg L<sup>-1</sup>) et dans les eaux



souterraines ( $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) proches du champ [63]. Une autre étude a montré qu'un transfert des antibiotiques jusqu'à des légumes ayant poussé dans un champ ayant reçu du lisier de porc contenant des antibiotiques comme fertilisant était possible. Plusieurs classes d'antibiotiques ont été retrouvées dans des légumes destinés à la consommation humaine à des concentrations variables ( $0,1$  à  $532 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) [89].

### 1.5.2.3 Présence dans les sols et sédiments

Une fois que le lisier est épandu sur le champ, une grande quantité des antibiotiques présents initialement dans le lisier va se retrouver adsorbée rapidement sur les sols. La plupart des antibiotiques vont demeurer dans les premiers centimètres de surface de terre à cause de leur affinité avec la nature du sol [76, 90]. Les phénomènes météorologiques vont permettre aux antibiotiques de s'infiltrer plus en profondeur grâce à l'infiltration de l'eau de pluie dans les couches plus profondes. Une étude rapporte la présence de tétracycline et de chlortétracycline (entre  $0,3$  et  $198,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) à des profondeurs comprises entre 10 et 30 cm de la surface du champ plusieurs mois après l'épandage. Toutefois, en dessous de 30 cm, aucun antibiotique n'a été retrouvé [48]. Cela signifie que les tétracyclines sont persistantes dans les premiers centimètres de la surface malgré leurs dégradations et peuvent s'accumuler dans les sols. L'accumulation de ces composés adsorbés sur les sols représente donc un réservoir de contaminants qui peuvent potentiellement contaminer les eaux de surfaces et les eaux souterraines par lessivage des sols. Les concentrations en antibiotiques dans les sols de champs agricoles ont été déterminées par plusieurs études et peuvent parfois atteindre plusieurs centaines de  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Ces données sont résumées dans le **Tableau 1-5**.

**Tableau 1-5.** Concentrations d'antibiotiques vétérinaires retrouvées dans des sols de champs agricoles d'après plusieurs études.

<b>Classes</b>	<b>Composés</b>	<b>Concentrations (<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>Références</b>
<b>Tétracyclines</b>	Tétracyclines	200	[48]
	Oxytétracycline	305	[91]
	Chlortétracycline	39	[58]
<b>Macrolides</b>	Clarithromycine	67	[64]
<b>Sulfamides</b>	Sulfadiazine	1,0	[91]
	Sulfadimazine	11	[48]
	Sulfamethazine	2,0	[58]
<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthopriime	500	[91]
<b>Lincosamides</b>	Lincomycine	8,5	[58]
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine	6,0 - 52	[64]

#### 1.5.2.4 Présence dans les eaux de surfaces et souterraines

Les sols chargés en antibiotiques représentent une source de contamination de l'environnement aquatique. Les antibiotiques vont atteindre les eaux de surfaces proches des zones agricoles par le lessivage des sols fertilisés puis le ruissellement des eaux de pluie. Une grande majorité des antibiotiques est soluble dans l'eau, de ce fait, il est possible de les retrouver dans les milieux aquatiques. Les  $\beta$ -lactamines ne sont pas présents en grandes concentrations dans les eaux de surfaces et souterraines du fait de l'hydrolyse rapide de ces composés [64]. Cependant, les tétracyclines, les sulfamides, les macrolides et les lincosamides ont été quantifiés de plusieurs centaines à plusieurs milliers de  $\text{ng L}^{-1}$  dans les eaux de surfaces et souterraines [52, 91, 92]. Les antibiotiques vétérinaires vont atteindre les eaux souterraines en voyageant par l'intermédiaire de l'infiltration des eaux de pluie. Une étude a fait l'échantillonnage et l'analyse d'eaux souterraines peu profondes à proximité d'une zone agricole [93]. Ces eaux étaient certainement affectées par l'épandage de lisier dû à la présence de fortes concentrations de chlorure, d'ammoniac et de potassium. Peu d'échantillons contenaient des tétracyclines, cependant les produits de dégradation des tétracyclines étaient présents à des concentrations inférieures à  $500 \text{ ng L}^{-1}$  [93]. Une autre étude à long terme menée par Kuchta *et al.* ont révélé la présence de la lincomycine dans les eaux souterraines proches d'un champ agricole à une concentration maximale de  $36 \text{ ng L}^{-1}$ , six mois après l'épandage du lisier sur le champ. Un an après l'épandage de lisier, les concentrations en lincomycine se sont révélées être inférieures à  $5 \text{ ng L}^{-1}$  [63].

Une liste d'antibiotiques provenant de l'activité humaine et agricole détectés dans des échantillons d'eaux superficielles et souterraines est présentée au **Tableau 1-6**. Des concentrations relativement élevées d'antibiotiques ont été révélées dans des échantillons d'eaux souterraines et de surface. Cependant, les quantités d'antibiotiques issus de l'élevage porcin restent tout de même beaucoup moins importantes que les concentrations que l'on peut trouver dans les eaux de rejets des hôpitaux [64].

**Tableau 1-6.** Concentrations d'antibiotiques vétérinaires trouvés dans des eaux superficielles et souterraines d'après plusieurs publications.

Classes	Composés	Concentrations (ng L <sup>-1</sup> )	Sources	Échantillons	Références
<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline	40	Agricole	Eaux souterraines	[93]
	Oxytétracycline	32 000	Agricole	Eaux d'écoulement	[91]
	Chlortétracyclines	690	Humaine et agricole	Eaux de surface	[49]
<b>Macrolides</b>	Clarithromycine	260	Humaine et agricole	Eaux de surface	[52]
	Érythromycine	1 700	Humaine et agricole	Eaux de surface	[52]
	Roxithromycine	560	Humaine et agricole	Eaux de surface	[52]
	Tylosine	50	Agricole	Eaux de surface	[94]
<b>Sulfamides</b>	Sulfadiazine	4 130	Agricole	Eaux de surface	[64, 92]
	Sulfaméthazine	240	Agricole	Eaux souterraines	[58]
		160	Agricole	Eaux souterraines	[52]
	Sulfaméthoxazole	410	Agricole	Eaux souterraines	[95]
		480	Agricole	Eaux de surface	[52]
<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthoprime	20 - 200	Agricole	Eaux de surface	[52, 64]
<b>Lincosamides</b>	Lincomycine	21 100	Agricole	Eaux de surface	[64, 92]

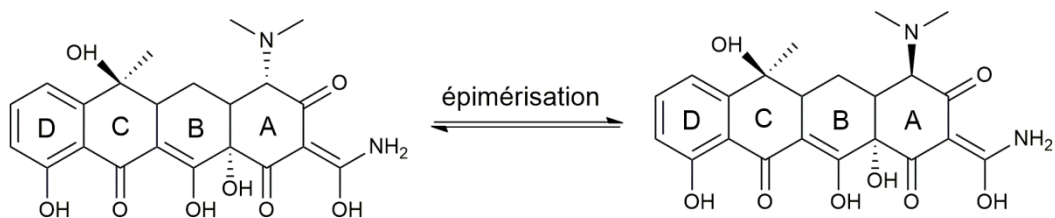
## 1.5.3 Devenir des antibiotiques dans l'environnement

### 1.5.3.1 Métabolites et produits de dégradation

Les métabolites ou produits de dégradation forment un groupe de composés issus de la dégradation de leurs molécules mères par diverses réactions. D'une manière générale, la dégradation des antibiotiques, quel que soit le milieu dans lequel ils se trouvent, va se faire de manière biotique et abiotique. Les principaux facteurs abiotiques qui vont dégrader les antibiotiques sont la photo-dégradation, l'oxydoréduction et l'hydrolyse [64, 96, 97]. Les bactéries présentes dans le milieu vont aussi participer à la biodégradation de ces composés [98, 99]. Toutes ces réactions de dégradation sont dépendantes de la température, de l'humidité et de la teneur en matière organique du milieu.

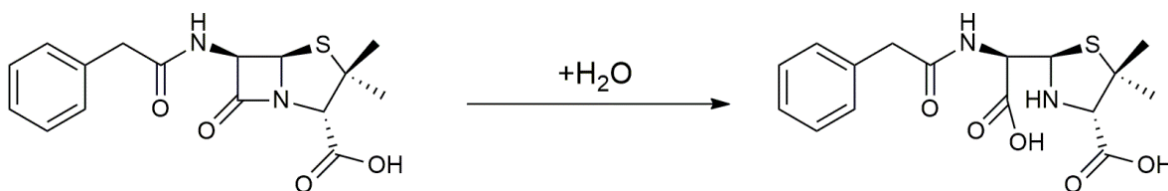
Les fluoroquinolones, les tétracyclines et les sulfamides sont très sensibles à la lumière [96, 100]. Leurs structures présentent des groupes fonctionnels (chromophores) comme des cycles aromatiques qui vont être capables d'absorber la longueur d'onde de la lumière naturelle. Les tétracyclines vont absorber certaines longueurs d'onde, 250 à 300  $\mu\text{m}$  et 340 à 380  $\mu\text{m}$  [96]. Cette absorption de lumière va dégrader les tétracyclines en attaquant les deux cycles du milieu et générer des sous-produits de dégradation faisant perdre une partie de l'activité antimicrobienne de la molécule [99]. Cette photolyse de la tétracycline peut aussi former l'anhydrotétracycline par perte d'une molécule d'eau [101]. Cette dégradation peut aussi avoir lieu majoritairement à des températures supérieures à 100°C d'après Kühne *et al.* [102].

Certaines tétracyclines peuvent aussi potentiellement former des diastéréoisomères appelées épimères qui ne diffèrent que par la configuration de leur centre de symétrie comme le montre la **Figure 1-9**. Cette épimérisation parfois réversible se déroule sur le carbone numéro 4 du cycle A de la structure à 4 cycles des tétracyclines. Ce changement de conformation peut se dérouler en milieu aqueux à des pH acides (pH 2-6), par ailleurs la lumière peut aussi contribuer à cette dégradation. Les tétracyclines peuvent aussi être hydrolysées en milieu acide [96, 103].



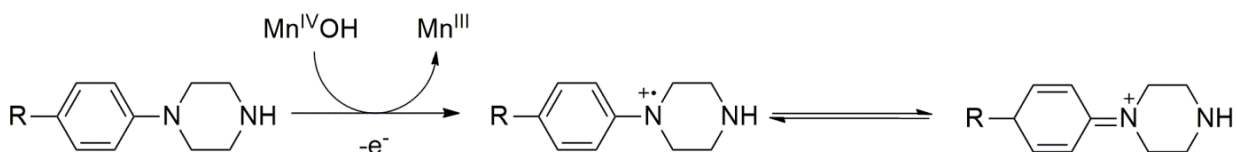
**Figure 1-9.** Épimérisation de la tétracycline [96].

Plusieurs antibiotiques sont sensibles à l'hydrolyse. Les  $\beta$ -lactamines comme la benzylpénicilline ou l'amoxicilline sont constituées d'un cycle  $\beta$ -lactamique qui va contribuer à leur instabilité. En milieu aqueux ce cycle va s'ouvrir pour former une amine secondaire et un groupement carboxylique, cette hydrolyse est présentée à la **Figure 1-10** [64].



**Figure 1-10.** Hydrolyse de la benzylpénicilline.

Une oxydation des antibiotiques est possible notamment les fluoroquinolones qui sont sensibles à cette dégradation [97]. Le mécanisme expliqué à la **Figure 1-11** est initié en formant un complexe de surface entre le composé organique et l'hydroxyde de manganèse lié à la surface. L'oxydation va avoir lieu sur l'azote aromatique de la moitié de pipérazine et va générer un intermédiaire radicalaire. Ce radical va engendrer un processus de dégradation de la molécule par hydroxylation ou une désalkylation [97].



**Figure 1-11.** Oxydation des fluoroquinolones par  $\text{MnO}_2$  [97].

Les antibiotiques peuvent être dégradés par les micro-organismes présents dans le milieu dans des conditions aérobiques et anaérobiques. Cette biodégradation se fait

principalement par des réactions enzymatiques, transformant les composés parents par hydrolyse ou par décarboxylation [104]. Par exemple le cycle des  $\beta$ -lactamines peut être ouvert par une enzyme, la  $\beta$ -lactamase présente dans les cellules bactériennes [64]. Plusieurs études ont étudié la dégradation de différentes classes d'antibiotiques dans différents milieux riches en micro-organismes en estimant leur temps de demi-vie. Cette estimation peut se faire expérimentalement en mesurant la quantité d'oxygène consommée par les micro-organismes dans un espace clos, en général une bouteille, pour éliminer les antibiotiques [100].

### 1.5.3.2 Dégradation dans les sols et le lisier de porc

Entre l'injection à l'animal et sa libération dans l'environnement, les antibiotiques vont subir plusieurs changements. Dans un premier temps, l'animal va digérer et transformer une partie des antibiotiques en métabolites, produits de la biotransformation [25]. Ces métabolites ainsi que leurs molécules mères respectives restantes vont être excrétés par l'animal dans le lisier [105]. Le temps de stockage du lisier avant fertilisation du champ est très variable [19]. Durant cette période, les antibiotiques ainsi que leurs métabolites respectifs peuvent encore subir une dégradation supplémentaire due à la présence d'une grande quantité de micro-organismes dans le lisier [19, 64]. Il a été montré que les antibiotiques vétérinaires peuvent persister de quelques jours à plusieurs mois dans le lisier voire même revenir sous la forme de la molécule mère [25, 106]. Un autre facteur important de la dégradation est le pH, les antibiotiques se dégradent plus rapidement à des pH basiques ou acides extrêmes [19, 107]. Le lisier étant un milieu alcalin, ce milieu va être propice à l'hydrolyse des antibiotiques.

La dégradation des antibiotiques dans les sols est principalement due aux micro-organismes présents en grand nombre dans ce milieu [64]. Les sols représentent un vaste réservoir de micro-organismes, un champ agricole peut contenir jusqu'à  $10^6 \text{ g}^{-1}$  de bactéries [64]. Cette dégradation va être accélérée lors de l'ajout du lisier et donc d'une grande quantité de micro-organismes à la terre du champ. Ainsi, plus la quantité de lisier épandue est importante, plus la dégradation sera rapide. Ces micro-organismes vont transformer les antibiotiques par des réactions enzymatiques comme l'hydroxylation ou la décarboxylation. Toutefois, cette dégradation n'est pas totale et les antibiotiques peuvent rester plusieurs mois dans les sols et ainsi être bioaccumulés [19]. L'influence de la lumière sur les antibiotiques ne

va pas être très importante dans les sols puisque ceux-ci sont protégés par une couche de sédiments qui empêche la photolyse. Seuls les antibiotiques présents situés en surface peuvent subir une photo-dégradation. Les métaux comme le manganèse sous forme oxydé ( $MnO_2$ ) sont présents en grande quantité dans les sols et peuvent notamment contribuer à la dégradation des antibiotiques par oxydoréduction [97]. Les informations relatives à la dégradation des antibiotiques dans ces milieux sont disponibles dans le **Tableau 1-7**.

### 1.5.3.3 Dégradation dans les eaux de surfaces et souterraines

Une fois qu'ils ont rejoint le milieu aquatique, les antibiotiques vont subir des changements de structures suivant la chimie de l'eau [52]. La dégradation des antibiotiques dans l'eau peut se faire par des voies biotiques et abiotiques [52, 108]. En se retrouvant dans un milieu aquatique, les antibiotiques vont être plus biodisponibles pour les micro-organismes et leur dégradation va être accélérée [3, 109, 110]. L'information sur la biodégradation des antibiotiques vétérinaires dans les eaux de surfaces et souterraines est manquante se base sur les données répertoriées en aquaculture [111, 112]. Cependant, ces données sont difficiles à comparer et varient énormément d'une étude à l'autre, elles sont résumées dans le **Tableau 1-7**. La dégradation des antibiotiques dans l'eau peut aussi se faire selon des conditions abiotiques comme l'hydrolyse pour les  $\beta$ -lactamines ou la photo-dégradation dans les eaux de surfaces [3, 110]. Ces processus vont jouer un rôle important dans l'élimination des antibiotiques dans le milieu aquatique. L'acidité de l'eau va aussi jouer un rôle important dans la dégradation de ces composés [3, 110]. La tylosine A par exemple va s'hydrolyser en tylosine B à un pH acide alors qu'elle va rester stable à pH neutre ou former la tylosine A-aldol [113]. Dans le cas des tétracyclines, l'épimérisation de ces molécules va être rapide dans les premiers jours puis se stabiliser à un taux constant et former un équilibre avec la molécule mère et l'épimère. Ces isomères optiques peuvent donc persister plusieurs mois dans le milieu aquatique [114]. D'une manière générale, la dégradation des différentes classes d'antibiotiques dans le lisier, les sols ou le milieu aquatique est très variable en termes de temps et certains de ces composés peuvent persister plusieurs mois dans ces matrices.



**Tableau 1-7.** Dégradation de différentes classes d'antibiotiques vétérinaires suivant la matrice.

Classes	Composés	Matrices	Températures	% Dégradation	Temps (jours)	Références
<b>β-lactamines</b>	Ceftiofur	Sol argileux et sablonneux	22	50	22 - 49	[115]
		Eau	-	50	4 - 100	[115]
<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline	Lisier de porc	-	50	4,5 - 9	[114]
		Eau	-	50	15 - 30	[114]
		Lisier de porc	8	50 - 70	48	[116]
	Chlortétracyclines	Sol sablonneux	20	12	30	[117]
	Oxytétracyclines	Sol	-	50	18 - 79	[90]
		Lisier de porc	-	50	30	[118]
<b>Macrolides</b>	Tylosine	Sol	20	100	30	[117]
		Eau	15	50	9,5 - 40	[109]
		Lisier de porc	-	50	3,6	[118]
	Érythromycine	Sol	20	50	11	[119]
		Mélange de sulfamides	Sol	-	50	3,5 - 127

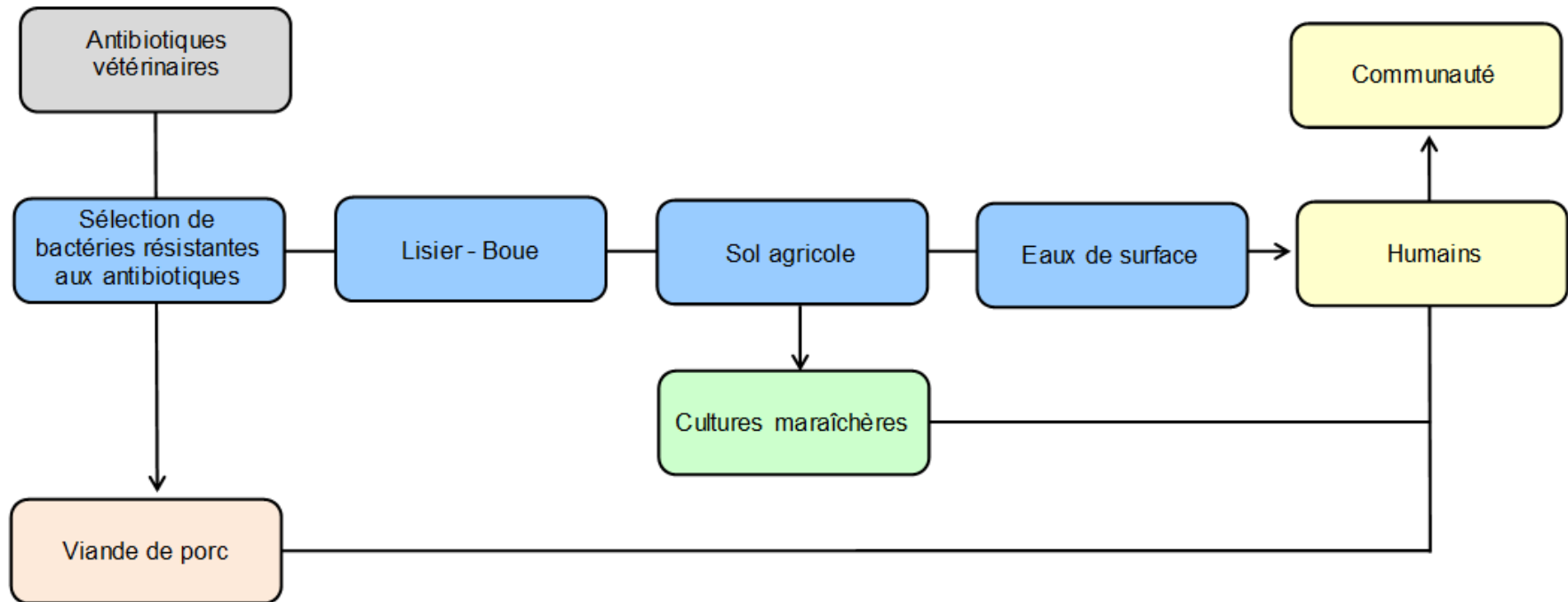
## **1.5.4 Résistance bactérienne et toxicité des antibiotiques liée à l'activité agricole**

### **1.5.4.1 Résistance bactérienne**

La résistance aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique. La résistance bactérienne est la capacité d'un micro-organisme à résister aux effets des antibiotiques en créant un mécanisme de protection [1]. L'utilisation fréquente et parfois systématique d'antibiotiques pour traiter les porcs contre des infections et comme stimulateur de croissance a mené à l'apparition de nouvelles souches bactériennes résistantes aux antibiotiques [120]. Ces souches bactériennes qui présentent des gènes résistants aux antibiotiques peuvent être relâchées dans les différents compartiments de l'environnement proche des zones agricoles et pourraient transmettre ce gène codant pour la résistance bactérienne aux bactéries initialement présentes. Par ailleurs, cette résistance aux antibiotiques peut également être transmise à des bactéries pouvant générer des infections difficilement traitables chez les humains [121, 122]. Plusieurs études suggèrent un lien entre l'utilisation d'antibiotique dans le domaine agricole et des infections liées à des bactéries résistantes [123].

Les sols agricoles représentent un vaste réservoir de différentes souches bactériennes. La présence de ces bactéries est importante pour maintenir les processus de minéralisation et la dégradation de la matière organique du sol [124]. Les antibiotiques vont affecter cette communauté bactérienne en perturbant leurs activités. Ces micro-organismes vont alors se protéger en se munissant de gènes codant pour une résistance à ces antibiotiques. Une étude a montré que des micro-organismes présents dans les sols agricoles sont devenus résistants aux tétracyclines après l'application de lisier contenant des bactéries déjà résistantes [125]. L'acquisition de gènes codants en faveur d'une résistance aux antibiotiques se ferait dans le système digestif de l'animal et dans le lisier [125]. Ces gènes seraient par la suite transmis aux bactéries présentes dans le sol lors de la fertilisation. Cette souche résistante va alors se multiplier dans les sols et peut atteindre les nappes d'eau souterraine par infiltration [98]. Toutefois, cette population de bactéries résistantes aux tétracyclines va diminuer un certain temps après l'application de lisier au profit de bactéries non affectées [126]. Les eaux

souterraines ou de surfaces contaminées par ces bactéries et utilisées comme eaux de boissons pourraient être une voie d'entrée de bactéries résistantes chez l'homme [122]. Un transfert de bactéries résistantes aux antibiotiques à l'homme comme les staphylocoques ou *Escherichia coli* pourraient aussi se faire via la consommation de viandes ou de légumes contaminés [122, 127]. Certains antibiotiques étant utilisés dans la médecine vétérinaire et humaine, peuvent créer des infections difficiles à contrôler avec les traitements généralement utilisés [122]. Un article du *The New York Times* estime qu'en 2005, 19 000 personnes seraient décédées aux États-Unis à la suite d'infections liées à des bactéries résistantes à la méthiciline ( $\beta$ -lactamine) comme *Staphylococcus aureus* [121, 128]. La **Figure 1-12** résume les différentes voies possibles menant au transfert des bactéries résistantes aux antibiotiques jusqu'aux humains.



**Figure 1-12.** Transmission des bactéries résistantes aux antibiotiques suivant différentes voies jusqu'aux humains adaptés de Khachatourians *et al.* [122].

#### 1.5.4.2 Effet et toxicité

Les antibiotiques sont conçus pour affecter principalement les bactéries et les micro-organismes. Ces composés créés pour être biologiquement actifs sont en réalité potentiellement toxiques pour les autres êtres vivants présents dans l'environnement [25]. Les poissons, les daphnés, les algues, les microbes, les vers de terre, les plantes et certains invertébrés peuvent être affectés par la présence d'antibiotiques dans leur environnement [19, 25]. Pour pouvoir avoir un effet toxique sur les organismes, les antibiotiques doivent être présents à une certaine concentration.

Il existe plusieurs manières de mesurer la toxicité d'un composé sur un organisme. L' $EC_{50}$  représente la concentration d'un composé actif qui induit une réponse à 50% après un certain temps d'exposition, on l'utilise pour mesurer l'efficacité d'un composé [129]. La  $LC_{50}$  correspond à la concentration létale à 50% sur un organisme et donne une indication de la toxicité aiguë d'un composé. Enfin, la  $MIC_{50}$  est la concentration minimum pour qu'un antibiotique inhibe la croissance à 50% d'un micro-organisme après une incubation d'une nuit [129].

Les antibiotiques vont affecter les organismes présents dans les différents compartiments de l'environnement proche des zones agricoles. Une fois présents dans les sols du champ, les antibiotiques vont fortement affecter la communauté microbienne présente dans les sols et avoir un impact sur la respiration, la dégradation de la matière organique, la nitrification et les transformations enzymatiques [130]. Les organismes vivants dans les sols comme les vers de terre vont cependant être faiblement affectés par la présence de ces antibiotiques [55]. Les antibiotiques vont aussi affecter les cultures maraichères cultivées dans les champs contaminés par les antibiotiques [131, 132]. La sulfaméthoxine par exemple va s'accumuler dans les racines et la tige de la plante, et cette accumulation d'antibiotiques par la plante peut avoir un effet sur sa croissance. [133]. Par ailleurs, les tétracyclines comme la chlortétracycline et l'oxytétracycline vont ralentir le développement de la plante même à de faibles concentrations [131]. Les données relatives à la toxicité aiguë des antibiotiques vétérinaires sur les organismes aquatiques comme les poissons sont limitées, toutefois, des données sont disponibles en ce qui concerne les algues bleu-vert et les petits insectes

aquatiques comme les daphnés [134]. Celles-ci semblent être sensibles seulement à certains antibiotiques comme les macrolides. L'EC<sub>50</sub> de l'éprinomectine est comprise entre 2,5 – 450 ng L<sup>-1</sup> pour les daphnés ce qui signifie qu'une très faible quantité de cet antibiotique peut être toxique pour cette espèce aquatique [25]. Ces résidus d'antibiotiques vont affecter leur reproduction et leur espérance de vie [135]. Les algues bleu-vert ou cyanobactéries vont être sensibles à la plupart des classes d'antibiotiques. Par exemple, les EC<sub>50</sub> de l'amoxicilline, de la benzylpénicilline, de la spiramycine et de la tétracycline relatives aux cyanobactéries sont inférieurs à 100 µg L<sup>-1</sup> [54]. Finalement, le temps d'exposition, la température, le pH du milieu sont autant de paramètres qui vont influencer ces études toxicologiques. La plupart de ces tests ont été effectués avec des concentrations élevées et à des temps d'exposition courts et ne sont pas représentatifs de la réalité et des concentrations que l'on peut retrouver dans la nature [19]. Cependant, on peut généraliser en admettant que le déversement des antibiotiques vétérinaires sur les milieux aquatiques et terrestres serait toxique pour les organismes qui y habitent plus de manière chronique qu'aigüe.

#### 1.5.4.3 Impact des produits de dégradation

Généralement, les métabolites et produits de dégradation des antibiotiques vétérinaires perdent une partie de leur efficacité face aux bactéries. Toutefois, ces molécules restent actives et gardent une partie de leur activité antimicrobienne et peuvent ainsi avoir un effet toxique sur les organismes présents dans l'environnement. Bien que plusieurs études aient élucidé et identifié les principales voies de dégradation des antibiotiques vétérinaires et les sous-produits qui en résultent [58, 114, 136]. Peu de ces études ont évalué la toxicité et l'impact que pouvaient avoir ces composés dégradés sur les organismes présent dans l'environnement. Une étude qui a étudié les produits de dégradation des tétracyclines a révélé que ceux-ci avaient un effet similaire sur les bactéries présentes dans des boues que leurs molécules mères respectives (**Tableau 1-8**) [56]. L'anhydrotétracycline, un métabolite de la tétracycline, a une valeur d'EC<sub>50</sub> environ 3 fois inférieure à sa molécule mère. Cela signifie que ce sous-produit est actif sur ces bactéries à de plus faibles concentrations que la molécule d'origine et est donc plus toxique [56]. García-Gallán *et al.* ont référencé les principaux métabolites et produits de dégradation des sulfamides [137]. Cette transformation engendre une diminution de leurs

pouvoirs antibactériens de ces molécules. Toutefois, ces molécules ont révélé avoir encore des effets inhibiteurs sur les populations de bactéries testées. Par ailleurs, ces composés auraient aussi la capacité de se retransformer sous leurs formes originales et ainsi de regagner leurs activités antimicrobiennes comme c'est le cas pour l'acetyl-sulfaméthazine un produit de dégradation de la sulfaméthazine [137].

Beaucoup d'études qui se sont intéressées à la toxicité et l'impact des antibiotiques vétérinaires dans l'environnement ne prennent pas en compte la toxicité des produits de dégradation [51]. D'autant plus que ces composés se retrouvent souvent à des concentrations supérieures à leurs molécules mères dans l'environnement. Cela conduit à des estimations erronées et une sous-estimation de l'impact des antibiotiques vétérinaires sur l'environnement. Il est également nécessaire de prendre en compte le potentiel de retransformation de ces composés en leurs molécules mères ce qui leur permet de regagner leurs activités biologiques originales.

**Tableau 1-8.** Exemples d'effet de l'exposition de différentes classes d'antibiotiques vétérinaires sur les sols, certains organismes, certains micro-organismes et plantes.

Classes	Composés	Organismes	Toxicité/Effet	Concentrations	Références
<b>β-lactamines</b>	Pénicillines	Bactérie de boues d'épuration	EC <sub>50</sub>	85 mg L <sup>-1</sup>	[105]
<b>Tétracyclines</b>	Chlortétracycline	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Perte de poids des racines	160 mg L <sup>-1</sup>	[131]
		<i>Fungal hyphae</i>	48% inhibition	10 mg L <sup>-1</sup>	[138]
	Tétracycline	Bactérie de boues d'épuration	EC <sub>50</sub>	2,2 mg L <sup>-1</sup>	[105]
		<i>Pseudomonadaceae</i>	MIC <sub>50</sub>	2,0 mg L <sup>-1</sup>	[56]
		<i>Escherichia Coli</i>	MIC <sub>50</sub>	32 mg L <sup>-1</sup>	[56]
	Isochlortétracycline*	<i>Pseudomonadaceae</i>	MIC <sub>50</sub>	>32 mg L <sup>-1</sup>	[56]
		<i>Escherichia Coli</i>	MIC <sub>50</sub>	32 mg L <sup>-1</sup>	[56]
		<i>Pseudomonadaceae</i>	MIC <sub>50</sub>	12 mg L <sup>-1</sup>	[56]
	Anhydrotétracycline	<i>Escherichia Coli</i>	MIC <sub>50</sub>	1,5 mg L <sup>-1</sup>	[56]
		Oxytétracycline	Collemboles	LC <sub>10</sub> /EC <sub>10</sub>	>5000/>5000 mg kg <sup>-1</sup>
		Vers de terre	LC <sub>10</sub> /EC <sub>10</sub>	>5000/1954 mg kg <sup>-1</sup>	[55]
		Bactérie de boues d'épuration	EC <sub>50</sub>	1,2 mg L <sup>-1</sup>	[105]
<b>Macrolides</b>	Tylosine	Collemboles	LC <sub>10</sub> /EC <sub>10</sub>	>5000/149 mg kg <sup>-1</sup>	[55]
		Vers de terre	LC <sub>10</sub> /EC <sub>10</sub>	>5000/3306 mg kg <sup>-1</sup>	[55]
		Bactérie de boues d'épuration	EC <sub>50</sub>	55 mg L <sup>-1</sup>	[105]

EC<sub>50</sub> : Concentration effective à 50%, EC<sub>10</sub> : Concentration effective à 10%, LC<sub>10</sub> : Dose létale à 10%, MIC<sub>50</sub> : Concentration minimum d'inhibition à 50%

\*Produit de dégradation de la chlortétracycline.



**Tableau 1-8.** Exemples d'effet de l'exposition de différentes classes d'antibiotiques vétérinaires sur les sols, certains organismes, certains micro-organismes et plantes (suite).

Classes	Composés	Organismes	Toxicité/Effet	Concentrations	Références
Sulfamides	Sulfadiazine	Bactérie de boues d'épuration	EC <sub>50</sub>	16/17 mg L <sup>-1</sup>	[139]
	Sulfaméthoxine	Racine et tige			
		( <i>Panicum miliaceum</i> )	Bioaccumulation	110-2071 mg kg <sup>-1</sup>	[133]
		( <i>Pisum sativum</i> )	Bioaccumulation	60-178 mg kg <sup>-1</sup>	[133]
		( <i>Zea mays</i> )	Bioaccumulation	13-269 mg kg <sup>-1</sup>	[133]
		Racine, tige, feuille			
		Carotte	Inhibition	1 mM	[140]
		Mais	Inhibition	1mM	[140]
		Millet	Pas d'effet	1mM	[140]
Pois	Inhibition	1mM	[140]		

EC<sub>50</sub> : Concentration effective à 50%, EC<sub>10</sub> : Concentration effective à 10%, LC<sub>10</sub> : Dose létale à 10%, MIC<sub>50</sub> : Concentration minimum d'inhibition à 50%

## **1.6 Enjeux de l'utilisation des antibiotiques vétérinaires**

Les antibiotiques vétérinaires sont des composés ayant des propriétés bactériostatiques ou bactéricides ciblées. Dans l'élevage porcin, ils sont principalement utilisés pour soigner et guérir les animaux d'élevages, mais aussi comme facteur de croissance pour faire prendre du poids à l'animal plus rapidement. Ces molécules sont encore utilisées en grande quantité dans l'élevage des porcs en Amérique du Nord alors que plusieurs pays dans le monde ont décidé de limiter, voir, de bannir leur utilisation dans les élevages pour des raisons sanitaires. Une fois ces composés administrés aux porcs, une partie va être métabolisée par leur organisme et former des métabolites, alors qu'une autre ne va pas être assimilée et va se retrouver inchangée dans le lisier. Ce mélange d'antibiotiques vétérinaires et de métabolites va atteindre l'environnement par l'intermédiaire de l'épandage du lisier sur les champs agricoles. Tout dépendants de leurs propriétés physicochimiques, ces composés peuvent s'infiltrer dans les sols pour atteindre les eaux souterraines ou être transportés vers les eaux superficielles. Compte tenu du fait que ces molécules peuvent avoir un effet toxique sur les organismes présents dans l'environnement et qu'elles sont soupçonnées de contribuer à la résistance bactérienne. Il est important de les identifier et de les quantifier à la source du déversement, dans le lisier avant l'épandage sur des champs et d'étudier le devenir de ces produits pharmaceutiques dans l'environnement terrestre et aquatique proche des zones agricoles. C'est pourquoi, afin d'entreprendre des actions de recherche, de surveillance et de recensement de ces composés, le développement et l'utilisation de méthodes analytiques adaptées est nécessaire.

## **Chapitre 2. Analyse des antibiotiques vétérinaires**

---

## **2.1 Mise en contexte**

Les antibiotiques vétérinaires forment un groupe de molécules hétérogènes qui diffèrent notamment par leurs structures moléculaires, leurs propriétés physicochimiques, mais aussi par leurs stabilités. Ces différences ajoutées à la complexité des matrices dans lesquelles se retrouvent ces résidus pharmaceutiques compliquent l'analyse. Il est alors nécessaire de faire appel à plusieurs techniques analytiques pour extraire, purifier et analyser ces échantillons de lisier, de sols agricoles ou encore d'eaux impactées par ces contaminants émergents.

De nombreuses techniques analytiques ont été proposées dans la littérature scientifique pour quantifier les antibiotiques vétérinaires dans de nombreux types de matrices comme les sols, les eaux de surfaces, les eaux souterraines, l'eau potable ou encore dans la viande destinée à la consommation humaine [141-143]. Toutefois, peu proposent l'analyse de ces contaminants organiques dans des matrices issues de l'élevage intensif des porcs comme le lisier ou les effluents provenant du lavage des porcheries qui sont pourtant considérées comme une des sources principales de relâchement de ces molécules dans l'environnement [19, 48, 58, 59].

La section suivante décrit les principales techniques analytiques qui ont été employées dans cette thèse pour l'analyse des antibiotiques vétérinaires et réfère plusieurs méthodes proposées dans la littérature scientifiques dans le **Tableau 2-1**.

## **2.2 Extraction des antibiotiques vétérinaires contenus dans des matrices biologiques et environnementales**

Compte tenu du grand nombre de variables influençant la sorption des antibiotiques à des solides dans l'environnement et de la diversité des matrices étudiées il est nécessaire de choisir une méthode d'extraction adaptée. Il existe de nombreuses techniques d'extraction capables d'extraire les différentes classes d'antibiotiques contenues dans diverses matrices

avec plus ou moins d'efficacité. Seules les extractions et les purifications effectuées sur les matrices étudiées dans cette thèse seront présentées ici : lisier, sol agricole et eaux de surfaces et souterraines. Les échantillons solides comme les sols, ou semi-solides comme le lisier (contenant jusqu'à 15% de matière sèche) peuvent être analysés lyophilisés ou sous leur forme naturelle. En ce qui concerne les échantillons d'eau, tout dépendant leur propriété (eaux de drainage, eaux de surface, eaux souterraines), le volume d'échantillon disponible et la quantité d'analyte qu'elles contiennent plusieurs traitements sont possible. Une concentration sur cartouche SPE manuelle, sur une cartouche SPE en ligne ou même une injection directe de petit volume est possible. Plusieurs exemples des différentes méthodes d'analyse utilisées pour analyser les antibiotiques vétérinaires dans les matrices étudiées sont disponibles dans le **Tableau 2-1**.

**Tableau 2-1.** Résumé de différentes techniques analytiques utilisées pour analyser les antibiotiques dans les eaux superficielles ou souterraines, les sols agricoles et le lisier de porc.

Auteurs	Classes	Composés	Solvant d'extraction	SPE	Séparation chromatographique	Détecteurs	Matrices	Récupération (%)	Limites de détection/quantification	
Jacobsen <i>et al.</i> [144]	<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline		<i>Strong</i>				80,5±3,7	LD = 10 µg .kg <sup>-1</sup>	
		Oxytétracycline		<i>Anion</i>				52,6±2,4	LD = 8,3 µg kg <sup>-1</sup>	
		Chlortétracycline		<i>Exchange (SAX) -</i>				75,6±5,3	LD = 15 µg kg <sup>-1</sup>	
			Doxycycline	PLE :	<i>Hydrophilic</i>				137,8±3,9	LD = 15 µg kg <sup>-1</sup>
			4-épitétracycline	- 50% MeOH	<i>Lipophilic</i>	C18 :			57,9±2,3	LD = 3,9 µg kg <sup>-1</sup>
			4-épioxytétracycline	- 50% acide	<i>Balance</i>	MeOH et H <sub>2</sub> O	ESI-	Lisier de	96,7±4,5	LD = 17 µg kg <sup>-1</sup>
			4-épichlortétracycline	citrique 0,2 M pH 4,7	<i>(HLB) :</i> Cartouche échangeuse anionique	acidifié avec de HCOOH à 13°C	MS/MS (+)	porc	72,9±7,4	LD = 32 µg kg <sup>-1</sup>
		<b>Sulfamides</b>	Sulfadiazine		en tandem				63,6±2,4	LD = 8,7 µg kg <sup>-1</sup>
			Sulfaméthazine		avec une				88,6±5,5	LD = 8,2 µg kg <sup>-1</sup>
			Sulfadoxine		cartouche polymérique				86,3±1,7	LD = 2,7 µg kg <sup>-1</sup>
	<b>Macrolides</b>	Tylosine A						9,1±1,2	LD = 27 µg kg <sup>-1</sup>	
Kay <i>et al.</i> [91]	<b>Tétracyclines</b>	Oxytétracycline	Sonication : tampon McIlvaine	SAX-HLB	C18 : tetrahydrofurane, ACN et 0,05% acide trifluoroacétique	UV-Vis	Eau	99,6±4,6	LQ = 0,35 µg L <sup>-1</sup>	
							Sédiment	35±5	LQ = 10 µg kg <sup>-1</sup>	
	<b>Macrolides</b>	Tylosine A	Eau	94,9±2,4	LQ = 0,35 µg L <sup>-1</sup>					
			Sédiment	50±10	LQ = 10 µg kg <sup>-1</sup>					

**Tableau 2-1.** Résumé de différentes techniques analytiques utilisées pour analyser les antibiotiques dans les eaux superficielles ou souterraines, les sols agricoles et le lisier de porc (suite).

Auteurs	Classes	Composés	Solvant d'extraction	SPE	Séparation chromatographique	Détecteurs	Matrices	Récupération (%)	Limites de détection/quantification
Blackwell <i>et al.</i> [145]	<b>Tétracyclines</b>	Oxytétracycline					Sol argileux et sableux	31-75	LD = 18 µg kg <sup>-1</sup>
							Lisier de porc	102	LD = 70 µg kg <sup>-1</sup>
	<b>Sulfamides</b>	Sulfachloropyridazine	Sonication : MeOH, McIlvaine à pH 7	SAX-HLB	C18 : tetrahydrofurane, ACN et 0,05% acides trifluoroacétique	UV-Vis et FLD	Sol argileux et sableux	73-85	LD = 18 µg kg <sup>-1</sup>
							Lisier de porc	89	LD = 140 µg kg <sup>-1</sup>
	<b>Macrolides</b>	Tylosine A					Sol argileux et sableux	61-105	LD = 40 µg kg <sup>-1</sup>
Lindsey <i>et al.</i> [142]	<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline						107	
		Oxytétracycline						109	
		Chlortétracycline						108	
	<b>Sulfamides</b>	Sulfachloropyridazine	Ajout de 75 µL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> et Na <sub>2</sub> EDTA	HLB : 60 mg	d'ammonium 90/10 H <sub>2</sub> O/MeOH avec 0,3% HCOOH et 10 mM de formate d'ammonium avec 0,5% HCOOH	ESI-MS (+)	Eaux de surfaces et souterraines	88	LD estimées entre 0,07 et 15 µg L <sup>-1</sup>
		Sulfadiméthoxide						96	
		Sulfaméthazide						130	
		Sulfamérazine						83	
	Sulfathiazole						108		

**Tableau 2-1.** Résumé de différentes techniques analytiques utilisées pour analyser les antibiotiques dans les eaux superficielles ou souterraines, les sols agricoles et le lisier de porc (suite).

Auteurs	Classes	Composés	Solvant d'extraction	SPE	Séparation chromatographique	Détecteurs	Matrices	Récupération (%)	Limites de détection/quantification	
Martinez-Carballo <i>et al.</i> [146]	<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline						91	LD = 0,85 µg kg <sup>-1</sup>	
		Oxytétracycline						88	LD = 0,85 µg kg <sup>-1</sup>	
		Chlortétracycline						94	LD = 1,9 µg kg <sup>-1</sup>	
	<b>Diaminopyrimidines</b>	Triméthoprim							77	LD = 0,11 µg kg <sup>-1</sup>
		<b>Sulfamides</b>	Sulfadimidine	Sonication : 3 × 30 mL de tampon McIlvaine à pH 4 et 0,1 M EDTA	Cartouche C18	C8 : H <sub>2</sub> O et ACN acidifié à 0,1% HCOOH	ESI-MS (+)	Lisier de porc	101	LD = 0,22 µg kg <sup>-1</sup>
			Sulfadiazine						83	LD = 0,29 µg kg <sup>-1</sup>
			Sulfadoxine						105	LD = 0,49 µg kg <sup>-1</sup>
			Sulfathiazole						101	LD = 0,81 µg kg <sup>-1</sup>
	Sulfaméthoxazole						95	LD = 0,35 µg kg <sup>-1</sup>		
	<b>Quinolones</b>	Ciprofloxacine							90	LD = 18 µg kg <sup>-1</sup>
Enrofloxacine								85	LD = 22 µg kg <sup>-1</sup>	
Jacobsen <i>et al.</i> [147]	<b>Tétracyclines</b>	Oxytétracycline						82	LD = 1,9 µg kg <sup>-1</sup>	
		Chlortétracycline	Extraction par fluide pressurisé ou ASE : 50% MeOH et 50% 0,2 M acide citrique	SAX-HLB	C18 : 5% MeOH et 80 mM HCOOH et 95% Meaux et 80 mM HCOOH	ESI-MS/MS (+)	Sol terreux	46	LD = 0,6 µg kg <sup>-1</sup>	
	<b>Sulfamides</b>	Sulfadiazine							84	LD = 0,9 µg kg <sup>-1</sup>
		<b>Macrolides</b>	Tylosine A						109	LD = 4,0 µg kg <sup>-1</sup>
	Tylosine B							108	LD = 0,4 µg kg <sup>-1</sup>	
	Tylosine C							153	LD = 1,3 µg kg <sup>-1</sup>	
	Tylosine D							85	LD = 1,8 µg kg <sup>-1</sup>	
Érythromycine							84	LD = 2,4 µg kg <sup>-1</sup>		



**Tableau 2-1.** Résumé de différentes techniques analytiques utilisées pour analyser les antibiotiques dans les eaux superficielles ou souterraines, les sols agricoles et le lisier de porc (suite).

Auteurs	Classes	Composés	Solvant d'extraction	SPE	Séparation chromatographique	Détecteurs	Matrices	Récupération (%)	Limites de détection/quantification
Raich-Montiu <i>et al.</i> [148]	Sulfamides	Sulfadiazine	MAE : ACN pour les sols. Tampon acide formique pH 3,4 pour les eaux	Cartouche polymérique HLB 30 mg	ACN et tampon acide acétique et acétate d'ammonium	FLD	Eau	96±6	LD = 1,5 ng L <sup>-1</sup>
							Sol	73±4	LD = 1,2 ng g <sup>-1</sup>
	Sulfadimidine	Eau					93±7	LD = 1,0 ng L <sup>-1</sup>	
		Sol					80±5	LD = 1,0 ng g <sup>-1</sup>	
	Sulfaméthoxidiazine	Eau					90±5	LD = 3,0 ng L <sup>-1</sup>	
		Sol					79±4	LD = 2,4 ng g <sup>-1</sup>	
	Sulfachloropiridazine	Eau					94±7	LD = 4,0 ng L <sup>-1</sup>	
		Sol					60±3	LD = 3,0 ng g <sup>-1</sup>	
	Sulfadiméthoxine	Eau					82±8	LD = 4,0 ng L <sup>-1</sup>	
		Sol					77±2	LD = 2,4 ng g <sup>-1</sup>	
Sulfaquinoxaline	Eau	80±10	LD = 8,0 ng L <sup>-1</sup>						
	Sol	76±3	LD = 6,0 ng g <sup>-1</sup>						

### 2.2.1 Méthodes d'extractions instrumentales

De nombreuses techniques d'extraction ont été employées pour extraire des molécules organiques comme les antibiotiques contenus dans les sols [66, 149]. Initialement, des techniques similaires à l'extraction de composés organiques dans des matrices solides comme le Soxhlet ou l'extraction solide-liquide ont été utilisées [132]. Toutefois, ces méthodes sont longues, fastidieuses et consomment une grande quantité de solvant avec des pourcentages de récupération variables et parfois non répétables. Elles ont été remplacées par des techniques instrumentales automatisées plus efficaces et moins consommatrices en solvant comme l'extraction par fluide supercritique (*supercritical fluid extraction*, SFE), l'extraction assistée par micro-ondes (*microwave assisted extraction*, MAE) ou encore par l'extraction par liquide pressurisé (*pressurized liquid extraction*, PLE). Les pourcentages de récupération de plusieurs techniques d'extraction employées dans l'analyse environnementale sont répertoriés au **Tableau 2-1**.

La SFE exploite les propriétés gazeuses et liquides des fluides à l'état supercritique, le plus souvent du dioxyde de carbone [150]. Cette technique permet d'extraire des molécules organiques contenues dans des solides à des pressions élevées. Initialement, cette technique était limitée à l'extraction de composés peu polaire. L'utilisation combinée du CO<sub>2</sub> et du méthanol a permis d'extraire une plus grande gamme de molécules avec différentes polarités [149]. Cette technique est surtout utilisée pour extraire les antibiotiques contenus dans la viande plutôt que dans les sols et le lisier [150].

Une autre technique employée pour l'extraction de composés organiques contenue dans des matrices environnementales est la MAE. Cette technique utilise les ondes micro-ondes pour chauffer un échantillon pour obtenir une température d'ébullition du solvant au-dessus de son point d'ébullition. Les hautes températures utilisées augmentent la solubilité des analytes dans le solvant. Le désavantage de cette technique est que le choix de solvant est limité et que les analytes sensibles aux chaleurs élevées peuvent subir une décomposition [151]. Cette méthode a permis d'obtenir des rendements d'extraction de 80% des quinolones contenues dans des sols et des sédiments [152].

La PLE, aussi appelée extraction accélérée par solvant (*accelerated solvent extraction*, ASE) est une technique d'extraction relativement récente employée pour une grande gamme de composés et de nombreuses matrices. L'extraction accélérée par solvant se base sur le même principe que la MAE en permettant aux solvants d'atteindre des températures supérieures à leur point d'ébullition à des pressions élevées. La viscosité et la tension de surface du solvant à des hautes températures vont être diminuées et permettre une meilleure pénétration du solvant dans la matrice notamment dans les espaces interstitiels. Par ailleurs, les analytes vont avoir une meilleure solubilité dans le solvant à haute température. L'utilisation de hautes températures dans l'extraction par PLE va extraire en plus des analytes, d'autres composés présents dans la matrice. Ces composés peuvent poser problème lors de la détection des analytes. C'est pourquoi une étape de purification importante sera nécessaire pour réduire les interférences avant l'analyse. Par ailleurs, ce système doit aussi être utilisé sur des molécules thermostables [153]. Cette technique a été employée avec succès pour l'extraction d'antibiotiques dans des sols et du lisier [144, 154].

### **2.2.2 Extraction par sonication**

L'extraction par sonication est une technique d'extraction très utilisée dans le domaine environnemental. Cette technique rapide, efficace, adaptable et qui ne requière pas de grands volumes de solvant a été utilisée pour l'analyse des antibiotiques vétérinaires présents dans les sols et le lisier dans plusieurs études [145]. Des extraits de sols vont être mis en contact avec le solvant d'extraction choisi puis placé dans un bain à ultrasons produisant des ondes entre 20 et 400 kHz. Ces ondes vont produire des bulles ultrasoniques qui peuvent pénétrer dans les interstices de la matrice. L'implosion de ces bulles va permettre de dissoudre l'analyte dans le solvant d'extraction. Le choix du solvant d'extraction est donc un paramètre important lorsque cette technique est employée [155]. Les antibiotiques sont souvent polaires et principalement solubles dans l'eau, pour cette raison des solvants aqueux sont préférés pour extraire les antibiotiques des échantillons solides [66]. Les solvants organiques ont le désavantage d'extraire une grande quantité de composés non désirés ce qui complique par la suite l'étape de purification et augmente les effets de matrice en spectrométrie de masse [88]. Par ailleurs,

l'utilisation d'un solvant organique nécessite un échantillon sec ou lyophilisé pour éviter d'affecter l'extraction. La présence d'eau dans l'échantillon peut affecter l'efficacité de l'extraction et ainsi le pourcentage de récupération. Le tampon de McIlvaine composé d'acide citrique et de phosphate de disodium a été utilisé à de nombreuses reprises pour l'extraction d'antibiotiques adsorbés aux sols [66, 145-147, 151]. Le coefficient de partage eau/sol résumé dans le **Tableau 1-4** indique que les tétracyclines sont la classe d'antibiotiques la plus accrochée aux solides. Les macrolides et les sulfamides sont accrochés de façon plus modérée à la matrice. Les antibiotiques sont en général peu accrochés au lisier de porc. Le **Tableau 2-1** donne quelques exemples d'extractions par sonication ainsi que leurs pourcentages de récupération associés.

### 2.2.3 Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (*solid phase extraction*, SPE) permet de concentrer et de purifier l'échantillon avant analyse. L'extrait obtenu après l'étape d'extraction d'un solide ou l'échantillon liquide filtré est passé à travers une cartouche constituée d'un sorbant capable de former des liaisons avec les analytes étudiés. Plusieurs types de sorbant sont utilisés pour retenir les antibiotiques sur la cartouche, en règle générale les cartouches polymériques sont préférées pour l'analyse des tétracyclines. Les cartouches à base de silice sont déconseillées pour éviter de créer des liaisons entre les tétracyclines et les silanols difficiles à défaire [151]. Ces cartouches polymériques retiennent les composés analysés en formant des liaisons  $\pi$ - $\pi$  et hydrophiles. Les cartouches échangeuses d'ions, cationiques avec un groupement sulfate ou anioniques avec un groupement amine, peuvent aussi être utilisées et forment des liaisons ioniques entre l'analyte et le sorbant. Ces liaisons fortes permettent l'utilisation de solvant organique durant l'étape de purification pour enlever une plus grande partie des composés de la matrice ayant été extraits [145]. Ces cartouches peuvent aussi être utilisées en tandem avec une cartouche polymérique, celle-ci va retenir les antibiotiques et la cartouche anionique va retenir les composés chargés comme les acides humiques [147]. L'élution des composés retenus sur la cartouche se fait avec un solvant organique, le plus souvent du méthanol acidifié ou alcalin, selon les analytes étudiés.

Les cartouches SPE peuvent être utilisées dans un système de SPE manuelle permettant des facteurs de concentrations élevées, ce qui permet l'analyse de composés à des niveaux traces ( $\text{ng L}^{-1}$ ) dans des échantillons d'eau chargés. Cette technique de pré-concentration efficace est par ailleurs laborieuse et parfois peu pratique compte tenu de toutes les étapes de manipulation nécessaire. Elle peut être remplacée par un système SPE automatisé en ligne branché avant la colonne chromatographique. Ce dernier système est très utile pour l'analyse de petit volume d'échantillon d'eau relativement propre (0,5 à 20 mL), selon le facteur de pré-concentration nécessaire [156]. Enfin, l'injection directe de petits volumes filtrés (20  $\mu\text{L}$ ) sans pré-concentration est aussi possible [157]. Plusieurs exemples de type de cartouches utilisées pour des analyses environnementales sont disponibles dans le **Tableau 2-1**.

## 2.3 Méthodes de séparation et d'introduction d'échantillons

### 2.3.1 La chromatographie liquide

La chromatographie liquide à haute performance (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) est une technique analytique séparative permettant de séparer les analytes avant leur détection [158]. Son principe de séparation repose sur les interactions que peuvent avoir les analytes avec la phase liquide et la phase stationnaire de la colonne chromatographique [158]. Le champ d'application de cette technique est large et permet l'analyse d'une grande partie du domaine de la chromatographie gazeuse ainsi que les composés thermosensibles, les composés de masse moléculaire importante et les composés polaires comme les antibiotiques. Un système HPLC est composé de différents modules reliés entre eux et permettant la circulation de la phase mobile à travers les différentes parties. Généralement, on retrouve l'injecteur permettant l'injection de petits volumes ( $\mu\text{L}$ ), le dégazeur, les pompes, la colonne analytique thermostatée, puis le détecteur [158, 159].

Il existe plusieurs types de phases stationnaires qui permettent de séparer différentes sortes de classes de composés suivant leurs propriétés physicochimiques. La phase stationnaire est constituée de micro particules sphériques de gel de silice ayant un diamètre compris entre 2

et 5  $\mu\text{m}$  [158]. Ce gel de silice est un solide amorphe ayant pour formule moléculaire  $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$  [158]. Celui-ci comporte des pores de tailles différentes permettant la circulation de la phase liquide à haute pression. La silice a une capacité d'adsorption élevée et est utilisée essentiellement pour la séparation des composés polaires. Des fonctions organiques de polarités différentes peuvent y être greffées selon la nature des composés que l'on souhaite séparer. On distingue alors la chromatographie en phase normale et la chromatographie en phase inverse qui est le type de séparation le plus utilisé. La chromatographie en phase normale fait intervenir des interactions polaires. Les groupements silanols Si-OH en surface de la phase stationnaire peuvent être utilisés pour séparer les analytes. Cependant, pour des applications plus spécifiques il est possible de greffer des fonctions amines ou diols sur le gel de silice pour modifier les interactions entre la phase stationnaire et les analytes. Ces types de colonnes offrent une forte interaction avec les composés polaires. La chromatographie en phase inverse est basée sur des interactions de type hydrophobes. Le gel de silice est greffé avec des chaînes alkyles de 8 ou 18 atomes de carbone ou encore des groupements phényles permettant la rétention des composés peu polaires [158, 159].

Suivant un principe général, la phase stationnaire utilisée doit avoir une polarité opposée à la phase mobile. La phase mobile a pour but de faire voyager l'analyte de l'injecteur jusqu'au détecteur. Suivant sa nature, elle va être capable d'entraîner l'analyte plus ou moins facilement en fonction du facteur de rétention du composé. Le choix de la phase mobile est donc un paramètre important. Dans le cas d'une chromatographie en phase inverse, les solvants polaires comme l'eau ou le méthanol auront un fort pouvoir d'élution sur les composés polaires et permettront à l'analyte polaire retenu sur la colonne de migrer plus facilement. Les composés polaires sont cependant difficiles à séparer entre eux en mode isocratique, c'est-à-dire sans changer la composition de la phase mobile. C'est pourquoi il faut réaliser un gradient d'élution en diminuant progressivement au cours du temps le pourcentage en eau au profit du solvant moins polaire comme le méthanol. On commencera par exemple avec un mélange 70/30% eau/méthanol pour terminer à la composition 5/95% et éluer les composés les plus retenus sur la colonne [158, 159]. La chromatographie en phase inverse avec colonne C18 ou C8 est la plus utilisée pour la séparation des antibiotiques vétérinaires

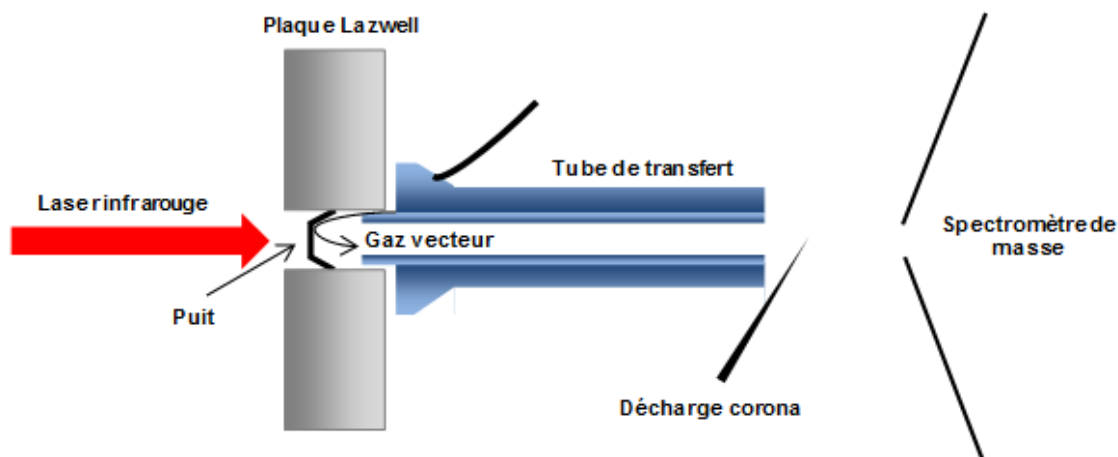
[145, 147]. Des exemples des colonnes utilisées pour séparer les antibiotiques vétérinaires ainsi que les paramètres relatifs à la séparation chromatographique sont disponibles dans le **Tableau 2-1**.

### **2.3.2 Méthode alternative d'introduction d'échantillons, la désorption thermique par diode laser**

La désorption thermique par diode laser (*laser diode thermal desorption*, LDTD) est une technique d'introduction d'échantillon couplée à une source d'ionisation à pression atmosphérique (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) mise au point par Picard *et al.* et développée par la compagnie Phytronix Technologies (Québec, Canada) [160]. La LDTD-APCI utilise le principe de désorption thermique des analytes par l'intermédiaire d'un laser qui va chauffer l'arrière d'un puits d'une plaque analytique Lazwell® [160, 161]. Cette désorption thermique va désorber tous les analytes en même temps, il n'y a donc pas de séparation chromatographique post-ionisation. Cette méthode d'introduction d'échantillon couplée avec un triple quadripôle a été utilisée dans le **Chapitre 3** de ce manuscrit pour faire l'analyse de quatre antibiotiques couramment utilisés dans l'élevage porcin. La **Figure 2-1** présente un schéma explicatif de l'appareil.

Un petit volume (entre 1 et 10 µL) de l'extrait à analyser est déposé dans un puits d'une plaque Lazwell® comprenant 96 puits. Ce puits a une forme hexagonale qui va permettre de faciliter le dépôt de l'échantillon dans le centre du puits. Après évaporation du solvant, un dépôt de l'échantillon sous forme cristalline contenant les analytes reste dans le fond du puits. La plaque est ensuite introduite dans l'appareil, la désorption va être possible par l'intermédiaire d'un laser (980 nm, 20 W) qui va frapper l'arrière du puits [161]. La forme du puits ainsi que sa composition en acier hexagonale va permettre un transfert de chaleur efficace et rapide [161]. Cette énergie transmise du laser, au puits, au dépôt de l'échantillon cristallisé va désorber sous forme neutre les analytes ainsi que les composés de la matrice [160, 161]. Le temps de désorption, la vitesse d'augmentation en puissance et la puissance du laser vont influencer la capacité de l'échantillon à être désorbé [161]. Une fois désorbés, ces

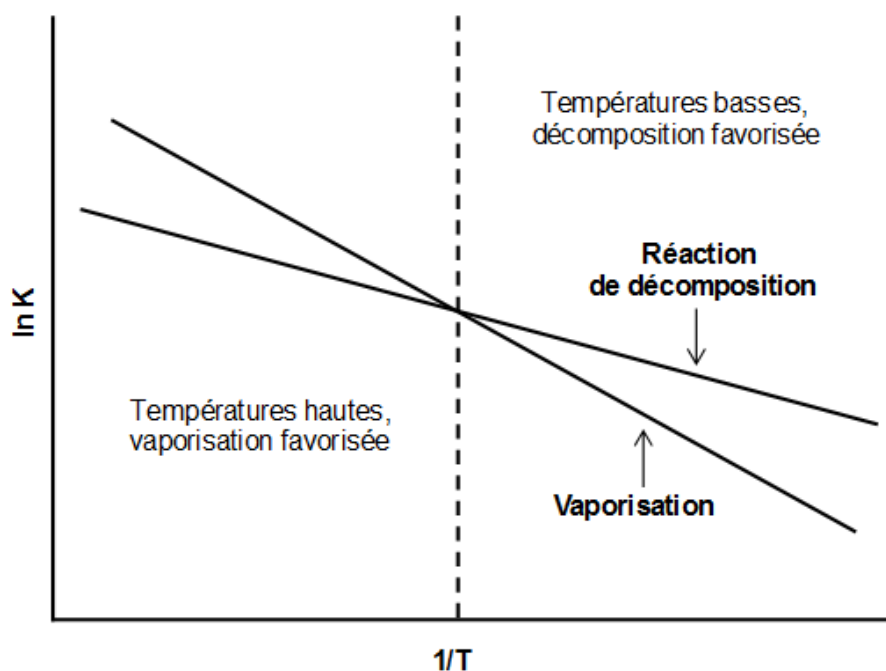
composés sous forme neutre vont être transférés par l'intermédiaire d'un gaz vecteur composé d'air vers l'APCI pour être ionisés [160-162].



**Figure 2-1.** Schéma de la LDTD-APCI adapté de Phytronix Technologies (Québec, Canada).

Les températures atteintes à l'arrière du puits sont généralement comprises entre 100 et 150°C. Le gaz vecteur qui a un débit entre 2 et 3 L min<sup>-1</sup> va refroidir l'échantillon rapidement après l'impact du laser à l'arrière du puits et ainsi limiter la dégradation des analytes. La vitesse de chauffage de la LDTD est de l'ordre de 3000°C s<sup>-1</sup> et permet à l'échantillon d'être chauffé à de hautes températures très rapidement [160]. Ce chauffage rapide a une grande importance et permet de minimiser le temps passé dans la région de décomposition décrite par le diagramme de Daves *et al.* d'après la théorie d'Arrhenius tout en favorisant la vaporisation des analytes (**Figure 2-2**) [163]. La fragmentation des analytes peut avoir lieu à des températures plus basses si l'on passe trop de temps dans la zone de décomposition. L'énergie d'activation pour vaporiser la molécule et briser les liaisons intermoléculaires entre la plaque LDTD et l'analyte doit être plus élevée que l'énergie d'activation de la décomposition. Si le chauffage se fait suffisamment rapidement et permet d'atteindre la zone située au-dessus du point de rencontre des deux droites, la vaporisation de la molécule sera favorisée [161, 163].





**Figure 2-2.** Diagramme de Daves *et al.* montrant la relation entre la température de vaporisation et la décomposition d'un composé non volatil et thermosensible d'après la théorie d'Arrhenius [163].

La LDTD-APCI comporte plusieurs avantages, notamment d'utiliser de faibles volumes d'échantillons. Elle permet aussi de faire l'acquisition du spectre de masse d'un échantillon en environ 15 secondes. La préparation d'échantillons doit alors être relativement simple et rapide pour concorder avec le faible temps d'analyse de cette technique alternative d'introduction d'échantillons. Plusieurs études qui ont utilisé la LDTD-APCI ont rapporté dans la littérature scientifique des résultats semblables à ce qui a été fait avec une chromatographie liquide. Une étude faisant l'analyse d'hormones dans des sédiments et dans des biosolides ont rapporté des limites de détection de l'ordre du  $\mu\text{g kg}^{-1}$  [164]. Boivert *et al.* ont fait l'analyse de pharmaceutiques dont le sulfaméthoxazole présents dans les eaux usées et ont obtenu des limites de détection de l'ordre d'une centaine de  $\text{ng L}^{-1}$  [165]. Segura *et al.* se sont intéressés à la présence de sulfamides dans le lait a rapporté des limites de détection comprise entre 0,5 et 4  $\mu\text{g L}^{-1}$  [166].

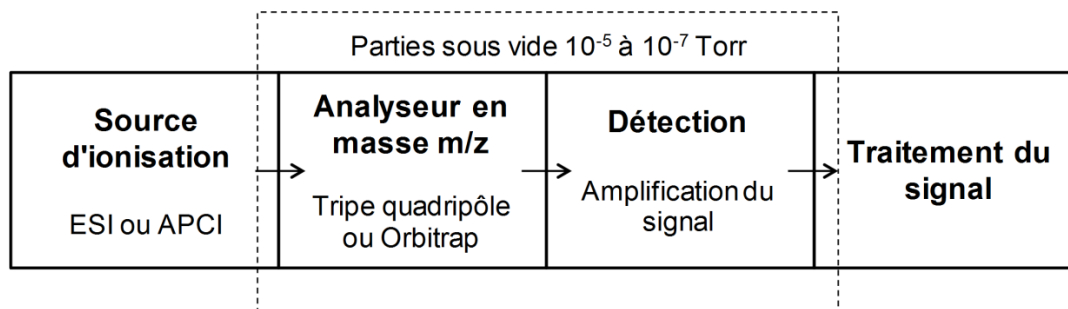
La LDTD-APCI ne permet pas de faire de séparation chromatographique avant analyse pour éviter les co-élutions des isomères de constitutions pouvant avoir des fragmentations similaires comme les tétracyclines et leurs produits de dégradation, isomères de constitution qui peuvent créer des faux positifs et ainsi une surestimation [161]. Par ailleurs, l'analyse de matrices chargées comprenant une grande quantité de composés interférant peut fortement diminuer la volatilisation des molécules. Une préparation d'échantillons avec une purification de l'échantillon efficace nécessitant plus de temps de préparation est alors nécessaire ce qui va à l'encontre du faible temps d'analyse proposé par cette méthode alternative. Enfin, toutes les molécules ne sont pas compatibles avec l'analyse par LDTD-APCI, les molécules très polaires par exemple ont plus de difficulté à être vaporisées et réagissent mal à l'APCI.

## 2.4 La spectrométrie de masse

### 2.4.1 Description générale

La spectrométrie de masse est une technique physique d'analyse basée sur la détermination et la séparation du ratio masse sur charge (*mass to charge ratio*,  $m/z$ ) des molécules permettant d'identifier ou de quantifier des composés d'intérêt [158, 167]. Cette technique permet l'analyse de mélanges complexes à l'état de traces lorsqu'elle est couplée à une technique séparative comme la LC ou la chromatographie gazeuse (*gas chromatography*, GC). Un spectromètre de masse se compose d'une source d'ionisation, d'un analyseur et d'un détecteur suivis d'un traitement du signal comme le montre la **Figure 2-3** [158]. Les composés analysés doivent tout d'abord être ionisés par une source d'ionisation préalablement à leurs entrées dans le spectromètre de masse. Les sources d'ionisation les plus utilisées pour analyser les contaminants émergents dans des matrices environnementales sont principalement l'ionisation par nébulisation électrostatique (*electrospray*, ESI) et l'APCI [158, 159]. L'analyseur situé dans la partie sous vide du spectromètre de masse après l'étape d'ionisation va faire la séparation des espèces ionisées suivant leur rapport  $m/z$  [167]. Dans cette étude, seuls les analyseurs quadripolaires et à haute résolution de type Orbitrap ou trappe ionique

orbitale ont été utilisés. Enfin, le détecteur va amplifier le signal avant traitement. Les sections suivantes vont décrire les spectromètres de masse utilisés pour analyser les antibiotiques.



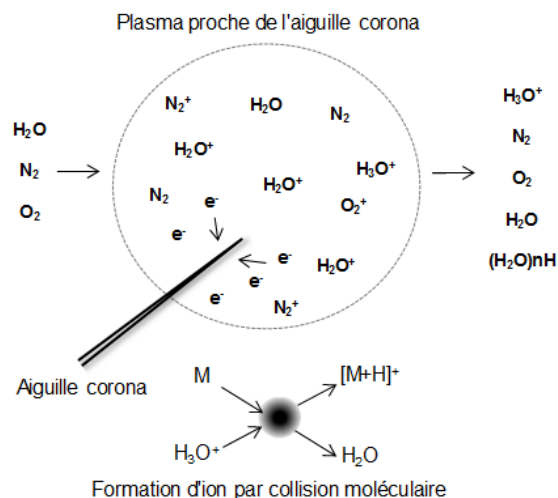
**Figure 2-3.** Structure générale d'un spectromètre de masse utilisé dans le cadre de cette thèse.

## 2.4.2 L'ionisation ESI et APCI

Il existe de nombreuses sources d'ionisation permettant de porter sous forme de gaz ou de vapeur des échantillons et d'ioniser les analytes de propriétés différentes (taille de la molécule, volatilité, stabilité thermique). On distingue l'ionisation douce qui ne fragmente pas la molécule lors de l'ionisation à l'ionisation forte qui produit des ions moléculaires issus de la fragmentation de la molécule. Seulement des ionisations de type douces (ESI et APCI) ont été utilisées dans notre étude.

Les sources APCI sont basées sur le transfert d'espèces chargées d'un ion réactif à une molécule en phase gazeuse. Le principe de l'ionisation positive par APCI est décrit dans la **Figure 2-4** [168, 169]. Dans un premier temps, les analytes ainsi que la phase mobile qui se rendent à l'APCI vont être vaporisées et désolvatées à des températures comprises entre 300 et 600°C dans le tube de vaporisation [168]. Dans le cas de la méthode LDTD-APCI décrite précédemment, la phase mobile est remplacée par un gaz vecteur composé d'air [160, 161]. Ce gaz va alors entraîner les analytes vers l'aiguille corona. Cette aiguille va appliquer une différence de potentiel de 3 à 5 kV qui va provoquer une décharge d'une intensité comprise entre 1 et 5  $\mu$ A. Des ions positifs vont être formés lorsque l'aiguille va capter des électrons alors que des ions négatifs seront formés si l'aiguille est maintenue à un potentiel négatif. Les

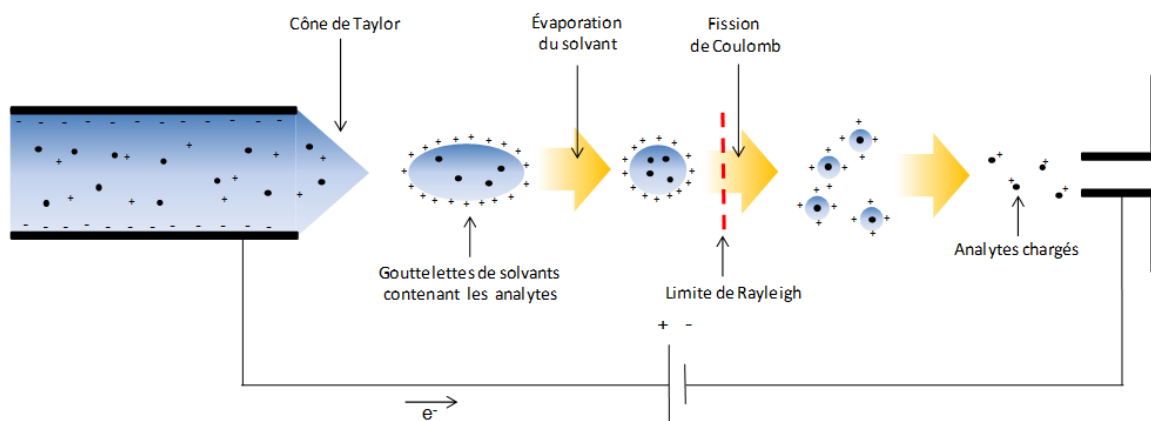
ions radicalaires ainsi formés vont participer aux réactions chimiques se produisant en phase gazeuse avec les molécules de gaz présent dans la source et ainsi ioniser les analytes [168, 170]. Les ions primaires formés par l'aiguille corona dans le mode positif sont soit  $N_2^+$ , soit  $O_2^+$ . Ceux-ci réagiront avec les molécules d'eau présentes pour former des ions secondaires et par transfert de protons aux analytes, des ions  $[M+H]^+$  seront formés [170, 171]. Cette technique d'ionisation robuste permet l'ionisation de petites molécules ayant une masse inférieure à 1500 Da, thermiquement stable, neutre ou moins polaire. Peu d'études utilisent l'APCI pour analyser les antibiotiques, toutefois, certaines études affirment que cette source d'ionisation est moins sensible aux effets matrices que l'ESI [119]. En effet, la suppression ionique est moins importante en APCI qu'en ESI dû au mécanisme de formation des ions. Il n'existe pas de compétition de charge ni de suppression de signal avec cette technique d'ionisation, mais plutôt une suppression de signal causée par la composition de l'échantillon [172]. Néanmoins, pour éviter les effets matrices plusieurs méthodes sont possibles : utilisation du mode négatif, dilution de l'échantillon et/ou surtout, amélioration de la préparation d'échantillon.



**Figure 2-4.** Mécanisme d'ionisation d'une molécule par APCI en mode positif adapté de De Hoffmann *et al.* et de Badjagbo *et al.* [168, 169].

L'ESI est une technique d'ionisation par nébulisation électrostatique couramment utilisée grâce à la facilité de couplage avec la chromatographie liquide et à sa sensibilité

élevée (**Figure 2-5**) [168]. L'électro-nébulisation est formée par l'application à pression atmosphérique, d'un potentiel élevé sur des gouttelettes de phase mobile contenant les analytes formées à l'extrémité d'un fin capillaire de silice. Le champ électrique est obtenu par l'application de différence de potentiel de 3 à 6 kV entre le capillaire et la contre-électrode [168]. Ce champ électrique va créer une accumulation de charge à la surface du liquide. Un cône de Taylor se forme à l'extrémité du capillaire lorsque la pression exercée par ces charges est supérieure à la tension superficielle. La surface du cône va alors se rompre et former des gouttelettes fortement chargées [168]. Les gouttelettes vont alors rétrécir à cause de l'évaporation du liquide et se fissionner dû à la répulsion coulombienne. Le rétrécissement de ces gouttelettes va mener à leur explosion due à la trop grande densité de charge et ainsi à la formation d'ions chargés (limite de Rayleigh) [168]. L'ESI permet aussi bien d'ioniser des macromolécules comme des protéines que des petites molécules comme les antibiotiques dans plusieurs types de matrices [173, 174].

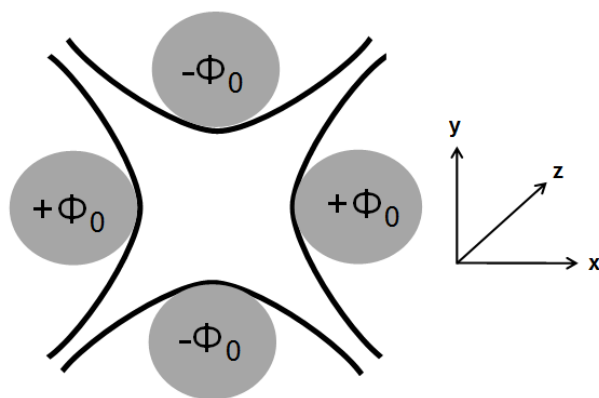


**Figure 2-5.** Schéma du mécanisme d'ionisation par nébulisation électrostatique en mode positif adapté de De Hoffmann *et al.* [168].

### 2.4.3 Le triple quadripôle

Le quadripôle (Q) est l'analyseur le plus répandu dans les spectromètres de masse et permet de séparer les ions par rapport à leur ratio  $m/z$ . Un schéma d'un quadripôle

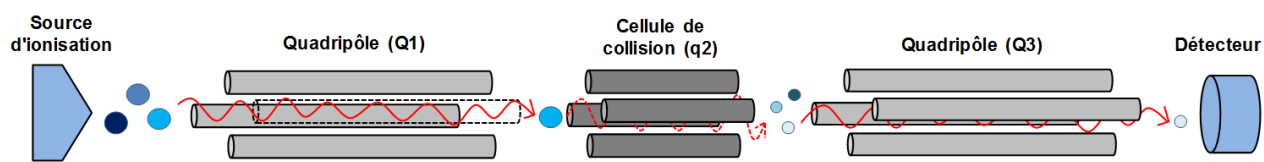
hyperbolique est présenté à la **Figure 2-6** [168]. L'application d'un champ électrique oscillant sur les quatre électrodes parallèles va influencer la stabilité de la trajectoire du faisceau d'ions. Les ions cheminant suivant l'axe  $z$  sont soumis à l'influence d'un champ alternatif quadripolaire résultant de l'application sur les électrodes des potentiels positifs ( $+\Phi_0$ ) et négatifs ( $-\Phi_0$ ). Pour pouvoir passer à travers le quadripôle et être accélérés, les ions doivent avoir une trajectoire stable, si leurs trajectoires sont instables, ils seront rejetés [168].



**Figure 2-6.** Schéma d'un quadripôle hyperbolique adapté de De Hoffmann *et al.* [168].

Le triple quadripôle est aujourd'hui l'appareil le plus populaire pour l'analyse de contaminants organiques dans tout type de matrices environnementales ou biologiques. Ce spectromètre de masse permet de faire de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) et est constitué d'un premier quadripôle Q1 faisant une première sélection ionique, suivi d'un quadripôle q2 servant de cellule de collision pour fragmenter les ions et d'un troisième quadripôle Q3 effectuant une deuxième sélection ionique comme le montre la **Figure 2-7** [168]. L'avantage de ce système réside dans la présence d'un quadripôle central permettant la fragmentation au milieu de deux analyseurs quadripolaires. Pour fragmenter les ions entrant dans q2, un gaz inerte, en général l'argon y est injecté provoquant la fragmentation par transfert d'énergie de l'argon à l'ion parent. Une partie de l'énergie cinétique du gaz va être convertie en énergie interne et va créer la fragmentation de l'ion. Les fragments ainsi produits seront par la suite analysés par Q3. Cette technique consiste à filtrer un ion précurseur avec Q1, le fragmenter avec q2 et sélectionner le fragment avec Q3. Cette approche sélective appelée suivi de réaction ciblée ou multiples fragmentations sélectives (*selected reaction*

*monitoring*, SRM ou *multiple reaction monitoring*, MRM) a été utilisée pour quantifier les antibiotiques. En plus de sa double sélectivité, cette technique est aussi sensible du fait de l'élimination du bruit de fond qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit. D'autres expériences sont possibles sur cet appareil comme le mode balayage complet (*full scan*, FS) permettant de balayer de large plage de masse, le mode suivi d'ion ciblé (*selected ion monitoring*, SIM) qui permet de sélectionner un ion parent avec Q1 et qui est principalement utilisé avec un simple quadripôle [168].



**Figure 2-7.** Schéma d'un triple quadripôle adapté de De Hoffmann *et al.* [168].

Un triple quadripôle couplé à la LDTD-APCI a été utilisé pour quantifier plusieurs antibiotiques vétérinaires dans le **Chapitre 3** pour sa sélectivité et sa sensibilité. Pour quantifier des contaminants organiques dans des matrices chargées avec précision sans risque d'avoir des cas de faux positifs, plusieurs paramètres doivent être vérifiés tels que : le temps de rétention, au minimum deux transitions de masses précurseurs-fragments et le ratio de ces deux transitions [175, 176]. De nombreuses études ont utilisé la spectrométrie de masse en tandem pour quantifier des antibiotiques dans diverses matrices [147, 177]. Jacobsen *et al.* ont fait l'analyse de tétracyclines, de sulfamides et de macrolides dans du lisier de porc et des sols agricoles et ont obtenu des limites de détection de quelques dizaines de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  pour le lisier et centaines de  $\text{ng kg}^{-1}$  pour les sols agricoles, malgré la complexité des matrices étudiées [144, 147]. Hirsch *et al.* ont fait l'analyse de plusieurs classes d'antibiotiques dans des eaux de surfaces et ont calculé des limites de détection de l'ordre de quelques dizaines de  $\text{ng L}^{-1}$  [177]. Malgré la sensibilité et la spécificité apportées par l'approche SRM, des cas de faux positifs ont été révélés avec l'utilisation d'un QqQ [178, 179]. Le faible pouvoir de résolution (RP) des quadripôles couplé à une mauvaise séparation chromatographique pouvant donner lieu à la co-élution de composés isobares sont susceptibles d'engendrer des faux positives [178]. C'est

pourquoi la spectrométrie de masse à haute résolution doit être considérée pour l'analyse de contaminants organiques dans des matrices complexes.

#### 2.4.4 La spectrométrie de masse à haute résolution

Depuis une dizaine d'années des spectromètres de masse à haute-résolution (*high-resolution mass spectrometer*, HRMS) disposant d'analyseurs capables d'avoir accès à la masse exacte comme le spectromètre de masse à temps de vol (*time of flight*, TOF) ou encore les Orbitrap sont devenus plus accessibles. Les HRMS étaient dans un premier temps utilisés principalement dans un but qualitatif, mais sont maintenant aussi utilisés pour quantifier des contaminants organiques grâce à l'apparition de systèmes hybrides dotés d'un quadripôle. On compare souvent la performance des analyseurs par leurs pouvoirs de résolution qui est définie par la capacité à fournir des signaux qu'on peut distinguer pour deux pics de masses voisines ( $m_1$  et  $m_2$ ). Il ne faut pas confondre la résolution avec le pouvoir de résolution. La résolution est la plus petite différence de masse entre deux pics de masses proches définies par  $\delta m = m_2 - m_1$ . Le pouvoir de résolution RP se calcule par  $RP = m/\delta m$ , avec  $m$  la masse du second pic et  $\delta m$  la plus petite différence de masse pour deux pics résolus. On admet que deux pics sont résolus quand l'intensité de la vallée entre ces pics égale 10% du pic le plus faible. Plusieurs appellations du pouvoir de résolution sont disponibles dans la littérature, notamment le pouvoir de résolution RP à *full width at half maximum* (FWHM) qui mesure  $\delta m_{50\%}$  à la moitié d'un pic résolu [158, 159, 168, 180]. C'est l'appellation que nous utiliserons dans ce manuscrit. Ainsi, l'habilité à distinguer des ions de composition élémentaire différente ayant des masses moléculaires très proches est déterminée par le pouvoir de résolution. Des pouvoirs de résolution importants sont donc nécessaires pour pouvoir distinguer des pics de masse très proches [158, 168, 180]. On estime qu'un spectromètre de masse est considéré à haute résolution si son pouvoir de résolution  $RP > 10\,000$  (FWHM à  $m/z$  200). Alors que les spectromètres de masse quadripolaire les plus efficaces sont capables d'atteindre un pouvoir de résolution autour de 1 000 (FWHM à  $m/z$  200), un TOF pourra atteindre un pouvoir de résolution de 60 000 (FWHM à  $m/z$  200) et un appareil doté d'un analyseur Orbitrap peut atteindre un pouvoir de résolution jusqu'à 600 000 (FWHM à  $m/z$  200) [180-182].



Les HRMS permettent une mesure précise des masses moléculaires ou masses mono-isotopiques. Une grande précision est alors nécessaire pour mesurer une masse avec justesse. La précision sur la masse mesurée par une valeur d'erreur mesurée en partie par million (ppm). Il s'agit en fait d'une comparaison de la masse exacte mesurée ( $Masse_{exp}$ ) et de la masse exacte théorique ( $Masse_{th}$ ) de la molécule étudiée. On la calcule avec la formule suivante :

$$Erreur (ppm) = \frac{Masse_{th} - Masse_{exp}}{Masse_{th}} \times 10^6$$

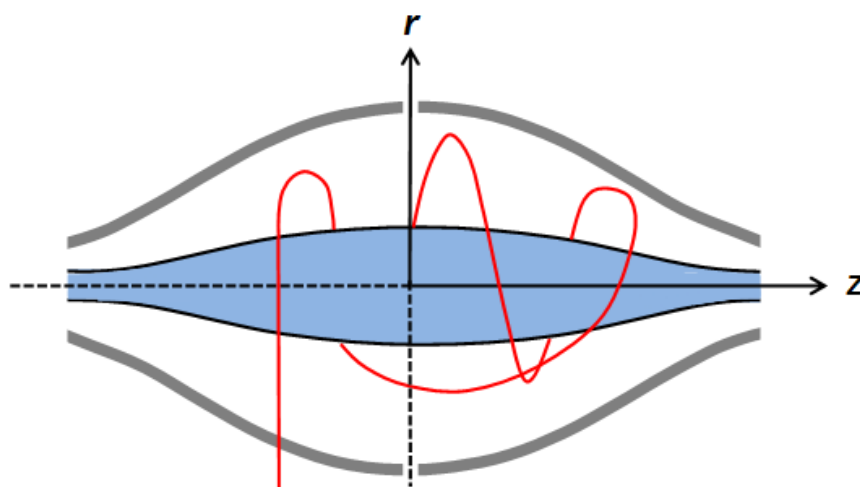
Une tolérance d'une erreur de 5 ppm maximum a été utilisée pour nos analyses par spectrométrie de masse à haute résolution ce qui permet d'acquérir une certaine spécificité dans nos analyses [183].

L'utilisation de la spectrométrie de masse à haute résolution dans le domaine environnemental comporte plusieurs avantages. Tout d'abord, son utilisation pour quantifier des contaminants organiques est intéressante puisqu'elle permet d'éviter des faux positifs provenant de composés isobares que le triple quadripôle n'est parfois pas capable de résoudre. Son utilisation en mode FS permet par ailleurs de balayer de larges plages de masse autant dans un but qualitatif que quantitatif avec la possibilité d'une analyse rétrospective. Enfin, avec l'aide d'un logiciel adapté au traitement des données générées par le spectromètre de masse à haute résolution, une recherche de contaminants non ciblée est possible.

### 2.4.5 L'Orbitrap

L'Orbitrap correspond à l'analyseur d'un HRMS basé sur un concept inventé par Alexander Makarov [184]. La **Figure 2-8** montre une vue en coupe de cette trappe. L'Orbitrap est constitué d'une électrode extérieure en forme de tonneau et d'une électrode centrale en forme de fuseau. Les ions sont injectés perpendiculairement à l'électrode interne par un petit interstice situé dans l'électrode extérieure. Une tension continue est appliquée entre les deux électrodes axiales. Les ions présents entre les deux électrodes se mettent alors à tourner selon une trajectoire elliptique d'un rayon  $r$  autour de l'électrode centrale tout en oscillant latéralement dans un mouvement périodique de va-et-vient le long de l'axe  $z$  ainsi leur

trajectoire dans l'espace ressemble à une hélice [182, 183]. Les oscillations axiales des ions dans la direction  $z$  dépendent seulement du rapport  $m/z$  en amplitude et en fréquence et pas de l'énergie cinétique des ions injectés, cette particularité donne un mouvement d'ion cohérent [182, 183]. Par ailleurs, les ions arrivent entre les deux électrodes par paquet d'ions d'une même masse avec quelques nanosecondes de différence. Cette différence de temps d'injection permet de donner un mouvement cohérent aux ions d'une même masse et de réduire l'effet de charge d'espace [183]. Cette cohérence procure une détection sensible et donne accès à la haute résolution, par ailleurs, les ions dont le mouvement n'est pas cohérent autour de l'électrode centrale ne donnent pratiquement pas de bruit de fond [183]. Le courant induit par les oscillations de ces ions est mesuré de manière différentielle entre les deux électrodes puis amplifié et enfin converti par la méthode de la transformée de Fourier en fréquence. On déduit ensuite la masse et l'intensité correspondantes qui constituent le spectre de masse [168, 180, 183].



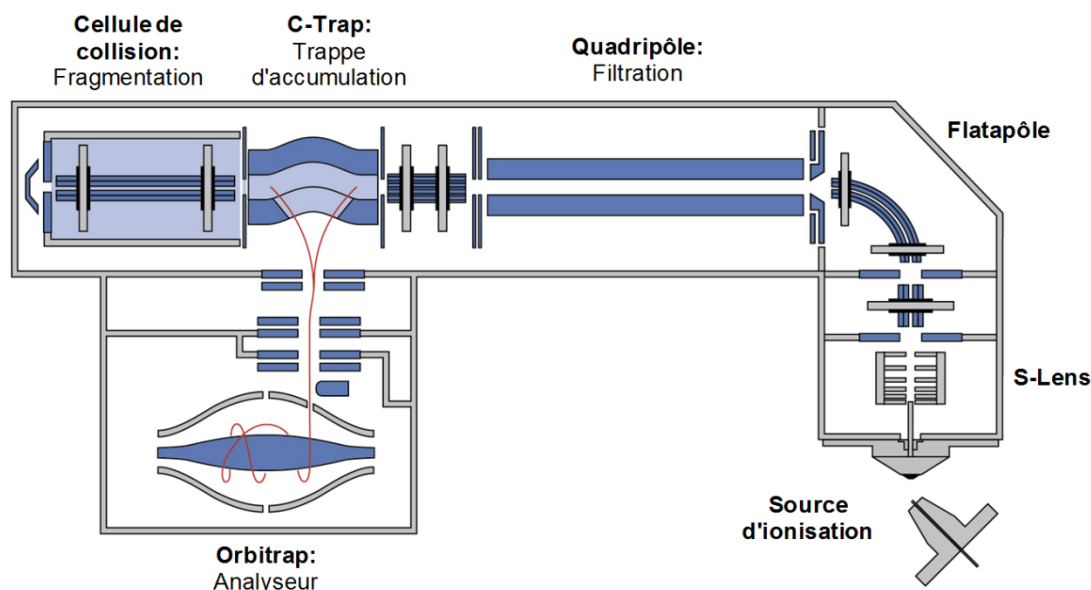
**Figure 2-8.** Schéma de l'Orbitrap selon une coupe axiale adapté de Thermo Fisher Scientific.

L'Orbitrap est très utilisé dans les domaines de la protéomique et de la métabolomique. Il permet aussi de faire du dépistage de plusieurs centaines de contaminants grâce à la possibilité de balayer de larges plages de masse en mode FS ce qui est très utile pour la recherche de composés. Hurtaud-Pessel *et al.* ont utilisé l'Orbitrap couplé à la chromatographie liquide pour faire le dépistage non ciblé des antibiotiques vétérinaires

présents dans la viande de porc. Ils ont trouvé 63 antibiotiques ayant des  $m/z$  compris entre 215 et 1042 ainsi que plusieurs produits de dégradation dans leurs échantillons [185]. Ces appareils ne peuvent toutefois pas limiter la plage de masse analysée et ne disposent pas de système permettant une fragmentation. Le développement de spectromètre de masse à haute résolution hybride disposant d'un quadripôle en amont de l'analyseur et d'une cellule de collision permettant de faire la fragmentation des ions a permis d'étendre les possibilités d'analyse avec ces types d'appareils.

#### 2.4.6 Le Q-Exactive

Le Q-Exactive est un HRMS hybride produit par la compagnie Thermo Fisher Scientific doté d'un quadripôle avant l'Orbitrap et d'une cellule de collision. Cet appareil très polyvalent qui peut aussi bien être utilisé pour l'identification et la caractérisation de grosse molécule que pour la quantification de petites molécules [186]. Un schéma du Q-Exactive est présenté à la **Figure 2-9** décrivant les différentes parties de ce spectromètre de masse. Après ionisation, les ions vont être dirigés vers le *S-Lens* constitué d'une série de lentilles qui va accélérer et transmettre les ions dans le système. Le *S-Lens* va augmenter la quantité d'ions transmis dans le spectromètre de masse comparé au système précédent et permettre une plus grande sensibilité. Ce faisceau d'ions est ensuite dirigé vers le quadripôle par l'intermédiaire du flatapôle. Le quadripôle va filtrer le faisceau d'ions pour obtenir la gamme de masse désirée ou sélectionner un ou plusieurs ions en particulier. Ces ions vont ensuite être accumulés dans une trappe d'accumulation, la *C-Trap* ou être fragmentés dans la cellule de collision avant analyse par l'Orbitrap. La possibilité de filtrer et de fragmenter les ions pour former des ions produits avant leur analyse par l'Orbitrap est un fonctionnement comparable à celui du triple quadripôle avec toutefois des différences. Le Q-Exactive donne accès à la masse exacte par l'intermédiaire de l'Orbitrap et accumule les ions par l'intermédiaire de la *C-Trap* avant analyse contrairement au triple quadripôle qui fonctionne en continu [186, 187]. En ce qui concerne les spécifications techniques, le Q-Exactive a un pouvoir de résolution allant de 17 500 à 140 000 (FWHM à  $m/z$  200) et une gamme de masse pouvant atteindre  $m/z$  6 000.



**Figure 2-9.** Schéma du Q-Exacte adapté de Thermo Fisher Scientific.

Plusieurs modes d'acquisitions disponibles sur le Q-Exacte sont comparables avec ceux utilisés sur un triple quadrupôle et peuvent être utilisés en fonction du type d'analyse recherché [188]. Le mode FS permet de balayer de larges gammes de masses sélectionnées par le quadrupôle. Ce mode peut être aussi bien utilisé dans un but qualitatif que quantitatif et donne une grande quantité d'information sur l'échantillon analysé. Le quadrupôle peut aussi sélectionner plusieurs ions spécifiques et les accumuler dans la *C-Trap* avant analyse par l'Orbitrap pour avoir accès au mode SIM dans un but quantitatif. L'expérience MS/MS appelée suivi des réactions de fragmentation parallèle (*parallel reaction monitoring*, PRM) est aussi possible en sélectionnant les ions désirés avec le quadrupôle et en les fragmentant dans la cellule de collision pour analyser les ions fragments avec l'Orbitrap. Fedorova *et al.* ont fait l'analyse de plusieurs drogues d'abus présentes dans les eaux usées avec ce mode et ont obtenu des limites de quantification comprises entre 1,5 et 11 ng L<sup>-1</sup> [189]. C'est ce mode d'analyse qui a été utilisé pour quantifier les antibiotiques vétérinaires dans notre étude pour sa spécificité et sa capacité à filtrer une grande partie des composés interférant par l'intermédiaire du quadrupôle. Le mode FS a été plus utilisé dans un but qualitatif, mais il peut aussi être utilisé pour quantifier les contaminants. L'identification de contaminants notamment

des métabolites des antibiotiques vétérinaires a été réalisée en utilisant le mode d'acquisition par données dépendantes (*data-dependant acquisition*, DDA) couplé au mode FS qui consiste à balayer une large plage de masse et de fragmenter tous les ions (ou certains préalablement choisis dans une liste) ayant une intensité supérieure à un seuil choisi. Ce mode peut être très utile pour confirmer la présence d'un contaminant par comparaison du patron de fragmentation obtenu dans un échantillon avec celui obtenu un standard. Wang *et al.* ont identifié et quantifié 451 résidus de pesticides présents sur des fruits en utilisant ce mode d'analyse [190]. Par ailleurs avec l'aide d'un logiciel adapté à la recherche non ciblée et d'une base de données, les données du mode FS peuvent permettre de faire un dépistage non ciblé de contaminants en reliant la masse exacte mesurée à une structure moléculaire [190]. Weiss *et al.* ont utilisé ce principe pour identifier huit composés non identifiés provenant d'un essai biologique [191]. Finalement, le Q-Exactive est un outil analytique intéressant pour l'analyse environnementale permettant aussi bien la quantification de contaminants organiques, l'identification et la recherche d'inconnus ou de métabolites.

## 2.5 Problématiques et objectifs des travaux de recherche

L'étude et le contrôle des résidus pharmaceutiques comme les antibiotiques vétérinaires issus de l'élevage intensif des porcs sont nécessaires étant donné la bioactivité de ces composés et les problèmes sanitaires qu'ils peuvent engendrer. Pour cela, des méthodes d'analyse sensibles, spécifiques et robustes sont nécessaires pour contrôler et recenser ces molécules qui peuvent potentiellement être déversées dans l'environnement par l'intermédiaire de l'épandage de lisier sur les champs agricoles.

Les techniques analytiques qui ont été développées jusqu'à aujourd'hui pour analyser ces produits pharmaceutiques sont principalement basées sur la spectroscopie et la spectrométrie de masse [91, 142, 146, 147]. Elles permettent de quantifier les antibiotiques vétérinaires présents dans des matrices environnementales comme les sols agricoles ou les eaux de surface à des niveaux de concentration relativement bas ( $\mu\text{g kg}^{-1}$  –  $\text{ng L}^{-1}$ ). Toutefois, peu d'études proposent des méthodes analytiques pour recenser ces contaminants organiques à

la source du déversement, c'est-à-dire dans le lisier. Par ailleurs, elles manquent parfois de sélectivité et de sensibilité et ont révélé être sujettes aux faux positifs étant donné la complexité des échantillons étudiés. De nombreuses méthodes d'analyse non ciblées ont été développées récemment pour faire le criblage de plusieurs classes de contaminants organiques dans différentes matrices, mais aucune n'a été développée pour rechercher les pharmaceutiques vétérinaires dans le lisier. Enfin, beaucoup de ces méthodes analytiques se concentrent sur l'analyse des composés parents, mais peu permettent le dépistage et l'analyse des métabolites et des produits de dégradation issue de la biotransformation et de la dégradation de ces composés.

Compte tenu de l'énoncé de ces problématiques, cette thèse présente le développement de méthodes d'analyses alternatives, sensibles, sélectives et robustes afin de répondre aux lacunes du domaine et améliorer le recensement de ces molécules biologiquement actives à la source du déversement en utilisant les dernières avancées en terme de spectrométrie de masse.

Dans un premier temps, les principaux antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire ont été répertoriés et recensés. Cette étude s'est concentrée exclusivement sur les antibiotiques les plus utilisés pour l'élevage des porcs au Canada et les plus cités dans la littérature scientifique. Une liste des antibiotiques à étudier a été établie à partir d'une liste des limites maximales de résidus d'antibiotiques que l'on peut retrouver dans la viande de porc fournie par le gouvernement canadien [42].

Dans ce contexte, deux méthodes d'analyse permettant d'analyser quantitativement plusieurs classes d'antibiotiques dans des échantillons de lisier de porc ont été développées. La première s'appuie sur le couplage LDTD-APCI-MS/MS avec comme objectif d'analyser de manière ultra rapide différentes classes d'antibiotiques vétérinaires avec une technique alternative. La deuxième méthode, quant à elle, est basée sur le couplage LC-HRMS dans l'objectif de mesurer les tétracyclines de manière sensible et sélective tout en évitant les cas de faux positifs par l'intermédiaire de la haute résolution [145].

Dans le but d'améliorer le dépistage et l'identification d'antibiotique vétérinaire dans des matrices issues de l'élevage intensif des porcs, une méthode d'analyse qualitative non ciblée a été développée en utilisant la HRMS. Cette méthode permet la recherche et

l'identification simultanées de plusieurs classes d'antibiotiques et de pharmaceutiques dans un échantillon de lisier avant une analyse ciblée et spécifique.

Enfin, les méthodes d'analyses préalablement développées ont été adaptées et étendues à d'autres classes d'antibiotiques afin d'étudier le devenir des antibiotiques ainsi que leurs métabolites et produits de dégradation dans des échantillons environnementaux issus d'un champ expérimental fertilisé par du lisier.

## 2.6 Structure de la thèse

La thèse est divisée en plusieurs chapitres qui sont organisés en fonction du développement et de l'avancement analytique qu'ils apportent dans l'analyse quantitative et qualitative des antibiotiques vétérinaires dans des matrices environnementales et biologiques faisant partie du domaine agricole.

Le **Chapitre 3**, un article publié dans le journal *Talanta*, décrit le développement d'une méthode d'analyse utilisant la LDTD couplée à la spectrométrie de masse en tandem pour quantifier 4 antibiotiques utilisés couramment dans la médecine vétérinaire dans le lisier de porc. Les échantillons sont traités par SPE manuelle en utilisant une cartouche échangeuse cationique.

Le **Chapitre 4**, un article publié dans le journal *Analytica Chimica Acta*, traite d'une méthode d'analyse quantitative des tétracyclines dans le lisier de porc par chromatographie liquide couplée à un HRMS hybride, quadripôle-Orbitrap. Deux modes d'analyses disponibles, PRM et FS, ont été comparés afin de déterminer l'approche la plus sélective pour quantifier les tétracyclines dans une matrice biologique chargée.

Le **Chapitre 5**, un article publié dans le journal *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, fait la description du développement d'une méthode d'analyse non ciblée par HRMS afin de rechercher et d'identifier des pharmaceutiques vétérinaires dans le lisier. Le traitement des données a été fait avec un logiciel habituellement utilisé dans le domaine de la métabolomique.

Le **Chapitre 6**, un article publié dans le journal *Science of the Total Environment*, fait l'analyse quantitative et étudie le devenir de plusieurs classes d'antibiotiques vétérinaires dans les sols et les eaux de drainage d'un champ fertilisé avec du lisier de porc contenant des antibiotiques. L'analyse de ces antibiotiques a été faite avec une adaptation des méthodes analytiques décrites dans le **chapitre 4 et 5**. Parallèlement, une identification et une semi-quantification des principaux produits de dégradation des tétracyclines ont été réalisées.

Le **Chapitre 7** comprend une conclusion générale de la thèse ainsi que les perspectives futures concernant l'analyse des antibiotiques vétérinaires.



### **Chapitre 3. Analyse de la triméthoprime, lincomycine, sulfadoxine et tylosine dans le lisier de porc par désorption thermique par diode laser-ionisation chimique à pression atmosphérique-spectrométrie de masse en tandem**

---

Analysis of trimethoprim, lincomycin, sulfadoxin and tylosin in swine manure using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry

Morgan Solliec, Daniel Massé and Sébastien Sauvé,

2014,

*Talanta*, 2014, 128 : 23-30

#### **Note sur ma contribution**

*Ma participation aux travaux de recherche* : J'ai conçu le design expérimental avec l'aide de mon superviseur. J'ai effectué les manipulations pour valider la méthode et fait l'interprétation des résultats.

*Rédaction* : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires du Prof. Sébastien Sauvé, mon directeur de thèse.

## Abstract

A new extraction method coupled to a high throughput sample analysis technique was developed for the determination of four veterinary antibiotics. The analytes belong to different groups of antibiotics such as chemotherapeutics, sulfonamides, lincosamides and macrolides. Trimethoprim (TMP), sulfadoxin (SFX), lincomycin (LCM) and tylosin (TYL) were extracted from lyophilized manure using a sonication extraction. McIlvaine buffer and methanol (MeOH) were used as extraction buffer, followed by cation-exchange solid phase extraction (SPE) for clean-up. Analysis was performed by laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical-ionization (LDTD-APCI) tandem mass spectrometry (MS/MS) with selected reaction monitoring (SRM) detection. The LDTD is a high throughput sample introduction method that reduces total analysis time to less than 15 seconds per sample, compared to minutes when using traditional liquid chromatography (LC). Various SPE parameters were optimized after sample extraction: the stationary phase, the extraction solvent composition, the quantity of sample extracted and sample pH. LDTD parameters were also optimized: solvent deposition, carrier gas, laser power and corona discharge. The method limit of detection (MLD) ranged from 2.5 to 8.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  while the method limit of quantification (MLQ) ranged from 8.3 to 28  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Calibration curves in the manure matrix showed good linearity ( $R^2 \geq 0.996$ ) for all analytes and the interday and intraday coefficients of variation were below 14%. Recoveries of analytes from manure ranged from 53 to 69%. The method was successfully applied to real manure samples.

**Keywords:** Laser diode thermal desorption, veterinary antibiotics, mass spectrometry, swine manure

### 3.1 Introduction

In the past few decades, veterinary antibiotics have been widely used in swine breeding [19]. They have been administered routinely at therapeutic doses to prevent diseases, improve feed efficiency and accelerate growth, and as a result, huge quantities have been used for swine husbandry. However, all these antibiotics are not absorbed by the animals and a significant portion is excreted in the feces and urine and end up in the manure. Those antibiotics enter the environment through the land application of manure as organic fertilizer and can potentially contribute to bacterial resistance [51, 64, 192]. For several years, researchers have studied the anaerobic digestion of swine manure slurry [193]. They are now trying to understand the biodegradation of veterinary antibiotics in swine manure. Thus, robust analytical methods are necessary in order to quantitate and measure the degradation of these compounds. Various authors have dealt with the analysis of veterinary antibiotics in manure or other matrices (soils, wastewaters, animal meat, etc.) and they almost systematically use liquid chromatography (LC) before analysis by tandem mass spectrometry (MS/MS) [62, 144, 146, 147, 194, 195]. This article explores an original analytical approach for the analysis of veterinary antibiotics in manure which switches from using a time consuming method based on LC-MS/MS (measured in minutes) with an ultrafast analytical methods based on laser diode thermal desorption (LDTD) coupled to MS/MS (measured in seconds).

Most of the methods proposed in the literature for the analysis of antibiotics use LC and require time-consuming preparation steps such as solid phase extraction (SPE) with solid liquid extraction (SLE), followed by evaporation to dryness and reconstitution in the solvent selected for analysis [145, 195, 196]. Moreover, for LC techniques using ultraviolet or fluorescent detection, a derivatization step is usually required prior to analysis [145]. Therefore sample preparation and chromatography require several minutes. The global objective of this study is to develop an original, simple, sensitive, robust and fast method to extract and quantify veterinary antibiotics from a complex dirty matrix like swine manure. This method requires the use of an LDTD interface to permit high throughput sample introduction. The LDTD is coupled to an atmospheric pressure chemical ionization (APCI)

source which precedes a triple-quadrupole MS instrument capable of MS/MS determinations. This method was applied to four different antibiotics: trimethoprim (TMP), sulfadoxin (SFX), lincomycin (LCM) and tylosin (TYL) which are among the most widely used antibiotics in veterinary medicine for swine production. The sample preparation time is minimized to an ultrasonic extraction followed by SPE and only one evaporation step. Ultrasonic extraction using a solution of methanol (MeOH), McIlvaine buffer and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used for the extraction of the target analytes [145, 197, 198]. Efficient clean-up was required, therefore a cation exchange cartridge was used to strongly retain the target analytes to the sorbent and allow the use of organic solvents to remove a large portion of the interfering matrix. This clean-up is crucial because no chromatographic separation occurs using the LDTD-APCI prior to MS/MS detection. The method was tested and validated with freeze-dried manure from the experimental farm of Agriculture and Agri-food Canada (Sherbrooke, QC, Canada). Method performance was evaluated by the determination of extraction recovery, linearity, precision, repeatability and limits of detection and quantification. The determination of target compounds at  $\mu\text{g}$  per kilogram in swine manure was performed to confirm the applicability of the method in real environmental samples.

LDTD-APCI is an alternative sample introduction technique without a separation step like LC or gas chromatography (GC) prior to detection. For that reason, LDTD-APCI technology permits the virtual elimination of chromatographic columns and mobile phase, thus drastically reducing analysis time, sample preparation and analysis costs while increasing sample throughput. In fact, the LDTD-APCI is coupled to MS/MS and reduces total analysis time to 15 seconds compared to minutes with LC coupled to MS/MS. The LDTD technology is based on the volatilization and on the physicochemical properties of the compound. An IR laser diode beam hits the back of the sample well (metal bottom) and the target sample is volatilized by the heat-gradient that is thus generated. In a second step, the compounds are transferred with a gas flow and ionized in the APCI before entering the MS/MS. To the best of our knowledge, there are no published methods using LDTD or similar APCI-based approaches to quantify veterinary antibiotics in swine manure. Some analytical methods have been published on LDTD-APCI-MS/MS and it has so far been applied in toxicology [199, 200], pharmaceutical [165], environmental samples such as endocrine disruptors in

wastewaters [161], municipal sludge and aquatic sediments [164]; and sulfonamides in dairy milk [166]. The schematic and assembly of the LDTD-APCI source apparatus have previously been detailed [162].

## **3.2 Materials and methods**

### **3.2.1 Chemicals, reagents and stock solutions**

LCM (purity  $\geq 89.1\%$ ), SFX (purity  $\geq 99.9\%$ ), TMP (purity  $\geq 99.5\%$ ), TYL (purity  $\geq 83.8\%$ ) and spiramycin (SPI, purity  $\geq 90.0\%$ ) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Isotopically-labeled trimethoprim, [ $^{13}\text{C}_3$ ]-trimethoprim ([ $^{13}\text{C}_3$ ]-TMP) used as internal standard (IS, purity  $\geq 99\%$ ), was obtained from ACP Chemical Inc. (Montreal, QC, Canada). All solvents used were of HPLC grade purity from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada) and deionized/distilled water (dd- $\text{H}_2\text{O}$ ) was used for dilutions. Individual stock solutions were prepared in MeOH at a concentration of  $1\,000\text{ mg L}^{-1}$  and kept at  $-20^\circ\text{C}$  for a maximum of 6 months. Individual intermediate solutions were prepared by dilution of the  $1\,000\text{ mg L}^{-1}$  stock solution in MeOH. Given the potential for degradation of the target analytes [201], working solutions were prepared daily at a concentration of  $1\text{ mg L}^{-1}$  by dilution in MeOH from individual intermediate stock solution. Sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , purity  $\geq 99.0\%$ ), citric acid ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , purity  $\geq 99.5\%$ ) and EDTA disodium salt dihydrate ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , purity  $\geq 99.0 - 101\%$ ) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO).

### **3.2.2 Swine manure**

Swine manure was obtained from the Dairy and Swine Research and Development Centre of Agriculture and Agri-Food Canada (Lennoxville, QC, Canada). Manure samples were collected in plastic flasks, homogenized and freeze-dried in Lennoxville. All the samples

were kept at 6°C until analysis. This manure does not contain target analytes and was used for all method validation tests.

### 3.2.3 Extraction and clean-up

Approximately 100 mg of freeze-dried manure was weighted into a 15 mL conical-bottom centrifuge tubes from Kimble Chase (Rockwood, TN) and 5 mL of extraction buffer MeOH/McIlvaine/EDTA (50:45:5, v/v/v) at pH 5 was added. McIlvaine buffer (20 mL) was prepared by mixing 9.70 mL of 0.1 M citric acid and 10.30 mL of 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The tubes were mixed for 1 min on a vortex and were subsequently placed into an ultrasonic bath for 15 min. They were then centrifuged at approximately 2 750 rpm for 15 min. The supernatant was collected into a 15 mL brown glass tube. These extractions were repeated twice but 50 µL of acetonitrile (ACN) were added for the second extraction, before the centrifugation step, to help proteins precipitation [194].

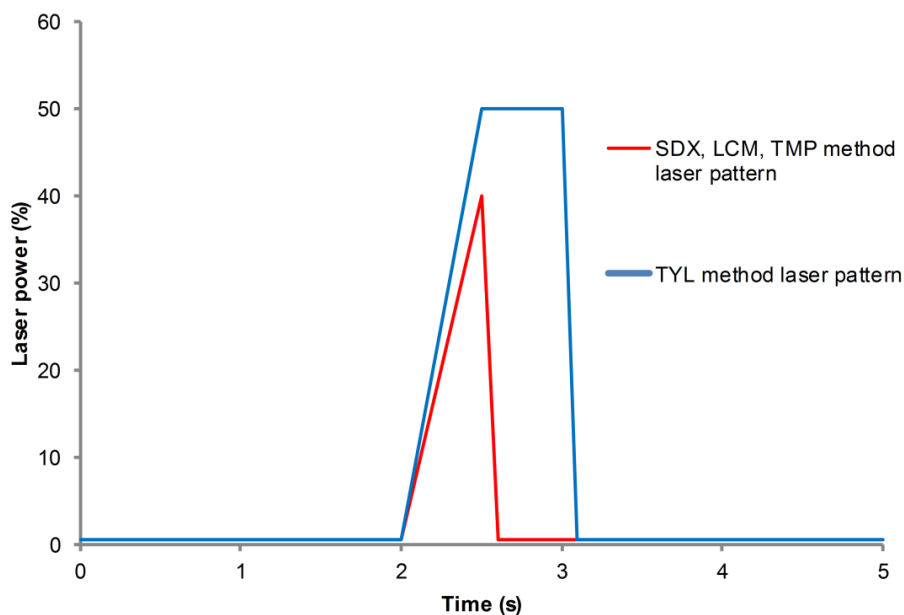
SPE was done using a 12-position manifold manufactured by Phenomenex (Torrance, CA). Strong cation mixed mode phase Strata-X-C (surface-modified styrene divinylbenzene polymer) cartridges with a total volume of 6 mL and a 200 mg bed mass from Phenomenex were used to wash the sample extracts. Multiple SPE parameters were optimized: cartridge type, loading step, loading flow rate, washing step and sample pH. The SPE cartridges were conditioned with 2 × 5 mL of MeOH and 2 × 5 mL of dd-H<sub>2</sub>O acidified at pH 4. Samples were loaded on the cartridge column at a flow rate of 2-3 mL min<sup>-1</sup> by applying negative pressure using a mechanical pump. The SPE cartridges were washed with 2 × 5 mL of MeOH followed by 2 × 5 mL of ethyl acetate (EtAc). The analytes were eluted with 2 × 5 mL of MeOH/NH<sub>4</sub>OH (95:5, v/v) at pH 9 into conical-bottom centrifuge tubes. Before evaporation, eluates were filtered on 0.45 µm pore size fiberglass membranes from Whatman (Piscataway, NJ) to eliminate particulate materials. The eluates were then evaporated to total dryness under a gentle stream of nitrogen at 40°C with a nine-port Reacti-vap unit from Pierce (Rockford, IL) and then reconstituted to 200 µL with MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) for LDTD-APCI-MS/MS analysis.

### 3.2.4 LDTD-APCI-MS/MS

Desorption and ionization of target veterinary antibiotics was performed with the T-960 LDTD-APCI ionization source controlled by the LazSoft 4 Software, developed and manufactured by Phytronix Technologies (Québec, Canada) and data integration was performed using the Xcalibur™ 2.0 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). For analyte detection, LDTD-APCI was mounted on a Quantum Ultra AM triple quadrupole mass spectrometer by Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). Ionization was performed in positive mode (PI). Sample solutions (3  $\mu\text{L}$ ) were spotted into a 96-well LazWell® plate (Phytronix Technologies, QC, Canada) containing inserts made of proprietary stainless steel alloy and then dried at 40°C for 5 minutes until complete solvent evaporation. The loaded LazWell® plate was then transferred into the LDTD housing unit. An infrared (IR) laser diode (980 nm, 20 W) was then focused to impact the back of the inserts, thermally desorbing the dried sample which is vaporized into the gas phase. The uncharged molecules travel along the transfer tube with a carrier gas (medical grade purified air). Upon reaching the corona discharge region, they are ionized by the APCI and then transferred to the MS inlet (see details in Supporting Information - **Figure S3-1**).

The LDTD-APCI optimization for MS/MS conditions in PI mode was performed by depositing the standard analytes of interest and the corresponding internal standard (IS) at a concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> in the well plate inserts. Analytes were spotted into the sample well once reconstituted in a MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) solution following SPE with a deposition volume of 3  $\mu\text{L}$ . Optimization of LDTD-APCI parameters was performed in pre-concentrated extraction samples in order to account for the matrix effects. The LDTD-APCI source parameters were set as follow : capillary temperature at 350°C, a discharge current of 3.6  $\mu\text{A}$  in PI mode, a carrier gas temperature of 50°C, a carrier gas flow set at 3.0 L min<sup>-1</sup>, the ion sweep gas set at 0.3 (arbitrary unit). The sheath gas, the auxiliary gas, the skimmer offset and the vaporizer temperature were set to 0. The final laser pattern for SDX, LCM and TMP consisted of a 0.5 s initial linear ramp from 0% to 40% with no holding time at the maximum power before shut-down. For TYL, the laser pattern consisted of 0.5 s initial linear ramp from

0% to 50% with a holding time of 1 s before shut-down. The two laser patterns of the target analytes are illustrated in **Figure 3-1**.



**Figure 3-1.** Illustration of LDTD laser pattern for SDX, LCM and TMP method and TYL method.

The respective relative intensity ratios per compound were used in selected reaction monitoring (SRM) mode for detection and quantification. Optimization of MS/MS parameters was done with the following settings: collision gas (Ar) pressure at 1.5 mTorr, resolution for  $Q_1/Q_3$  was set at 0.7 u and scan time was set at 0.005 s. The different SRM transitions and their optimized parameters for the quantification and confirmation of target analytes are shown in Supporting Information **Tableau S3-1**.

### 3.2.5 Validation of LDTD-APCI-MS/MS method

A minimum of two SRM transitions and their relative intensity ratios were used to avoid false positive and confirmed the presence of the compounds of interest. The instrument response was determined as the ratio of the analyte area to that of the IS. The method limit of



detection (MLD) and the method limit of quantification (MLQ) were determined as 3.3 and 10 times, respectively, the standard deviation of the y intercept divided by the slope of the calibration curve in matrix sample. The most intense transition was used for quantification and the second weaker transition was used for confirmation.

The recovery values for the SPE method were evaluated using concentrations of 100, 250 and 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . During the SPE optimization, three sets of samples were prepared to determine the extraction recovery. Extraction recoveries were determined by comparing mean peak area ratios of target analytes spiked prior to extraction in manure samples with those of the target analytes spiked in post-extraction manure samples in triplicate and were reported in percentage. Un-spiked manure sample were also extracted to account for their presence in the recovery values. The IS was added after the extraction and before the reconstitution step to calculate the extraction recovery. In the case of manure samples containing antibiotics, the IS was added before the extraction step to correct analytes losses in handling.

The repeatability (intra-day precision, expressed as relative standard deviation, in %) was evaluated by analysis of the same spiked sample at 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ten times on a single workday. Reproducibility (interday precision) was also calculated by spiking an extracted sample at 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  freshly prepared each day during 3 days. The Statistical Package for Social Science (SPSS 13.0, Chicago, IL), ANOVA and post hoc Tukey's *b* test were used to compare the signal intensities for the optimization of the LDTD-APCI parameters and were performed with statistical significance defined as *p*-value < 0.05.

### **3.3 Results and discussion**

#### **3.3.1 Manure characteristics**

Because swine manure is a complex matrix consisting of feces, urine, feed residues, straw and wash waters, several analyte-matrix interactions and possible impurities must be considered during method development. Manure consists largely of organic matter and

nutrients but may also contain substantial amounts of proteins and lipids. The organic matter of swine manure is mainly composed of low molecular weight compounds and a high content of functional groups such as carboxylic acids and phenols which contain a lot of potential binding sites for the target molecules based on hydrogen bonding and ion-exchange [202]. The higher molecular weight organic matter constituents are more hydrophobic substances which could make hydrophobic interactions with van der Waals forces. The sorption coefficient ( $K_d$ ) for TYL in manure is between 39 and 108 L kg<sup>-1</sup> [75]. To the best of our knowledge, sorption coefficients of TMP, LCM and SFX in manure have not been investigated, but  $K_d$  for sulfonamide in soil-manure (50:1) mixture was 0.59 - 1.18 L kg<sup>-1</sup> [75]. Thus, TYL is expected to show stronger retention on manure than SFX. Tylosin is excreted in parent and metabolites from livestock, desmycosin, macrosin and relomycin (TYL B, C and D) are the most known degradation products. Moreover, TYL degrades rapidly in metabolites in swine manure [203, 204].

### 3.3.2 Manure extraction method development

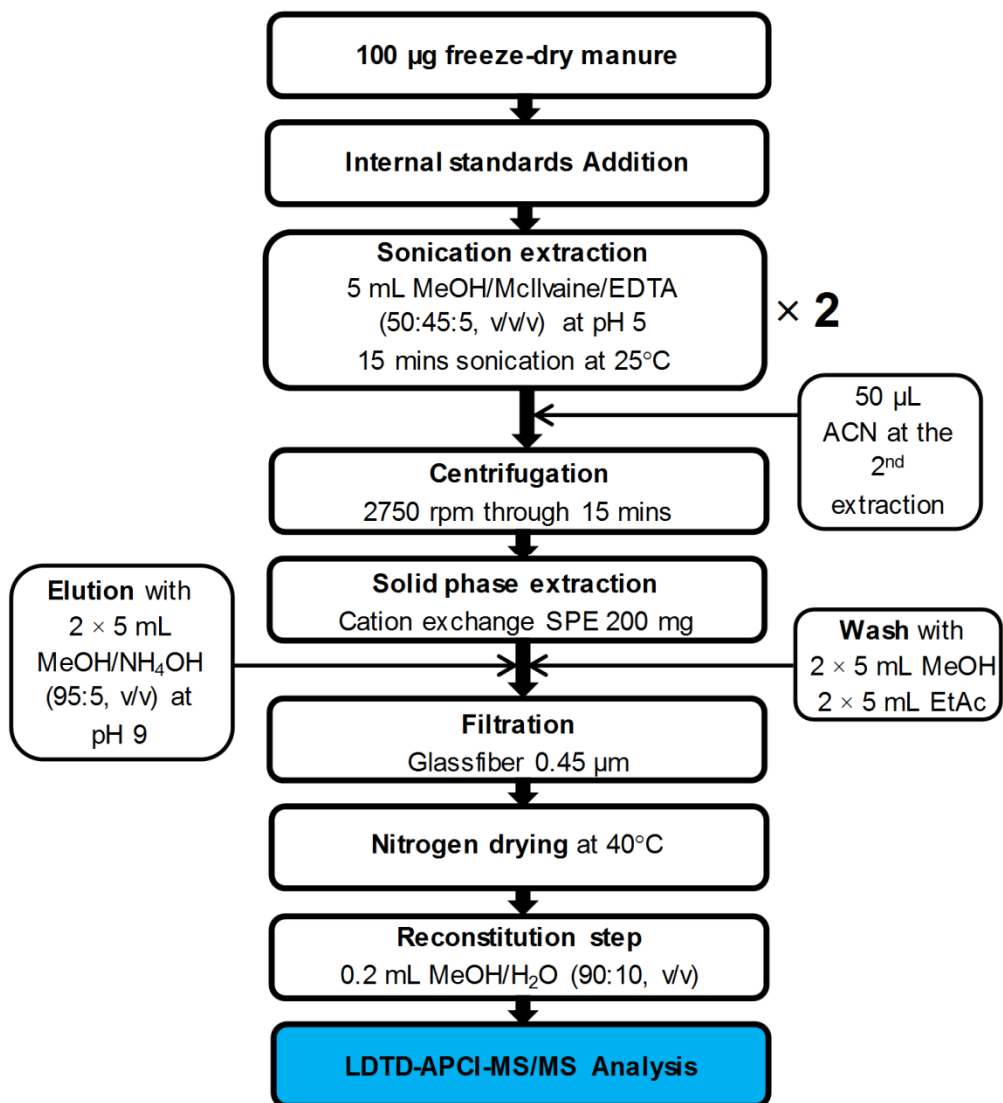
A number of different techniques deal with the extraction of organic chemicals such as veterinary antibiotics from manure. Traditional non-instrumental techniques such as Soxhlet extraction and shake flask extraction are well established but can be time consuming and they use large volumes of organic solvents [205]. An alternative technique which is rapid and does not consume large volume of solvents or expensive instrument is ultrasonic extraction [145, 146]. This technique has been successfully applied to veterinary antibiotics and it has been adopted in the current study.

The first step was to select a suitable buffer for extracting the target compounds. Sulfonamides are known to form chelate complexes with metal ions and therefore, the use of chelating agents such as EDTA and McIlvaine buffer were suitable. McIlvaine buffer is a mixture of citric acid and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and has previously been used in the extraction of sulfonamides from manure [144, 198]. For that reason, this extraction mixture was chosen for this study.

The extraction was optimized with the procedure described in **Figure 3-2**. Before the clean-up step, target analytes have to be protonated to create a positive charge that allow the formation of an ionic bond with the cationic phase. The  $pK_a$  of the target analytes are in the same range (**Tableau 3-1**), the  $pK_a$  of SDX is the lowest with 6.01 [206] and the  $pK_a$  of LCM is the highest at 7.79 [68]. The pH must be below the  $pK_a$  of the compounds to allow protonation. But TYL is instable below pH 4 [113]; thus the pH cannot be lowered below 4. Initial experiments with one extraction gave poor recoveries; therefore a second extraction was added to the procedure. Extractions were also carried out using a pH 5 McIlvaine buffer with a mixture of MeOH and EDTA to improve performances with target analytes. A vortexing stage was also added to the procedure before the ultrasonic extraction step to suspend the particles and homogenize the solution. Ultrasonic extraction was done at a temperature of 25°C during 15 minutes for TMP, LCM, SDX and TYL. After centrifugation, the supernatant liquids produced by the two extraction processes were combined in a single 15 mL glass vial.

**Tableau 3-1.** Compounds physical parameters for SDX, LCM, TMP and TYL including molecular weight,  $pK_a$  and  $\log P$  [68, 206].

Compounds	MW (g mol <sup>-1</sup> )	$pK_a$	Log $P$
SDX	310.3	6.01	0.58
LCM	406.5	7.79	0.56
TMP	290.3	6.76	1.28
TYL	916.4	7.50	2.32



**Figure 3-2.** Sample preparation and clean-up procedure for analysis of SFX, LCM, TMP and TYL.

### 3.3.3 Sample clean-up and elution

A solid phase extraction procedure was used to enable the manure extracts to be cleaned-up. Strata X-C cartridge, a cation exchange cartridge permits the use of organic solvents during the washing step that can remove large portions of the interfering matrix [113, 145]. The pH of the supernatants solutions was checked and adjusted with citric acid if necessary before clean-up because it could change due to the multiple compounds present in the samples. The pH of the solution has to be below the  $pK_a$  of the target analytes (**Tableau 3-1**) [68]. Thus, citric acid was added to the solution to protonate the target compounds in the case of a too high pH. The supernatant containing TMP, LCM, TYL and SDX was maintained to a pH of 5 because SDX has the lower  $pK_a$  (**Tableau 3-1**). The pH of the supernatant should not be below 4 because TYL is instable under this pH. This allows an ionic bond between the protonated target compounds and the cationic phase. Ionic bonds are stronger than van der Waals interactions and further allow us to use a strong wash with organic solvents to remove a maximum of interfering compounds. Various solvents and solvent mixtures were tested at different pH. After a series of experimental washes, MeOH and EtAc were found to remove a maximum of interferences without affecting analytes recovery. Additional washing stages were also tested to try to remove interfering compounds that had not been removed from the Strata X-C.

Target analytes were eluted with a solution of MeOH/NH<sub>4</sub>OH (95:5, v/v) at pH 9, above the  $pK_a$  of the compounds. The pH of the eluting solution should not be above pH 9 because TYL is instable at higher pH [113, 207]. This basic solution breaks ionic bonds between the protonated compounds and the cationic phase thus releasing the target analytes.

It is important to control well the pH at this step. First, it allows to hang and to liberate the analytes from the cartridge. Secondly, TYL is unstable at extreme pH, therefore, the pH have to be maintained between 4 and 9. Outside this range of pH, TYL will degrade rapidly and form metabolites. The stability of TYL was studied by varying the pH and measuring the amount of TYL. This shows that the pH used in this study to treat the samples did not affect TYL stability (**Figure S3-2**). Moreover, it was shown that TYL degrades rapidly in time outside the range but below 24 hours, degradation is not significant [113].

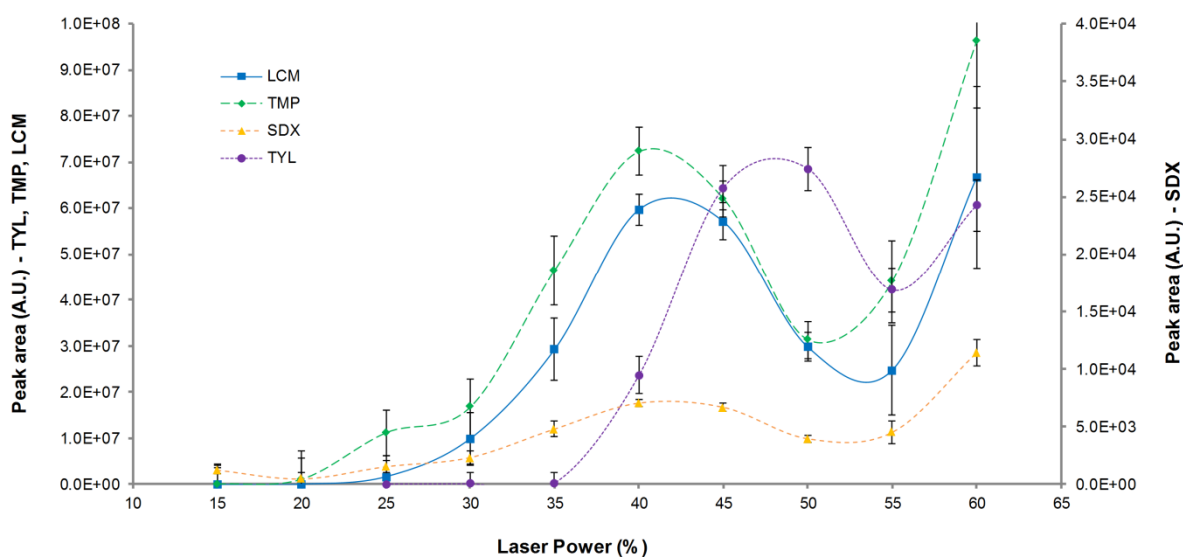
### 3.3.4 LDTD-APCI parameters optimization

Analysis of different pharmaceuticals by LDTD-APCI necessitates the optimization of different parameters to improve signal intensity. Therefore, several LDTD parameters were optimized to achieve signal enhancement while minimizing variability: the laser power, the laser pattern, the deposition volume, the carrier gas flow rate and the solvent of deposition. LDTD parameters were optimized in PI mode. Aliquots of extracts of manure were spiked with target analytes at  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  to account for matrix effects. Each spiked sample was analyzed 6 times ( $n = 6$ ) in SRM mode with the corresponding  $m/z$  precursor and product and optimized tube lens and collision energy.

Fragmentation of precursor ions at  $m/z$  311 for SFX, 291 for TMP, 407 for LCM, 916 for TYL gave very clean MS/MS spectra, consistent with the literature of MS/MS spectra from the same ions obtained using APCI and ESI. The major product ions obtained correspond to the losses of part from  $[\text{M}+\text{H}]^+$  and were observed at  $m/z$  156 and 92 for SFX,  $m/z$  123 and 230 for TMP,  $m/z$  126 and 359 for LCM and  $m/z$  174 and 772 for TYL, and those transitions could be used for detection. Tube lens and collision energy are presented in Supporting Information **Tableau S3-1** for each quantification transition.

The laser power and the laser pattern were used to control the power of the laser diode applied to the back of the metal well during a short period of time, approximately 1-3 s. Therefore, increasing the percentage of laser power will increase the laser radiation power hitting at the back side of the Lazwell<sup>®</sup> plate and ultimately the amount of energy transferred to the sample. This fast heat transfer (as high as  $3\ 000^\circ\text{C s}^{-1}$ ) generates a temperature of roughly  $200^\circ\text{C}$  induced by the laser and allows the thermal desorption of the target compounds and transfer them by the gas flow to the APCI ionization [160]. The amount of energy transferred is dependent on the laser power setting of the instrument (%). The laser power should not be set too high in order to maintain a low background signal generated by the thermal degradation of matrix components and cause the degradation or fragmentation of target compounds. Depending of the matrix, increasing laser power can cause a decrease of signal-to-noise ratio (S/N) response because of a larger amount of interfering compounds are being desorbed and transferred to the corona discharge along with the compounds of interest.

By adjusting the laser ramp pattern and the hold time at maximum laser power, it is possible to increase the amount of desorbed analytes and control the amount of desorbed matrix components. Laser power was evaluated between 10 and 60%. **Figure 3-3** shows the various laser patterns tested with their corresponding signal. The optimal laser power for maximum compound desorption was set at 40% for SFX, LCM and TMP but it was set at 50% for TYL. Lower laser power did not allow for maximum compound desorption and a higher laser power caused higher variability and decreased signal intensity which we attribute to heat-promoted compound degradation.



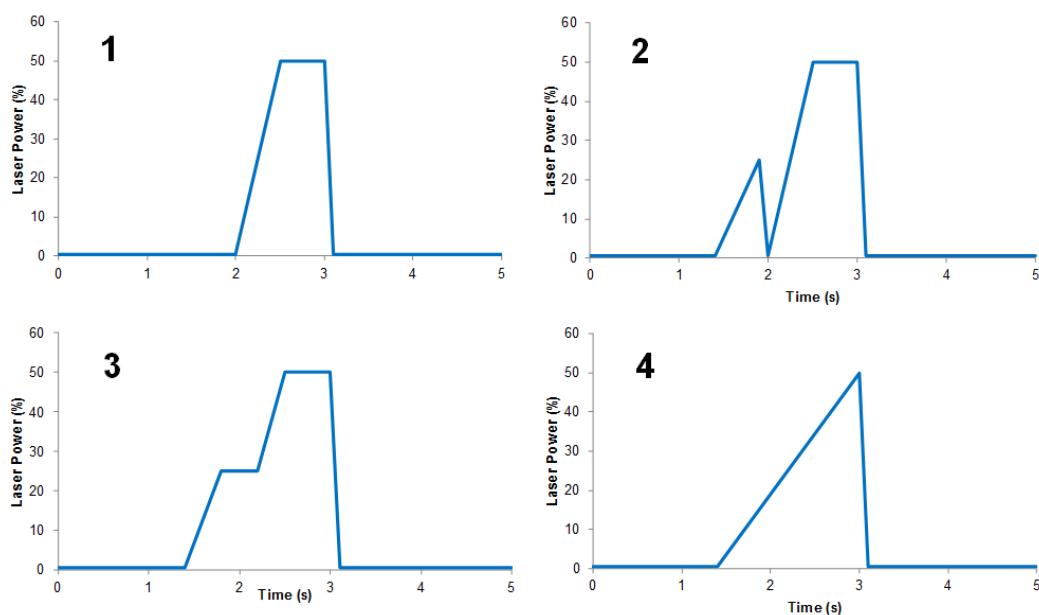
**Figure 3-3.** Effect of laser power on peak area of target analytes spiked in matrix solution (SDX use the right y-axis scale, others compounds use the left axis-scale) ( $n = 6$ ).

Optimized laser pattern for SFX, LCM and TMP was a 2 s at 0%, with a ramp of 0.5 s from 0 to 40%, with no hold time required at maximum power, and a direct decrease of 0.1 s from 40 to 0% with finally 2 s at 0% (**Figure 3-1**). Previous work used the same type of laser pattern for desorption of various pharmaceutical compounds in wastewater [165]. For TYL, optimized laser pattern was a 2 s at 0%, with a ramp of 0.5 s from 0 to 50%, with a hold time of 1 s before a direct decrease of 0.1 s from 50 to 0% with 2 s at 0% (**Figure 3-1**). The hold time of 1 s was necessary to desorb completely TYL, presumably because of its higher

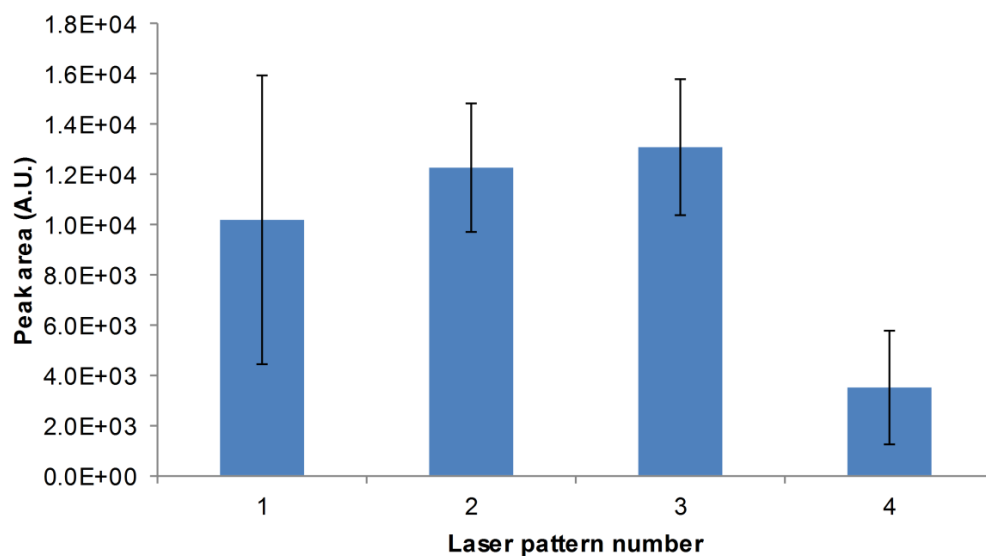
molecular weight. The total analysis time is 15 seconds per sample, which compares very favorably with the minutes usually required for chromatographic analysis.

LDTD does not permit compound separation prior to analysis. Therefore, during desorption, a large amount of compounds including matrix components and target analytes will simultaneously reach the APCI region. A competition will then occur between the compounds for ionization. Consequently, it is beneficial to try desorb part of the interfering matrix components before desorption of the target analytes. TYL starts to desorb at 35%, thus several laser patterns were tested in two different steps. Initially, a short laser impulsion at 25% laser power is used to desorb a part of the matrix without desorbing the analyte. In a second step, the target analyte will be desorbed with the optimized laser pattern (**Figure 3-1**). Laser patterns are presented in **Figure 3-4** (subfigure numbers 1, 2, 3 and 4) and the peak area measurements with their respective laser patterns are presented in **Figure 3-5**. SFX, LCM and TMP start to desorb at a low laser power (15%). Subsequently, it was not possible to use this “pre-desorption” technique for these analytes. Three different laser patterns were tested on a matrix solution spiked with  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  of TYL (**Figure 3-4**) and peak areas were measured in each case. Number 1 is the reference laser pattern. The best results seem to be the laser patterns 2 and 3 for which variability is lower and peak area is greater. Laser pattern number 4 gives the smallest peak area. Therefore, laser pattern numbers 2 and 3 were compared to the reference with an ANOVA and post hoc Tukey’s *b* tests. The result of this test showed that there is a significant difference between number 3 and the reference ( $p$ -value < 0.05). Laser pattern number 3 was chosen for the TYL method.



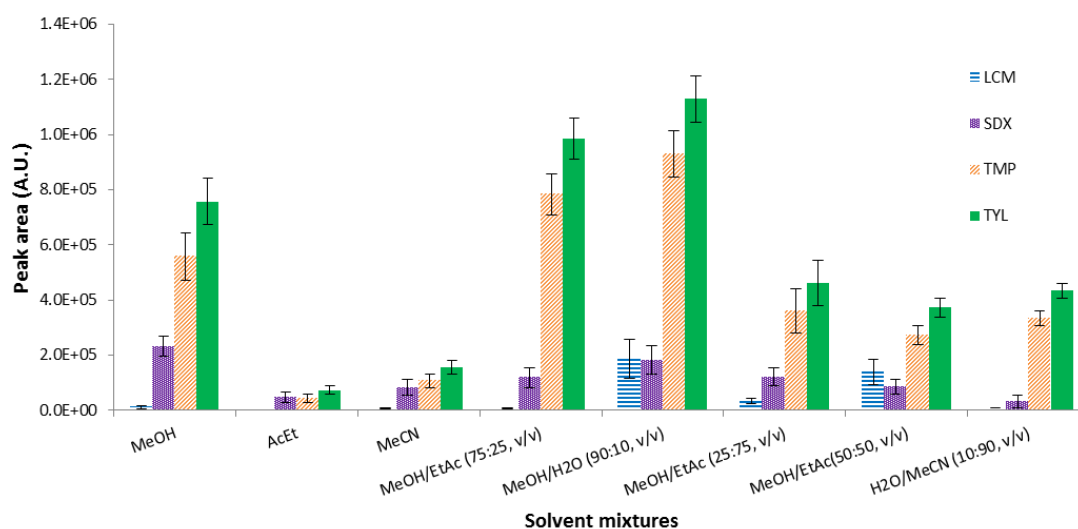


**Figure 3-4.** Illustration of different LDTD laser patterns tested for the TYL method.



**Figure 3-5.** Effect of laser pattern (presented in **Figure 3-4**) on TYL peak area measured with  $250 \mu\text{g kg}^{-1}$  of target analyte in matrix solution ( $n = 6$ ).

The solvent of deposition for analytes has an important impact on the MS/MS peak shape, peak intensity and signal variation [161]. Depending of the solvents used for deposition, those parameters could change significantly. Therefore, optimization of deposition solvent is required to optimize the LDTD-APCI method. Different types of solvents and mixtures were tested and the coefficient of variation (CV,  $n = 6$ ) was compared for the 8 different solutions. **Figure 3-6** shows that the MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) mixture gave the best peak intensity for TYL, TMP and LCM with acceptable CV. Thus, this mixture was selected for all optimization experiments.



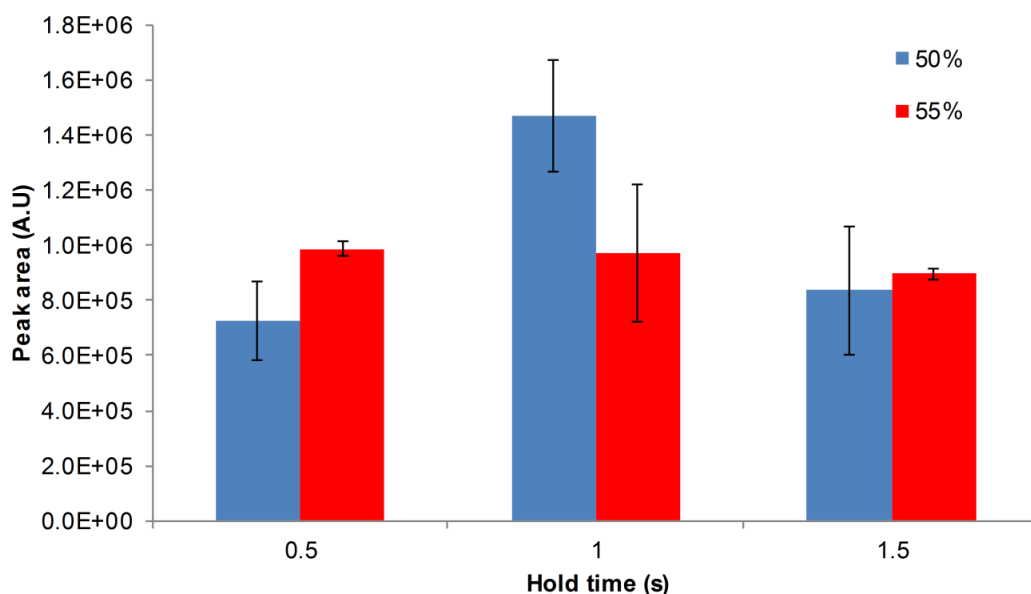
**Figure 3-6.** Effect of solvent mixture on peak area of target analytes ( $n = 6$ ).

The deposition volume has an important influence on the APCI ionization and on the MS signal intensity of the target compounds. Previous work showed the influence of deposition volume in the Lazwell<sup>®</sup> plate upon the effectiveness of the APCI [161]. It was shown that, by adding a large volume of sample, a higher amount of analytes would reach ionization, increasing the signal and sensitivity and improving the MLD. Consequently, more compounds in the ionization area can induce a proton affinity competition during the APCI discharge and would also affect signal intensity. Also, non-volatile matrix products could trap the target compounds and affect signal intensity. The deposition volume was tested from 2 to 8  $\mu$ L in steps of 1  $\mu$ L (see details in Supporting Information - **Figure S3-3**). The peak area

progressively decreases with increasing deposition volume in spiked matrix aliquots. These results suggest minimizing the deposition volume to minimize matrix effects and to maximize the peak area and the S/N. An optimal deposition volume of 3  $\mu\text{L}$  was chosen for the analysis of all target compounds with significantly higher S/N response ( $p$ -value < 0.05).

For the carrier gas optimization, the same samples were used to determine the highest S/N signal. The carrier gas flow has two main functions: transferring the thermally desorbed analytes to the corona discharge region for ionization and thermalization of the vaporized analytes. Carrier gas flow has an influence on the APCI ionization. A higher carrier gas flow reduces the residence time of neutral compounds in the ionization source and a lower gas flow limits the amount of molecules reaching the source. It has to be optimized to bring enough water molecules in the corona discharge area and permits formation of charged water clusters  $(\text{H}_2\text{O})_n\text{H}^+$  through a chain of ion-molecule reactions starting with  $\text{N}_2^+$ ,  $\text{O}_2^+$ ,  $\text{NO}^+$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ . Those clusters react with target analytes by proton-transfer and induce the ionization [169]. Therefore, it becomes important to control the time of residence in the ionization area to optimize ionization and thus improve sensitivity. Carrier gas flow rate was optimized between 1 and 8  $\text{L min}^{-1}$  and was set to 3  $\text{L min}^{-1}$  which gave significantly higher peak area response ( $p$ -value < 0.05) and showed the highest S/N values for the SRM of all target analytes (**Figure S3-4**). Additionally, a gas flow of 3  $\text{L min}^{-1}$  provided smaller signal variability than using 2  $\text{L min}^{-1}$ . This flow rates does correspond with what has been observed previously for hormones and pharmaceutical compounds [161, 165].

A sample of resulting peak shapes is illustrated in the Supporting Information **Figures S3-5** and **S3-6**. Peak shapes of LCM, SFX and TMP are symmetrical and reproducible for quantitative analysis. For TYL and SPI peak shapes are asymmetrical with significant peak tailing which might be caused by the laser pattern of the TYL method which has a hold time of 1 s at maximum laser power. This hold time is necessary to desorb all TYL and SPI. Different hold times were tested at 0.5 s, 1 s and 1.5 s with 50 and 55% laser power (**Figure 3-7**). The peak shapes are still asymmetrical when those parameters were modified. Despite being asymmetrical, the peaks are reproducible. A hold time of 1 s with 50% laser power gave the best intensity and seemed to be optimal for TYL (**Figure 3-7**).



**Figure 3-7.** Effect of hold time in laser pattern and laser power on TYL peak area measured with  $250 \mu\text{g kg}^{-1}$  of target analyte ( $n = 6$ ).

The target compounds were analyzed in two desorption events (two plate wells) in PI mode using two LDTD methods. Several LDTD methods were necessary because of the limitation of the maximum MS/MS transitions by the software in the same method. Therefore, 8 SRM transitions can be handled to keep enough acquisition points per peak. Moreover, TYL requires a higher laser power than the other target compounds, thus two LDTD methods are required. In the first method TMP, SFX, LCM and  $[\text{13C}^3]$ -TMP as IS were analyzed with the laser pattern described in the **Figure 3-1**. The second method allows the analysis of TYL and SPI (as IS) using the other laser pattern described in **Figure 3-4** (Number 3).

### 3.3.5 Method validation

The LDTD-APCI-MS/MS method with optimized parameters was applied to spiked freeze-dried manure. The analysis took 15 seconds per well, with 2 separate LDTD methods per sample. In consequence, for a sample, two wells were desorbed. The samples were

concentrated using SPE and gave extraction recoveries for a concentration of 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ranging from 53% to 69% in spiked freeze-dried manure for all tested antibiotics.

To validate the method, a five-point standard addition calibration curve was analyzed in a freeze-dried manure sample that was spiked one night before the SPE procedure. Each point of the linear dynamic range (0 to 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) was analyzed using triplicates. Method validation parameters are presented in **Tableau 3-2**. The calibration curves showed good linearity, with coefficients of determination ranging from 0.984 to 0.996. MLD were calculated from calibration curves and range from 2.5 to 8.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and MLQ ranged from 8.3 to 27.7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The MLD was comparable to several other analytical methods applied to veterinary antibiotics, including off-line SPE coupled to LC-MS/MS [144, 146].

**Tableau 3-2.** Method validation parameters including linearity ranges, correlation coefficient ( $R^2$ ), sensitivity, the MLD, the MLQ and recoveries.

Compounds	Linearity range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$R^2$	Sensitivity	MLD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	MLQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recovery (%) $\pm$ STD <sup>a</sup>
SDX	28 – 500	0.984	0.0011	8.3	28	61 $\pm$ 2
LCM	11 – 500	0.989	0.0048	3.3	11	53 $\pm$ 3
TMP	10 – 500	0.988	0.0015	3.1	10	69 $\pm$ 1
TYL	8.3 – 500	0.996	0.0075	2.5	8.3	63 $\pm$ 3

<sup>a</sup> Recovery is measured in 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  matrix solution with  $n = 3$

SPE followed by LDTD-APCI-MS/MS was tested with success to the spiked freeze dried manure. Accuracy and precision are presented in **Tableau 3-3**. Accuracy was determined at three concentration levels as percent bias (%) between the concentration added and that found in the spiked freeze-dried manure ( $n = 3$ ). Accuracy was good with bias under 11% for each concentration levels (100, 250, 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) for all compounds. Intraday precision calculated for 3 concentration levels ( $n = 10$ ) ranged from 5 to 10% and interday precision calculated for 3 concentrations levels too ( $n = 10$ ) ranged from 8 to 14%. The entire method with optimized parameters was applied to real manure sample containing TYL. The compound was detected and quantified in the sample with concentrations ranging from 30 to 543  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Tableau 3-3.** Mean concentration (mean analysis  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) of target analytes measured in freeze-dried manure samples including bias values and method interday/intraday precision ( $n = 10$ ).

Compounds	Accuracy			Precision	
	Amount added ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Amount Found $\pm$ STD ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Error (%)	Intraday (%)	Interday (%)
SDX	100	90 $\pm$ 3	10	6	12
	250	228 $\pm$ 6	9	6	8
	500	459 $\pm$ 7	8	8	12
LCM	100	93 $\pm$ 2	7	6	10
	250	234 $\pm$ 7	6	5	9
	500	470 $\pm$ 7	6	7	12
TMP	100	96 $\pm$ 2	4	5	13
	250	242 $\pm$ 6	3	9	11
	500	480 $\pm$ 8	4	10	14
TYL	100	89 $\pm$ 3	11	8	14
	250	230 $\pm$ 5	8	6	8
	500	465 $\pm$ 7	7	9	14

Overall, the LDTD-APCI-MS/MS is a robust method that allows high throughput analysis with less than 15 seconds per sample and could be a powerful tool for fast screening of veterinary pharmaceuticals in manure. TYL and SPI are well desorbed by LDTD and macrolides have practically the same structure. We can presume that other macrolides could potentially be analyzed using LDTD-APCI-MS/MS. Moreover, TYL metabolites are well known and could be analyzed with this method.

### 3.4 Conclusions

In summary, this new analytical method for antibiotic in swine manure is simple, sensitive, fast and allows high-throughput analysis with a simple extraction and clean-up step. The LDTD-APCI-MS/MS is suitable for the rapid detection and quantification of 4 veterinary antibiotics targeting some of the mostly commonly used antibiotics for swine production. Target analytes were determined at  $\mu\text{g kg}^{-1}$  levels using 100 mg of freeze-dried manure. This is proposed as an alternative to the traditional LC-MS/MS which gives comparable results. Only ultrasonic extractions followed by a SPE step with clean-up are necessary to remove interfering matrix components from this complex matrix. We used a solid phase extraction method using a cation exchange cartridge that allows a strong organic solvent wash and removes a large part of matrix components. SPE recovery ranged from 53 to 69%. The calibration curves were linear with  $R^2$  values ranging from 0.984 to 0.996. MLD and MLQ ranged from 2.5 to 8.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and from 8.3 to 28  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . The resulting accuracy bias was less than 11% for all compounds at 3 different concentrations levels. Interday and intraday precision was good with CV from 8 to 14% and 5 to 10% respectively for all compounds. The ultra-fast analysis combined with a robust quantification and simple sample pre-treatment makes this method a usable alternative for further environmental analysis and monitoring.

### **3.5 Acknowledgements**

Agriculture and Agri-food Canada and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) are acknowledged for financial support. We thank Thermo Fisher Scientific and Phytronix Technologies for their support. We thank Audrey Roy-Lachapelle, Paul Fayad and Sung Vo Duy for their technical help and scientific support.



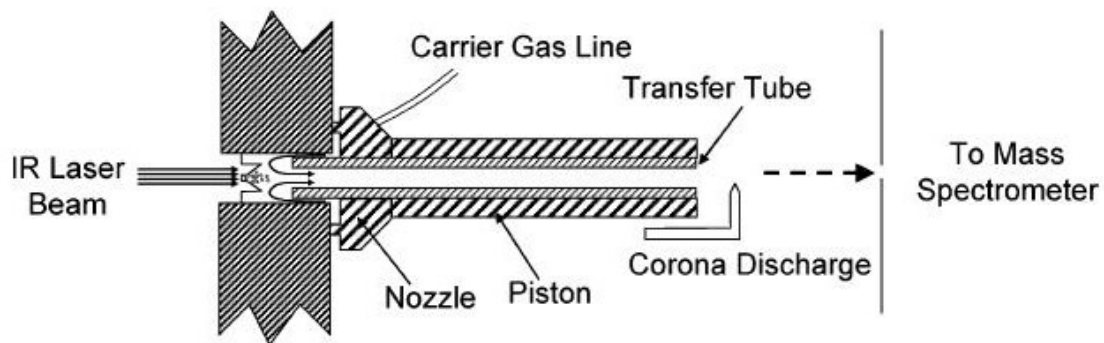
## ERRATUMS

**Incorrect formulation:** Sulfonamides do not form chelate complexes with metal ions but tetracyclines do. The use of this buffer combined with EDTA was motivated by the number of publications using this type of extraction solvent for veterinary antibiotics and the fact that chlortetracycline was integrated in the method in a first step. Chlortetracycline was then removed from the method due to low desorption and ionization efficiency of the APCI-LDTD interface with this compound.

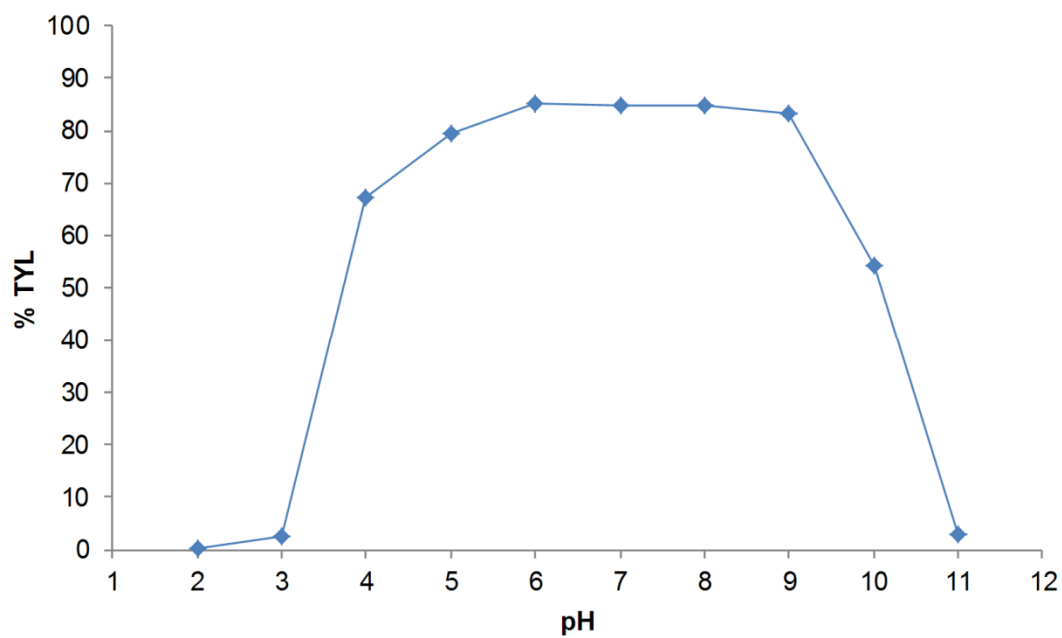
**Incorrect figure:** In the original publication, the laser patterns were associated with the incorrect subfigure numbers. The subfigure numbers of **Figure 3-4** has been changed in this manuscript to fit well with the text.

**Incorrect transcription of values:** In the original publication, linearity range values were incorrect in **Tableau 3-2** and have been change in this manuscript. Linearity range was evaluated from the MLQ to the maximum concentration measurable before limit of linearity.

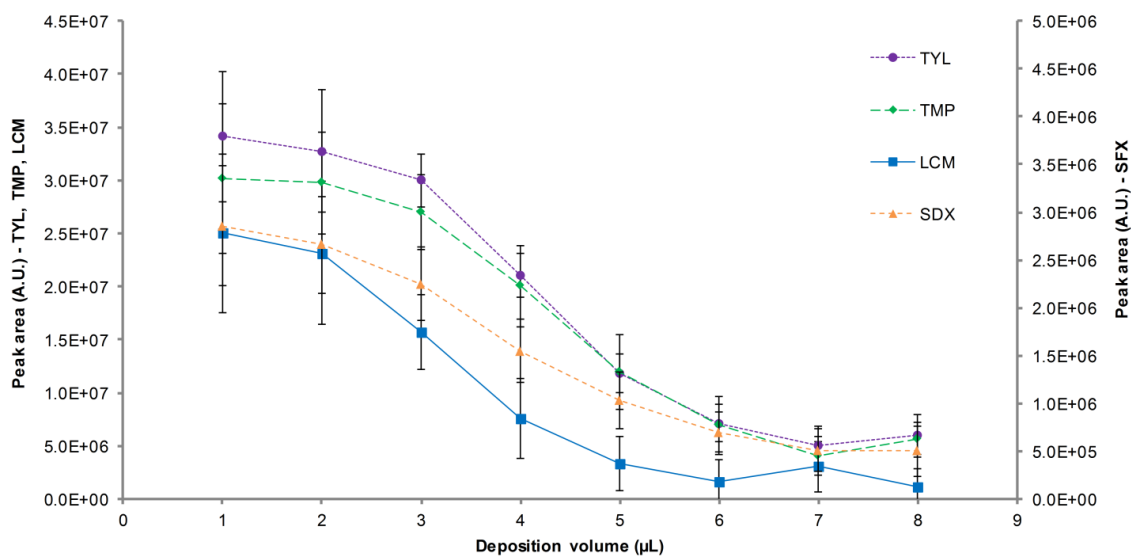
## **3.6 Supplementary materials**



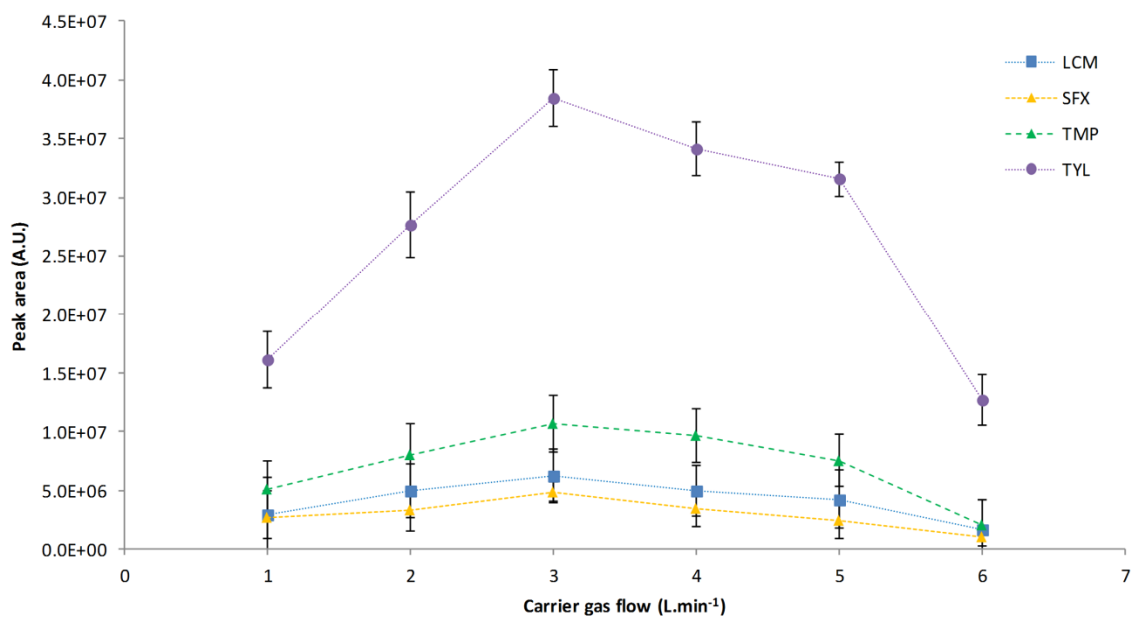
**Figure S3-1.** Schematic representation of the LDTD-APCI source.



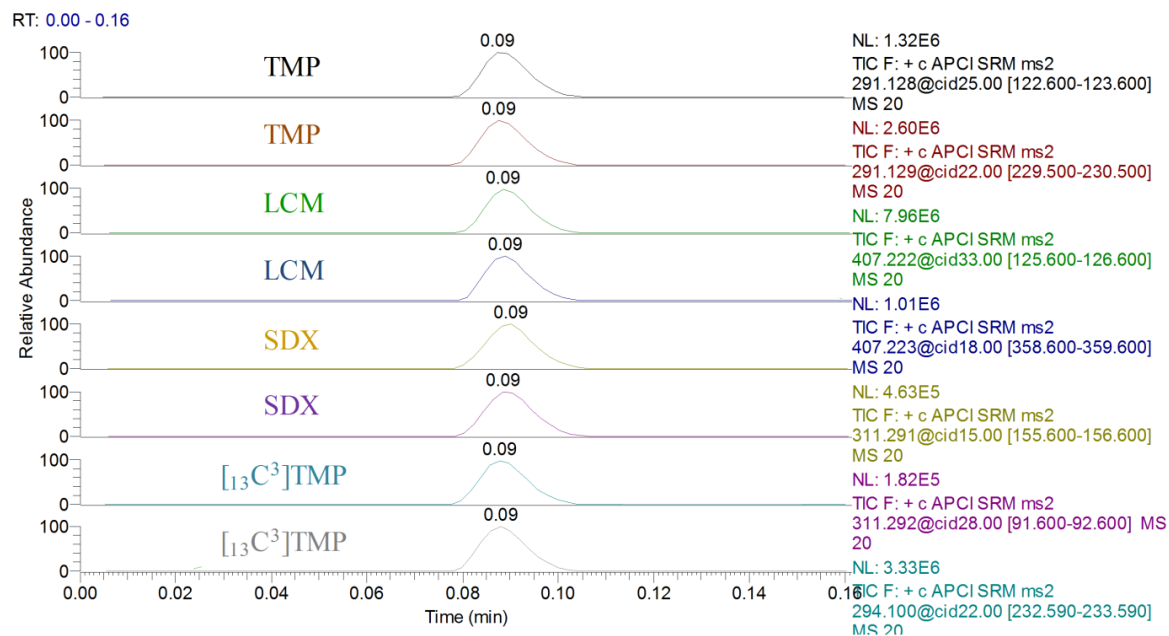
**Figure S3-2.** Stability of TYL measure between pH 2-11. The acidic solution is the McIlvaine buffer at different pH. The basic solution is composed of  $\text{NH}_4\text{OH}$ . The quantity of TYL was expressed in % compared to the initially doped concentration ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



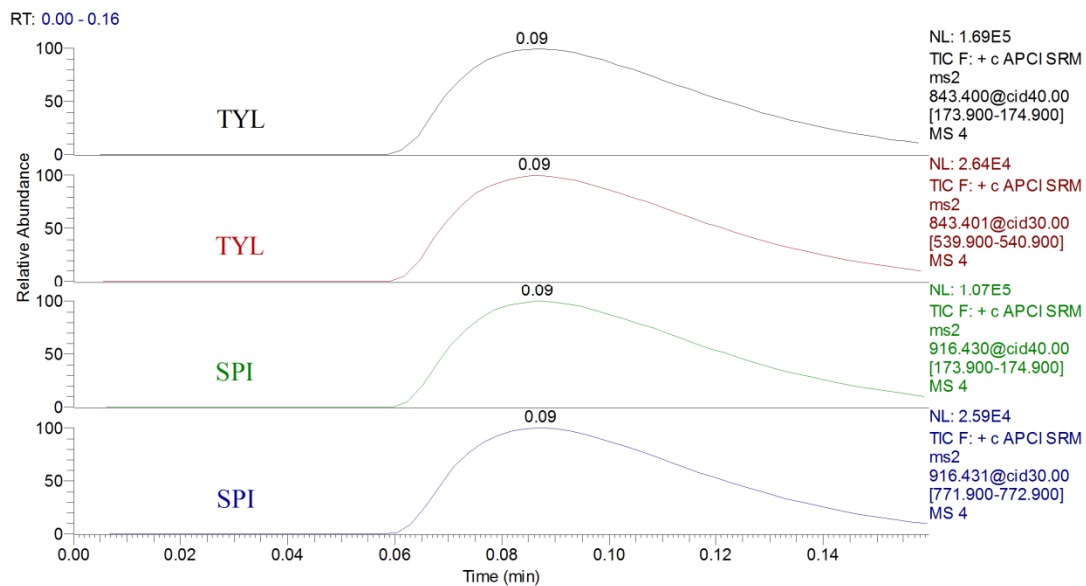
**Figure S3-3.** Effect of deposition volume on peak area of target analytes in spiked matrix solution (SDX use the right y-axis scale, others compounds use the left x-axis-scale) ( $n = 6$ ).



**Figure S3-4.** Effect of carrier gas flow on peak area of target analytes in spiked matrix solution ( $n = 6$ ).



**Figure S3-5.** Sample peak shape results of SFX, LCM, TMP and [<sup>13</sup>C<sub>3</sub>]-TMP obtained using LDTD-APCI-MS/MS of 250 μg L<sup>-1</sup> standards.



**Figure S3-6.** Sample peak shape results of TYL and SPI obtained using LDTD-APCI-MS/MS of  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  standards.



**Tableau S3-1.** SRM optimal parameters for SDX, LCM, TMP and TYL analysis by LDTD-APCI-MS/MS in PI.

Compounds	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)	Tube lens (V)
<b>SDX</b>	407	126*	25	86
		359	18	
<b>LCM</b>	311	156*	17	90
		92	28	
<b>TMP</b>	291	230*	23	77
		123	25	
<b>TYL</b>	916	174*	40	110
		772	30	

\*Quantification ion

## **Chapitre 4. Performance quantitative de la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution Q-Exacte pour l'analyse de tétracyclines dans une matrice complexe**

---

Quantitative performance of liquid chromatography coupled to Q-Exacte high-resolution mass spectrometry (HRMS) for the analysis of tetracyclines in a complex matrix

Morgan Sollicec, Audrey Roy-Lachapelle and Sébastien Sauvé,

2015,

*Analytica Chimica Acta*, 2015, 853 : 415-424

### **Note sur ma contribution**

*Ma participation aux travaux de recherche* : J'ai conçu le design expérimental avec l'aide de mon superviseur. J'ai effectué les manipulations pour valider la méthode et fait l'interprétation des résultats.

*Rédaction* : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires du Prof. Sébastien Sauvé, mon directeur de thèse.

*Co-auteur* : Audrey Roy-Lachapelle m'a assisté dans l'interprétation des résultats et dans la rédaction de l'article.

## Abstract

The presence of antibiotics in the environment is of increased interest and, as modern mass spectrometers become more efficient, we are increasingly aware of traces of pharmaceuticals appearing in a wide range of environmental and biological matrices. The Q-Exactive mass spectrometer is part of these innovative hybrid high-resolution mass spectrometers (HRMS), often associated with peptides sequencing or metabolomics but with a limited number of studies focusing on its application to small molecules quantification in environmental and biological matrices. It combines the high resolving power (RP) performance of the Orbitrap with the high-performance selectivity of the quadrupole. Tetracyclines (TCs) are a family of molecules comprising some of the most widely used antibiotics in veterinary medicine. This study presents the quantitative performances of the Q-Exactive by illustrating a new approach to quantify TCs using liquid chromatography coupled to a HRMS in a complex matrix, i.e. swine manure. The Q-Exactive was used at high-resolution in both full scan (FS) and parallel reaction monitoring (PRM) modes. These two modes were optimized and compared to determine the most reliable and efficient approach to quantify TCs with good accuracy. The proposed method was optimized to obtain the best selectivity and sensitivity, thus eliminating false positive and allowing the detection of trace levels of analytes. The TCs were extracted from the matrix by sonication using McIlvaine buffer followed by an off-line solid phase extraction method to concentrate and clean the extracts. Both FS and PRM modes presented good linearity ( $R^2 > 0.991$ ) and repeatability ( $RSD < 15\%$ ). Mass accuracy was acceptable with values below 2 ppm. The method detection limits (MLD) calculated from the calibration curves ranged from 2.0 to 12 ng g<sup>-1</sup> for FS mode and from 1.5 to 3.6 ng g<sup>-1</sup> for PRM mode. Accuracy and interday/intraday relative standard deviation were below 21% for both modes studied. TCs were quantified in real samples of swine manure with concentrations ranging from 29 to 75 ng g<sup>-1</sup>. This study showed the possibility of using hybrid HRMS for trace detection and quantification of TCs in a complex matrix, thus avoiding false positive while achieving good selectivity and sensitivity.

**Keywords:** Exact mass, high-resolution mass spectrometry, Orbitrap, tetracyclines, liquid chromatography

## 4.1 Introduction

Tetracyclines (TCs) are one of the most widely used families of antibiotics in veterinary medicine [208]. They have been administered routinely at therapeutic doses to prevent diseases, improve feed efficiency and accelerate growth, and as a result, huge quantities have been used for swine husbandry. However, all these antibiotics are not absorbed by the animals and a significant portion is excreted in the feces and urine and end up in manure. Those antibiotics enter the environment through the land application of manure as an organic fertilizer and can potentially contribute to bacterial resistance [2]. Thus, robust analytical methods are necessary in order to quantitate and measure the degradation and metabolism of these compounds.

Mass spectrometry has become an essential tool for the analysis of antibiotics in variety of matrices. The development of new high-resolution mass spectrometers (HRMS), now allows the measurements of accurate mass. While this has been mainly used for peptides sequencing [186, 209], there is an increased focus and interest for studies on the quantification of small molecules [189, 210, 211]. The Q-Exactive is a recent new benchtop hybrid Orbitrap mass spectrometers combining the high resolving power (RP) performance of the Orbitrap with the high-performance ability of selection from the quadrupole [183]. This combination coupled to the high energy collision cell (HCD), is a powerful tool for the screening of several emerging contaminants in environmental and biological matrices [189, 212].

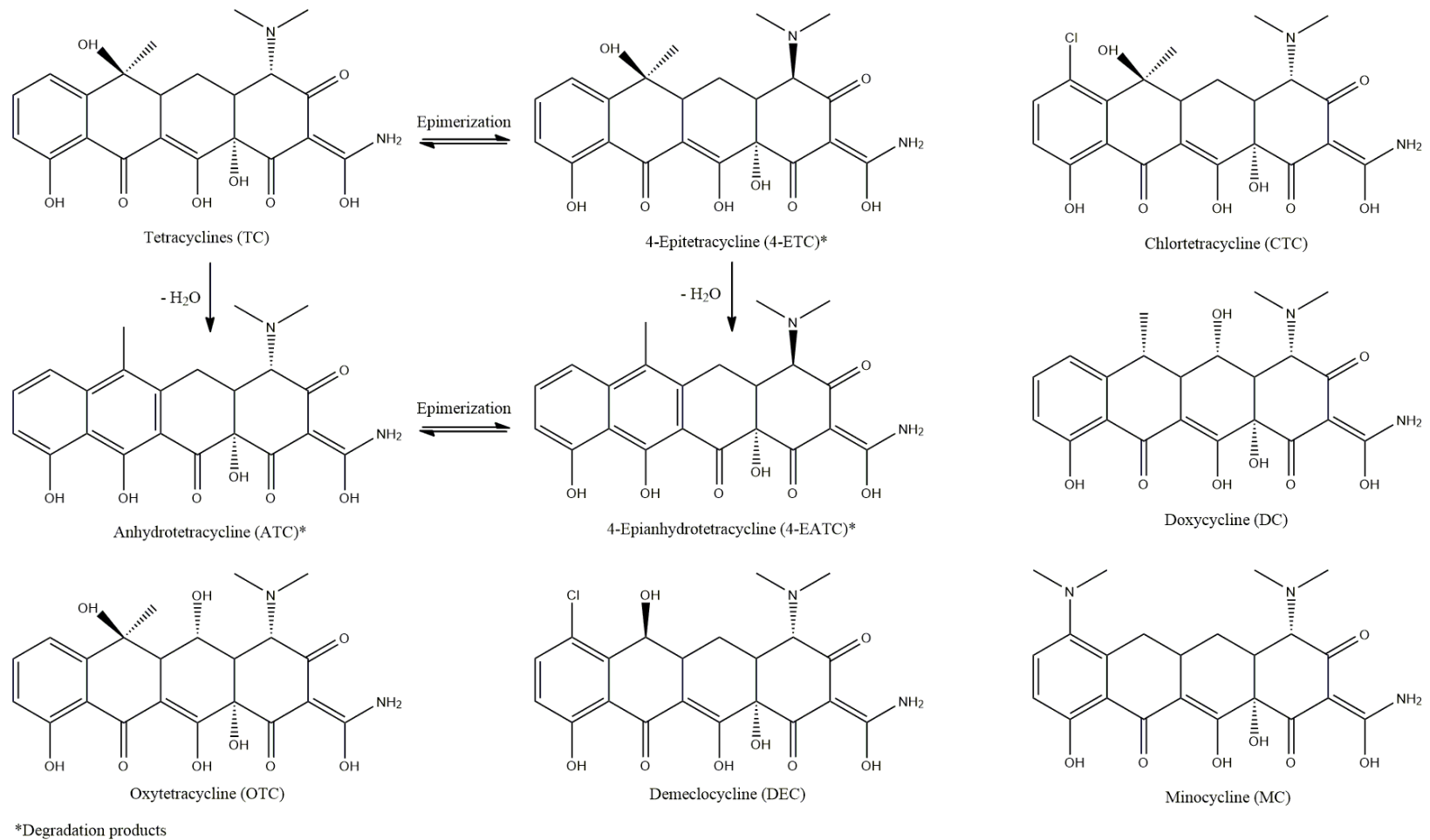
There are numerous methods in the literature to analyze TCs in several types of matrices based on liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [213-215]. The triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer is the preferred instrument for the analysis of complex environmental matrices. The main advantages of QqQ mass spectrometer are the sensitivity and selectivity allowed mainly by the selected reaction monitoring (SRM) mode [213, 216]. Environmental and biological matrices can cause ion suppression or enhancement due to the presence of organic matter or various other interfering compounds with near-isobaric or isobaric compounds that can be fragmented together with the target compounds and thus skewing the ion intensities. Indeed, the majority of QqQ operates at a low RP and

could not make the difference between a target compound and an interfering compound with a decimal difference, and thus potentially generating false positive. High RP instruments can readily avoid mass false positive and that is why the use of HRMS spectrometer is so useful [178]. For some years now, HRMS spectrometers have begun to be more accessible and seem a suitable alternative to QqQ instruments. This technology permits to improve selectivity with a high RP. Time of flight (TOF) and quadrupole time of flight (QTOF) have a RP up to 40 000 full width at half maximum (FWHM) at  $m/z$  200 with a mass accuracy lower than 5 ppm [217]. While, Orbitrap and LTQ-Orbitrap instruments offer better performance with a RP up to 70 000 FWHM at  $m/z$  200 and a mass accuracy lower than 2 ppm [183]. These devices have been used in accurate mass full scan (FS) analysis mode allowing good selectivity. Hybrid mass spectrometer like Q-Exactive or Q-Orbitrap has slightly better performance than Orbitrap with RP up to 140 000 FWHM at  $m/z$  200 and a mass accuracy lower than 2 ppm [186, 218, 219]. The main advantage is the presence of a quadrupole and the HCD cell on the Q-Exactive. This set-up allows this instrument to use a MS/MS mode named parallel reaction monitoring (PRM). However, it is also possible to use this instrument in high-resolution full scan mode (FS). The use of PRM mode, that couples high-resolution with tandem mass spectrometry, achieves high sensitivity and selectivity. This article presents a new method to quantify TCs in a complex matrix, i.e. swine manure, using a hybrid mass spectrometer, the Q-Exactive.

Only a limited number of studies explored the possibility to quantitate small molecules in environmental or biological matrices through the Q-Exactive [189, 210]. To the best of our knowledge, there are no publications on the use of liquid chromatography with heated electrospray ionization coupled to HRMS (LC-HESI-HRMS) for biological analysis of antibiotics in manure. A method was developed for the quantitative analysis of six different TCs as well as three of their degradation products. The chemical structures of these TCs and some of their degradation products are presenting in **Figure 4-1**. The sample preparation is minimized to an ultrasonic extraction followed by solid phase extraction (SPE) and an evaporation step [145]. Ultrasonic extraction was performed using a McIlvaine buffer and EDTA for the extraction of targets analytes. This buffer is often used to extract antibiotics in all types of matrices [145, 220]. The method validation was evaluated by the determination of

the method limit of detection (MLD) and limit of quantification (MLQ), linearity, accuracy and precision were determined. This method was applied to real swine manure samples and the determination of targets compounds at  $\text{ng g}^{-1}$  in swine manure was performed to confirm the applicability of the method in real biological samples.

This study aims to develop a new hybrid Q-Orbitrap method for the quantification of TCs in swine manure while exploring the performance of two analysis modes, i.e., FS and PRM modes. Several parameters of these two analysis modes, such as RP, automatic gain control (AGC), injection time (IT), lock mass and mass tolerance window (MTW) have been optimized in order to enhance selectivity and sensitivity.



**Figure 4-1.** Chemical structures of TCs and their degradation products (indicated by a star).

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 Chemicals and reagents

Tetracycline (TC, purity  $\geq 99.5\%$ ), 4-epitetracycline (4-ETC, purity  $\geq 98.4\%$ ), anhydrotetracycline (ATC, purity  $\geq 99.5\%$ ), 4-epianhydrotetracycline (4-EATC, purity  $\geq 90.5\%$ ), doxycycline (DC, purity  $\geq 98.2\%$ ), demeclocycline (DEC, purity  $\geq 94.5\%$ ), oxytetracycline (OTC, purity  $\geq 97.0\%$ ), minocycline (MC, purity  $\geq 98.7\%$ ), chlortetracycline (CTC, purity  $\geq 93.0\%$ ) and simeton (SIM, purity  $\geq 99.0\%$ ) were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO). All solvents used were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada) and HPLC grade H<sub>2</sub>O was used for dilutions. Individual stock solutions were prepared in methanol (MeOH) at a concentration of 1 000 mg L<sup>-1</sup> and kept at -20°C for a maximum of 3 months [221]. Individual intermediate solutions were prepared by dilution of the 1 000 mg L<sup>-1</sup> stock solution in H<sub>2</sub>O. Given the potential for degradation of the target analytes, working solutions were prepared daily at a concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> by dilution in H<sub>2</sub>O from individual intermediate stock solution. Sodium phosphate dibasic (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, purity  $\geq 99.0\%$ ), citric acid (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, purity  $\geq 99.5\%$ ), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·2H<sub>2</sub>O, purity  $\geq 99.0 - 101\%$ ) and formic acid (HCOOH, purity  $\geq 95.0\%$ ) were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO). Chromatographic mobile phases were prepared daily.

### 4.2.2 Swine manure

Swine manure samples for method development were obtained from the Dairy and Swine Research and Development Centre of Agriculture and Agri-Food Canada (Lennoxville, QC, Canada). Manure samples were collected in plastic flasks, homogenized and freeze-dried. All the samples were kept at 6°C until analysis. This manure was used for all method validation tests. Real swine manure samples containing significant concentrations of TCs



came from the Research and Development Institute for the Agri-environment (IRDA) (St-Bruno, QC, Canada).

### 4.2.3 Extraction and SPE parameters

Approximately 500 mg of freeze-dried manure were weighed into a 15 mL conical-bottom centrifuge tubes (Fisher, Rockwood, TN) to which 10 mL of extraction buffer McIlvaine at pH 4 containing 0.1 M EDTA was added. McIlvaine buffer (200 mL) was prepared by mixing 123 mL of 0.1 M citric acid and 77 mL of 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . The samples were mixed for 1 min on a vortex to suspend the particles and homogenize the solution and were subsequently placed into an ultrasonic bath for 15 min at 25°C. They were then centrifuged at approximately 6 000 rpm for 15 min. Finally, 8 mL of the supernatant was collected into a 15 mL amber glass tube.

The SPE was done using a 12-position manifold manufactured by Phenomenex (Torrance, CA). A polymeric reversed phase Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA) cartridge with a total volume of 6 mL with 200 mg bed mass was used to wash the sample extracts. The others cartridges tested (C18-E, C18-U and Phenyl) were purchased from Phenomenex (Torrance, CA). Multiple SPE parameters were optimized: cartridge type, loading step, washing step and sample pH. The SPE cartridges were conditioned with 5 mL of MeOH, 5 mL of  $\text{H}_2\text{O}$  and 5 mL of McIlvaine buffer. Samples were loaded on the cartridge column by gravity. The SPE cartridges were washed with 5 mL of  $\text{H}_2\text{O}$ :MeOH (90:10, v/v). The analytes were eluted with 5 mL of MeOH containing 1% HCOOH into conical-bottom centrifuge tubes. The eluates were then evaporated to total dryness under a gentle stream of nitrogen at room temperature with a nine-port Reacti-vap unit from Pierce (Rockford, IL) and then reconstituted into 200  $\mu\text{L}$  with  $\text{H}_2\text{O}$  for LC-HESI-HRMS analysis.

#### 4.2.4 LC parameters

A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series RS pump coupled with a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS column compartments and a Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS autosampler controlled by Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA and Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific, Germany) were used for analysis. A Hypersil GOLD™ C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.9 μm particles) column preceded by a guard column (5 mm × 2.1 mm, 0.2 μm porosity) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used for chromatographic separation of target compounds at 20°C.

Mobile phase A consisted of H<sub>2</sub>O with 0.1% formic acid. Mobile phase B consisted of MeOH with 0.1% formic acid. A gradient was used starting from 30% B, and then the MeOH was increased to 95% from 0-6 min and was held constant for 2 min. Finally, the mobile phase was brought back to initial conditions and maintained for 4 min. A flow rate of 300 μL min<sup>-1</sup> and an injection volume of 10 μL were employed. The LC gradient is given in supplementary information (**Figure S4-1**).

A heated electrospray ionization source (HESI-II) in positive mode was used for the ionization of the target compounds. The parameters were set as follow: the ionization voltage was optimized at +4 300 V; capillary temperature was set at 275°C; the vaporizer temperature was set to 300°C; sheath gas (**Figure S4-2**) and auxiliary gas flow were optimized at 50 and 30 arbitrary units respectively.

#### 4.2.5 HRMS parameters

Detection of compounds was performed using a Q-Exactive mass spectrometer controlled by the Xcalibur 2.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The molecular formulas of the target compounds were acquired from Chemspider (Royal Society of Chemistry, Raleigh, NC) and the exact mass of the compounds were calculated using Qualbrosver in Xcalibur 2.3. Instrument calibration in positive mode was done every 5 days

with a direct infusion of a LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL). The PRM parameters were optimized using individual standards at a concentration of  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . They were infused with a syringe at a flow rate of  $0.01 \text{ mL min}^{-1}$  through a T piece connected to an LC system with a mobile phase flow rate of  $300 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ . The product ions were found by increasing the normalized collision energy (NCE) using the Q-Exactive Tune 2.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After choosing the more intense product ions (**Figure S4-3**), fragmentation energy scans were carried out to obtain the optimal NCE for complete fragmentation of precursor ions (**Figure S4-4**). The calculated exact mass of the product ions were obtained using the Mass Frontier (Highchem, Bratislava, Slovakia) and are shown in **Tableau 4-1**.

**Tableau 4-1.** HRMS parameters of FS and PRM detection.

Compounds	Chemical formula	RT (min)	Exact mass [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Average experimental mass [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Mass accuracy (ppm) <sup>a</sup>	NCE <sup>b</sup> (%)	Quantification ion transition (m/z)	Confirmation ion transition (m/z)
TC	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	1.87	445.161093	445.1611	0.57	30	410.1240	
4-ETC	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	1.47	445.161093	445.1611	0.55	30	410.1240	
ATC	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	5.96	427.150528	427.1505	0.49	31	410.1240	
4-EATC	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	5.79	427.150528	427.1505	0.56	31	410.1240	
DEC	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	3.00	465.106471	465.1065	0.62	34	448.0799	154.0504
OTC	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	2.02	461.156008	461.1560	0.56	30	426.1189	
MC	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	1.27	458.192727	458.1927	0.18	38	441.1662	
CTC	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	4.47	479.122121	479.1221	0.54	42	444.0850	
DC	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	5.65	445.161093	445.1611	0.35	30	428.1345	
SIM (IS)	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	2.76	198.135485	198.1355	1.23	50	128.0824	none

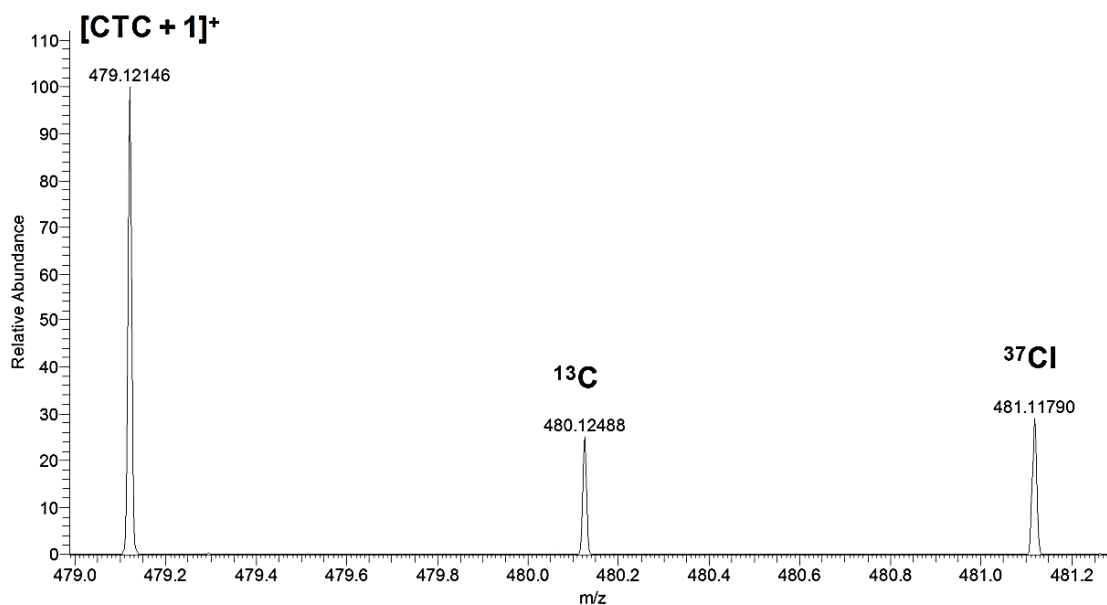
<sup>a</sup>Mass accuracy was measure just after Q-Exactive calibration  
<sup>b</sup>NCE (%) for quantification transitions

All Q-Exactive parameters such as: RP, AGC and IT were optimized to improve sensitivity and selectivity. The different optimization tests were performed with a mix solution containing  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  of the 9 target analytes and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of SIM spiked in a blank manure sample submitted to SPE. The FS and PRM modes were optimized and compared to determine their performance for TCs analysis in swine manure. Some other modes available on the Q-Exactive software were rejected for quantitation: all ion fragmentation (AIF), data-dependent acquisition (DDA) and data-independent acquisition (DIA) because of a lack of selectivity due to the complexity of such biological matrices. A lock mass ( $m/z$  391.28429 -  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$  - Diisooctyl phthalate) which is a plasticizer observed in the background interferences has been tested as internal standard for mass accuracy enhancement during spectral data acquisition [222, 223]. A mass exclusion list was used for the two analysis modes to eliminate interfering ions present in the background. This exclusion list was generated by measuring the most important interfering ions in a blank of matrix sample. Mass range of FS mode was within  $m/z$  100 - 500. The data were acquired at a RP of 70 000 FWHM at  $m/z$  200. The AGC representing the maximum capacity in C-trap was set at  $5 \times 10^5$  ions for a maximum injection time of 200 ms. As for PRM mode, a mass inclusion list was used including the precursor ion masses, their expected retention time (with one minute acquisition time window center on each retention time of target compounds) and their NCE (**Tableau 4-1** and **Figure S4-3**). The precursor ions are filtered by the quadrupole which operates at an isolation width of  $m/z$  2. A RP of 17 500 FWHM at  $m/z$  200 was used. The AGC target was set at  $2 \times 10^5$  ions for a maximum injection time of 100 ms. All optimized collision energies, precursor ions and fragment ions are shown in **Tableau 4-1**.

#### 4.2.6 Data analysis and method validation

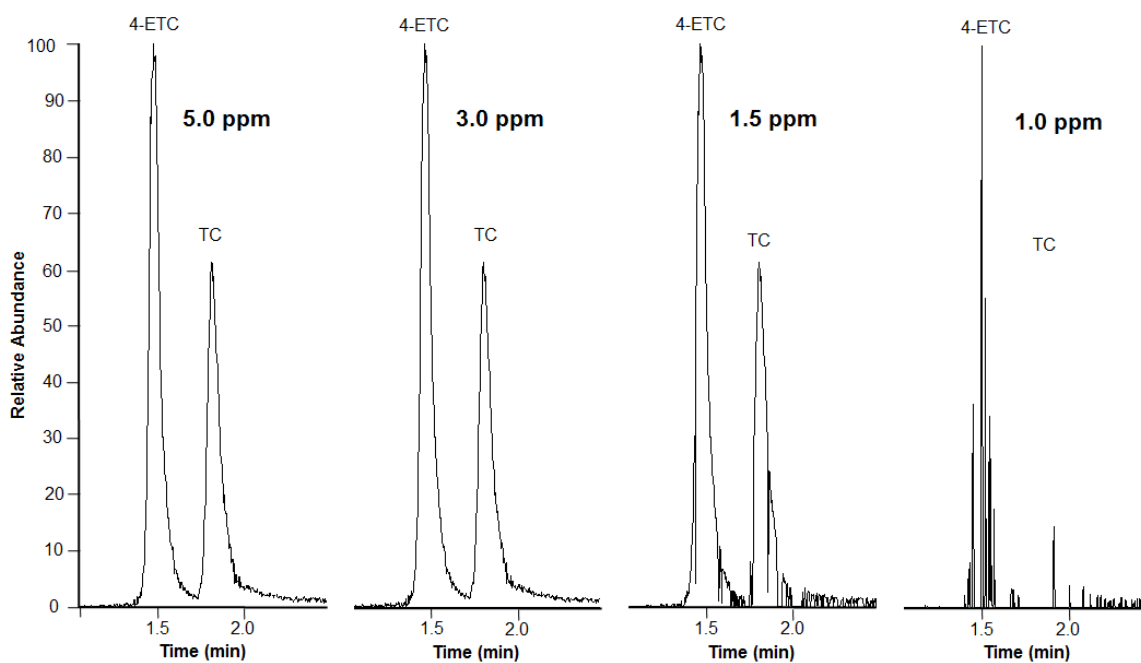
The PRM mode was validated using the sum of the two most intense product ions. This approach increases the signal intensity of the target compounds and allows lower MLD. The presence of a weaker product ion and common to all TCs was used for confirmation (**Tableau 4-1**). In FS mode precursor ion was used for quantification (**Tableau 4-1**) and the second most

abundant ion of the isotopic pattern was used as confirmation for each target compound (Figure 4-2).



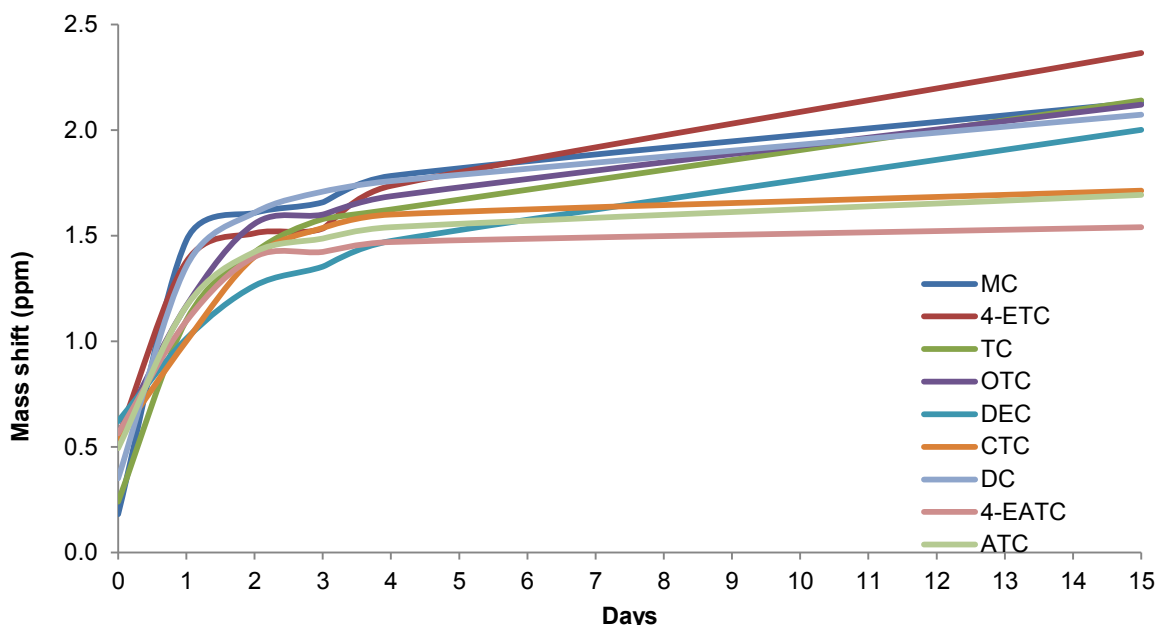
**Figure 4-2.** Isotopes of CTC for confirmation.

HRMS parameters were determined using a solution containing  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  of the 9 target compounds and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  of SIM spiked in a blank manure sample submitted to SPE. The mass tolerance window (MTW) was set to 5 ppm ( $\pm 2.5$  ppm) for the two analysis modes (Figure 4-3).



**Figure 4-3.** Optimization of MTW for TC and 4-ETC in FS mode.

The instrument response was determined as the ratio of the analytes area to that of the IS. Mass accuracy was assessed by measuring the precursor ion mass of target compounds in FS mode from the beginning, top and end of the chromatographic peak and the error was expressed in ppm. This parameter was evaluated after several days until calibration of the Q-Exactive (**Figure 4-4**).



**Figure 4-4.** Mass accuracy stability of TCs measure in FS with lock mass ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ;  $n = 3$ ).

Seven-point calibration curves were obtained by passing the entire extraction and clean-up methods (SPE) on manure samples spiked between 0 and  $500 \text{ ng g}^{-1}$  and were analyzed in triplicates. The IS ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ) was selected for its capacity to correct the signal variation of TCs [142, 214]. Matrix effects in FS and PRM modes were expressed as a ratio of the response of the analytes obtained for spiked matrices after extraction to the response of the analytes recorded for the standard solution expressed as a percentage at  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 5$ ) (**Tableau S4-1**). Repeatability (intraday precision) was evaluated by analysis of the same spiked sample at three different concentrations ( $50, 100$  and  $250 \text{ ng g}^{-1}$ ) five times on a single workday. Reproducibility (interday precision) was also calculated by spiking an extracted sample at three different concentrations ( $50, 100$  and  $250 \text{ ng g}^{-1}$ ) freshly prepared each day five times during 3 days. Accuracy values were determined by the relative error (%) and precision values were defined as the relative standard deviation (RSD - %). All validation parameters were determined for both scan modes (FS and PRM) for performance comparison.

The MLD and MLQ were determined as 3.3 and 10 times, respectively, the standard deviation of the y intercept divided by the slope of the calibration curve in matrix sample. The recovery values for the SPE method were evaluated using concentrations of 50, 100 and 250



ng g<sup>-1</sup>. During the SPE optimization, three sets of samples were prepared to determine the extraction recovery. Extraction recoveries were determined by comparing mean peak area ratios of target analytes spiked prior to extraction in manure samples with those of the target analytes spiked in post-extraction manure samples in triplicate and were reported as percentage. Un-spiked manure sample were also extracted to account for their presence in the recovery values. In each set of sample, the IS was added after the extraction and before the reconstitution step. Statistical tests were made when needed using the Statistical Package for Social Science (SPSS 21.0, Chicago, IL) for Windows. ANOVA test and post hoc Tukey's *b* tests were used with statistical significance defined as *p*-value < 0.05.

## **4.3 Results and discussion**

### **4.3.1 Extraction and clean-up development**

A number of different techniques deal with the extraction of antibiotics in different matrices such as soil, manure, milk and honey [224, 225]. A technique which often used is the ultrasonic extraction [145] which is rapid, does not consume large volume of solvents and does not require expensive instrumentation. This technique has been successfully applied to veterinary antibiotics and it has been adopted in the current study. The first step was to select a buffer suitable for extracting the TCs. Tetracyclines are readily soluble in aqueous-based solutions which are also miscible with the matrix of interest. Organically-based extraction, and more particularly MeOH, is not used due to difficulties encountered during further clean-up steps given that it cannot be used as a load solvent in most SPE applications but also for its propensity to extract excessive matrix material. Moreover, the mix McIlvaine/EDTA buffer system is the most used for a wide range of similar matrices [145, 224]. McIlvaine buffer is a mixture of citric acid and Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and has previously been used in the extraction of TCs from manure [145]. TCs are more soluble at pH 4 where they are in equilibrium favoring the zwitterionic state over the fully protonated species [87]. In fact, TCs have three *pK<sub>a</sub>* at approximately 3, 8 and 9 and are in zwitterionic form between pH 3 and 8 [68]. TCs can thus

form chelation complexes with multivalent cations such as ternary complexes in the presence of metal ions and ligands which can affect the different protonation states of TCs depending on their nature [226]. For these reasons, this extraction mixture was preferred in this study. A solid phase extraction procedure was used to enable the manure extracts to be cleaned-up and concentrated. A polymeric reversed phase cartridge (Strata X) was the most appropriate since it removed a maximum of interferences without affecting analytes recoveries [147, 215]. The C18-U, C18-E and phenyl cartridges were already tested but did not show improved recoveries (**Figure S4-5**). Strata-X was conditioned respectively with MeOH, H<sub>2</sub>O, and McIlvaine/EDTA buffer system at pH 4. Conditioning and loading with EDTA enhance recovery and provide consistent results. Washing stages were performed using H<sub>2</sub>O/MeOH (90:10, v/v) containing a low percentage of MeOH to try to remove a maximum of interferences. Target analytes were eluted with MeOH containing 0.1% HCOOH. Recoveries range from 40±4 to 103±7% and are consistent with reported literature values [48, 144, 227].

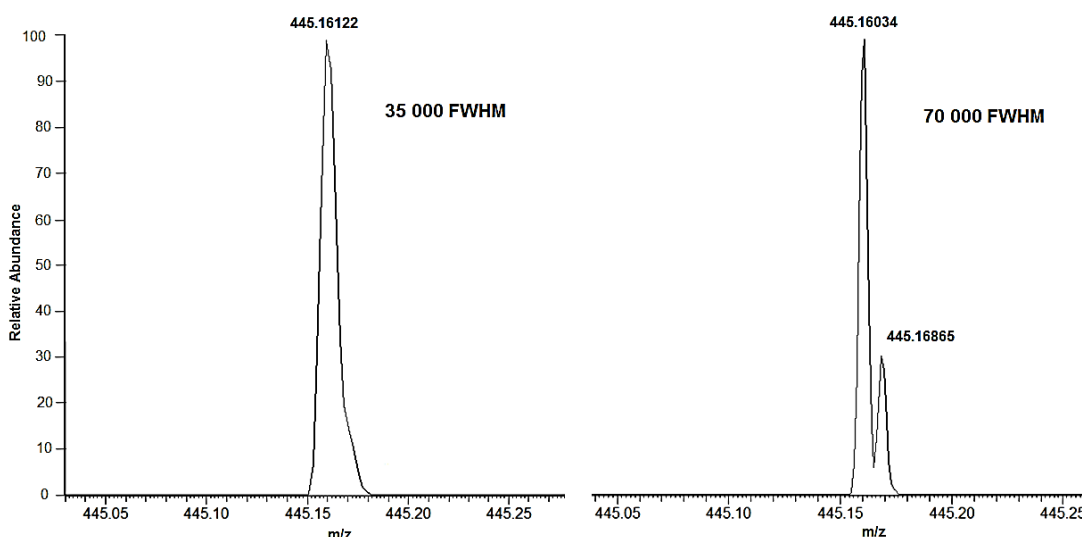
#### 4.3.2 LC parameters optimization

A C18 chromatography column was used to separate TCs. Tetracyclines could easily change their conformation to give corresponding epimers [114]. The result is an excessively high baseline during target compounds separation especially with CTC and OTC which seem to be more heat-sensitive than the other analytes. To limit this phenomenon, temperature was set to 20°C in the column compartment. It has been reported that an IS and target compounds have to be of similar structures to reflect the properties of the target compounds during the entire analytical procedure. It is certainly better to have an isotopically-labeled compound from the same class of antibiotics. Unfortunately, the cost and difficulty in obtaining such sister IS-labeled compound often requires the use of close alternatives. Therefore, SIM was chosen as an IS for TCs in this study because it eluted at the same time of TCs and responds well to HESI (+) mode while not interfering with the target compounds [214, 224].

### 4.3.3 HRMS parameters optimization

The fragmentation of TCs is well known in the literature [228] and produced a loss of H<sub>2</sub>O or NH<sub>3</sub> or both of them from precursor ion and is consistent with what we observed. Precursor ions and their respective NCE are listed in **Tableau 4-1**, and the fragmentation spectra produced are shown in **Figure S4-3**. Fragmentation of TC, 4-ETC, OTC, and CTC produced a major product ion corresponding to [M+H-H<sub>2</sub>O-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, while fragmentation of ATC, 4-EATC, DEC, MC and DC produced major fragments corresponding to [M+H-NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (**Figure S4-3**). Selectivity in our case is the possibility to choose or select one mass. A charged matrix such as swine manure could contain isobaric masses or near-isobaric masses compared to our analytes. Matrix related compounds negatively affect the reliability of the detection process and also affect the detection limit. Thus, enhanced selectivity could avoid the problem by minimizing false positive and matrix effects. Indeed, the use of high RP allows a better mass accuracy, which improves selectivity and as a result, permits a more accurate quantitation. However, at a higher RP, the acquisition is affected by the LC elution peak due to duty cycle. In order to obtain accurate quantitation, it is generally accepted that a minimum of seven acquisitions is needed per LC elution peak [178]. The RP for both modes were tested between 17 500 and 140 000 FWHM at *m/z* 200. At the fastest setting of the instrument (12 Hz) and the lowest RP, the mass analyzer will produce a large number of scans (represented as sticks on the chromatogram) but will greatly affect the mass resolution (**Figure S4-6** and **S4-7**). The same experiment was repeated using the lowest scan speeds (7; 3 and 1.5 Hz). In these cases fewer points per peak are acquired across the chromatographic peak. However the mass resolution is greatly improved in both modes, as shown by the mass spectrum (**Figure S4-6** and **S4-7**). FS mode recorded the whole mass range (*m/z* 100 - 500) without quadrupole filtration. Selectivity of HRMS in FS mode exceeds MS/MS use in SRM mode if the HRMS data are recorded with a RP above 50 000 FWHM at *m/z* 200 and a corresponding mass window, according with the European Commission 2002/657/EC [178]. Therefore, FS mode was recorded at a RP of 70 000 FWHM at *m/z* 200 to avoid matrix effects. Behind this point of FWHM, it is possible to observe false positive causes by a near-isobaric matrix compound. **Figure 4-5** present two mass spectra of DC recorded in FS mode at two RP. HRMS

measurements in FS mode at high RP (70 000 FWHM at  $m/z$  200) clearly resolved an interfering matrix compound and revealed the false positive [229]. The target compound and the matrix compound have really close masses ( $m/z$  445.16122 and 445.16034). These two masses could be separated only with a RP above 54 000 FWHM at  $m/z$  200 according with RP calculation. On the contrary, at a lower RP (35 000 FWHM at  $m/z$  200), the target compound and the interfering compound were not resolved. This interfering matrix compound could affect the mass accuracy and the selectivity. This is why FS mode should be used at a RP of 70 000 FWHM at  $m/z$  200.



**Figure 4-5.** Example of near-isobaric compounds which cause deviations of measured masses for DC in FS mode.

The PRM mode operated a filtration of  $m/z$  2 on the precursor ion with the quadrupole before the HCD cell. Therefore PRM mode was set at a RP of 17 500 FWHM at  $m/z$  200 to measure product ions of target compounds which are sufficient to avoid false positive and have an acceptable selectivity. Another important point to consider in order improving efficiency and selectivity in HRMS is the mass tolerance window (MTW). The MTW was optimized to reduce interferences and was set at 5 ppm ( $\pm$  2.5 ppm) for both modes. A wide MTW provides poor selectivity but an excessively narrow MTW can result in false negative or peak distortion (**Figure 4-3**). These precautions will prevent isobaric interferences (false

positive) and also false negative that appear when utilizing narrow mass windows and insufficient RP.

The data acquired by the Orbitrap has high mass accuracy. The calculation of the error between the theoretical and the calculated mass for all target compounds was below 2 ppm. This high mass accuracy ensured confident identification of the TCs. It could be reached with the use of a lock mass in FS mode for internal correction to adjust results for unknown masses. The selected lock mass should have a mass close to that of the target compounds [223]. It has to be present in the background throughout the course of chromatographic separation with a stable signal and a good abundance [223]. However,  $m/z$  391.28429 was used as a lock mass to check if it corrected well the experimental accurate masses. The mass error 3 days after the Q-Exactive calibration with the use of lock mass was 1.5 ppm error that is good enough to give acceptable selectivity. Without the use of lock mass, the mass error of the target ions were determined to be higher than 1.5 ppm after three days without calibration. Therefore, this lock mass was used during TCs analysis and mass accuracy was checked periodically. The positive calibration of the Q-Exactive was done every 5 days. A drift of the mass accuracy with time was observed in court days (**Figure 4-4**). Just after the calibration, the mass drift is around 0.5 ppm. A few days after the calibration, it will increase and stabilize around 1.5 ppm. After 15 days without calibration, the errors on the measured masses were still acceptable with 2.5 ppm error. The Q-Exactive is very robust in terms of mass accuracy over time but for higher accuracy, calibration could be done every day to bring a mass error below 1 ppm.

The Q-Exactive features a C-Trap which temporarily traps ions [186]. Thus, AGC is the number of ions to fill the C-Trap or, in other words, the total ion population entering the C-Trap. The other parameter related to the AGC is the IT defined by the maximum time of the C-Trap opening for ion accumulation. Depending on the intensity of the incoming ion beam, the IT varies [229]. In FS mode, the entire mass range is scanned and a large amount of ions will reach the C-Trap, this is even more important in the case of a complex matrix. Therefore, it is important to set the IT and the AGC depending on the matrix and the mode used. In FS mode with a charged matrix, the AGC was set at  $5 \times 10^5$ . This parameter should be high enough in the case of FS mode to ensure the recovery of a sufficient number of the target analytes in the ion beam. It is important to carefully choose the IT, as it can induce the loss of

information. If the IT is too long, the Orbitrap will not be able to see the beginning of the chromatographic peak because it will not have time to adjust to the significant decrease of IT. Reverse-wise, if the IT is too short, this will result in an opening and closing frequency of the trap too fast and the entire ion beam will not be able to reach the C-Trap. The IT was set at 100 ms and resulted in better detection of all species in the mass range. In the case of PRM mode, the selective isolation window of a narrow mass range ( $m/z$  2) by the quadrupole will filter the target ions and remove a large amount of interfering ions. A too narrow isolation window will result in a loss of sensibility of the target ion. Contrariwise, isolation windows not selective enough will let pass large amount near-isobaric ions because the quadrupole cannot do the difference between two compounds with masses close. Those compounds may have similar transitions that our target compounds and create false positive. After they passed the quadrupole they will enter in the HCD cell to be fragmented. Then, ions are selectively accumulated in the C-Trap and the large majority of ions to reach the C-Trap will be product ions. That is much less than in the case of FS mode which scans the whole mass range selected. Hence, the AGC was set to  $2 \times 10^5$  to limit the amount of ions in the Orbitrap. Too many ions in the analyzer will disrupt the analysis of ions in the Orbitrap and could create distortions. The IT was set to 100 ms to have enough scan per second. The target ions will be in greater proportion of total ions population as the mass range narrows. This leads to an improved signal-to-noise ratio and to lower detection limits.

Another important point to consider is the number of scans per second. The RP, the numbers of analytes in the inclusion list for PRM and the IT have a direct influence on the number acquisitions per second. The RP directly affects the number of acquisition, as observed before (**Figures S4-5** and **S4-6**). The numbers of target compounds in the inclusion list affect the duty cycle; the more analytes that elute in the same time window, the fewer acquisitions per seconds are possible. In the case of IT, the more time the trap will take to fill, the fewer acquisitions per seconds will be possible. These parameters influence the duty cycle and the quality of the analysis.

The effect of the matrix on the analysis is an important parameter to consider during quantitation of any analytes. Matrix effects were well described in several publications and greatly influence analysis [230, 231]. The extraction of TCs in freeze-dried manure brings

along a large amount of organic matter and interfering compounds. These compounds could co-elute with target compounds and create a competition during ionization, and as result cause analytes signal suppression or in some case signal enhancement. Furthermore, matrix effect and the filling of the C-trap are directly linked. The filling of the C-Trap which is limited both with AGC and IT affects the signal. In the presence of a charged matrix, there will be a competition between target ions and interfering ions which are in larger quantities to reach the C-Trap. This is even more the case of the FS mode where there is no ion filtration before the ion beam reached the C-Trap. Therefore, a certain amount of target ions will not be able to attain the C-Trap and will not be taken into account in the quantification. In the case of PRM mode, the quadrupole applies a selection on the ion beam and eliminate a large part of the interfering ions. Thus, the ion beam abundance is much lower due to the quadrupole selection and the competition between the target ions and interfering ions is less important which leads in a better detection of TCs.

The matrix effects could be determined by calculating the ratio of the response of the analytes recorded for the standard solution and the response of the analytes obtained for spiked matrices after extraction expressed as a percentage (**Tableau S4-1**). Significant matrix effects were observed for all the analytes and signal suppression and signal enhancement was observed for several TCs. Moreover, co-eluting components may produce similar ions or near-isobaric product that our target ions which leads to a misinterpretation of results and sometimes in false positive. We observed significant matrix effect with signal suppression for 4-ETC, OTC, DEC, DC and MC and signal enhancement for TC, ATC, 4-EATC and CTC. We could also see that matrix effects affect less PRM mode than FS mode (**Tableau S4-1**).

#### **4.3.4 Data analysis and method validation**

The advantages and disadvantages of each mode were based on the performance parameters: linearity, precision, accuracy, matrix effect and selectivity. The parameters of the performance of the method are presented in **Tableau 4-2** and **4-3**.

**Tableau 4-2.** Accuracy and precision parameters of target analytes measured at three different concentrations ( $\text{ng g}^{-1}$ ) in freeze-dried manure samples including bias values (% ,  $n = 5$ ) and method interday/intraday precision (RSD - %,  $n = 5$ ).

Compounds	Accuracy (%)						Interday RSD (%)						Intraday RSD (%)					
	FS			PRM			FS			PRM			FS			PRM		
	50	100	250	50	100	250	50	100	250	50	100	250	50	100	250	50	100	250
TC	8	10	8	4	8	2	17	16	15	9	5	7	7	11	9	5	2	2
4-ETC	9	11	13	6	8	2	16	21	19	10	4	4	9	15	7	5	2	2
ATC	5	7	6	3	4	6	18	17	16	10	12	11	15	14	11	8	5	4
4-EATC	4	6	5	2	4	3	16	14	15	9	11	14	13	11	10	6	5	6
DEC	8	12	9	5	8	5	13	14	11	6	8	4	12	10	11	4	5	6
OTC	10	8	7	7	7	2	14	12	16	4	5	8	11	12	11	2	3	2
MC	13	10	12	6	7	5	16	15	17	9	7	7	13	11	10	7	5	7
CTC	5	10	15	1	5	9	12	13	15	8	8	9	9	10	12	7	5	2
DC	13	10	9	11	8	2	11	12	14	7	8	9	11	11	13	6	7	4

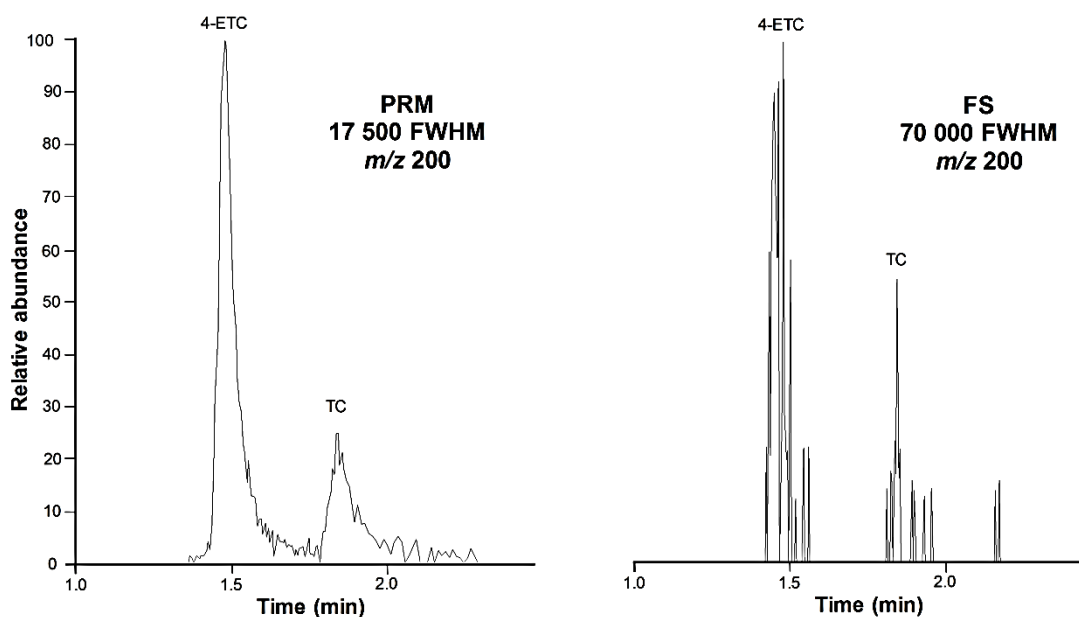


**Tableau 4-3.** Method validation parameters for FS and PRM modes including linearity ranges, coefficient correlation ( $R^2$ ), sensibility, the MLD, the MLQ and recoveries.

Compounds	Linearity range (ng g <sup>-1</sup> )		$R^2$		Sensitivity		MLD (ng g <sup>-1</sup> )		MLQ (ng g <sup>-1</sup> )		Recovery (%) ± STD <sup>a</sup>		
	FS	PRM	FS	PRM	FS	PRM	FS	PRM	FS	PRM	50	100	250
TC	18 - 500	8.3 - 500	0.997	0.996	0.0007	0.0021	5.6	2.5	18	8.3	87±11	76±13	92±3
4-ETC	22 - 500	8.3 - 500	0.998	0.993	0.0005	0.0042	6.6	2.5	22	8.3	103±7	74±8	77±3
ATC	6.6 - 500	5.0 - 500	0.997	0.999	0.0006	0.0033	2.0	1.5	6.6	5.0	67±5	63±6	64±7
4-EATC	12 - 500	8.9 - 500	0.997	0.997	0.0007	0.0043	3.6	2.7	12	8.9	59±2	53±9	60±6
DEC	16 - 500	12 - 500	0.996	0.997	0.0002	0.0005	4.9	3.6	16	12	47±7	55±9	62±8
OTC	15 - 500	11 - 500	0.998	0.998	0.0005	0.0018	4.5	3.3	15	11	89±10	72±6	92±6
MC	40 - 500	6.6 - 500	0.991	0.998	0.0003	0.0011	12	2.0	40	6.6	49±2	62±5	43±1
CTC	15 - 500	8.6 - 500	0.998	0.997	0.0003	0.0014	4.5	2.6	15	8.6	92±7	92±3	88±3
DC	7.9 - 500	7.6 - 500	0.998	0.997	0.0009	0.0009	2.4	2.3	7.9	7.6	40±4	54±5	50±3

<sup>a</sup> Recoveries for FS and PRM modes were sensibly the same. Therefore, recoveries are presented at three different concentrations in ng g<sup>-1</sup> measure in PRM mode.

The LC-HESI-HRMS method with optimized parameters was applied to spiked freeze-dried manure. To account for matrix effects and validate the method, a seven-point standard addition calibration curve was analyzed in freeze-dried manure samples that was spiked prior to the SPE procedure from 0 to 500 ng g<sup>-1</sup> ( $n = 3$ ). The calibration curves showed good linearity, with coefficients of determination ( $R^2$ ) ranging from 0.991 to 0.998 for FS mode and from 0.993 to 0.999 for PRM mode. MLD calculated from the calibration curves ranged from 1.5 to 3.6 ng g<sup>-1</sup> for PRM mode and from 2.0 to 12 ng g<sup>-1</sup> for FS mode. To confirm the calculation of the MLD, target compounds were analyzed in FS and PRM modes close to their MLD (3 ng g<sup>-1</sup>) (**Figure 4-6**).



**Figure 4-6.** Chromatographic peaks of 4-ETC and TC in PRM mode (17 500 FWHM at  $m/z$  200) and FS mode (70 000 FWHM at  $m/z$  200) at 3 ng g<sup>-1</sup>.

In both modes, the Q-Exactive presented acceptable results, but PRM mode showed significant improvements and had the best performance for the majority of the target TCs analyzed. It improved selectivity and MLD and was less impacted by the matrix effect (**Tableau 4-2 and S4-1**). For some of the TCs, FS mode did not seem to be adequate and important interferences were observed. Moreover, the analysis was not selective enough at

lower resolving power (17 500 and 35 000 FWHM at  $m/z$  200) and could lead to false positive detection (**Figure 4-5**). The analytes were extracted using SPE and gave extraction recoveries ranging from 40% to 103% in spiked freeze-dried manure for all TCs (**Tableau 4-3**). Some product ions of TCs were selected, the two most intense were used for quantification and the product ion in common for each TCs was used for confirmation ( $m/z$  154.0499 –  $C_7H_8O_3N$  with 0.327 ppm error). Hence, the characteristic isotopes of the target compounds appear with relative heights of approximately 25% (**Figure 4-2**). The use of SIM as IS was justified by a RSD behind 5%. Accuracy was determined at three concentration levels as percent bias (%) between the concentration added and the one found in the spiked freeze-dried manure ( $n = 3$ ). Accuracy was good with bias under 15% for each concentration level (50, 100, 250  $ng\ g^{-1}$ ) for all compounds. Overall, the data showed a better accuracy for PRM mode with bias under 11% compare to bias under 15% for the FS mode. Precision for intraday and interday was expressed using relative standard deviations (RSD - %). Intraday precision calculated for 3 concentration levels ( $n = 5$ ) ranged from 2 to 8% for PRM mode and from 7 to 15% for FS mode. Interday precision calculated for 3 concentrations levels ( $n = 5$ ) ranged from 4 to 14% for PRM mode and from 11 to 21% for FS mode. The mass accuracy for all target analytes monitored in FS mode show acceptable value less than 1 ppm error with the selected lock mass (after 1 day calibration). Mass accuracy is shown in **Figure 4-4** and still lower than 3 ppm after 15 days without calibration, with an acceptable stability for mass measurements.

The entire method with optimized parameters was applied to real manure sample containing TCs. Tetracycline, 4-ETC, ATC, 4-EATC, OTC and CTC have been quantified above the MLQ in the sample with concentrations ranging from 29 to 75  $ng\ g^{-1}$ . Overall, the LC-HESI-HRMS is a robust method that allows high accuracy and precision analysis and could be a powerful tool for fast screening of TCs in number of environmental and biological matrices.

## 4.4 Conclusions

The two tested modes showed good linearity and repeatability. For most TCs, an improvement in MLD was achieved with PRM mode. Only DC has a better MLD with FS mode. FS mode showed poorer results in term of selectivity than PRM and many interferences were observed. The PRM mode significantly reduced interference and improved selectivity and sensitivity. The results obtained allow us to conclude that for the quantitation of the tested TCs in a complex matrix such as swine manure, the Q-Exactive should be used in PRM mode to exploits the benefits of the quadrupole and the collision cell. This set-up allows tandem mass spectrometry which is more selective with the use of the high-performance quadrupole selection that filter a part of the interfering ion. In addition, product ions were also measured with accurate masses and high-resolution Orbitrap detection to avoid false positive. This detection method significantly improved selectivity as well as MLD (for most of our target compounds). Consequently, PRM mode allowed a more accurate determination of TCs and should be considered when using complex and dirty matrices. While the FS mode is very useful for the screening and the research of compound residues or metabolites in wide mass range but it shows some limitations for small molecule compounds quantification. On the other hand, the PRM mode allows tandem mass spectrometry and seems to be the method of choice for the quantification of small molecules with precision in complex environmental and biological matrix.

## 4.5 Acknowledgements

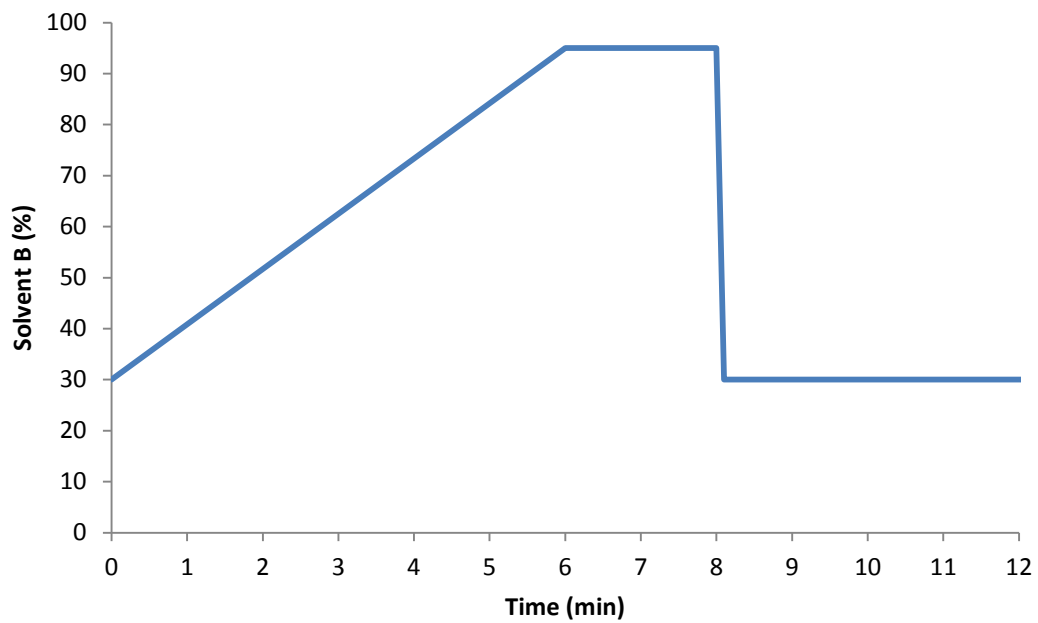
The Fonds de Recherche Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) are acknowledged for financial support. We thank Thermo Fisher Scientific for their support. We also thank Paul Fayad and Sung Vo Duy for their technical help and scientific support.

## ERRATUM

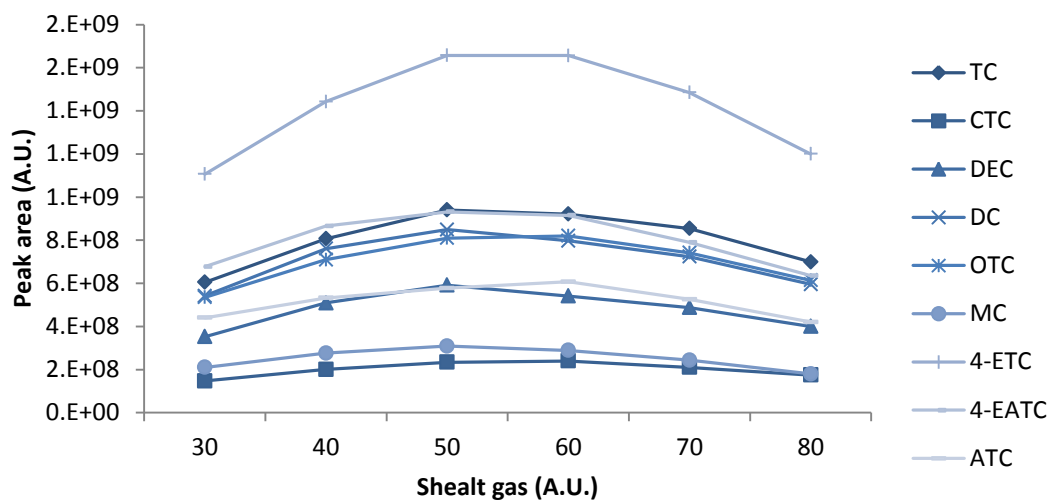
**Incorrect formulation:** In the original publication, the calculation of matrix effects was explained as “the ratio of the response of the analytes recorded for a standard solution to the response of the analytes obtained for spiked matrices after extraction expressed as a percentage at  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ”. This incorrect formulation has been changed in this manuscript for “a ratio of the response of the analytes obtained for spiked matrices after extraction to the response of the analytes recorded for the standard solution expressed as a percentage at  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ”.

**Incorrect description:** The description of the Hypersil GOLD C18 column in the original article was incorrect and has been changed for "100 mm × 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  particles" in this manuscript.

## **4.6      Supplementary material**

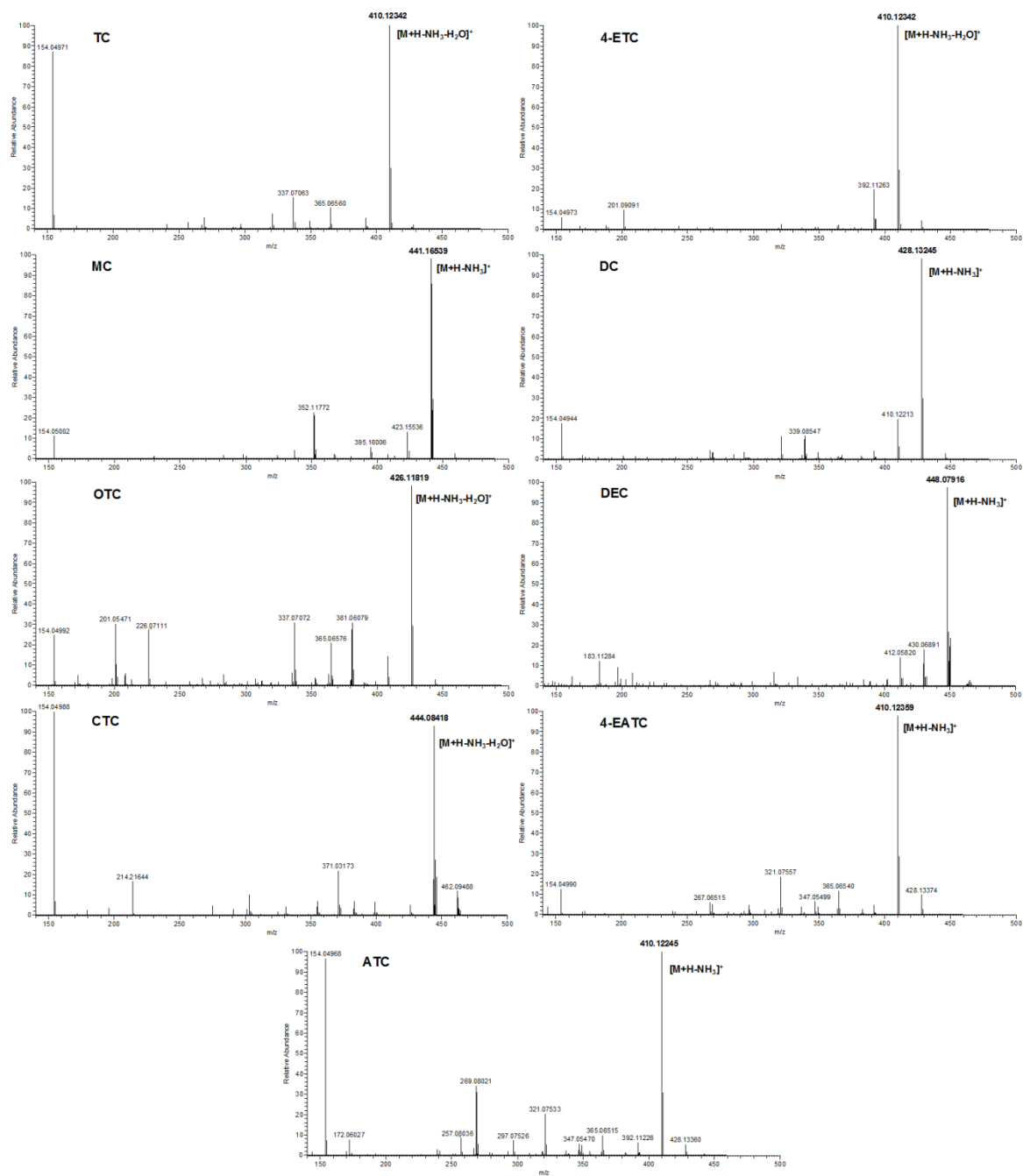


**Figure S4-1.** LC gradient.

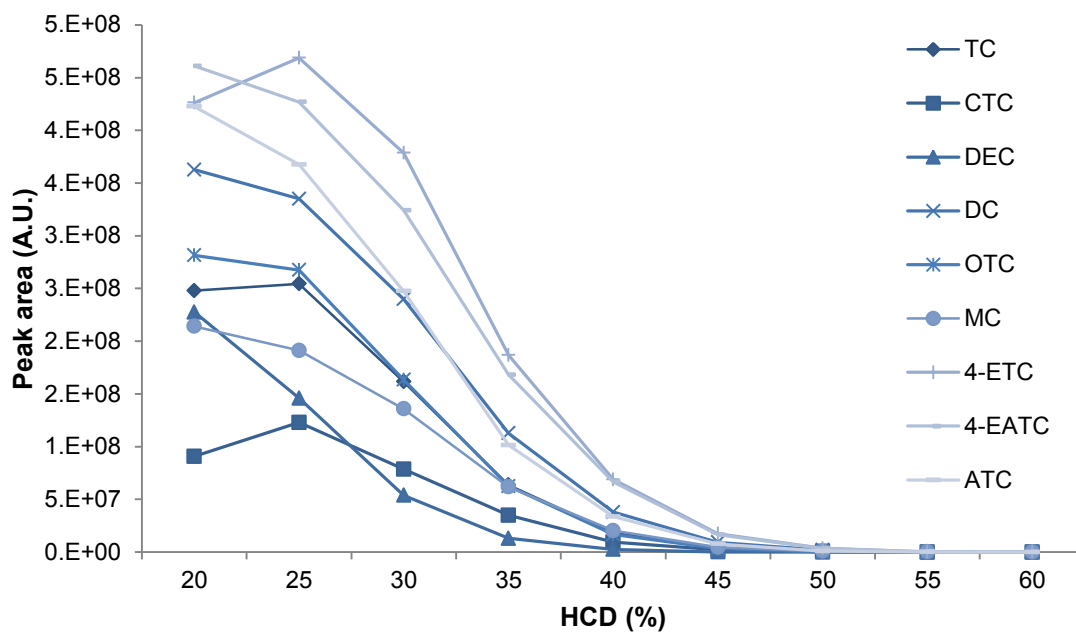


**Figure S4-2.** Effect of sheath gas on peak area.

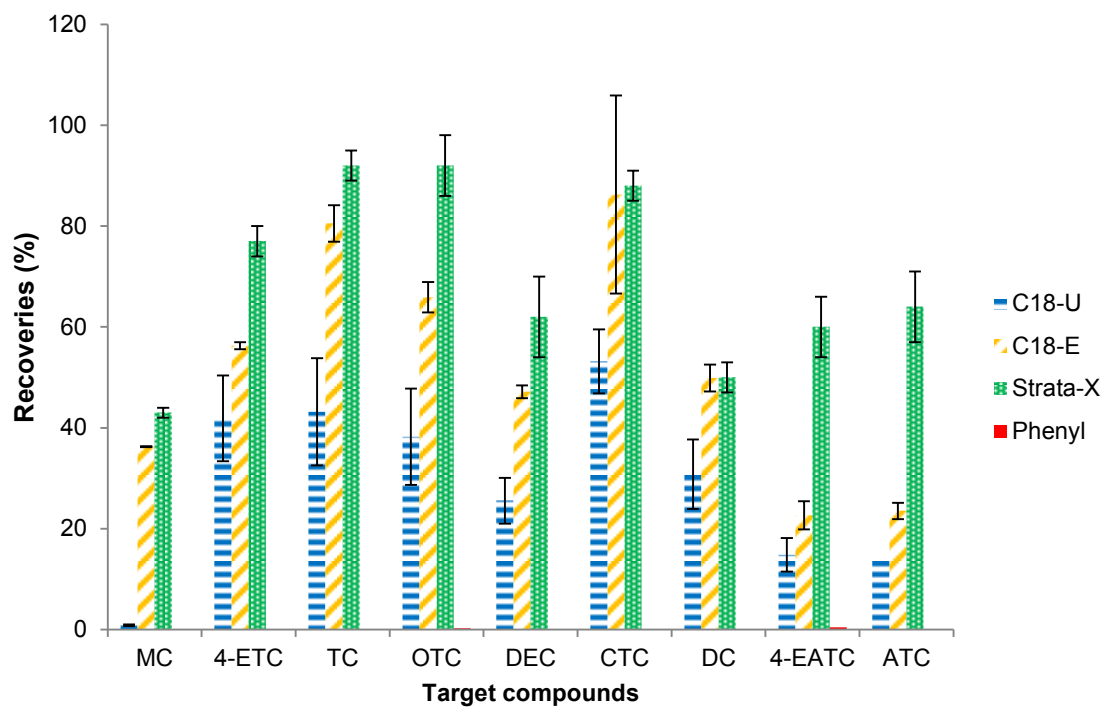




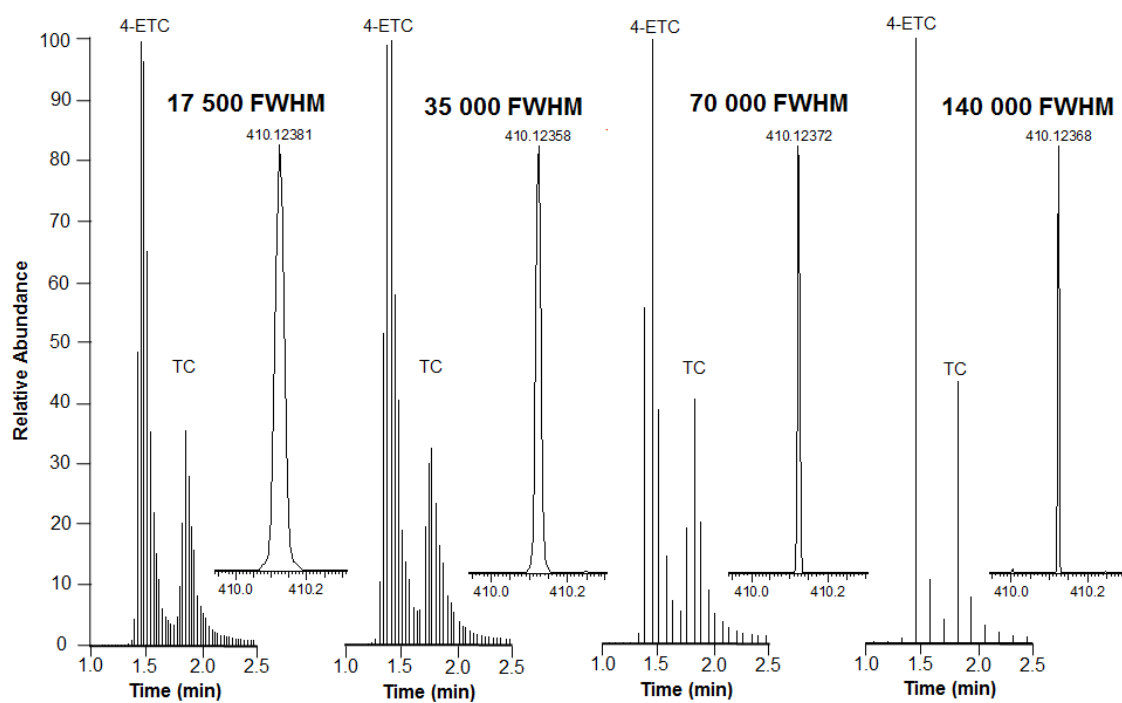
**Figure S4-3.** PRM fragmentation mass spectra of target compounds acquired with respective NCE. Major products ions used for quantitation appear in bold.



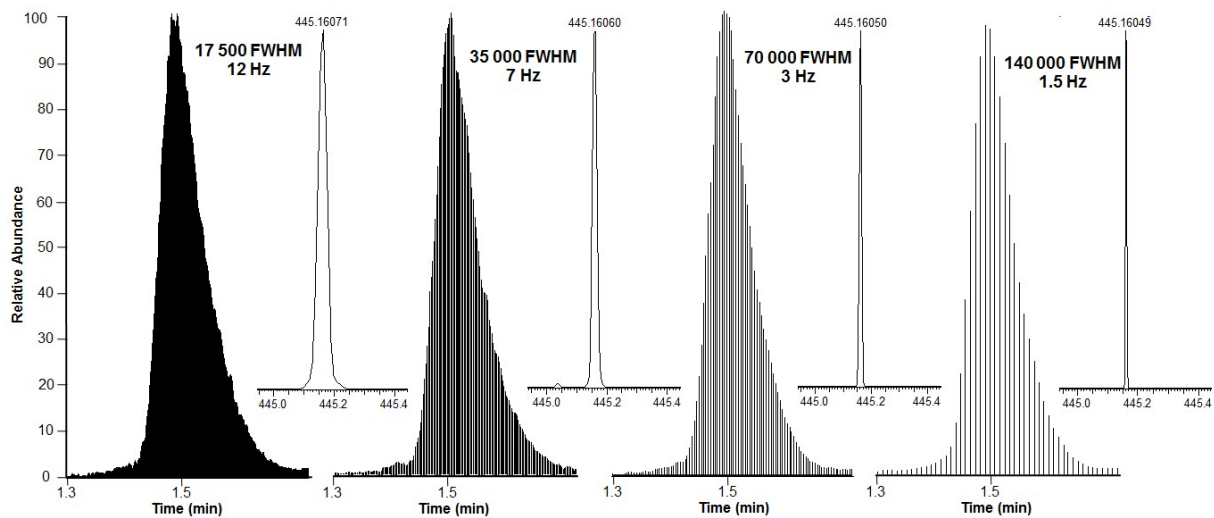
**Figure S4-4.** Tetracyclines fragmentation with increasing HCD percentage in collision cell.



**Figure S4-5.** Recoveries of target compounds at  $250 \pm \text{STD ng g}^{-1}$  ( $n = 3$ ) four different cartridges.



**Figure S4-6.** Evolution of the number of acquisition per chromatographic peak (4-ETC and TC) in PRM mode relative to the resolving power.



**Figure S4-7.** Evolution of the number of acquisition per chromatographic peak (4-ETC) in FS mode relative to the resolving power.

**Tableau S4-1.** Matrix effects in FS and PRM mode are the ratio of the response of the analytes obtained for spiked matrices after extraction to the response of the analytes recorded for the standard solution expressed as a percentage at  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 5$ ).

Compounds	Matrix effect (%)	
	FS	PRM
TC	137	142
4-ETC	48	58
ATC	128	131
4-EATC	110	114
DEC	74	83
OTC	64	68
MC	37	47
CTC	100	110
DC	74	80

## **Chapitre 5. Développement d'une approche de dépistage suspecté et non ciblé pour la détection de résidus d'antibiotiques vétérinaires dans une matrice biologique complexe par HRMS**

---

Development of a suspect, non-target screening approach to detect veterinary antibiotic residues in a complex biological matrix using HRMS

Morgan Sollic, Audrey Roy-Lachapelle and Sébastien Sauvé,  
2015,

*Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015, 29 (24) : 2361-2373

### **Note sur ma contribution**

*Ma participation aux travaux de recherche* : J'ai conçu le design expérimental avec l'aide de mon superviseur. J'ai effectué les manipulations pour valider la méthode et fait l'interprétation des résultats.

*Rédaction* : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires du Prof. Sébastien Sauvé, mon directeur de thèse.

*Co-auteur* : Audrey Roy-Lachapelle m'a assisté dans l'interprétation des résultats et dans la rédaction de l'article.

## Abstract

**Rationale:** Swine manure can contain a wide range of veterinary antibiotics, which could enter the environment via manure spreading on agricultural fields. A suspect and non-target screening method was applied to swine manure samples to attempt to identify veterinary antibiotics and pharmaceutical compounds for a future targeted analysis method.

**Methods:** A combination of suspect and non-target screening method was developed to identify various veterinary antibiotic families using liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS). The sample preparation was based on the physicochemical parameters of antibiotics for the wide scope extraction of polar compounds prior to LC-HRMS analysis. The amount of data produced was processed by applying restrictive thresholds and filters to significantly reduce the number of compounds found and eliminate matrix components.

**Results:** The suspect and non-target screening was applied on swine manure samples and revealed the presence of seven common veterinary antibiotics and some of their relative metabolites, including tetracyclines,  $\beta$ -lactams, sulfonamides and lincosamides. However, one steroid and one analgesic were also identified. The occurrence of the identified compounds was validated by comparing their retention times, isotopic abundance patterns and fragmentation patterns with certified standards.

**Conclusions:** This identification method could be very useful as an initial step to screen for and identify emerging contaminants such as veterinary antibiotics and pharmaceuticals in environmental and biological matrices prior to quantification.

**Keywords:** Veterinary antibiotics, pharmaceuticals, suspect screening, non-target screening, liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry



## 5.1 Introduction

Veterinary drugs are widely used to treat disease and protect animal health, especially in swine production. Moreover, some drugs are considered to be growth promoters and used as feed additives to bring animals to the market faster and at lower cost. Swine farmers supplement their animal feeds with a wide range of compounds from a number of therapeutic classes, including antibiotics, antiparasitics, hormones and other pharmaceuticals [21, 232, 233]. There are several dozens of different types of veterinary antibiotics used in swine production [19]. This practice requires the use of a large amount of antibiotics, whose compounds are not fully metabolised by the animals when transferred through their digestive system. Therefore, a large part of these compounds will end up in urine and feces either unchanged or as metabolites [62, 105, 125]. The swine manure is then used as crop fertilizer, and active compounds could be bioavailable and lead to environmental impacts. Several studies have reported the presence of tetracyclines (TCs), macrolides, sulfonamides and quinolones in the nearby agricultural environment [89, 177, 213]. These broad-spectrum antibiotics are widely used in modern animal husbandry and could contribute to bacterial resistance [98, 126]. Furthermore, obtaining information on the type and amount of veterinary antibiotics used in swine husbandry is difficult, making the monitoring and recording of these compounds problematic.

In recent decades, analyses of veterinary antibiotics in different types of matrices were carried out, mainly using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [62, 143]. The use of LC coupled with MS/MS combines the chemical separation of analytes with the selectivity and sensitivity of mass detection achieved by selected reaction monitoring (SRM) by the triple quadrupole (QqQ) [234]. This analytical technique in SRM mode requires the selection of known compounds and the optimization of each individual compound using certified standards prior to the analysis. Consequently, only compounds included in the SRM method may be detected and other emerging contaminants in the sample will not be detected even if they are present in significant amounts [235]. Moreover, data acquisition for multi-compound detection is limited by the number of possible acquisitions

given the duty cycle of the MS instrument. More recently, high-resolution mass spectrometry (HRMS) operated in full scan (FS) mode facilitated the analysis of several hundreds of compounds from different families in a single run. In fact, high selectivity is necessary in FS mode to avoid false positive identification of near-isobaric compounds and is obtained by filtering the total ion chromatogram (TIC) with a narrow mass window (5 ppm) [189, 236, 237]. Full scan mode available on HRMS was applied in numerous types of matrices to analyze pesticides in fruits and vegetables [190], veterinary drugs in swine muscle [238] and pharmaceuticals in wastewater [239]. These detection and quantification approaches were based on external standard methods and referred to targeted screening, which exclude the option to measure unexpected compounds that were not initially included in the method, otherwise, HRMS used in FS mode enabled retrospective analysis.

Nowadays, identifying the structure of small molecules is still challenging in complex matrices (i.e. manure, soils, sludge and sediment). The presence of natural organic matter such as biomolecules or humic acids can interfere with extraction, ionization, detection and identification. Due to its sensitivity and selectivity, mass spectrometry (MS) is a method of choice to screen for and identify “know unknown” compounds. Identification of small molecules was initially based on the comparison of the fragmentation pattern of mass spectra acquired with gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) with NIST library [240]. More recently, new approaches based on mass measurements for the screening of unknown compounds were reported using the Orbitrap mass spectrometer [191, 241]. High-resolution mass spectrometers are able to scan wide mass range in FS acquisition mode with high resolving power (RP), mass accuracy and sensitivity. Suspect and non-target screening refer to identification of compounds with little or without information on their chemical identities, can only be carried out by a selective exact mass extraction of the high-resolution FS data. However, this screening method based on accurate mass measurement produces a large amount of data. It is therefore important to develop and use a strategy to selectively process these data and eliminate irrelevant information. This identification strategy used in this study was based on metabolomics studies using data processing and statistical software able to process the large amount of data generated [242, 243].

A sample extraction and clean-up method followed by a target compound quantification method was previously developed and validated by our laboratory using LC-HRMS in FS and parallel reaction monitoring (PRM) mode for the analysis of TCs in swine manure [236]. Veterinary antibiotics are mainly hydrophilic and polar [244, 245], therefore, an extraction using a water-based McIlvaine buffer solvent followed by a polymeric clean-up and concentration was used in this study to extract and concentrate the more polar compounds present in the matrix [145]. However, analytes were contained in a complex matrix and this type of extraction recovered a large amount of polar molecules, including matrix components, thus complicating the data processing. There is a wide range of commercial such as SIEVE (Thermo Fisher Scientific) or toxID (Thermo Fisher Scientific) and free access software options such as XCMS (Scripps Research Institute), MZmine, MetAlign (Rikilt Wageningen UR) or enviMass (Eawag) for HRMS data processing and they are usually based on peak picking, deconvolution and alignment for metabolomics data analysis [246-249]. Due to its ability to process the large amount of data generated by the LC-HRMS techniques and because it was designed for both small and large molecules, the SIEVE 2.1 software was used in this study [250]. The software relies on free database libraries to identify the isolated compounds relative to their exact masses. Several libraries are available online, but PubChem and Chemspider seemed to be the most complete. The combination of the exact mass measurements of the Orbitrap coupled with data processing software able to process and assign exact masses to compound names with the help of databases has already been used in numerous studies. For example, Hollender *et al.* found several pesticides with this strategy in Swiss surface waters [247]; Lohne *et al.* used the same approach and applied a non-target screening on dog food to detect and identify glycoalkaloids [251]; Schymanski *et al.* developed a suspect and non-target screening method to characterize polar organic contamination in wastewater [252] and Chiaia-Hernandez *et al.* also used a suspect and non-target screening approach to identify various organic contaminants in lake sediments [248].

This identification strategy consists of an automated data processing, a statistical rejection procedure and a confirmation step. Once the masses were isolated by the data processing and linked to the potential candidates, a statistical rejection was applied. Then, the peak shape and mass accuracy were first checked manually to ensure that the exact mass peak

isolated truly belonged to the identified compound. Confirmation of the presence of identified compounds was based on an identification points system inspired by European Commission decisions [253]. Various identification requirements were achieved in order to confirm their presence in the sample. Mass measurements retention times and fragmentation and isotopic patterns of the identified compound were also checked and compared to those of their corresponding reference standards. Checks to determine whether the identified compounds log *D* matched with the aqueous extraction window and with the expected retention time were also carried out as additional evidence [247].

The objectives of this study were first to develop a multi-class extraction and sample treatment method inspired by previous work and second to propose a suspect and non-target screening method to identify veterinary antibiotics and other potential agricultural contaminants in a complex biological matrix. This procedure makes it possible to carry out a sample characterization as a first approach before a quantification step. This metabolomics-inspired strategy using HRMS to screen for and identify compounds of interest can deliver valuable information despite matrix complexity and could be useful in the field of veterinary drug residues control.

## **5.2 Materials and methods**

### **5.2.1 Chemicals and reagents**

Tetracycline (TC, purity  $\geq 99.5\%$ ), 4-epitetracycline (4-ETC, purity  $\geq 98.4\%$ ), anhydrotetracycline (ATC, purity  $\geq 99.5\%$ ), 4-epianhydrotetracycline (4-EATC, purity  $\geq 90.5\%$ ), chlortetracycline (CTC, purity  $\geq 93.0\%$ ), 4-epi-chlortetracycline (4-ECTC, purity  $\geq 97.0\%$ ), doxycycline (DC, purity  $\geq 98.2\%$ ), demeclocycline (DEC, purity  $\geq 94.5\%$ ), amoxicillin (AMX, purity  $\geq 98.7\%$ ), benzylpenicillin (PEG, purity  $\geq 99.6\%$ ), ceftiofur (CFT, purity  $\geq 97.7\%$ ), sulfadoxin (SFX, purity  $\geq 99.9\%$ ), sulfadiazine (SFZ, purity  $\geq 99.3\%$ ), lincomycin (LCM purity  $\geq 100\%$ ), trimethoprim (TMP, purity  $\geq 99.5\%$ ), tylosin (TYL, purity  $\geq 84.6\%$ ), acetaminophen (N-Acetyl-p-Aminophenol, APAP, purity  $\geq 99.0\%$ ),

medroxyprogesterone (MP, purity  $\geq 99.0\%$ ) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Isochlortetracycline (ICTC, purity  $\geq 95.0\%$ ) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Chloramphenicol (CAM, purity  $\geq 99.0\%$ ) was purchased from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada). All solvents were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada), and HPLC grade H<sub>2</sub>O was used for dilutions. Individual stock solutions were prepared in methanol (MeOH) at a concentration of 1 000 mg L<sup>-1</sup> and kept at -20°C for a maximum of 3 months. Individual intermediate solutions were prepared by dilution of the 1 000 mg L<sup>-1</sup> stock solutions in H<sub>2</sub>O. Given the potential for degradation of the target analytes, working solutions were prepared daily at a concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> by dilution in H<sub>2</sub>O from individual intermediate stock solutions. Sodium phosphate dibasic (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, purity  $\geq 99.0\%$ ), citric acid (purity  $\geq 99.5\%$ ), formic acid (HCOOH, purity  $\geq 95.0\%$ ) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>·2H<sub>2</sub>O, purity  $\geq 99.0 - 101\%$ ) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Chromatographic mobile phases were prepared daily.

### 5.2.2 Extraction and sample clean-up

To achieve the extraction of all veterinary antibiotics and pharmaceutical compounds of interest, an aqueous-based extraction was applied to a swine manure sample. Exactly 2.0 mL of liquid swine manure was measured 4 times and placed into 4 different 15 mL polypropylene conical-bottom centrifuge tubes (Fisher, Rockwood, TN). A fifth tube without manure served as blank method. Exactly 10.0 mL of McIlvaine extraction buffer at pH 5 containing 10 mM EDTA was added to the vial. McIlvaine extraction buffer (500 mL) was prepared by mixing 243 mL of 0.1 M citric acid and 257 mL of 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [254]. The samples were vortexed for 1 min to suspend the particles and homogenize the solution and were subsequently placed in an ultrasonic bath for 15 min at 25°C. They were then centrifuged at 4 000 rpm for 15 min. Finally, 9 mL of the supernatant was collected into 15 mL amber glass tubes.

The solid phase extraction (SPE) was done using a 12-position manifold manufactured by Phenomenex (Torrance, CA). A polymeric reversed phase Strata-X (Phenomenex,

Torrance, CA) cartridge with a total volume of 6 mL with 200 mg bed mass was activated with 5 mL of MeOH and 5 mL of H<sub>2</sub>O. The extraction solution buffer (5 mL) was passed through the cartridge before the sample was loaded onto the cartridge column by gravity. The SPE cartridges were rinsed with 5 mL of H<sub>2</sub>O to eliminate the remaining salts and other matrix compounds before a 45-min cartridge drying step. Elution of the cartridge was done with 5 mL of MeOH into polypropylene conical-bottom centrifuge tube. The eluates were then evaporated to dryness using a gentle stream of nitrogen at about 30°C with a nine-port Reacti-vap unit from Pierce (Rockford, IL). Successive dilutions were done by dissolving the dry extracts into 250, 500, 1 000 and 2 500 µL of HPLC grade water in the polypropylene conical-bottom centrifuge tubes. The solutions were then centrifuged (5 min at 4 000 rpm) and transferred into a polypropylene autosampler vial (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) before injection.

### **5.2.3 Swine manure sample**

The swine manure sample analyzed in this paper was collected at the research farm of the Research and Development Institute for the Agri-environment (IRDA) located near Quebec City (Québec, Canada) and was sampled from the indoor pit of a swine facility.

### **5.2.4 LC-HESI-HRMS parameters**

A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series RS pump coupled with Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS column compartments and a Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS autosampler controlled by Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA and Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific, Germany) were used for the analysis. A Hypersil GOLD<sup>TM</sup> C18 column (150 mm × 2.1 mm, 1.9 µm particles) preceded by a guard column (5 mm × 2.1 mm, 0.2 µm porosity) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used for the chromatographic separation of target compounds at 20°C.

Mobile phase A consisted of H<sub>2</sub>O with 0.1% HCOOH. Mobile phase B consisted of MeOH with 0.1% HCOOH. A gradient was used starting from 30% B and then the MeOH was increased to 95% from 0-6 min and was held constant at 95% for 4 min. Finally, the mobile phase was brought back to initial conditions and maintained for 4 min for column conditioning before the next injection. A flow rate of 300  $\mu\text{L min}^{-1}$  and an injection volume of 10  $\mu\text{L}$  were used. The LC gradient is given in the supplementary information (**Figure S5-1**).

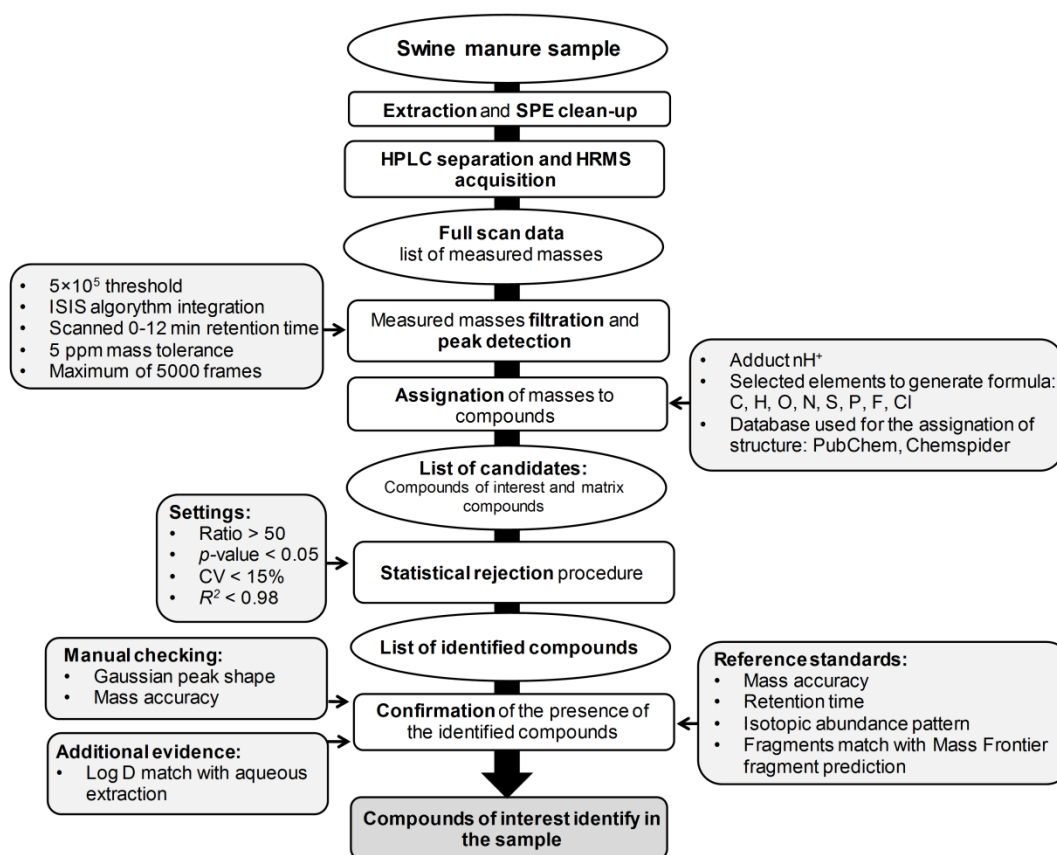
A heated electrospray ionization interface (HESI-II) operated in positive mode was used for the ionization. The parameters were set as follows: ionization spray voltage at +4 300 V; capillary temperature at 275°C; vaporizer temperature at 300°C and sheath gas and auxiliary gas flow at 50 and 30 arbitrary units, respectively.

The detection of compounds of interest was performed using a hybrid quadrupole-Orbitrap (Q-Exactive) mass spectrometer controlled by Xcalibur 2.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Instrument calibration was done every 5 days with a direct infusion of a LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL) to reach mass accuracies under 5 ppm. All Q-Exactive parameters, such as RP, automatic gain control (AGC) and ion time (IT), were chosen to improve sensitivity and selectivity. The FS mode RP was set at 70 000 FWHM  $m/z$  200 (7 Hz) and  $m/z$  100 – 1 000 scan range wide. The AGC and IT parameters were set at  $5 \times 10^5$  ions capacity and 100 ms filling, respectively. The data-dependent acquisition (DDA) mode was activated to automatically switch between the FS and fragmentation modes. Resolving power was set at 17 500 FWHM  $m/z$  200 (1.5 Hz), AGC and IT parameters were set at  $2 \times 10^5$  and 55 ms for fragmentation mode. The intensity threshold was fixed at  $3.6 \times 10^5$  to trigger the fragmentation at collision energy of 35% with the HCD. The top five most abundant ions were selected for fragmentation and a single loop count was used for the number of repetitions. The precursor ions were filtered by the quadrupole, which operates at an isolation width of 0.4 FWHM at  $m/z$  200. For this experiment, the maximum possible cycle time of the instrument was about 0.6 s. These parameters allowed enough acquisition points across the chromatographic peaks to screen compounds of interest. **Figure S5-2** illustrates the number of acquisition points for 4-ETC and TC chromatographic peak as an example.

### 5.2.5 SIEVE parameters

SIEVE 2.1 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used to determine the mass peaks of interest among the other mass peaks introduced via a complex biological matrix and sample processing. In an attempt to reduce the volume of data generated by FS mode, software settings were chosen to minimize the number of responses and keep the peaks of interest. The FS data were submitted to SIEVE, and the first step was an alignment of the chromatograms [255]. Then, a frame separation of the chromatograms was carried out. SIEVE's basic settings during the sieving procedure were a minimum intensity threshold of  $5 \times 10^5$ , which triggers the framing of the peak. The entire FS TIC was acquired between 0 - 12 min retention times and was developed with a window of  $m/z$  100 – 1 000 and a 5 ppm mass tolerance window. A 1 min frame time window and a maximum of 5 000 frames were used. Chromatographic peaks were integrated using the ISIS algorithm. The PubChem and Chemspider databases were used for the assignation of mass peaks to compound names. Compound screening was limited to adduct  $nH^+$ , and the elements selected to generate the chemical formula from the  $m/z$  were C, H, O, N, S, P, F and Cl. The entire identification process is summarized in **Figure 5-1**.





**Figure 5-1.** Workflow of the non-target screening identification procedure.

## 5.2.6 Data processing

SIEVE processing results in a list of masses linked to a Chemspider identification. Each Chemspider identification was relative to several proposed compounds according to their measured masses and statistical parameters such as the ratio of the sample on the blank peak intensity, the  $p$ -value of the significant difference, coefficient of variation ( $CV$ ,  $n = 3$ ) and the peak intensity integrations. This list of measured masses was processed and reduced by applying a statistical rejection procedure with restrictive settings. The first requirement to select measured masses was a comparison of the  $p$ -value to a defined threshold, here  $\alpha = 0.05$ . To be retained as statistically significant and enable the rejection of the null hypothesis, a  $p$ -value  $< 0.05$  was required for the measured masses. Significance was calculated in SIEVE

using a standard *t*-test. Only measured mass peaks with a ratio  $> 50$  between peak intensity in the sample extracts and in the blank sample were retained [191]. Then, all the measured masses with a CV above 15% between each injection ( $n = 3$ ) and with a  $R^2 < 0.98$  resulting from the successive dilution of the dry extracts were rejected. Finally, SIEVE could propose several results for a same measured mass with different ppm errors ( $\leq 5$  ppm). Only compounds with the lowest mass error compared to the mass measured and with a chemical abstracts service (CAS) number were selected.

### 5.2.7 Confirmation and validation

The compounds remaining after statistical treatment were first confirmed by visually checking their presence and their chromatogram peak shape in the TIC spectrum. Also, their masses were associated with their supposed chemical formulas via the elemental composition tool of Xcalibur software to avoid false positives. Depending of their availability, the reference standards of the suspect compounds were purchased and their expected retention times and fragmentation patterns obtained via the DDA mode were checked and compared with the sample results for confirmation. The isotopic abundance patterns of the identified compounds were also checked to confirm the identification. The statistical generation of product ion structures and the proposed mechanism of fragmentations to confirm the presence of any compounds were carried out with Mass Frontier software (Highchem, Bratislava, Slovakia). Product ion masses were compared with those found in the sample for confirmation purposes. Each identified compound was associated with its  $\log D$  at pH 5.5 calculated with ACD/labs (Toronto, Ontario, Canada) available on Chemspider and was correlated to the fraction of extraction and with their expected retention times [71]. Finally, the entire method was evaluated on a swine manure sample spiked ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) with veterinary antibiotics from different families (i.e. AMX, TMP, LCM, SFX, TYL, PEG, TC, CTC, CAM). This assessment confirmed that the different families of veterinary antibiotics could pass through the sample extraction and clean-up steps and the entire identification procedure.

The validation of the method was assessed by determining the limit of identification (LOI) of each identified compound. The LOI of a qualitative screening method is the lowest

concentration for which it has been demonstrated that a compound can be detected and identified by the identification procedure method [256]. Limits of identification were determined experimentally by injecting extracts of sample spiked with the suspected compounds at four concentration levels (100, 50, 25, 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). The highest concentration was first injected and if the tested compounds were identified and present in the identified compounds list, they were considered identifiable at this concentration. Then, another spiked sample with lower concentration was injected and the results were processed by the identification procedure method. The process was repeated until the lowest concentration was reached. The LOI was assigned to each identified compound as the lowest concentration that the method was still able to detect this compound.

## **5.3 Results and discussion**

### **5.3.1 Sample extraction and clean-up**

Numerous veterinary antibiotics are composed of a non-polar core and polar functional groups, which give them hydrophilic properties and are thus soluble in acidic aqueous solutions. During the development of method for multiclass compounds, recovery optimization remains an important but secondary issue because the challenge when screening putative compounds is to develop a simultaneous extraction able to extract as many compounds of interest—here, veterinary antibiotics—from as many classes as possible in a repeatable way. At the same time, this extraction must be efficient enough to impart sufficient sensitivity to the analytes in order to be distinguishable from the matrix background noise. Various extraction solvents were used to extract antibiotics in all types of matrices. Aqueous extraction solvents showed poor recoveries for semi-polar antibiotics and organic solvents revealed low recoveries for certain polar antibiotics [238]. Many studies used acetonitrile (ACN) and MeOH to extract different drug residues [185]. While they were suitable solvents for most of the drugs, they were not optimal for TCs [88]. Moreover, ACN is preferred over MeOH as an extraction solvent because  $\beta$ -lactam antibiotics are unstable in alcohol and

because MeOH extracts too many matrix components, complicating the clean-up step [88]. The extraction method was inspired by a previous study on the analysis of TCs in swine manure [236]. This study used an aqueous McIlvaine buffer at pH 5 to extract target compounds and avoid extracting matrix compounds. The pH was adjusted to 5 to ensure stability of all compounds of interest. Depending on the pH of the aqueous medium, most of the antibiotics used in veterinary medicine are soluble in water [244, 245]. Also, EDTANa<sub>2</sub> is often employed at high concentrations in the extraction step to trap divalent ions. However, sodium could cause signal suppression by decreasing the ionization efficiency in the source, and the concentration of EDTANa<sub>2</sub> was therefore limited to 10 mM in the extraction fraction. The method was validated by the successful extraction of different classes of antibiotics (i.e. TCs, sulfonamides,  $\beta$ -lactams, macrolides, lincosamides, and amphenicols) in a spiked sample of swine manure. Moreover, other pharmaceuticals related to swine husbandry medicine could be extracted with this method.

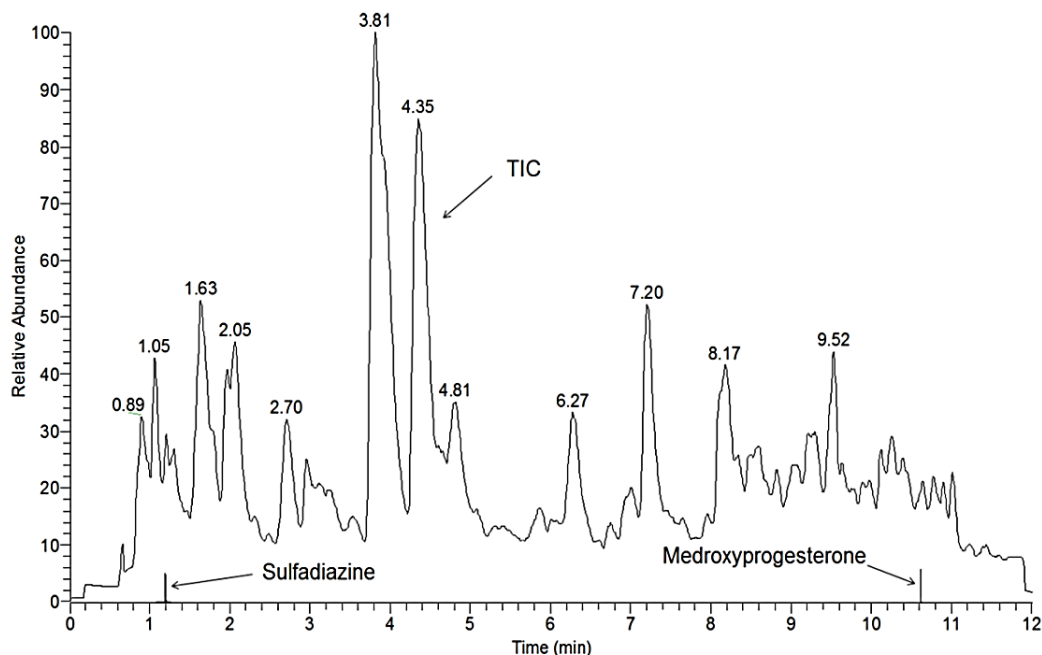
Clean-up is an important step for compounds with different physicochemical properties. Analytes loss could occur with an excessively selective SPE clean-up but this can be significantly reduced with a generic polymeric reversed phase (Strata-X) with adjusted pH and a loading step control. This type of cartridge is able to capture a broad class of polar compounds, including veterinary antibiotics and pharmaceuticals, by creating hydrophilic interactions with polar functions and  $\pi$ - $\pi$  bonding of the aromatic core. In addition, this type of cartridge also retains a large amount of polar compounds from the matrix, such as primary or secondary amines from the manure fermentation, which can complicate the identification process and considerably increase the amount of data. The cartridge was washed with water to eliminate part of the salt remaining on the cartridge, which could impact ionization efficiency.

### **5.3.2 Liquid chromatography, ionization and HRMS detection**

The chromatographic separation was done with a reversed phase column, which provides interactions on veterinary antibiotics and a wide range of potentially interesting compounds.

Electrospray is a soft ionization source that is able to ionize compounds with a wide range of physicochemical properties with high efficiency. Veterinary antibiotic compounds are composed of many polar functional groups, which could be positively charged and are therefore easily ionizable. The ionization source parameters (i.e. temperature of the capillary and of vaporization, gas flows and voltage) were set to have the optimal ionization for all target compound families. Parameters were determined by ionizing a solution containing the different veterinary antibiotic families, and signal intensity enhancement was measured for all the compounds with these settings. Thus, the parameters were not optimized for a specific class of compound. Otherwise, these standard settings would enable the ionization of matrix compounds that could create significant matrix effects and ion signal suppression.

The chromatographic separation method and the non-restrictive ionization were combined with a detection method able to distinguish all possible compounds of interest at low concentrations through the amount of peaks of the TIC (**Figure 5-2**). The FS mode available on the Q-Exactive enabled the wide mass range scanning at high RP required for sufficient selectivity to avoid false positives. The high RP (70 000 FWHM at  $m/z$  200), which provides high mass accuracy and high signal stability, yields selectivity comparable to that obtained using tandem MS technology operated in SRM [189, 236]. A narrow mass tolerance window was applied on FS spectrum to prevent the inclusion of near-isobaric compounds in data treatment. However, a very narrow mass tolerance window could result in peak distortion or, in the worst case, in false negatives [189, 236]. But an excessively wide mass tolerance window could include false positives caused by co-elution of near-isomeric compounds [257]. Therefore, the mass tolerance window must be carefully evaluated according to the mass resolution provided by the Q-Exactive and the complexity of the sample. Finally, during the detection process, DDA mode was activated and fragmentation was triggered when the intensity was above  $5 \times 10^5$  to acquire fragmentation patterns of the compounds of interest.



**Figure 5-2.** Total ion chromatography obtained in FS mode of swine manure sample with example of SDZ and MD traces compared to the TIC.

### 5.3.3 Identification strategy and data processing

The main goal of the structure identification of unknown small molecules by HRMS is to obtain candidate molecular formula of the most intense peaks that emerge from the background noise generated by the matrix. Thus, the challenge is to selectively process the data to identify the veterinary antibiotic and pharmaceutical ions through the amount of matrix-generated ions. The identification strategy consists of automated and manual rejection procedure steps to acquire a list of candidates potentially present in the sample, while eliminating irrelevant compounds. Initially, a blank spectrum, which is basically a solvent blank extract, was automatically subtracted from the TIC by the software (**Figure 5-2**). This operation removed the background peaks that result from sample processing, such as plasticizers from the tubing, phthalates from the column or the SPE cartridge and volatile molecules in laboratory air, and kept only compounds of interest and matrix compounds. Low intensity and non-aligned masses were also rejected. The automated data processing with

SIEVE (intensity threshold, peak shape, blank subtraction and retention time alignment) allowed the elimination of the major part of the undesired compounds.

After automated data processing, the software produced lists of masses connected to a ratio between peak intensities of the sample and a control sample, and the  $p$ -values of the significance difference for potential compounds was assessed. The significance level for testing the statistical hypothesis was  $\alpha = 0.05$ . Masses with a  $p$ -value below  $\alpha$  mainly belonged to matrix compounds and were rejected. Masses with high ratio ( $> 50$ ) were retained as potential compounds of interest. This arbitrary threshold coupled with a visual inspection made it possible to remove a large part of the undesired compounds. Some peaks with a lower intensity ratio could be of interest but a strict selection was preferred to limit the volume of the dataset. Moreover, masses with a ratio below 50 often belonged to distorted chromatogram peaks and were attributed to matrix components. The coefficient of correlation ( $R^2 > 0.98$ ) established relatively to successive dilutions and coefficient of variation ( $CV < 15\%$ ,  $n = 3$ ) allowed to selectively retain compounds of interest. Exact masses from matrix compounds presented high CV and  $R^2$  well below 0.98 due to instability and were eliminated. Statistical processing of the data and visual inspection of the chromatogram further reduced the potential candidates list by 20 %.

Compounds present at high concentrations in the sample can lead to high intensities of  $^{13}\text{C}$  (M+1) and  $^{37}\text{Cl}$  (M+2) isotopes. These isotope peaks could be confused with peaks of unknowns and selected in the list as potential compounds of interest because the software does not take into account the presence of less abundant isotopes (i.e.  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ ). Therefore, it was necessary to manually check the mass spectra and the isotopic abundance pattern for each mass selected by the software. It was also possible to find several chromatogram peaks that had the same exact mass due to the epimerization of certain veterinary compounds such as TCs. The degradation and metabolic transformations of these antibiotic families will change the conformation of the molecule and yield a different retention time compared to the parent molecule [103, 136]. The software is not able to differentiate between these two hits and will assign the same name to both. The mass measurement is the principal parameter of the identification strategy, and it was assumed that all target compounds were protonated during the ionization. In the case of veterinary compounds, adducts containing alkali metals such as

$K^+$  or  $Na^+$  could be formed, leading to the incorrect identification of unknown compounds [242]. To avoid this, masses of interest selected by the software were manually related to the elemental composition using Xcalibur. At the end of the process, PubChem and Chemspider databases were used to connect the molecular formulas of the selected exact masses to compound names. These databases contain information on over millions of molecules from several databases [258, 259]. Also, data processing software could propose several molecule names with few ppm of difference between the suggested and database masses. Molecular names proposed could belong to registry compounds such as veterinary antibiotics or to unregistered matrix compounds. Therefore, only parent compounds with a CAS number were selected as compounds of interest.

### **5.3.4 Confirmation and validation**

The last step of this identification strategy was to confirm the presence of the compounds identified in the sample to avoid false positive. A simple confirmation of the presence of an identified compound was done by manually checking the chromatogram peak shape with Xcalibur and allows rejecting several false positive compounds. A chromatographic peak must have a Gaussian shape to be accepted. Interfering compounds from the matrix or background are often distorted and do not have a Gaussian shape due to instability. This first check eliminates several false positive.

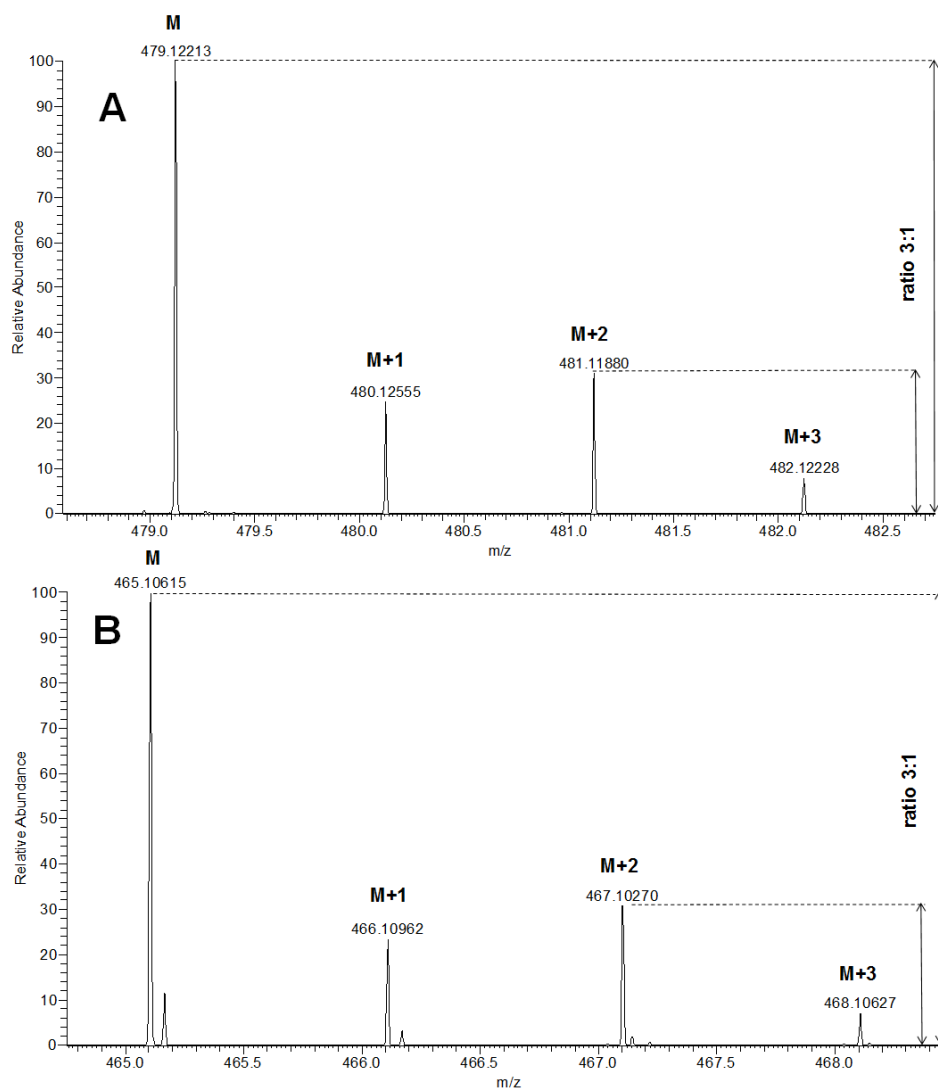
This confirmation was inspired by the identification point system of the European Commission decisions [253]. Identification points are based on different filters including: mass accuracy, retention time, fragmentation and isotopic pattern of the identified compounds. Firstly, the mass accuracies of the identified compounds should not be over 5 ppm to avoid false positives [247]. Over 5 ppm tolerance, the possibility of measuring a co-isomer of the identified compound is important [189, 247, 260]. Secondly, identified compounds in the sample were confirmed by comparing retention times with reference standards [247]. The retention time of the reference standard solution of the identified compound may have shifted by a few seconds compared to the measurement made in the matrix. This difference should not exceed  $\pm 0.15$  min [261]. Thirdly, the isotopic patterns of the suspected compounds were



checked and compared to those of the reference standard. The presence of chlorine atoms could be easily confirmed by manually checking the relative intensity of the M+2 isotope ion indicating the presence of a chlorine atom (**Figure 5-3**). Fourthly, the fragmentation pattern of each suspected compound was checked and interpreted. Mass Frontier is a powerful tool to study the fragmentation pattern and the confirmation of the presence of any identified and unknown compounds such as metabolites. The software could accurately predict the fragmentation of a charged molecule by applying known fragmentation mechanisms to a submitted structure. Thus, the confirmation and validation of the presence of a compound was done by comparing the product ions derived from the DDA mode on the standard solution and on the sample with those found with Mass Frontier.

As a final check, the identified compounds that passed through the different filters were correlated with their  $\log D$  at pH 5.5 to check whether they matched with the aqueous extraction and with their expected retention times. Identified compounds that were not soluble in water were potentially false positives. In addition, it is known both from theory and practice that there is a relationship between the  $\log D$  and the retention time of the compound.

The main purposes of qualitative screening methods are the ability to confirm the presence of a compound of interest at a determined level and to distinguish between positive and negative sample. The series of filters (mass accuracy, retention time, fragmentation and isotopic pattern) applied on the data allowed the elimination of the major part of possible false positive, while manual inspection of the chromatogram (peak shape, mass accuracy and  $\log D$ ) further reduced the possibility of false positive remaining. As a last step, the screening method and identification strategy has been assessed by data processing of spiked extract sample chromatograms of the identified compounds at different levels. This method must be able to suggest the correct compound for each mass peak retained by the identification strategy. Thus, this identification strategy identified compounds of interest as low as  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  in swine manure without false positive according to LOI (**Tableau 5-1**), which varied between 10 and  $25 \mu\text{g L}^{-1}$ . However, the LOI obtained in this study can effectively detect compounds of interest in swine manure at low levels. This type of matrix could contain veterinary antibiotics and pharmaceuticals at concentrations up to  $\text{mg L}^{-1}$ , and LOI measured with this method were therefore adapted to the matrix.

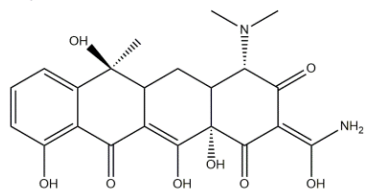


**Figure 5-3.** Isotopic abundance pattern of CTC (A) and DEC (B) with ratio 3:1 between M and M+2 in swine manure sample.

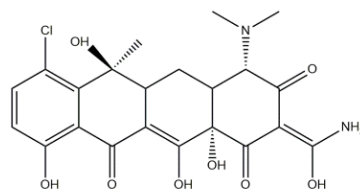
### 5.3.5 Identified compounds

SIEVE software produced a list of 5 553 masses found after FS automated data processing of the swine manure extracts. The statistical rejection procedure retained only 50 masses related to compound names. Eight compounds (one hormone, one analgesic and six antibiotics) and some of their isomeric metabolites were identified and presented an interest in

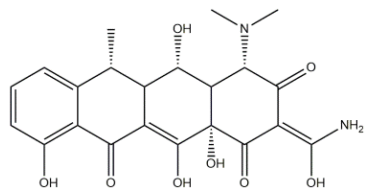
veterinary medicine treatment. In a first approach, screening of compounds of interest was focused on veterinary antibiotics. Because the APAP and MD found in the sample are of interest to veterinary medicine and linked to swine husbandry, they were added to the list of identified compounds of interest. Their structures are presented in **Figure 5-4** and their principal physicochemical parameters are described in Table 1. Among the identified compounds (**Figure 5-4**), several were not of interest such as purines and amines related to manure fermentation and compounds derived from urea. Examples are presented in the supplementary materials (**Figure S5-3** and **Tableau S5-1**).

**Tetracyclines**

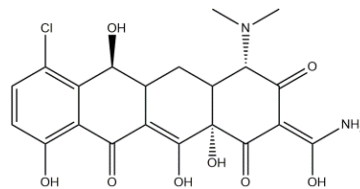
Tetracycline (TC)



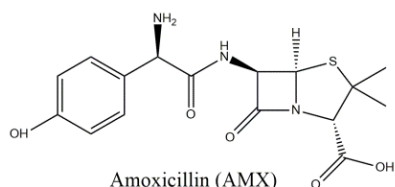
Chlortetracycline (CTC)



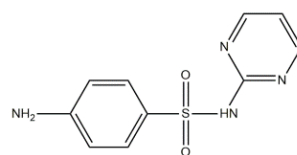
Doxycycline (DC)



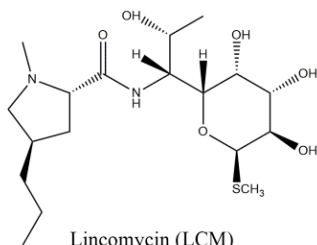
Demeclocycline (DEC)

**Beta-lactams**

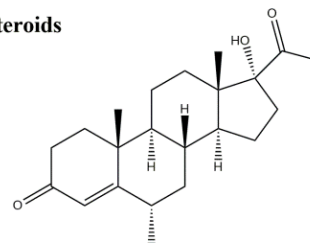
Amoxicillin (AMX)

**Sulfonamides**

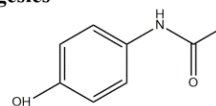
Sulfadiazine (SDZ)

**Lincosamides**

Lincomycin (LCM)

**Steroids**

Medroxyprogesterone (MD)

**Analgesics**

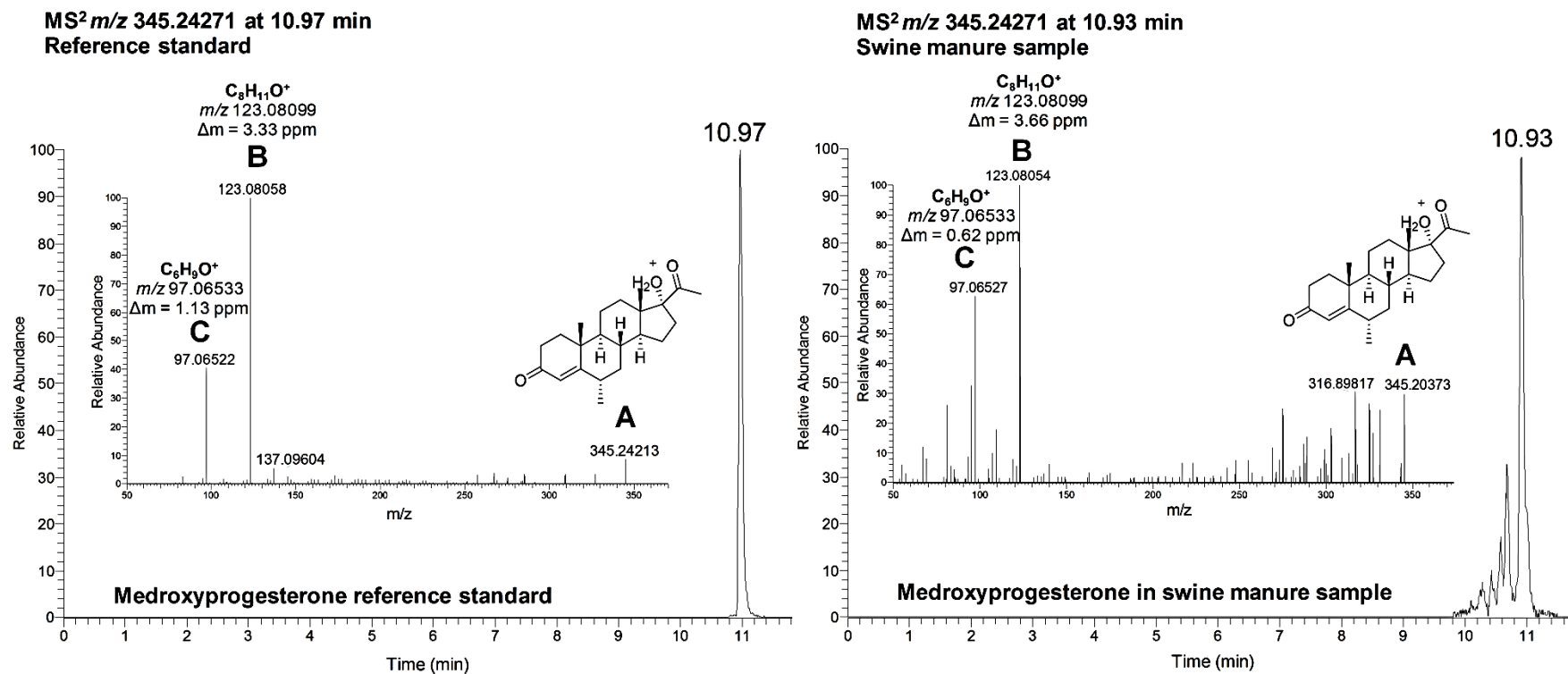
Acetaminophen (APAP)

**Figure 5-4.** Chemical structures of veterinary antibiotics, steroid and analgesic as well as matrix compounds found in swine manure sample.

**Tableau 5-1.** Description of the identified compounds of interest.

Compounds	CAS number	Description	Molecular formula	Retention time (min)	Measured mass [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Mass accuracy (ppm)	Log <i>D</i> (pH 5.5)	LOI (µg L <sup>-1</sup> )
Tetracycline	64-75-15	Antibiotic	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	2.17	445.16100	0.21	-3.27	10
4-epitetracycline	×	Metabolite	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	1.73	445.16033	1.71	-3.27	10
Doxycycline	564-25-0	Antibiotic	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	8.15	445.16196	1.94	-2.98	25
Demeclocycline	127-33-3	Antibiotic	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	3.39	465.10673	0.56	-2.97	25
4-epidemeclocycline	×	Metabolite	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	2.12	465.10613	0.56	-2.97	25
Chlortetracycline	57-62-5	Antibiotic	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	4.47	479.12193	0.40	-2.71	10
4-epichlortetracycline	×	Metabolite	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	3.94	479.12153	1.23	-2.71	10
Isochlortetracycline	514-53-4	Metabolite	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	2.70	479.12148	1.33	-1.32	10
Lincomycin	154-21-2	Antibiotic	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	1.59	407.22164	0.14	-2.08	25
Amoxicillin constitution isomer	×	Metabolite	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	1.03	366.11249	0.36	-2.04	25
Sulfadiazine	68-35-9	Antibiotic	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	1.20	251.06006	0.85	-0.09	10
Acetaminophen	103-90-2	Analgesic	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	1.28	152.07087	1.87	0.40	10
Medroxyprogesterone	520-85-4	Steroidal progestin drug	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	10.97	345.24271	0.75	3.52	25

The identification of MP and SDZ is described in **Figures 5-5** and **5-6** as examples and the identification of the other compounds of interest are presented in supplementary materials (**Figure S5-4–9**). The compound exhibiting androgenic potency found in the sample of swine manure was MP, a synthetic variant of the steroid hormone progesterone. Medroxyprogesterone acetate (MPA), a highly potent acetylated derivative of MP, is mostly used in swine farming and belongs to the class of progestine hormone drugs. The steroid is usually used for humans to prevent pregnancy and control the estrus cycle but, in swine production, it is used as a growth promoter [262]. It is administered to the swine via their feed and therefore comes from an exogenous source. Medroxyprogesterone is also a metabolite of MPA and may have been administered instead of MP but no traces of MPA were detected in the sample. Also, MP molecular ion ( $m/z$  345.2) fragments into two major product ions (i.e.  $m/z$  123.1 and  $m/z$  97.1) according to the fragmentation spectrum of the standard (**Figure 5-5**). The same fragments were present in the swine manure sample and correspond to  $C_8H_{11}O^+$  ( $m/z$  123.1) and  $C_6H_9O^+$  ( $m/z$  97.1) according to Mass Frontier. The chromatographic injection of the standard reveals a similar retention time to the standard (10.97 min) and the sample (10.93 min) and confirms the presence of MP in swine manure.

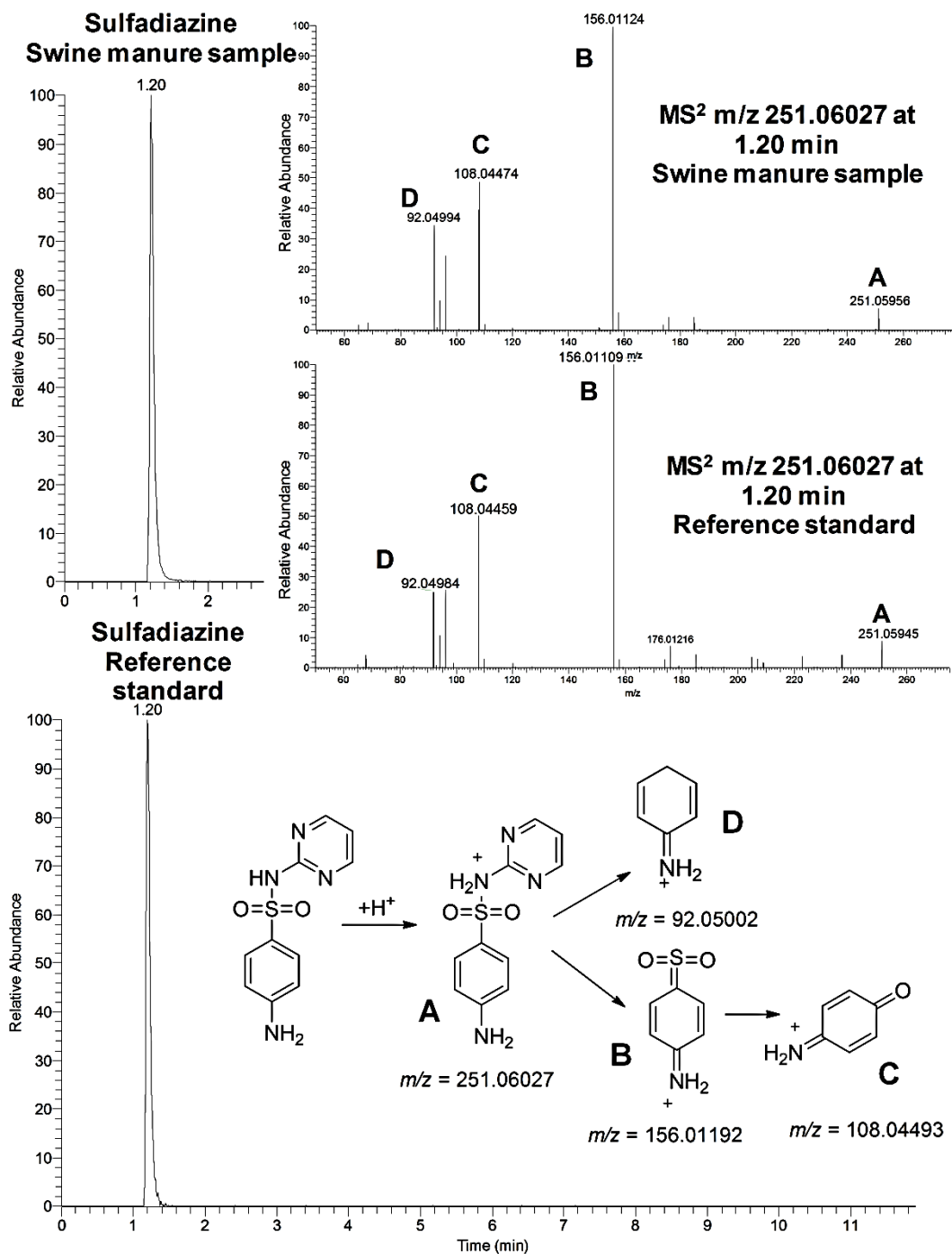


**Figure 5-5.** Identification of MP from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energy); Summary of the mechanism of fragmentation proposed.

Acetaminophen is widely used for its analgesic and antipyretic properties, and, according to a study, it is used in veterinary medicine to improve the clinical efficiency of DC against bacteria [263]. The fragmentation of the APAP molecular ion ( $m/z$  152.1) could produce two major fragments at  $m/z$  134.1 and 110.1 found in the fragmentation spectra of the standard and the sample (**Figure S5-4**). Moreover, the structure and mass of these fragments were confirmed by Mass Frontier and correspond to  $C_8H_8NO^+$  ( $m/z$  134.1) and  $C_6H_8NO^+$  ( $m/z$  110.1), respectively. Then, the presence of APAP was confirmed by the matching retention times for the standard (1.30 min) and the sample (1.28 min) (**Figure S5-4**). The seven antibiotics found in the sample are from different families (i.e. TCs,  $\beta$ -lactams, sulfonamides and lincosamides) used in swine farm production and are all used in swine veterinary medicine to treat disease, promote growth and improve feed efficiency. Lincomycin is part of the lincosamide group and is widely used in swine production. A molecular ion was formed at  $m/z$  407.2 (1.55 min) that matched the purchased standard (1.59 min). This molecular ion was fragmented in a major product ion ( $m/z$  126.1) and the fragmentation pattern was confirmed with Mass Frontier (**Figure S5-5**). Tetracycline, CTC, DEC and DC were identified in the swine manure sample. The compounds from the tetracycline family present an identical structure though certain functions differ. This similarity of their structure produces a common fragment at  $m/z$  154.0 ( $C_7H_8NO_3^+$ ). The fragment was found at their respective retention times of the chromatographic course in agreement with the retention times of the commercially-available standard (**Figure S5-6-8**). Moreover, the isotopic patterns showed the presence of a chlorine atom in the structures with a 3:1 ratio between M and M+2 abundance. This isotopic distribution confirmed the presence of CTC and DEC compounds that include a chlorine element in their structures. TCs antibiotics could readily degrade into their isomeric metabolite forms, which have a different retention time compared to their parent compounds [136]. Isochlortetracycline (2.34 min) and 4-ECTC (3.58 min) (**Figure S5-6**) were found at relatively high intensity in the sample, and the confirmation of their presence was validated with the standard. An isomeric compound (1.67 min) that had the common fragment of the TCs and presented a chlorine atom in its structure according to its isotopic abundance pattern was potentially identified as the epimer form of ICTC, 4-epiisochlortetracycline. This could not be confirmed since the reference standard was unavailable [264]. The presence of tetracycline



was also characterized by the strong intensity of its constitution metabolite peak, 4-ETC (1.76 min) (**Figure S5-7**). Finally, the DEC metabolites were also present in the sample (2.13 and 2.95 min, **Figure S5-8**) and presented product ion  $m/z$  154.0 and an isotopic pattern that demonstrated the presence of a chlorine atom. Unfortunately, their standards were unavailable or difficult to obtain. Sulfadiazine and AMX are part of sulfonamide and  $\beta$ -lactam antibiotics and form a molecular ion at respectively  $m/z$  251.1 and 366.1 (**Figure 5-5 and S5-9**). A molecular ion of SDZ (1.20 min) could fragment into  $m/z$  156.0 ( $C_6H_6NO_2S^+$ ) and 108.0 ( $C_6H_6NO^+$ ) according to **Figure 5-6** and literature while AMX (1.03 min) fragments are mainly at  $m/z$  160.0 ( $C_6H_{10}NO_2S^+$ ) and 114.0 ( $C_5H_8NS^+$ ) [265]. Also, AMX standard retention times differ from those of the sample. Amoxicillin contains a  $\beta$ -lactam ring in its structure, making it an easily degradable structure. Therefore, only chromatographic peaks at 1.76, 2.46 and 3.39 min were measured and referred to isomeric metabolite forms of AMX that fragment like the AMX standard.



**Figure 5-6.** Identification of SDZ from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energy); Summary of the mechanism of fragmentation proposed.

One important point to consider in this screening of emerging contaminants linked to veterinary medicine is that several settings, assumptions and parameters were selected and could lead to the exclusion of valuable information. Swine manure is a complex matrix but the relatively high intensity (almost  $1 \times 10^8$ ) of certain compounds of interest makes them stand out from the background noise of the matrix compounds. It is clear that certain compounds with low intensity signal hidden by the background noise could be of significant interest. Moreover, certain compounds of interest are unstable and readily degradable. This degradation could be amplified by bacteria present in the matrix, which could degrade antibiotics or drugs and leading to a short half-life. The main limitation in suspect and non-target analysis is extraction. This step must enable the extraction of the maximum amount of compounds of interest with different physicochemical parameters while extracting the least amount of matrix compounds as possible. The selected procedures were chosen to handle the amount of data generated by the FS acquisition mode and identify the most intense veterinary antibiotics, veterinary pharmaceuticals and growth promoter compounds. While the data processing is time consuming, this suspect and non-target screening coupled with this identification strategy provides a better idea of the compounds present in a sample before targeted analysis.

## 5.4 Conclusions

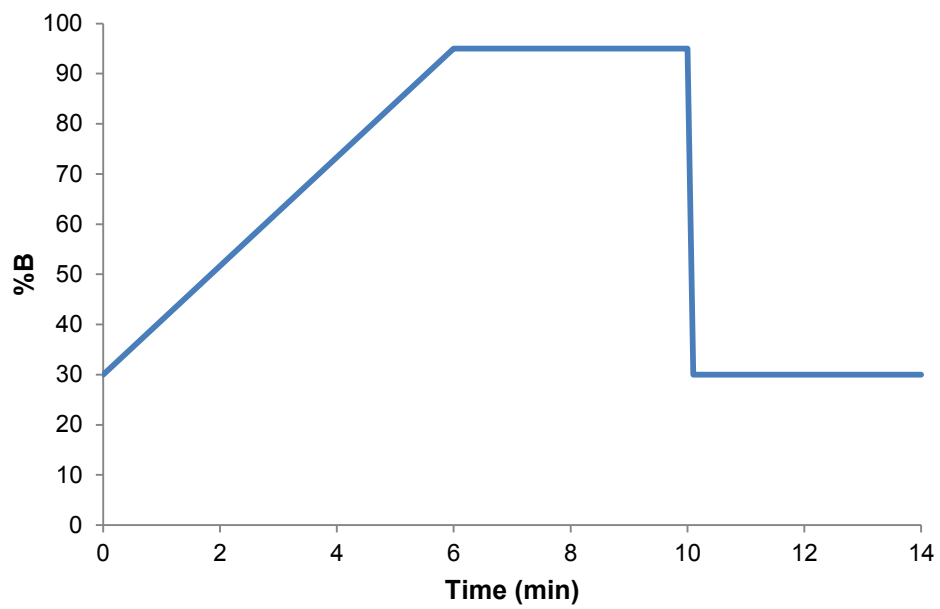
This LC-HRMS method coupled with an identification strategy highlighted the presence of eight compounds of interest as well as their degradation products in a complex matrix (i.e. swine manure). The screening initially focused on suspect veterinary antibiotic compounds and was then expanded to non-target emerging agricultural contaminants, including steroid and analgesic compounds such as MD and APAP. The LOI of the identified compounds found with this qualitative screening method vary between 10 and 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ . This level is more than enough for the search and identification of veterinary antibiotics and pharmaceuticals in a matrix that may contain much larger quantities. The concept of identifying the unknown was first developed in metabolomics research but could easily be adapted to search for and identify small molecules as a post-target screening approach. The

next step will be to perform target analyses of the identified compounds to quantify them and then measure the impact of these active molecules on the agricultural environment and beyond. This method demonstrates that complementary application of suspect and non-target screening can deliver valuable information despite the matrix complexity. In the strategy presented here, several thresholds, filters, settings and database choices were made that could lead to the exclusion of valuable candidates. However, thresholds and filters are necessary to obtain a more manageable amount of data. Another limitation is to develop an effective multi-class, multi-residue sample extraction and clean-up with suitable ionization. Extraction and clean-up are important steps to consider when developing suspect and non-target screening. These steps should extract all compounds of interest while eliminating a large part of matrix compounds that impact ionization and complicate data processing. Still, in order to process the amount of data from the HRMS non-target analysis and identify the most intense compounds of interest, thresholds and filters are mandatory. While the large amount of data produced by HRMS FS mass acquisition could be difficult to process, it makes it possible to retrospectively analyze datasets based on needs and detect additional compounds which were not anticipated to be of interest at the time of sample analysis.

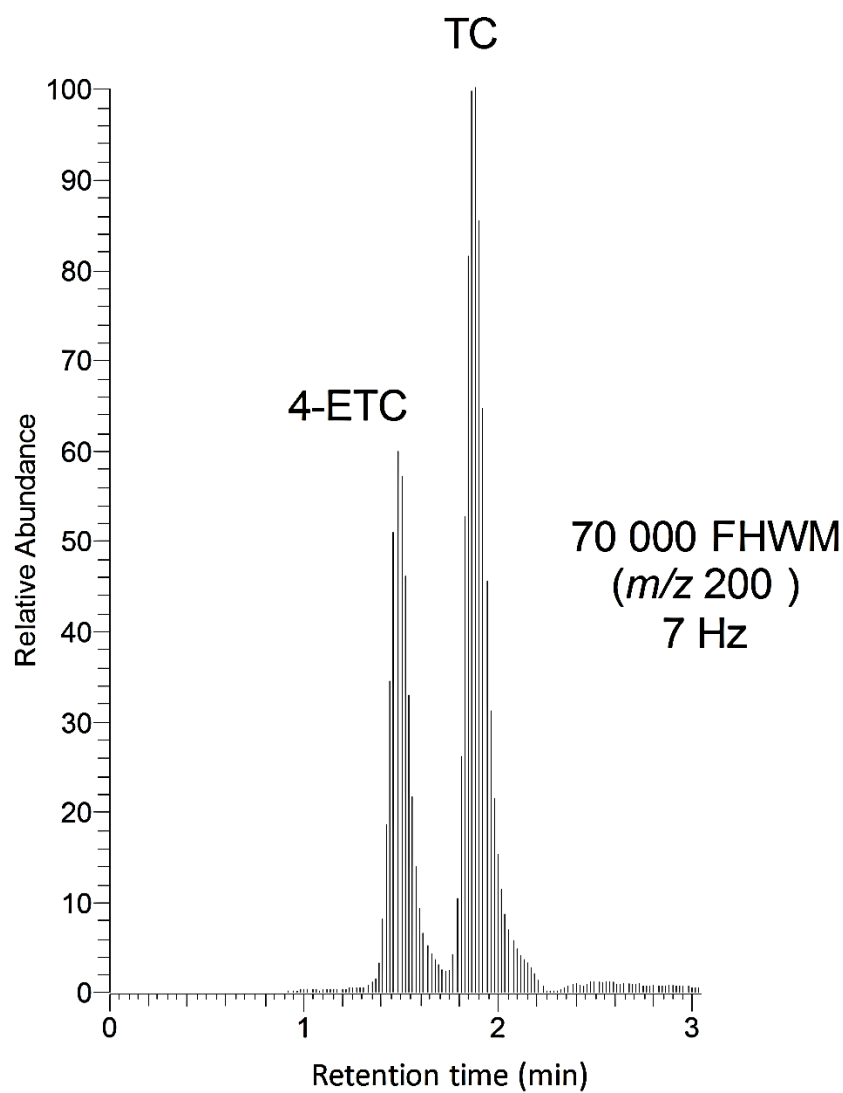
## **5.5 Acknowledgements**

The authors would like to thank the Fonds de Recherche Québec – Nature et technologies (FRQNT) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for their financial support, Thermo Fisher Scientific for its technical support and Sung Vo Duy for his technical help and scientific support.

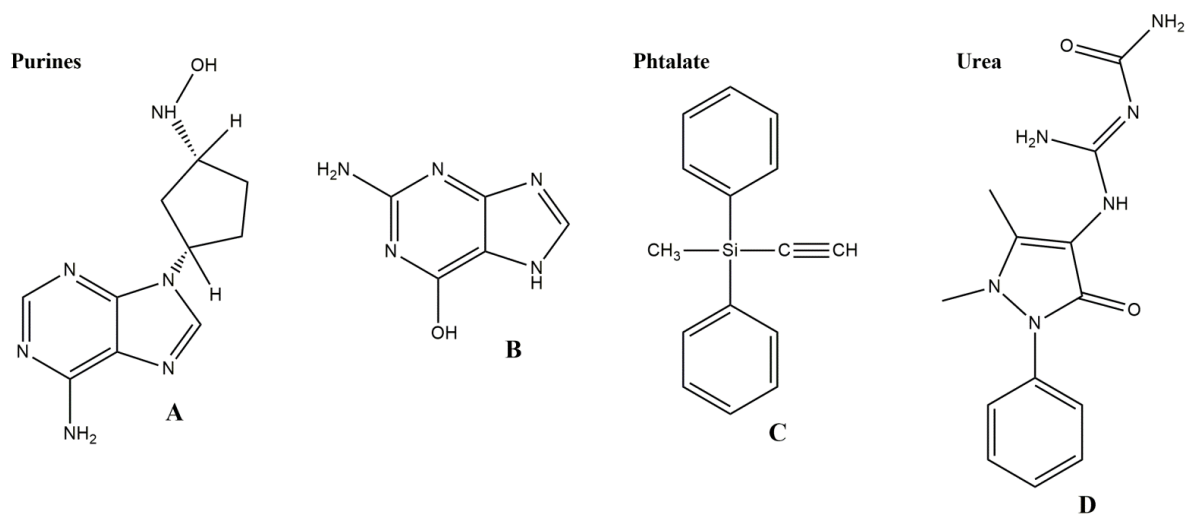
## **5.6      Supplementary materials**



**Figure S5-1.** LC gradient

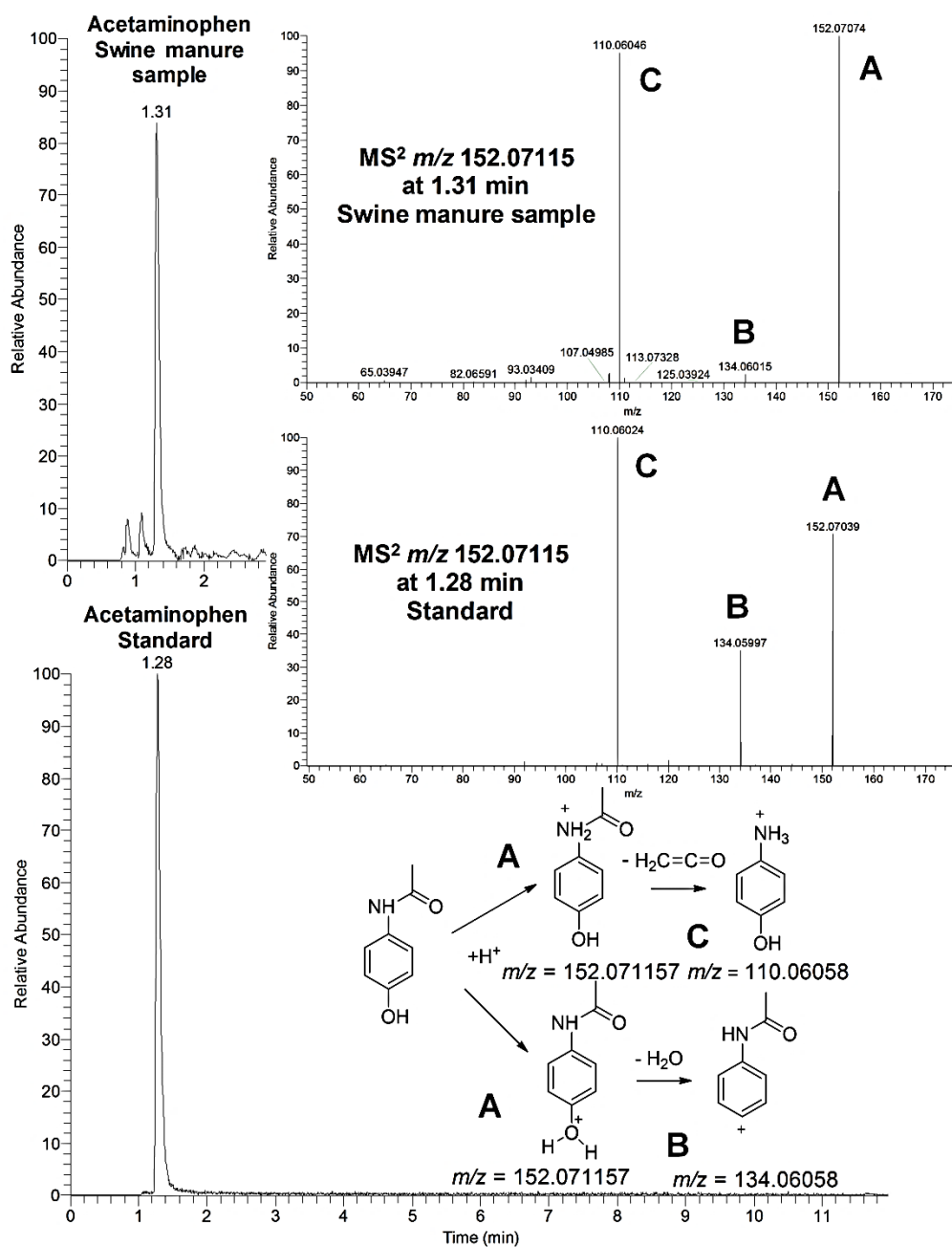


**Figure S5-2.** Number of acquisition point across the chromatographic peak for 4-ETC and TC.

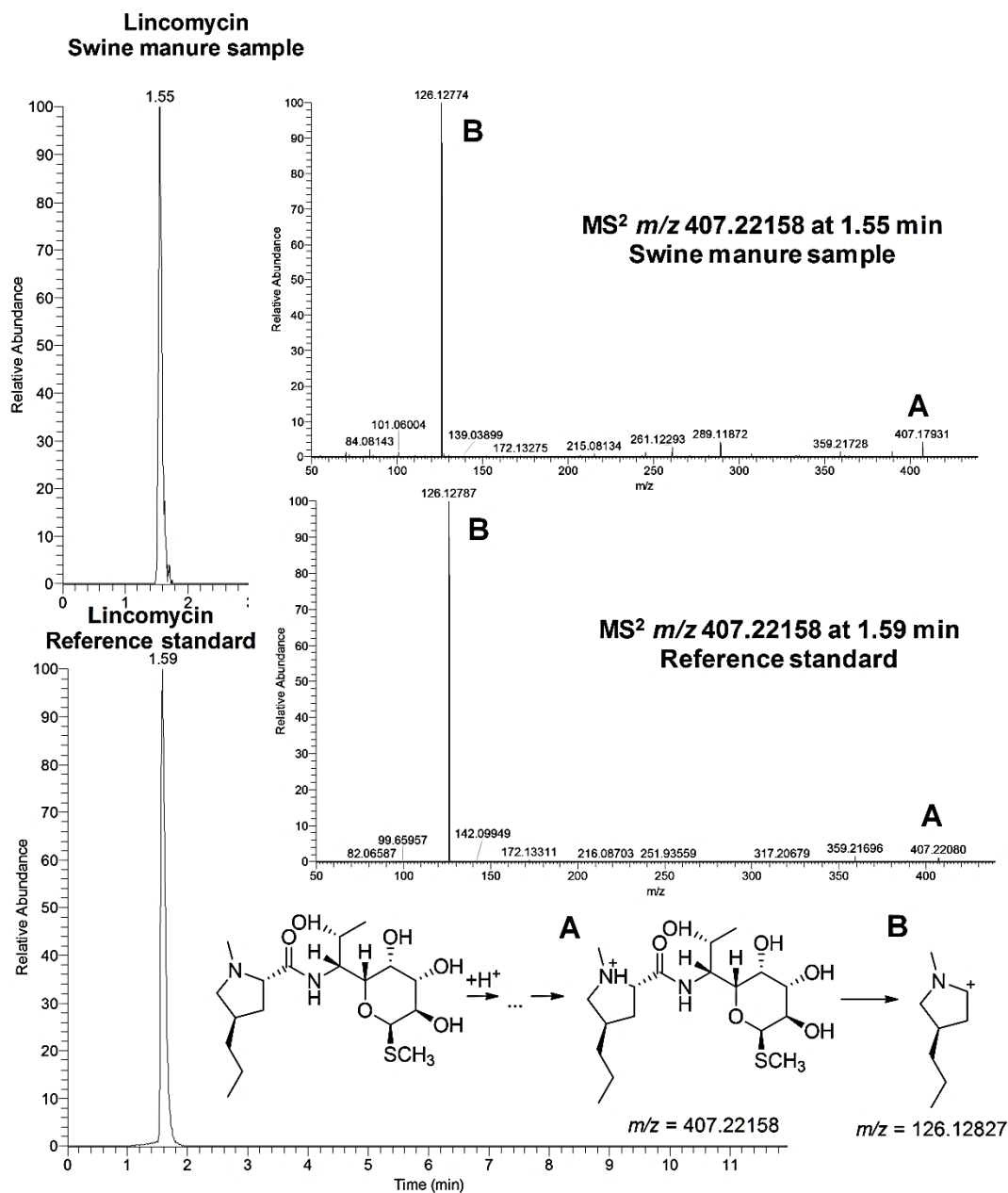


**Figure S5-3.** Chemical structures of compounds from the matrix: (A) 9-((1S,3R)-3-(Hydroxyamino)cyclopentyl)-9H-purin-6-amine, (B) Guanine, (C) Ethynyl(methyl)diphenylsilane, (D) 1-((E)-Amino((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)methylene)urea.

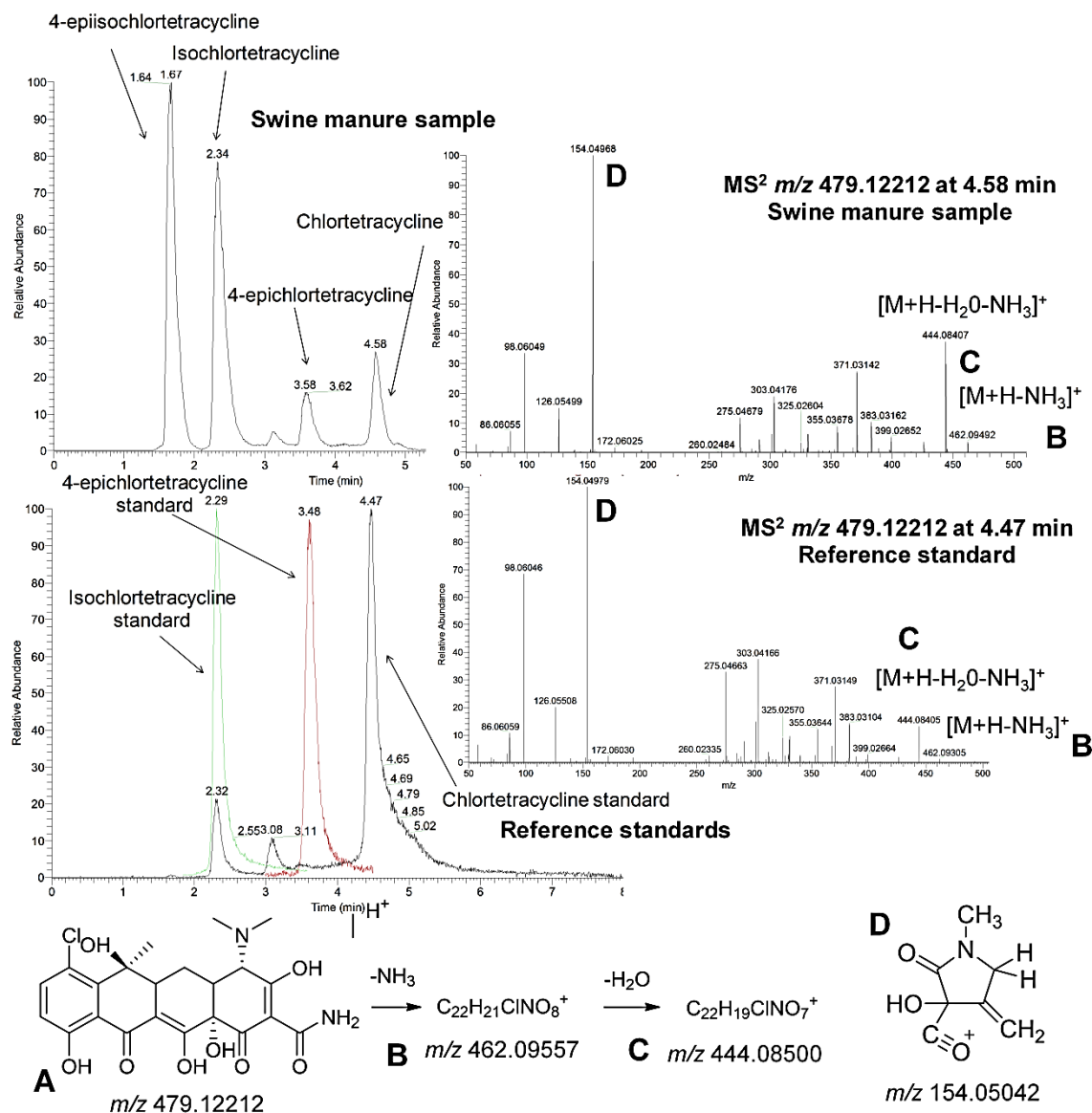




**Figure S5-4.** Identification of acetaminophen (APAP) from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); Summary of the mechanism of fragmentation proposed.

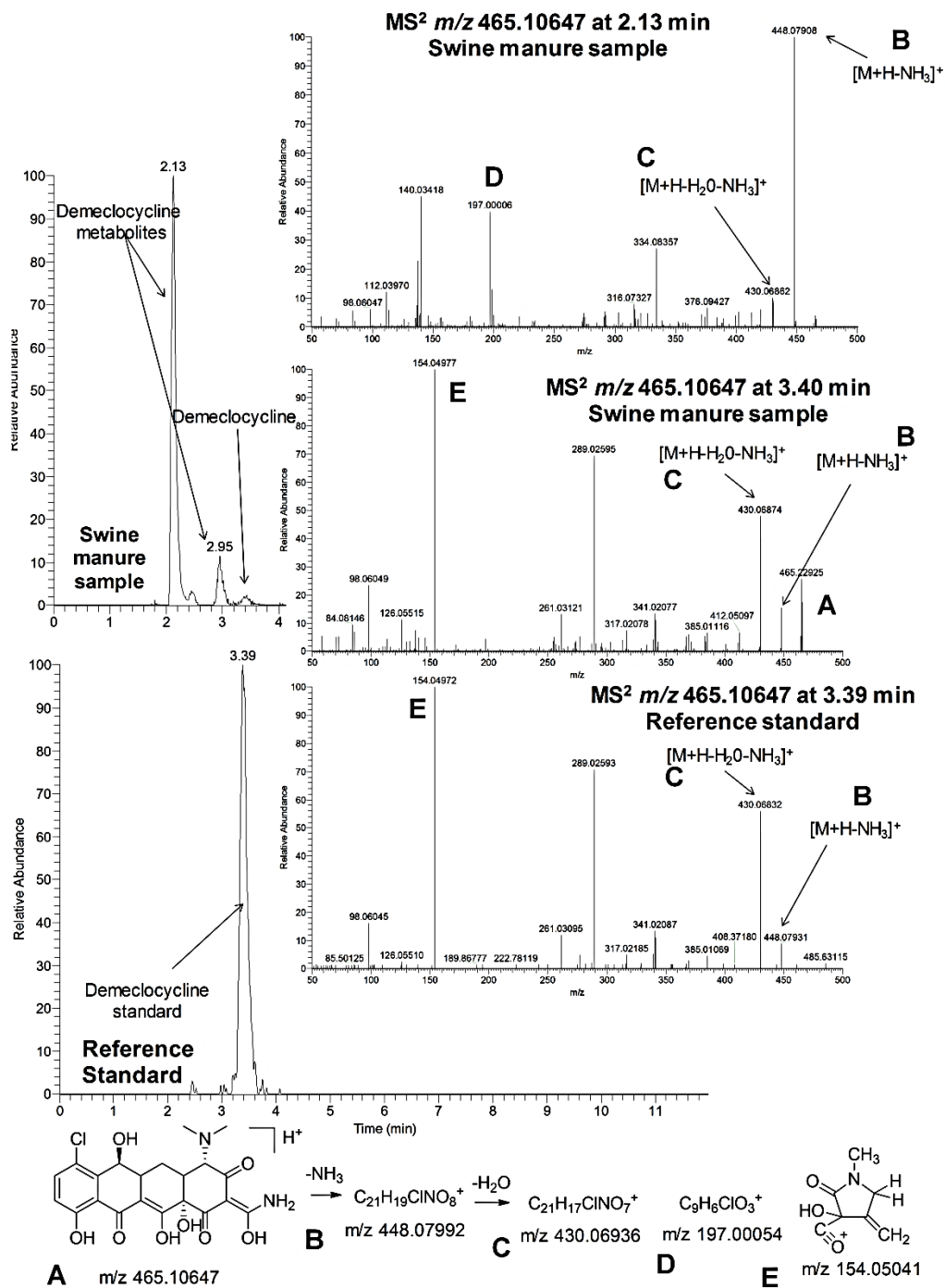


**Figure S5-5.** Identification of lincomycin (LCM) from swine manure sample included: chromatographic separation of the reference standard and of the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); Summary of the mechanism of fragmentation proposed.

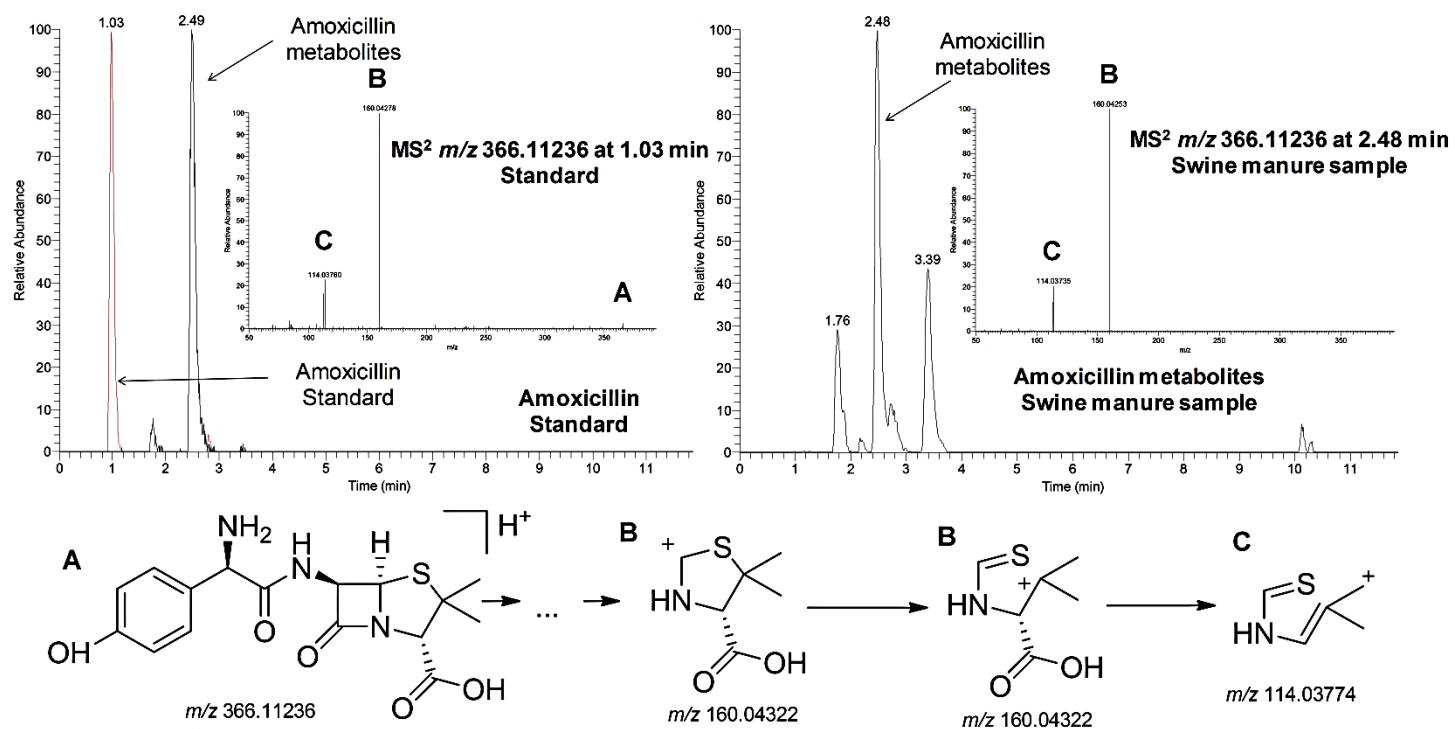


**Figure S5-6.** Identification of chlortetracycline (CTC) from swine manure sample included: chromatographic separation of reference standard and of the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); proposed fragmentation structure of  $\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_3$  ( $m/z$  154.08680) according to the literature [266].





**Figure S5-8.** Identification of demeclocycline (DEC) from swine manure sample included: chromatographic separation of reference standard and of the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); proposed fragmentation structure of  $C_7H_8NO_3$  (*m/z* 154.05041) according to the literature [266].



**Figure S5-9.** Identification of amoxicillin (AMX) from swine manure sample included: chromatographic separation in purchased standard and in the sample; fragmentation with HCD (35% normalized collision energies); Summary of the mechanism of fragmentation proposed.

**Tableau S5-1.** Example of identified compounds which were part of the matrix.

Compounds	Description	Molecular formula	Retention time (min)	Measured mass [M+H] <sup>+</sup> ( <i>m/z</i> )	Mass accuracy (ppm)	Log <i>D</i> (pH 5.5)
Amino(((1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)amino)methylene)urea	Urea derived from urea	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	7.31	289.14151	0.76	-1.15
Guanine	Purine	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub> O	1.55	136.06202	2.20	-3.31
9-((1S,3R)-3-(Hydroxyamino)cyclopentyl)-9H-purin-6-amine	Purine	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O	9.22	235.13069	0.17	-0.35
Ethynyl(methyl)diphenylsilane	Phtalate	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> Si	5.20	223.09430	0.53	4.92

## **Chapitre 6. Analyse d'antibiotiques vétérinaires dans les sols agricoles et les eaux de drainage d'un champ ayant reçu une fertilisation par lisier de porc**

---

Analysis of veterinary antibiotics in agricultural soils and drainage waters from a field following swine manure amendment

Morgan Sollic, Audrey Roy-Lachapelle, Marc-Olivier Gasser, Caroline Coté, Mylène Généreux and Sébastien Sauvé,  
2016,  
*Science of the Total Environment*, 2016, 543 : 524-535

### **Note sur ma contribution**

*Ma participation aux travaux de recherche* : J'ai conçu le design expérimental avec l'aide de mon superviseur. J'ai effectué les manipulations pour valider la méthode et fait l'interprétation des résultats.

*Rédaction* : J'ai rédigé l'article en m'appuyant sur les commentaires du Prof. Sébastien Sauvé, mon directeur de thèse.

*Co-auteur* : Les co-auteurs m'ont assisté dans l'interprétation des résultats et dans la rédaction de l'article.



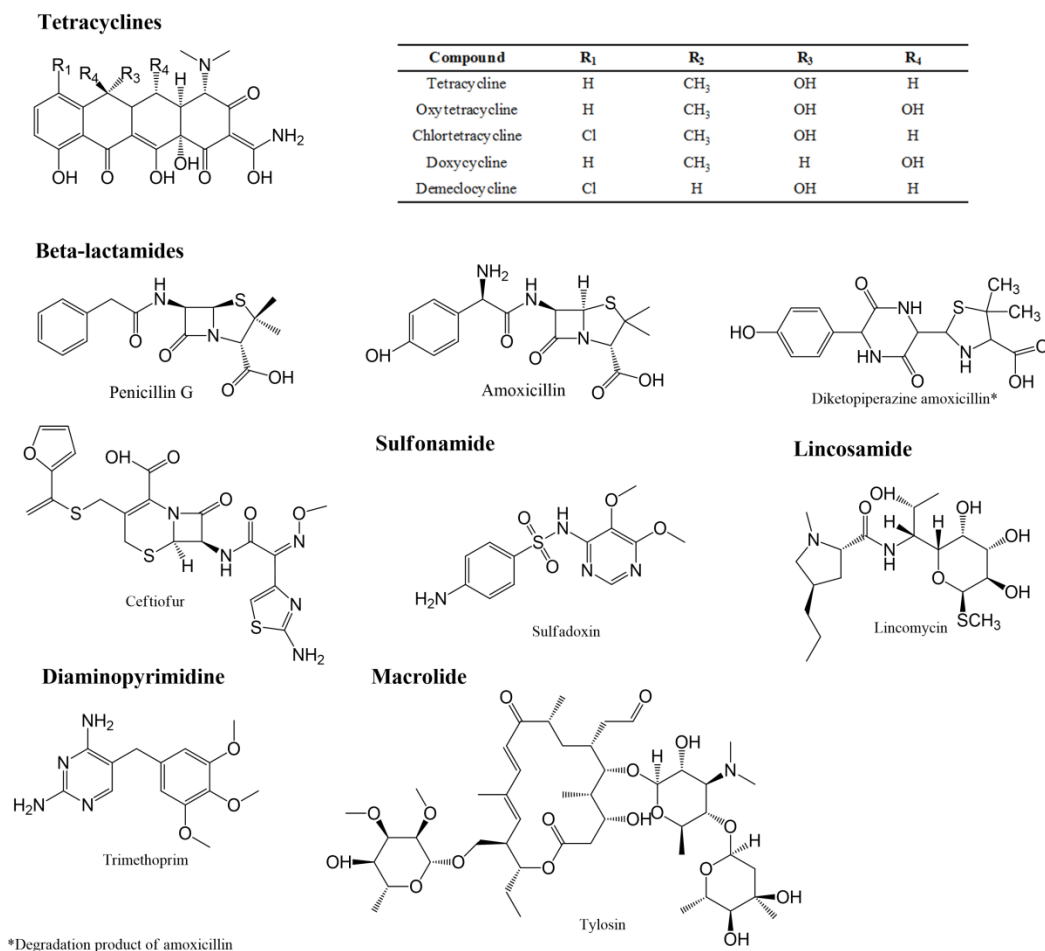
## Abstract

The fate of antimicrobial active compound residues in the environment, and especially antibiotics used in swine husbandry are of particular interest for their potential toxicity and contribution to antibiotic resistance. The presence of relatively high concentrations of bioactive compounds has been reported in agricultural areas but few information is available on their degradation products. Veterinary antibiotics reach terrestrial environments through many routes, including application of swine manure to soils. The objectives of this project were first, to develop an analytical method able to quantify and identify veterinary antibiotics and their degradation products in manure, soil and water samples; and second, to study the distribution of these target compounds in soils and drainage waters. A brief evaluation of their potential toxicity in the environment was also made. In order to achieve these objectives, liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry was used for its ability to quantify contaminants with sensitivity and selectivity, and its capacity to identify degradation products. Samples of manure, soil and water came from a long-term experimental site where swine manure containing veterinary antibiotics has been applied for many years. In this study, tetracycline antibiotics were found at several hundred  $\mu\text{g L}^{-1}$  in the swine manure slurry used for fertilization, several hundred of  $\text{ng L}^{-1}$  in drainage waters and several  $\text{ng g}^{-1}$  in soils, while degradation products were sometimes found at concentrations higher than the parent compounds.

**Keywords :** Veterinary antibiotics, metabolites, soil, drainage water, LC-HRMS

## 6.1 Introduction

As worldwide swine production is constantly increasing, the associated consumption of veterinary antibiotics is also growing. Veterinary antibiotics are widely used to treat diseases and to protect the animals from infections. They can also be used to improve feed efficiency and act as growth promoters. A study estimates that nontherapeutic uses of antibiotics for livestock production alone account for 11 200 tons annually in the United States [24]. In France, 1 349 tons were sold in 2007 including 50% for swine breeding [267]. Commercial swine production is the agricultural activity consuming the largest amount of antibiotics compared with other livestock [19]. Several classes of antibiotics exist, among them, tetracyclines (TCs) are the most used, followed by  $\beta$ -lactamines, sulfonamides, lincosamides, diaminopyrimidines and macrolides (**Figure 6-1** and **S6-1**) [19, 267]. Due to the large doses used and the fact that the antibiotics are poorly absorbed by swine; the majority of these pharmaceuticals are excreted either unchanged or as metabolites resulting from the biotransformation of the parent compounds. Depending on the substance, the mode of application and the period after administration, it has been shown that excretion rates vary between 40 and 90% for TCs and sulfonamides [62, 105, 125, 143]. This means that a large quantity of these antibiotic residues is present in swine fecal matter and can thus be released in the environment through the field application of manure. Several studies have revealed the presence of numerous veterinary antibiotic residue classes in different environmental compartments close to agricultural areas and especially in soils, surface waters, ground waters and aquatic sediments [3, 64, 65, 89, 177, 213]. The introduction into the ecosystem of substances created to be biologically active raises questions on their potential health or ecotoxicological impact on the environment. Moreover, all these molecules could certainly contribute to bacterial resistance, for example, TCs-resistant genes were found in *Escherichia coli* bacteria isolated from manure of agricultural animals [98, 126]. Otherwise, their mobility, their sorption and their degradation in the environment is not well known due to their highly variable nature.



**Figure 6-1.** Chemical structures of target compounds i.e. tetracyclines,  $\beta$ -lactams, sulfonamides, lincosamides, diaminopyrimidines and macrolides. Tetracyclines and their respective degradation products were all presented in **Figure S6-1**.

However, throughout their transfer from the ingestion by the animal to the environment, the antibiotic molecules could undergo changes. There are an important number of biotransformation by-products (metabolites) excreted by animals [114, 136]. All these metabolites along with their parent molecules will be released in the environment and could subsequently be transformed into primary degradation products. Recent studies have shown that the dissipation in the environment of organic contaminants such as veterinary antibiotics or even pesticides occurred via different physicochemical ways i.e. oxidation, hydrolysis, photo-degradation and reduction reactions [65, 268]. Several factors such as humidity,

temperature, organic matter content and other soil components strongly affect the degradability of the molecules by initiating these abiotic transformations [65, 109]. Various compounds and especially sulfur organic compounds and metal species present in the soil can degrade organic contaminants via direct reduction or electron transfer. Nitroaromatic compounds, a pesticide class, could be reduced through a direct electron transfer in presence of sulfur species after sorption on organic matter [268]. In that case, organic matter plays the role of sorbent and initiator of the degradation via reduction or electron transfer [269]. Otherwise, sulfonamides could undergo rapid transformation by reacting with metallic species such as Fe(II) generated by microbial reduction of Fe(III) soil minerals [270]. Also, TCs behaviour could be affected by the presence of aluminium oxide in the aquatic environment via both adsorption and transformation and promote dehydration of TCs [271]. These examples of abiotic reactions could play a significant role in the fate and transformation of veterinary antibiotics. In addition, microbial populations present in the different compartments of the environment can also contribute, to a lesser degree, to the degradation of veterinary antibiotics [109]. Antibiotics, along with their associated metabolites and degradation products have different physicochemical properties and therefore, different behavior in the environment. This study focuses on the fractionation and the degradation of the most used TCs antibiotics in swine husbandry and a few other current antibiotic classes i.e.  $\beta$ -lactamines, macrolides, sulfonamides, lincosamides and diaminopyrimidines. Tetracyclines tend to degrade by changing their conformation to form epimers, depending on various environmental conditions such as pH, the presence of chelating ions and light [56, 103]. These isobaric compounds or epimers were found in large quantities in manure, soil and drainage water samples study. All these metabolites and primary by-products were grouped under the name of degradation products in this manuscript.

Robust analytical methods are necessary in order to extract and quantitate veterinary antibiotic residues and their degradation products in a variety of biological and environmental matrices. The presence of organic compounds and large amounts of divalent cations in these matrices can significantly decrease the extraction recoveries and the target compounds quantitation by affecting signal intensities [151, 272]. Thus, these interferences could also have significant impact on the selectivity and sensitivity of the method when applied to traces

of organic contaminants. To avoid this, an appropriate sample processing is necessary to remove large portions of undesirable compounds while keeping the compounds of interest. The extraction of veterinary antibiotics contained in biological and environmental matrices have been reported earlier and were usually based on sonication or pressurized liquid extraction (PLE) [144, 145, 215]. The extraction process used here was inspired by a previous study developed at our laboratory to quantitate several TCs in freeze-dried swine manure and was adapted to soils, drainage waters and swine manure [236]. The advantage lies in the fact that this method used a sonication extraction with an aqueous McIlvaine buffer wherein veterinary antibiotics are readily soluble. A water solvent extraction will therefore extract less potentially interfering matrix compounds compared to organic solvent such as MeOH [66, 88]. This extraction method was used at pH 5 to avoid the degradation of tylosin and TCs [113]. The addition of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) has been used to prevent the chelation of TCs with divalent cations present in the samples and make them more available [151, 226]. Drainage water samples were acidified at pH 5 by adding citric acid and EDTA before filtration on fiberglass filter. A Strata-X polymeric SPE cartridge was used in previous studies with acceptable recoveries and was selected for its ability to capture large amount of polar contaminants [147, 214, 236].

Veterinary antibiotics are usually analysed by liquid chromatography (LC) coupled to ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis), diode array detector (DAD) or triple quadrupole (QqQ) [145, 273, 274]. The UV-Vis detection is still the most common method and achieves relatively low method limit detection (MLD), but has poor selectivity. The QqQ is the preferred instrument for the analysis of complex matrices due to its sensitivity and selectivity owing mainly to the specificity of selected reaction monitoring (SRM). Nevertheless, a recent study has shown that false positives could potentially be generated, especially when using QqQ due to the low resolving power (RP) of the quadrupoles [237]. The use of high-resolution mass spectrometry (HRMS) could avoid a large portion of false positives due to its high RP measurement. This technology was previously mainly applied in the field of proteomics and metabolomics but there is an increasing interest for environmental studies focusing on small molecules in recent years [186].

The Q-Exactive is a hybrid mass spectrometer which combines the high RP of the Orbitrap with the selectivity of the quadrupole. This combination, coupled to a high-energy collision cell, is a powerful tool for the screening of emerging contaminants and the investigation and identification of degradation products. The use of hybrid quadrupole-Orbitrap operated in a combination of full scan (FS) and fragmentation events named data-dependent acquisition (DDA) has previously been employed for the research of unknowns. Negreira *et al.* developed a method to investigate and identify unknown transformation products of anticancer drugs with this approach [275]. However, degradation products of veterinary antibiotics are “know unknowns” since many have already been referenced [276, 277]. Thus, we used a derived mode of DDA that use an inclusion list in order to make a targeted identification of degradation products. This approach was used by Wang *et al.* to obtain high-resolution product ion spectra and allowed them to identify and confirm the presence of pesticide residues in fruits and vegetables [190]. The DDA mode was used in a first approach to screen for veterinary antibiotics and degradation products by scanning a large mass range ( $m/z$  100 – 1 000) using the FS event. In a second event, the quadrupole select target ions from an inclusion list and then carries out fragmentation in the collision cell to generate high-resolution spectra of the product ions. Fragmentation was triggered uniquely if the signal intensity of the target ion compounds included in an inclusion list exceeds the pre-defined threshold. This inclusion list included several exact masses of common veterinary antibiotics and known associated degradation products that are of interest (**Tableau S6-1**). However, we also leave the door open for unknown candidates. When the instrument is not already acquiring a target ion, this mode will be triggered to fragment unexpected ions that exceed the specified threshold but that were not present in the inclusion list. In a second run, target compounds were quantified using the parallel reaction monitoring (PRM). These target compounds were selected based on their ability to trigger fragmentation in the DDA mode when analysing samples. This mode was already used in previous studies to quantify organic contaminants in complex biological and environmental matrices [189, 236] and it allowed reaction monitoring in a tandem mass spectrometry (MS/MS) mode, it improved selectivity and lessened the impact of the matrix on the signal [278]. We used this mode to allow semi-quantification of the degradation products of chlortetracycline (CTC) and demeclocycline

(DEC) because absolute quantification would require reference standards that were not available.

This method was adapted to quantify TCs, 7 other veterinary antibiotics from several classes and a few degradation products (**Figure 6-1 and S6-1**). An evaluation of the analytical methods was done by determining the MLD and quantification (MLQ), linearity, accuracy, precision and matrix effects. Three samples of swine manure, 24 samples of drainage waters and 96 soil samples were investigated in DDA mode and contaminants were quantified in PRM mode. These samples were provided by the Research and Development Institute for the Agri-Environment (IRDA) and are part of a long term study on the environmental fate of nitrogen following field applications of swine manure.

We report here the development, the validation and application of HRMS for the quantification of veterinary antibiotics and the identification of degradation products in environmental and biological matrices. This study also emphasises the behavior and the solid-liquid partitioning of veterinary antibiotics and some of their degradation products in an agricultural field.

## **6.2 Materials and methods**

### **6.2.1 Chemicals and reagents**

Amoxicillin (AMX, purity > 98.7%), trimethoprim (TMP, purity > 99.5%), lincomycin (LCM purity > 100%), sulfadoxin, (SFX, purity > 99.9%), ceftiofur (CFT, purity > 97.7%), tylosin (TYL, purity > 84.6%), benzylpenicillin (PEG, purity > 99.6%), tetracycline (TC, purity > 99.5%), 4-epitetracycline (4-ETC, purity > 98.4%), anhydrotetracycline (ATC, purity > 99.5%), 4-epianhydrotetracycline (4-EATC, purity > 90.5%), 4-epichlortetracycline (4-ECTC, purity > 97.0%), doxycycline (DC, purity > 98.2%), demeclocycline (DEC, purity > 94.5%), oxytetracycline (OTC, purity > 97.0%), minocycline (MC, purity > 98.7%), chlortetracycline (CTC, purity > 93.0%), spiramycin (SPI, purity > 94.9%) and simeton

(purity > 99.0%) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). [ $^{13}\text{C}_3$ ]-trimethoprim ([ $^{13}\text{C}_3$ ]-TMP, purity > 99.0%) was purchased from ACP Chemical Inc. (Montreal, QC, Canada). Isochlortetracycline (ICTC, purity > 95.0%) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). All solvents used were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade from Fisher Scientific (Whitby, ON, Canada) and HPLC grade  $\text{H}_2\text{O}$  was used for dilutions. Individual stock solutions were prepared in methanol (MeOH) at a concentration of  $1\,000\text{ mg L}^{-1}$  and kept at  $-20^\circ\text{C}$  for a maximum of 3 months. Individual intermediate solutions were prepared by dilution of the  $1\,000\text{ mg L}^{-1}$  stock solution in  $\text{H}_2\text{O}$ . Given the potential for degradation of the target analytes, working solutions were prepared daily at a concentration of  $1\text{ mg L}^{-1}$  by dilution in  $\text{H}_2\text{O}$  from individual intermediate stock solutions. Sodium phosphate dibasic ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , purity > 99.0%), citric acid (purity > 99.5%), formic acid ( $\text{HCOOH}$ , purity > 95.0%) and EDTA disodium salt dihydrate ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , purity > 99.0 - 101%) were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Chromatographic mobile phases were prepared daily.

### 6.2.2 Water, soil and manure samples

Swine manure, soil and drainage water samples were collected from a long-term experimental field trial conducted at the IRDA research farm located near Quebec City (Quebec, Canada). Swine manure samples analysed in this paper came from the indoor pit of a swine facility and were collected during the third field application on September 6<sup>th</sup>, 2013. Soil samples were taken at 0 - 10, 10 - 20 and 20 - 40 cm depth on November 16<sup>th</sup> 2011, after swine manure applications at a rate of  $54\text{ t ha}^{-1}$  treatments on May 19<sup>th</sup>. Two years later, soil samples were taken at the same depths on November 20<sup>th</sup> 2013 after two swine manure applications at rates of  $55\text{ t ha}^{-1}$  and  $25\text{ t ha}^{-1}$  treatments on June 5<sup>th</sup> and September 6<sup>th</sup> 2013 respectively. Soil samples consisted of five subsamples of soil taken at each depth with a 2.5 cm diameter soil core sampler. Water samples were regularly collected after significant drainage occurred following rain events or snowmelt. Water samples analysed in this paper were collected on September 13<sup>th</sup>, 2013 and September 18<sup>th</sup>, 2013, following swine manure application on September 5<sup>th</sup> and rain events totalling 74 mm between September 5<sup>th</sup> and



September 13<sup>th</sup> and 28 mm between September 13<sup>th</sup> and September 18<sup>th</sup>. Soil samples were collected in plastic flasks and were kept at 4°C until analysis. Swine manure and drainage water samples were collected in respectively 500 and 100 mL plastic flasks and were kept at 4°C until analysis. All samples were collected for a previous study dealing with the fertilizer efficiency of swine manure on crops and the partitioning of nitrogen in the environment following manure fertilization. More details and generalities on the field and sample collection are available in supplementary material (**Section 6-1**).

### **6.2.3 Extraction and sample clean-up**

The same extraction was applied to the swine manure and to the soils. Exactly 2 mL of liquid manure were measured and placed into 15 mL conical-bottom centrifuge tubes (Fisher, Rockwood, TN). For soils, exactly two grams of dried soil were weighted into the tube. We then added 10 mL of McIlvaine extraction buffer at pH 5 containing 0.1 M EDTA to the manure and the dried soil samples. McIlvaine buffer (500 mL) was prepared by mixing 243 mL of 0.1 M citric acid and 257 mL of 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [254]. The samples were mixed for 1 min on a vortex to suspend the particles and homogenize the solution and they were subsequently placed into an ultrasonic bath for 15 min at 25°C. They were then centrifuged at approximately 6 000 rpm for 15 min. Finally, 9 mL of the supernatants were collected into 15 mL centrifuge tubes. Drainage water samples were filtered on fiberglass membrane filters GF-75 of 0.45 µm porosity (Sterlitech, Kent, WA) and 100 mL aliquots were measured and acidified with citric acid (pH 5) and 0.1 M of EDTA was added before SPE.

The SPE was done using a 12-position manifold manufactured by Phenomenex (Torrance, CA). A polymeric reversed phase Strata-X (Phenomenex, Torrance, CA) cartridge with a total volume of 6 mL with 200 mg bed mass was used to wash the sample extracts. Multiple SPE parameters were optimized: cartridge type, loading step, washing step and sample pH. The SPE cartridges were conditioned with 5 mL of MeOH, 5 mL of H<sub>2</sub>O and 5 mL of McIlvaine buffer. Samples were loaded on the cartridge by gravity. The SPE cartridges were washed with 5 mL of H<sub>2</sub>O:MeOH (90:10, v/v). The analytes were eluted with 5 mL of MeOH containing 0.1% HCOOH into conical-bottom centrifuge tubes. The eluates were then

evaporated to total dryness under a gentle stream of nitrogen at room temperature with a nine-port Reacti-vap unit from Pierce (Rockford, IL) and then reconstituted into 250  $\mu\text{L}$  with  $\text{H}_2\text{O}$  for LC-HESI-HRMS analysis.

#### 6.2.4 LC parameters

A Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series RS pump coupled with a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series TCC-3000RS column compartments and a Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000 Series WPS-3000RS autosampler controlled by Chromeleon 7.2 Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA and Dionex Softron GmbH Part of Thermo Fisher Scientific, Germany) were used for analysis. A Hypersil GOLD<sup>TM</sup> C18 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$  particles) column preceded by a similar guard column (5 mm  $\times$  2.1 mm, 3  $\mu\text{m}$  particles) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used for chromatographic separation of target compounds at 20°C .

Mobile phase A consisted of  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1%  $\text{HCOOH}$ . Mobile phase B consisted of  $\text{MeOH}$  with 0.1%  $\text{HCOOH}$ . A gradient was used starting from 30% B, and then the  $\text{MeOH}$  mobile phase was increased to 95% from 0-6 min and was held constant for 2 min. Finally, the mobile phase was brought back to initial conditions and maintained for 4 min. A flow rate of 300  $\mu\text{L min}^{-1}$  and an injection volume of 10  $\mu\text{L}$  were employed. The LC gradient is given in supplementary information (**Figure S6-2**).

A heated electrospray ionization source (HESI-II) in positive mode was used for the ionization of the target compounds. The parameters were set as follows: the ionization voltage was optimized at +4 300 V; capillary temperature was set at 275°C; the vaporizer temperature was set to 300°C; sheath gas and auxiliary gas flow were optimized at 50 and 30 arbitrary units, respectively.

### 6.2.5 HRMS parameters

Detection and quantification of target compounds were performed using a Q-Exactive mass spectrometer controlled by the Xcalibur 2.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The molecular formulas of the target compounds were acquired from Chemspider (Royal Society of Chemistry, Raleigh, NC) and exact masses of target compounds were calculated using Qualbrowser in Xcalibur 2.3. Instrument calibration in positive mode was done every 5 days with a direct infusion of a LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution (Pierce Biotechnology Inc. Rockford, IL). The PRM parameters were optimized using individual standards at a concentration of  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . They were infused with a syringe at a flow rate of  $10 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$  through a T-piece connected to a LC system with a mobile phase flow rate of  $300 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$ . The product ions were found by increasing the normalized collision energy (NCE) using the Q-Exactive Tune 2.3 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). After choosing the most intense product ions, fragmentation energy scans were carried out to obtain the optimal NCE for complete fragmentation of precursor ions. The exact masses of the product ions were obtained with Mass Frontier software (Highchem, Bratislava, Slovakia). A mass inclusion list for PRM mode was used including the precursor ion masses, their expected retention time (with one minute acquisition time window center on each retention time of target compounds) and their NCE (**Tableau 6-1**). This inclusion list of target compounds referred to the veterinary antibiotics and their associated epimers present in the samples that triggered fragmentation in the DDA mode. All Q-Exactive parameters such as RP, automatic gain control (AGC) and ion time (IT) were chosen relative to the complexity of the matrix study. The different optimization tests were performed with a mix solution containing  $250 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  of the 16 target analytes and  $100 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$  of IS spiked in a blank sample of each matrix submitted to SPE. The Q-Exactive was also operated in DDA mode that included a FS screening and a fragmentation event. The FS event was set at 70 000 FWHM ( $m/z$  200) and  $m/z$  100-1000 scan range wide. The AGC and IT parameters were set respectively at  $5 \times 10^5$  ions capacity and 100 ms filling maximum time; and  $2 \times 10^5$  and 55 ms for the fragmentation event of the DDA and PRM mode. A RP of 17 500 FWHM ( $m/z$  200) was used for the measure of product ions. The intensity threshold depends of the filling of the

accumulation trap of the Q-Exactive was fixed at  $3.6 \times 10^4$ , as determined as a function of the IT and AGC parameters. An inclusion list was used to force the Q-Exactive to focus on selected common veterinary antibiotics and their known associated degradation products listed in the literature (**Tableau S6-1**). Only 26 % of the 39 compounds present in this list triggered the fragmentation and were found present in the samples. The fragmentation was triggered when selected target compound ions present in the list or unexpected ions have intensities above the threshold. The top 5 most intense ions were selected for fragmentation and a single loop count was used for the number of repetitions. The precursor ions were filtered by the quadrupole which operated at an isolation width of 0.4 FWHM ( $m/z$  200). All optimized collision energies, precursor ions and fragment ions are shown in **Tableau 6-1**.

Tableau 6-1. HRMS parameters.

Compounds	Associated IS	Chemical formula	RT (min)	Calculated exact mass [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Average experimental mass [M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Mass accuracy (ppm) <sup>a</sup>	NCE (%)	Quantification ion transition (m/z)	Confirmation ion transition (m/z)
TC	SIM	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	1.87	445.16109	445.16003	2.4	30	410.1240	154.0504
4-ETC	SIM	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	1.50	445.16109	445.15982	2.9	30	410.1240	154.0504
ATC	SIM	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	6.01	427.15052	427.14957	2.2	31	410.1240	154.0504
4-EATC	SIM	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	5.82	427.15052	427.14957	2.2	31	410.1240	154.0504
DEC	SIM	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	3.05	465.10647	465.10522	2.7	34	448.0799	154.0504
OTC	SIM	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	2.08	461.15600	461.15496	2.3	30	426.1189	154.0504
MC	SIM	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	1.27	458.19272	458.19222	1.1	38	441.1662	154.0504
CTC	SIM	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	4.43	479.12212	479.12086	2.6	42	444.0850	154.0504
DC	SIM	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	5.67	445.16109	445.16012	2.2	30	428.1345	154.0504
TMP	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1.19	291.14516	291.14507	0.3	50	261.0981	230.1161
SFX	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	2.47	311.08085	311.08080	0.2	35	156.0115	108.0446
LCM	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	1.23	407.22103	407.22147	1.1	34	126.1277	359.2176
PEG	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	6.01	335.10600	335.10656	1.7	40	220.0425	217.0640
AMX	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	1.01	366.11181	366.11236	1.5	35	347.1669	338.8692
CFT	[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>3</sub>	5.32	524.03628	524.03672	0.8	20	241.0389	285.0107
TYL	SPI	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	6.15	916.52642	916.52742	1.1	30	174.1124	772.4446
SIM (IS)		C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O	2.63	198.13548	198.13572	1.2	50	124.0870	None
SPI (IS)		C <sub>43</sub> H <sub>74</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>	4.96	843.52183	843.52026	1.9	24	174.1120	None
[ <sup>13</sup> C <sub>3</sub> ]-TMP (IS)		C <sub>11</sub> <sup>13</sup> C <sub>3</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	1.17	294.15578	294.15512	2.2	50	262.1021	None

<sup>a</sup>Mass accuracy was measured just after Q-Exactive calibration

### 6.2.6 Degradation products

The degradation of the target antibiotics was monitored in surface waters, soils and HPLC grade water as control solution by spiking a mixture of veterinary antibiotics ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $500 \text{ ng g}^{-1}$  and  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  respectively). These samples were exposed to laboratory light at ambient temperature and aged during one month. They were then submitted to sample processing and investigated in DDA mode (**Figure S6-3**). This degradation was studied by comparing the TCs epimerization of spiked surface waters, spiked soils and control spiked HPLC grade water. Only isomeric degradation products of CTC were investigated in this study.

### 6.2.7 Method validation

The selected quantification method was validated in three different matrices. The mass tolerance window (MTW) was set to 5 ppm ( $\pm 2.5$  ppm). Target compounds were quantified with PRM mode with the most intense product ion signal and the one in common for each TCs was used for confirmation ( $m/z$  154.0504 –  $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3\text{N}$ ). The instrument response was determined as the ratio of the analytes area to that of the IS. Simeton, SPI and [ $^{13}\text{C}_3$ ]-TMP were used as IS and were selected for their capacity to correct the signal variation of their associated target compounds. The DDA mode was used for the investigation and identification of degradation products. The fragmentation patterns of unknown chromatographic peaks were compared to those of CTC, 4-ECTC, ICTC, DEC and AMX reference standards ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) for identification. Fragmentation spectrums were then interpreted and product ion masses were compared to those predicted by Mass Frontier software that is able to generate fragmentation patterns based on general fragmentation rules. Isochlortetracycline and its associated epimer were semi-quantitative based on the calibration curve of the parent compound. Seven-point calibration curves were obtained by spiking samples between 0 to  $500 \text{ ng L}^{-1}$  for drainage waters, 0 to  $500 \text{ ng g}^{-1}$  for soils and 0 to  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  for swine manure ( $n = 3$ ). The IS ( $100 \text{ ng L}^{-1}$ ,  $100 \text{ ng g}^{-1}$  and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) were selected for their capacity to correct the signal variation

of target compounds with a RSD ratio  $< 10\%$  (data not shown). Matrix effects were determined by calculating the ratio of spiked target compounds recorded in sample matrices (soil, water and manure) submitted to SPE relative to a solvent solution ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and were expressed as a percentage (**Tableau S6-2**). The recovery values of the SPE method were evaluated at two different concentrations by comparing the analyte to IS ratio of the sample spiked before extraction to the analyte to IS ratio of the sample spiked after extraction and was expressed as a percentage ( $n = 3$ ) (**Table S6-2**). Unspiked samples were also extracted to account for their presence in the recovery values. In each set of samples, the IS was added after the extraction and before the reconstitution step. Repeatability (intraday precision) was evaluated for the three matrices with the analysis of the same spiked sample at two different concentrations on a single workday ( $n = 5$ ) (**Tableau S6-3**). Reproducibility (interday precision) was also calculated for the three matrices by spiking an extracted sample at two different concentrations freshly prepared each day ( $n = 5$ ) (**Tableau S6-3**). Accuracy values were determined by the relative error (%) and precision values were defined as the relative standard deviation (RSD - %) (**Tableau S6-3**). The MLD and MLQ were determined as 3.3 and 10 times, respectively, the standard deviation of the y intercept divided by the slope of the calibration curve in matrix sample (**Tableau 6-2**). Statistical tests were made using the Statistical Package for Social Science (SPSS 21.0, Chicago, IL) for Windows. ANOVA and Tukey's post hoc *b* tests were used with statistical significance defined as  $p\text{-value} < 0.05$ .

## 6.3 Results and discussion

### 6.3.1 Validation

The analytical method with optimized parameters was applied to the three matrices. The calibration curves in the different matrices showed good linearity, with coefficients of determination ( $R^2$ ) ranging from 0.967 to 0.999. The calculated MLD from the calibration curves ranged from 2.0 to  $27 \text{ ng L}^{-1}$  for drainage waters, from 1.0 to  $7.4 \text{ ng g}^{-1}$  for soils and from 3.6 to  $12 \mu\text{g L}^{-1}$  for swine manure (**Tableau 6-2**). The MLD results in swine manure

were comparable with those reported previously [147]. Matrix effect is an important parameter to control considering the diversity and the complexity of the analysed matrices. Drainage waters had the lowest impact on target compounds intensity with matrix effect ranging from 75 to 105%. Soils and swine manure had similar matrix effects with a range of 65 to 110% for soils and 62 to 112% for swine manure (**Tableau S6-2**). These matrices contained an important quantity of organic compounds which can lead to an underestimation or overestimation of the measured concentration. Otherwise, isobaric interferences or false positives could occur due to the presence of organic compounds from the matrices with closely related exact masses [237, 278]. Furthermore, the Q-Exactive was used in PRM mode, a mimicked SRM mode, to quantitate target compounds. This mode enjoys the benefits of the quadrupole and the collision cell and allows tandem mass spectrometry with high RP measurement on the product ion. A recent study stated that selectivity with HRMS is mostly dependent of the selective mass defect of certain compounds containing halogens or that are highly unsaturated [278]. This type of compounds such as veterinary antibiotics has molecular structures that lower the chances of interfering signals with matrix compounds and thus false positives. The selectivity of the method also depends of several factors such as matrix type, selected transitions, sample clean-up procedure, mass defect and RP according with Berendsen [278].

The analytes were extracted using SPE and gave extraction recoveries ranging from 40 to 111 % in all matrices for all target compounds (**Tableau S6-2**). Recovery is an important parameter but could be highly variable when looking at multi-residues in a single method. Considering the differences of physicochemical properties of analytes, acceptable recoveries cannot be reached for all target compounds. Degradation products of tetracyclines, ATC and 4-EATC, have low recoveries in soils (40 and 41%) and swine manure (64 and 65%) but acceptable recovery in drainage waters (103 and 102%). Tetracyclines are known to complex with divalent ions such as  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  as well as with substances of low and high molecular weight [84, 279]. By dehydration, TC become ATC and this change in conformation tend to influence its capacity to complex with divalent ions and thus its sorption capacity with humic substances, minerals and clays present in both swine manure and soil matrices. Tetracycline and ATC differ by their chelation sites that seems to influence their complexation capacity and



results in low recovery for ATC and its associate epimer [279]. Moreover, TCs are well known to be difficult to remove once adsorbed onto organic matter according with their high  $K_d$  [72]. In the context of environmental analysis, according to US Environmental Protection Agency (US EPA) and European Commission (EC), recoveries for ATC and 4-EATC were non acceptable for accredited method. Acceptable recoveries should be in the range 70 - 130%. However, US EPA has also determined similarly low recoveries for ATC and 4-EATC in soils [280, 281].

Several filter materials were tested for drainage waters filtration: fiberglass, polycarbonate, cellulose, nitrosamine, nylon and mixed cellulose esters. Fiberglass filters had the best recoveries for all target compounds (**Figure S6-4**).

Accuracy was determined at two concentration levels as percent bias (%) between the concentration added and the one found in the samples ( $n = 3$ ). It was acceptable with bias under 15% for each concentration levels (50, 250  $\text{ng L}^{-1}$  -  $\text{ng g}^{-1}$  -  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) for all compounds (**Tableau S6-3**). Precision for intraday and interday was expressed using relative standard deviations (RSD - %). Intraday precision values calculated for two concentration levels ( $n = 5$ ) were under 7% (**Tableau S6-3**). Interday precision calculated for two concentrations levels ( $n = 5$ ) was under 14% (**Tableau S6-3**).

**Tableau 6-2.** Method validation parameters of target compounds in swine manure, soil and drainage water samples including coefficient correlation ( $R^2$ ), sensitivity, the MLD and the MLQ and recoveries.

Compounds	$R^2$			MDL			MQL		
	Manure	Soil	Water	Manure ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Soil ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Water ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Manure ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Soil ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Water ( $\text{ng L}^{-1}$ )
TC	0.989	0.997	0.998	4.1	2.25	3.0	14	7.4	10
4-ETC	0.983	0.993	0.999	8.0	1.0	3.5	27	3.3	12
ATC	0.974	0.986	0.993	6.1	2.0	11	20	6.8	37
4-EATC	0.982	0.963	0.994	7.2	2.7	13	24	9.1	42
DEC	0.977	0.999	0.999	7.1	7.4	2.1	24	25	7.0
OTC	0.987	0.998	0.999	9.4	3.6	2.3	31	19	7.7
MC	0.967	0.977	0.986	8.2	6.6	5.6	27	22	18
CTC	0.998	0.998	0.999	5.7	5.6	2.0	19	19	6.5
DC	0.986	0.988	0.997	5.9	5.3	9.0	20	18	30
TMP	0.999	0.996	0.999	4.6	1.1	2.8	15	3.6	9.4
SFX	0.997	0.996	0.998	6.3	1.8	4.4	21	6.1	15
TYL	0.972	0.961	0.983	16	3.1	27	53	10	91
LCM	0.999	0.999	0.999	8.6	1.2	6.1	29	4.2	20
PEG	0.993	0.991	0.994	12	1.3	10	41	4.4	34
AMX	0.988	0.991	0.998	3.6	1.1	7.6	12	3.6	25
CFT	0.996	0.999	0.999	12	2.2	2.9	42	7.2	9.8

### 6.3.2 Degradation of TCs and formation of metabolites

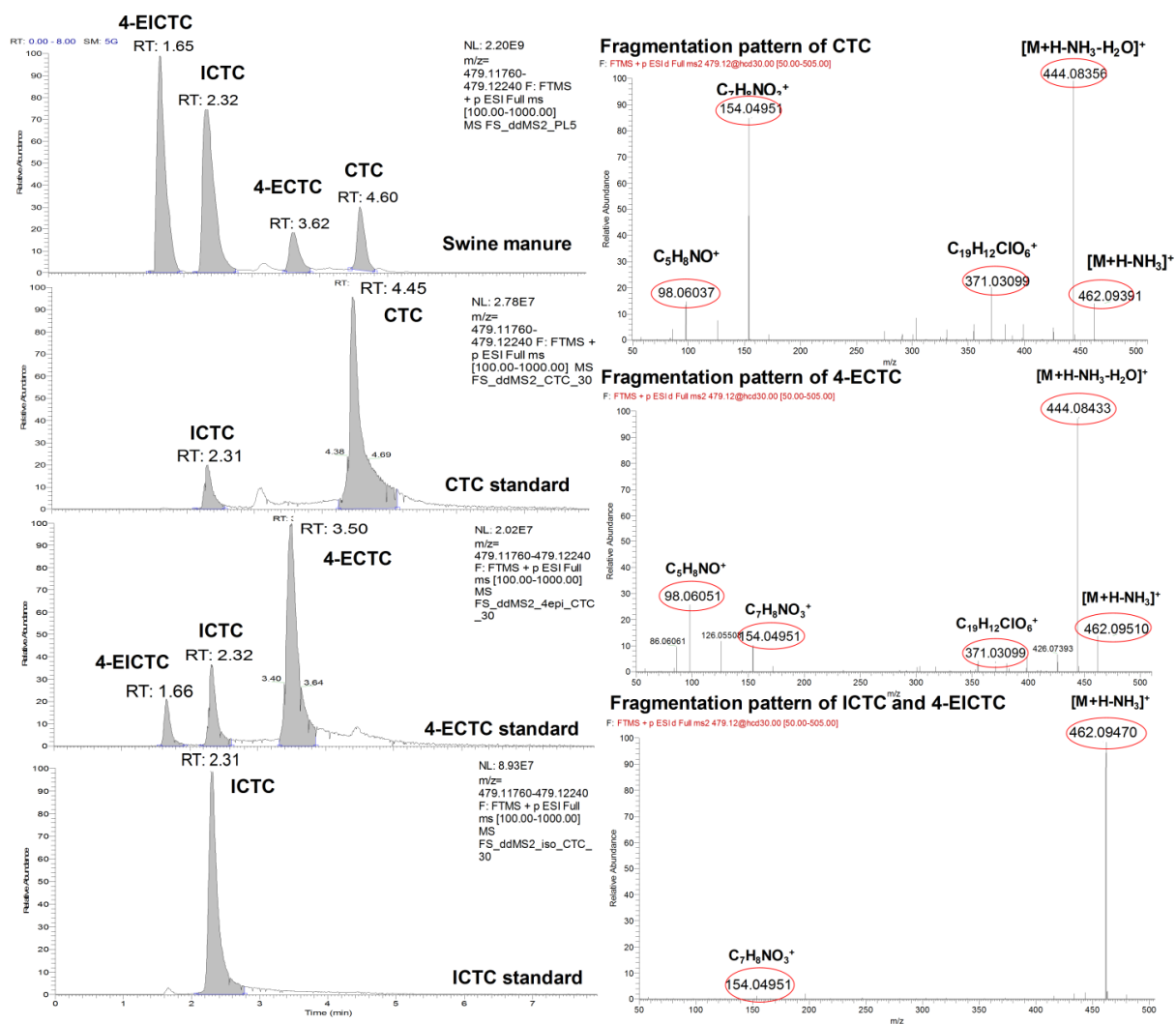
The metabolism of veterinary antibiotics can be divided into several stages. Primary metabolites result from the biotransformation of the parent compounds by the animal, whereas secondary metabolites result from the biotransformation by the bacteria present in the ecosystem. All these compounds are then subjected to abiotic physicochemical degradation when released into the environment which further complicates the environmental fate of these substances. This mixture of metabolites, degradation products and parent compounds has been measured in the different samples, thanks to LC separation. Several peaks eluted before the TCs standard compounds with greater intensity especially for TC, CTC and DEC chromatographic separation (**Figure S6-5**). Those peaks are constitution isomers of the parent compounds called epimers and could be formed in mildly acidic conditions [264]. Chlortetracycline could form several different degradation epimers: 4-ECTC, ICTC, 4-epiisochlortetracycline (4-EICTC), ketochlortetracycline (KCTC) and 4-epiketochlortetracycline (4-EKCTC) [136, 264]. Also, TC and DEC could produce 4-ETC and 4-epidemeclocycline (4-EDEC) [56]. This epimerization of TCs is a steric rearrangement in the configuration of dimethylamine group and oxidation of the phenolic group present on the TC nucleus [221]. Several of these degradation products have a concentration level above their parent compounds in the samples suggesting the increased environmental stability of the latter. The identification of some degradation compounds may be difficult due to the unavailability of standards. It was thus based on the interpretation and comparison of retention times and fragmentation patterns of these constitution isomers with the available reference standards.

Three major chromatographic peaks (FS mode  $m/z$  479.1209) eluted before CTC (4.45 min) at 1.65 min, 2.32 min and 3.62 min respectively and reached relatively high intensity in the swine manure sample (**Figure 6-2**). Two of these chromatographic peak retention times and fragmentation patterns matched with those of ICTC (2.31 min) and 4-ECTC (3.50 min) reference standards and were also easily identifiable. Chlortetracycline and 4-ECTC reference standards produced three major fragment ions at HCD 30 (%):  $m/z$  444.0850, 462.0939 and 154.0504 corresponding to  $[M+H-NH_3-H_2O]^+$ ,  $[M+H-NH_3]^+$  and  $C_7H_8NO_3^+$  respectively (**Figure 6-2**) [266]. However, the ICTC reference standard that eluted at 2.31 min produced

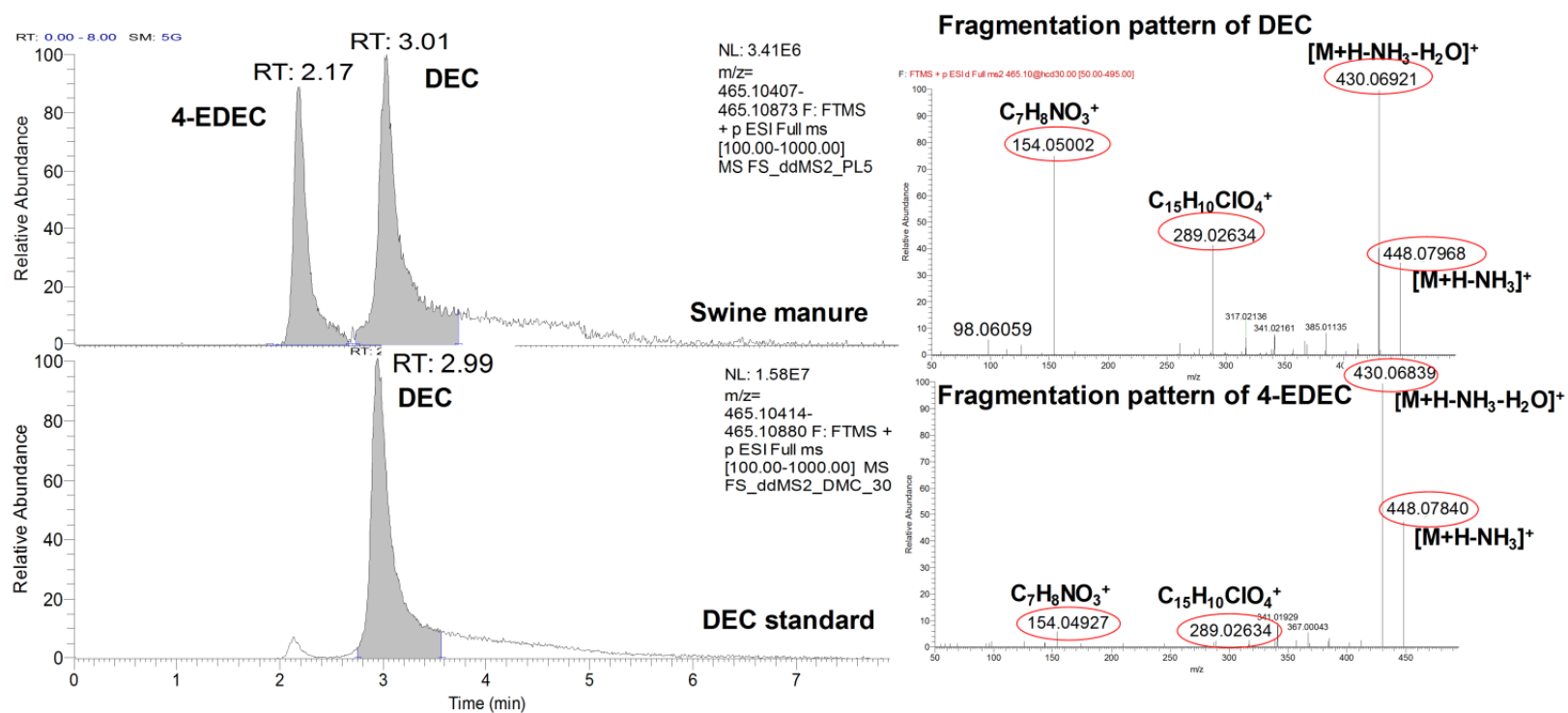
the same fragments with a greater intensity for  $m/z$  462.0939. The same fragmentation pattern has been noticed for the chromatographic peak that eluted before ICTC at 1.65 min (**Figure 6-2**). Related epimers have a similar fragmentation pattern due to their close structure; fragment ions of the unidentified epimer peak showed a close relation with ICTC, and allowed us to propose that this peak is 4-EICTC.

The low intensity degradation products were not formally identified because of the unavailability of the standards. Otherwise, a study reported the presence of KCTC and its conjugate epimer 4-EKCTC in swine tissues that produced a major fragment at  $m/z$  462.0939 and a minor fragment at  $m/z$  444.0850 [282]. These results were compared with the DDA spectrums of the spiked surface water solutions and the control HPLC grade solution waters incubated at ambient temperature and laboratory light. After one month, a major part of CTC was transformed into its constitutive isomers. The spiked surface water solutions contained only two isomers of CTC at 1.67 and 2.30 min and they corresponded respectively to 4-EICTC and ICTC according to their retention times and their fragmentation patterns. However, the control solution in HPLC grade water showed a slower degradation of CTC (**Figure S6-3**). In this solution, the five constitutive epimers of the CTC were present. The epimers at 2.54 and 3.06 mins are related due to their close fragmentation pattern and are certainly related to 4-EKCTC and KCTC, keto formed of both enol 4-ECTC and CTC.

Only one chromatographic peak eluted before DEC (3.01 min) and belongs to 4-EDEC according to its fragmentation pattern. The fragmentation of DEC and its related epimer both showed peaks at  $m/z$  448.0799 and 430.1 related to a loss of  $H_2O$  followed by a loss of  $NH_3$ . A common TCs product peak was also present at 154.0504 ( $C_7H_8NO_3^+$ ) thus confirming the presence of 4-EDEC in the sample (**Figure 6-3**). The 4-ETC (1.50 min) and TC (1.87 min) reference standards showed the same product ions at  $m/z$  410.1240 and 154.0504 and similar retention times were also observed between samples and standards.



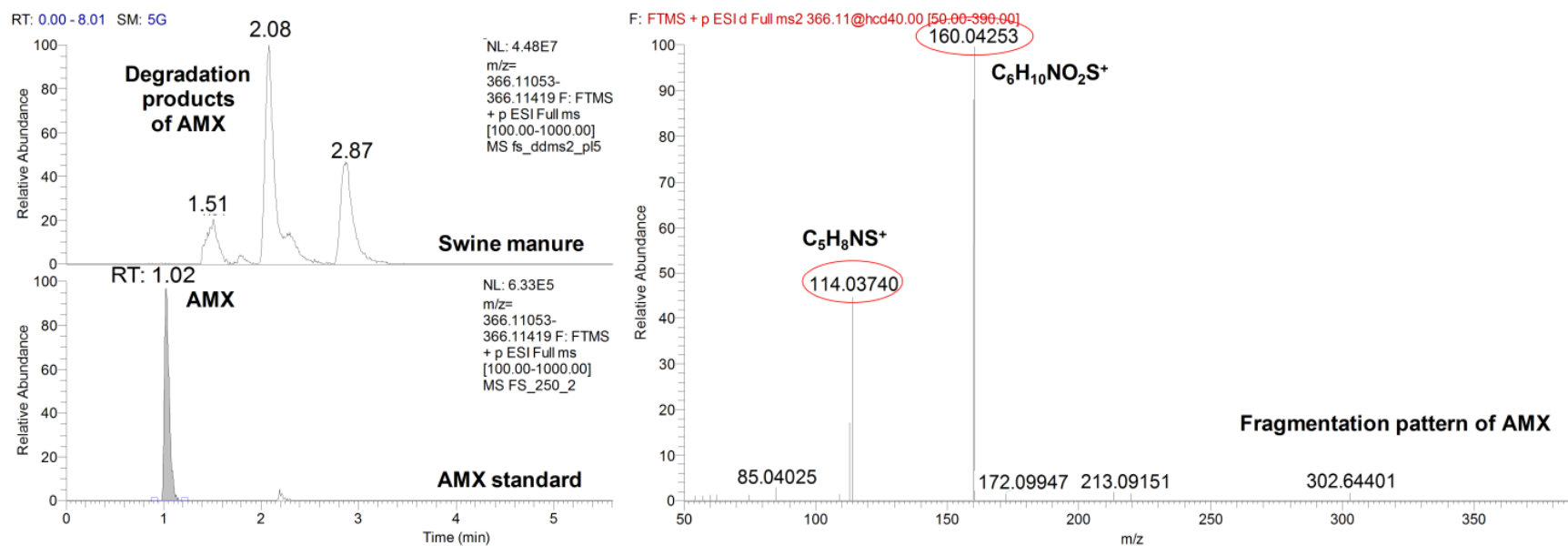
**Figure 6-2.** Chromatographic separation of CTC and its degradation products with their fragmentation patterns, proposed structures of fragment ions and mass accuracy.



**Figure 6-3.** Chromatographic separation of DEC and its degradation products with their fragmentation patterns, proposed structures of fragment ions and mass accuracy.

The  $\beta$ -lactamines AMX, PEG and CFT were not found in the samples despite being widely used in agriculture. The absence of this antibiotic family could be explained by the poor stability of the  $\beta$ -lactam ring. Indeed, this ring can be opened by  $\beta$ -lactamase, an enzyme family linked to bacterial resistance, or by a chemical hydrolysis [64]. However, three chromatographic isomeric peaks (1.51, 2.08 and 2.87 min) appeared in the extracted ion chromatogram of swine manure sample for protonated AMX at  $m/z$  366.1124, while reference standard of AMX showed main peak intensity at 1.02 min and a lower at 2.09 min in standard solution (**Figure 6-4**). The fragmentation of AMX reference standard resulted in the formation of two major product ions at  $m/z$  160.0426 and 114.0374. Those fragments assigned to molecular structures with Mass Frontier software and correspond to  $C_6H_{10}NO_2S^+$  and  $C_5H_8NS^+$  respectively (**Figure 6-4**). The same fragmentation pattern was observed for the chromatographic isomeric peak and could be assigned to diketopiperazine amoxicillin which is known to be a degradation product of AMX [283]. It was shown that this compound considerably affects microbial activity and its presence confirmed that AMX was actually used during swine husbandry [64].

One important issue in quantifying TCs degradation products is their lack of stability and the relative ease with which they form epimers. Pure ICTC reference standard is unstable and readily transforms to its conjugate epimer to form a stable mixture of ICTC and 4-EICTC which further complicates the quantification [264]. In addition, 4-EICTC standard is not available. This unavailability coupled with the instability of TCs epimers lead us to consider the use of a semi-quantification approach. Thus, 4-EICTC and ICTC were semi-quantified based on the calibration curve of CTC. This approach by using an analogous compound to propose estimation has already been used in several studies that study metabolites or degradation products [284]. The accuracy of these data relies on the assumption that the response factor for degradation products was comparable with the response factor for the parent compound. Because of different factors such as matrix effect causing ionisation suppression, detector dynamic range or difference in the structure of epimer, semi-quantification could be viewed as a general indication of relative abundance.



**Figure 6-4.** Chromatographic separation of AMX and its degradation products with their fragmentation patterns, proposed structures of fragment ions and mass accuracy.

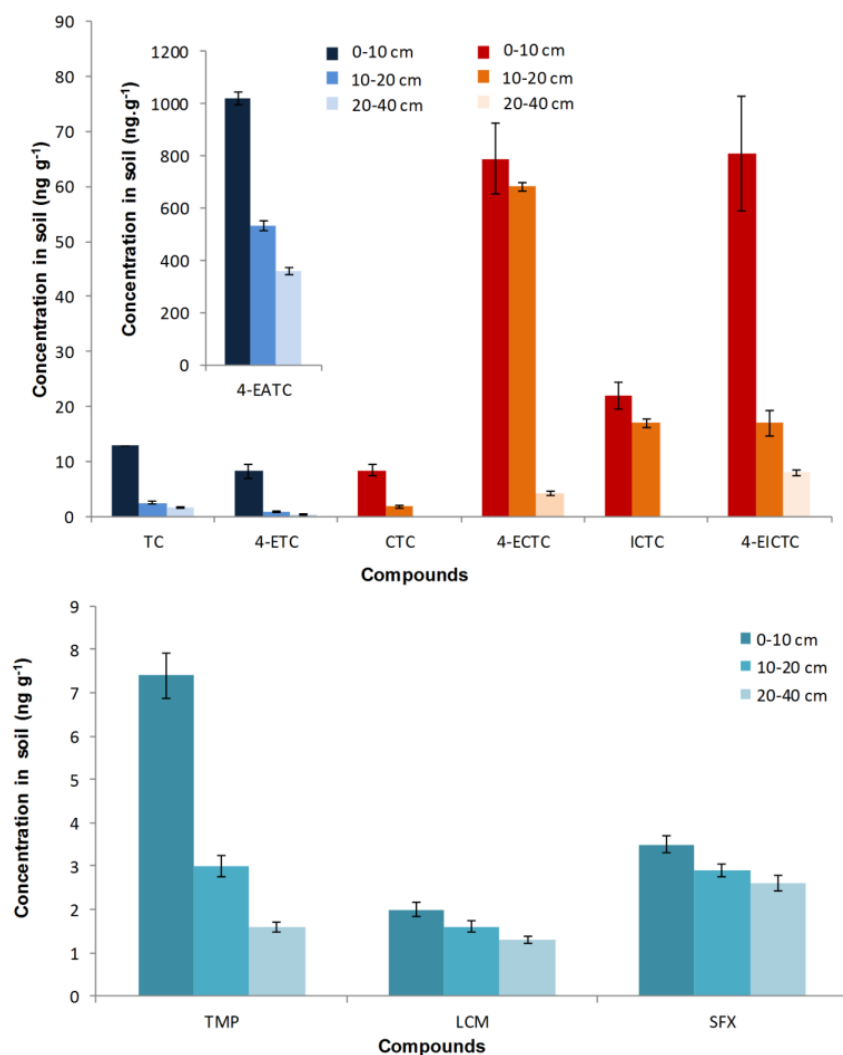


### 6.3.3 Occurrence, mobility and efficiency of veterinary compounds

The use of large quantities of veterinary antibiotics in swine husbandry has led to the occurrence of some TCs and other often encountered pharmaceuticals in swine manure, soils, drainage waters as well as surface waters and ground waters. The quantity of swine manure spread on the field in 2011 was  $54 \text{ t ha}^{-1}$  and soil samples were collected 6 months after. However, swine manure samples from 2011's spreading were unavailable; therefore, no data on this manure was recorded. A summary of ranging concentrations found in the different samples was presented in **Tableau S-4**. Traces of TCs, TMP, LCM, SFX and TYL close to the MLD were found in the 2011 soil samples with higher concentrations for DC ranging between 16 and  $46 \text{ ng g}^{-1}$ . Otherwise, degradation products of TCs formed by a loss of water were present in large amount with concentrations comprised between 17 and  $1\,020 \text{ ng g}^{-1}$ . The degradation products of CTC i.e. ICTC and 4-EICTC were semi-quantitative and ranged between 16 and  $145 \text{ ng g}^{-1}$ .

The same experiment was repeated in 2013, with 2 manure applications of  $55 \text{ t ha}^{-1}$  and  $25 \text{ t ha}^{-1}$ , 3 months apart. In this experiment, the drainage waters were collected one week after manure spreading. The swine manure spread on the field was analysed and large amounts of TCs were found at concentrations ranging from 53 to  $137 \mu\text{g L}^{-1}$ , also, LCM was also found up to  $28 \mu\text{g L}^{-1}$ . While, the degradation products of CTC and DEC were present at concentrations between 118 and  $663 \mu\text{g L}^{-1}$ . In soil samples collected in 2013, several veterinary antibiotics were present at trace levels. Also, TCs and their epimers were found between 3.4 and  $333 \text{ ng g}^{-1}$ . A rainfall event following manure spreading was recorded by a weather station near the field one day before the sampling of drainage waters. The drainage waters generated by the rainfall carried away part of the antibiotics present in the soils surface. The rainfall waters passed through soils and could have brought the antibiotics deeper in the soils. The concentrations of the different families of antibiotics found in the different soil layers (2011 and 2013) seems to stay in the surface layer (0 - 10 cm), while a portion of antibiotics infiltrates into deeper layers (10 - 40 cm) (**Figure 6-5**). Moreover, the concentration of the parent compounds was low compared to the degradation products of TC,

CTC and DEC which ranged from 17 to 3 290 ng L<sup>-1</sup>. Tetracyclines could readily degrade in aqueous environments under acidic or alkaline conditions [56]. The pH of the drainage waters was measured at 7.1 and this is compatible with the formation of iso-TCs degradation products [264]. The same phenomenon was observed in the aging surface waters spiked with target compounds; TCs were rapidly degraded while degradation was slower in the control HPLC grade water solution. Otherwise, CTC was still present in the aging soil samples test and seems to persist longer in this matrix (**Figure S6-3**).

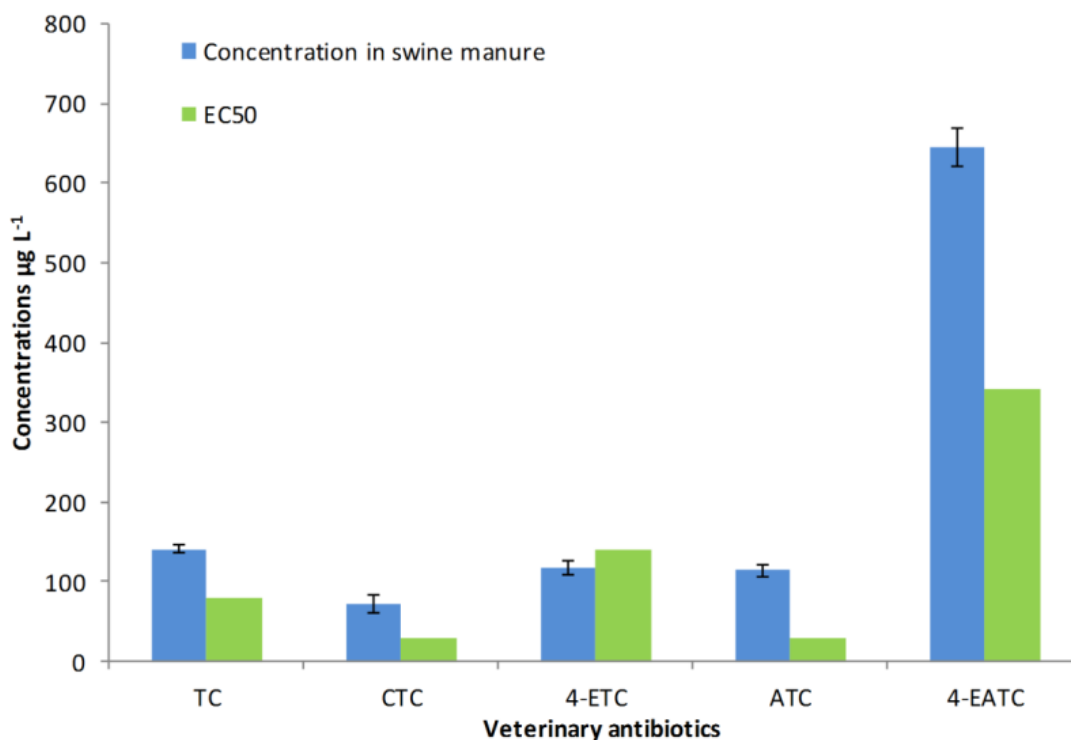


**Figure 6-5.** Distribution of veterinary antibiotic concentrations (ng g<sup>-1</sup>) from different families as a function of depth sampling in 2011 and 2013 ( $n = 3$ ).

There are many ways for such antibiotic residues to be released into the environment. The most obvious way is through the land application of swine manure as fertilizers on agricultural fields. Once the application is made, the antibiotics contained in the manure could migrate to the soils and transit via drainage systems. Veterinary antibiotics are mainly hydrophilic with a  $\log P$  below 1, thus allowing them to travel relatively easily through soils [66]. These antibiotics could infiltrate through soils and could eventually reach surface waters or seep into ground waters. Moreover, depending of the type of soil, TCs have a certain affinity with the solid phase (especially with the organic matter and mineral particles) which could modify their potential mobility [66]. This wide range of sorption coefficients reflects the variability in the binding of TCs to soil particles. Otherwise, this binding is based on the ability of the TCs to form complexes with double-charged cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$ ) which are in abundant in soils [151]. The sorption is less important in the case of the metal-chelate complexes due to a charge competition, thus, making complexed TCs less susceptible to be bound to soil surfaces and therefore increase their mobility [72]. The epimerization of TCs is inhibited by the presence of these cations which explain the persistence of TCs in soils compared to drainage waters. Moreover, the chelation reduces the bioavailability and may therefore reduce the antibacterial effect [56]. Complexation is an important parameter for assessing their environmental fate and effects, especially when considering that divalent metals are often present at high concentrations in the studied matrices. The temperature and the humidity level of the medium, as well as the pH could greatly influence the mobility of the TCs in soils. It has been demonstrated that under more acidic condition, the adsorption of TCs decreases [285]. The analysed soil samples have a pH between 5 and 6 which could indicate a moderate mobility of TCs.

The effects of TCs on pathogenic bacteria have been reported in many studies but the toxicity of their associated degradation products has not been clearly evaluated. Generally, metabolites are less potent than the parent compounds, as illustrated in the case of doramectin [286]. But in some cases, metabolites may still have significant activity [56]. The major forms of degradation products of TCs in the matrices were 4-ETC, ATC, 4-EATC, 4-ECTC, ICTC, 4-EICTC and 4-EDEC [136, 213, 264]. Several of these degradation products were found to be more toxic and potent than their expected parent compounds [56]. For example, ATC that

has a hydroxyl group missing relative to its parent molecule, had an  $EC_{50}$  value for sludge bacteria approximately 3 times lower than the  $EC_{50}$  value for the parent compound. Relative to CTC, ICTC lost more than 99% of the potency of its parent ( $EC_{50} = 36 \text{ mg L}^{-1}$ ) [56]. All other degradation products had  $EC_{50}$  values less or around  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , in the same range as the parent compounds. The concentrations of these degradation products found in soil and drainage water samples were substantially below  $EC_{50}$  values. However, the concentrations of TCs degradation products in swine manure samples were above their  $EC_{50}$  values (**Figure 6-6**). This means that these molecules were still active on tetracycline-resistant bacterial strains. Moreover, the degradation products behavior could differ from the parent compounds. ATC has a lower sorption coefficient relative to TC and is therefore likely to be transported more readily with drainage waters [85, 285]. The constant land application of manure containing TCs residues can exert selective pressure on the soil microorganisms and could probably promote the selection of resistant microbes.



**Figure 6-6.** Concentrations of some TCs in swine manure ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) compared to their relative  $EC_{50}$  [56].

## 6.4 Conclusions

LC-HRMS is an interesting tool to study the occurrence and the fate of organic contaminants in complex environmental and biological samples. This hybrid mass spectrometer allowed a selective and sensible quantification of veterinary antibiotics while providing the investigation and identification of several degradation products by using the DDA mode. This study revealed the presence of veterinary antibiotics and several of their related degradation products in agricultural soils, drainage waters and swine manure. Even if the concentrations of most of these compounds have been found at trace levels, several degradation products occurred at relatively high concentrations, reaching 1 000 ng L<sup>-1</sup> for drainage waters, 100 ng g<sup>-1</sup> for soils and 100 µg L<sup>-1</sup> for swine manure. Other antibiotics such as TMP, SFX, LCM and TYL were present at trace levels in the samples and the occurrence of AMX was confirmed by the presence of one of its degradation product. Following the spreading swine manure and the rain event, veterinary antibiotic residues were distributed in the various soil depth layers of the field but seem to stay mainly at the surface. However, these organic residues can travel in the nearby environment via drainage waters. These constitutive isomers, found in the samples, only represent a small portion of the total potential degradation products. The degradation pathway of these molecules is complex and could result in bioactive compounds, stable, mobile in the environment with potentially higher toxicity than their parent. All these compounds could have a significant impact on both living organisms and microbial communities even at relatively low levels of exposure. Thus, it should be important to consider the degradation products of veterinary antibiotics and not focus solely on the fate of the parent molecules.

## **6.5 Acknowledgements**

The Fonds de Recherche Québec - Nature et Technologies (FRQNT) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) are acknowledged for financial support. We thank Thermo Fisher Scientific for their technical support. We also thank Sung Vo Duy for his technical help and scientific support.

## **6.6      Supplementary materials**

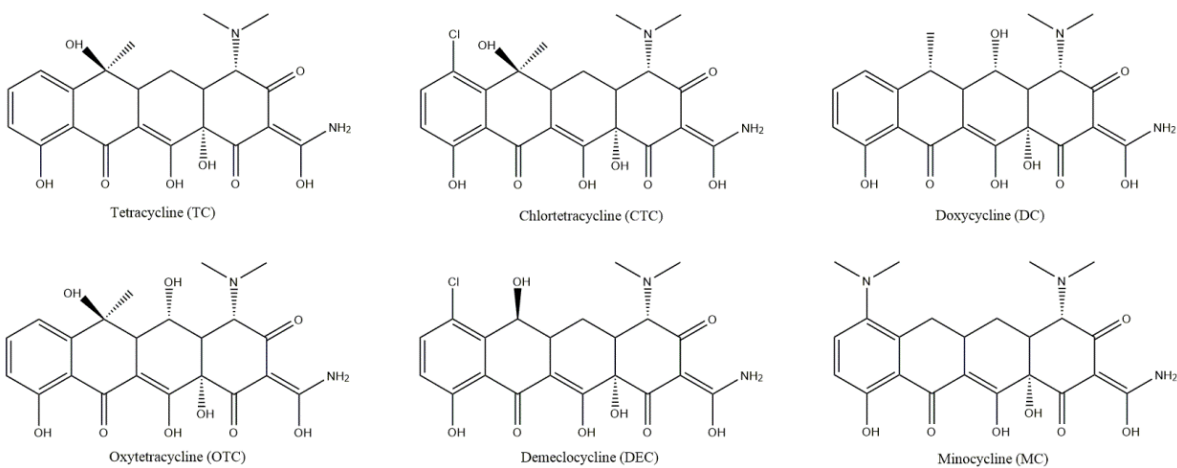
**Section 1.** Generalities on the field and sample collection.

The field trial was initiated in 1978 to compare the ability of mineral fertilizer and LSM applied at increasing rates (30, 60, 90 and 120 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) to sustain soil fertility, and productivity of corn (*Zea mays* L.) grown in a monoculture [287]. These five treatments were replicated four times in a completely randomised bloc design of twenty parcels of 6 m x 15 m. The soil was a poorly-drained Le Bras series, clay loam (275 g clay kg<sup>-1</sup>, 425 g silt kg<sup>-1</sup>), classified as an orthic humic gleysol. The soil was an imperfectly drained Le Bras series, clay loam (275 g clay kg<sup>-1</sup>, 425 g silt kg<sup>-1</sup>; loamy, mixed, frigid, Typic Humaquept). In 1998, subsurface drainage systems (perforated plastic pipe) were installed at the center of each parcel at 0.9 m depth with separate drains outlets to monitor subsurface water quality with tipping buckets and 60-L reservoirs to measure water flow and sample water.

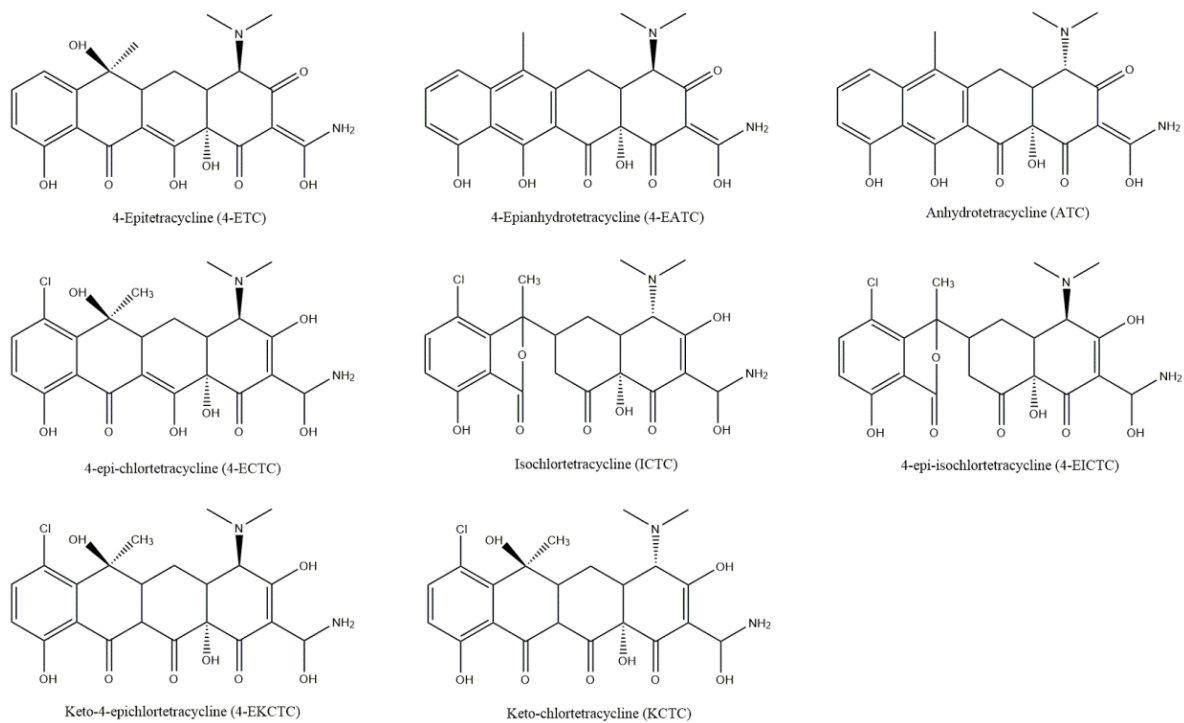
Starting in 2006, a crop rotation of corn (*Zea mays* L.), canola (*Brassica napus* L.) and spring wheat (*Triticum aestivum* L.) was implemented, except following canola harvest in 2013, where winter wheat was sown instead of spring wheat in 2014. Mineral fertilization was adjusted according to local crop recommendations. Swine manure was applied at increasing rates (25, 50, 75 and 100 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup>) before seeding in spring and in summer of 2013 before winter wheat. In spring of 2006, 2008, 2009, 2011 and 2013, LSM came from an outdoor storage pit from a maternity confinement. In spring of 2007, 2010, 2012 and summer of 2013, swine manure came from the indoor pit of a hog finishing facility. During each field application, swine manure samples were collected in triplicates at the outlet of the tank.



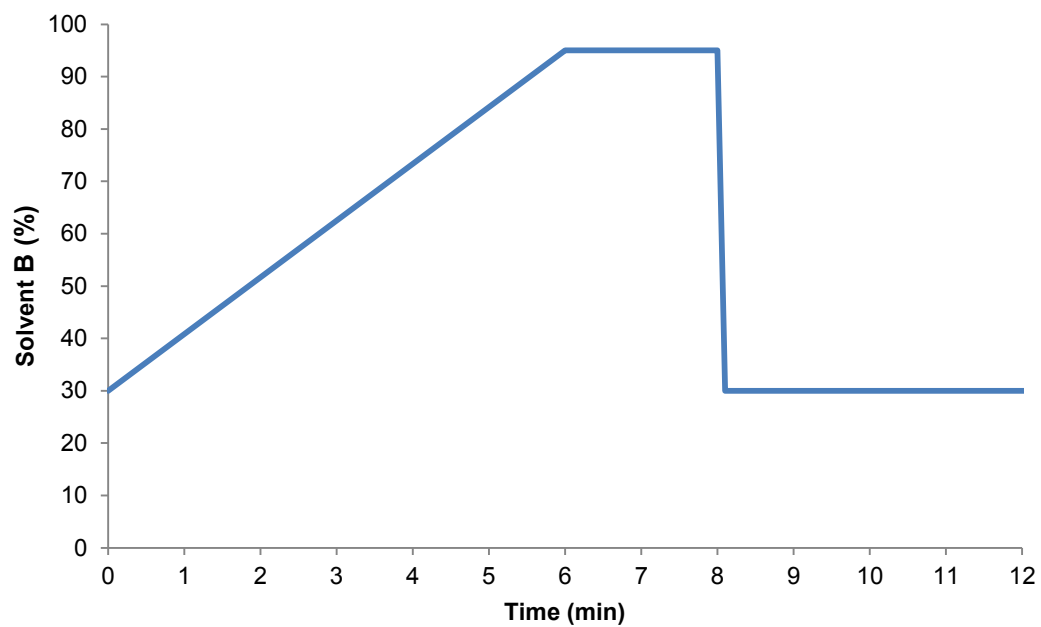
## Tetracyclines



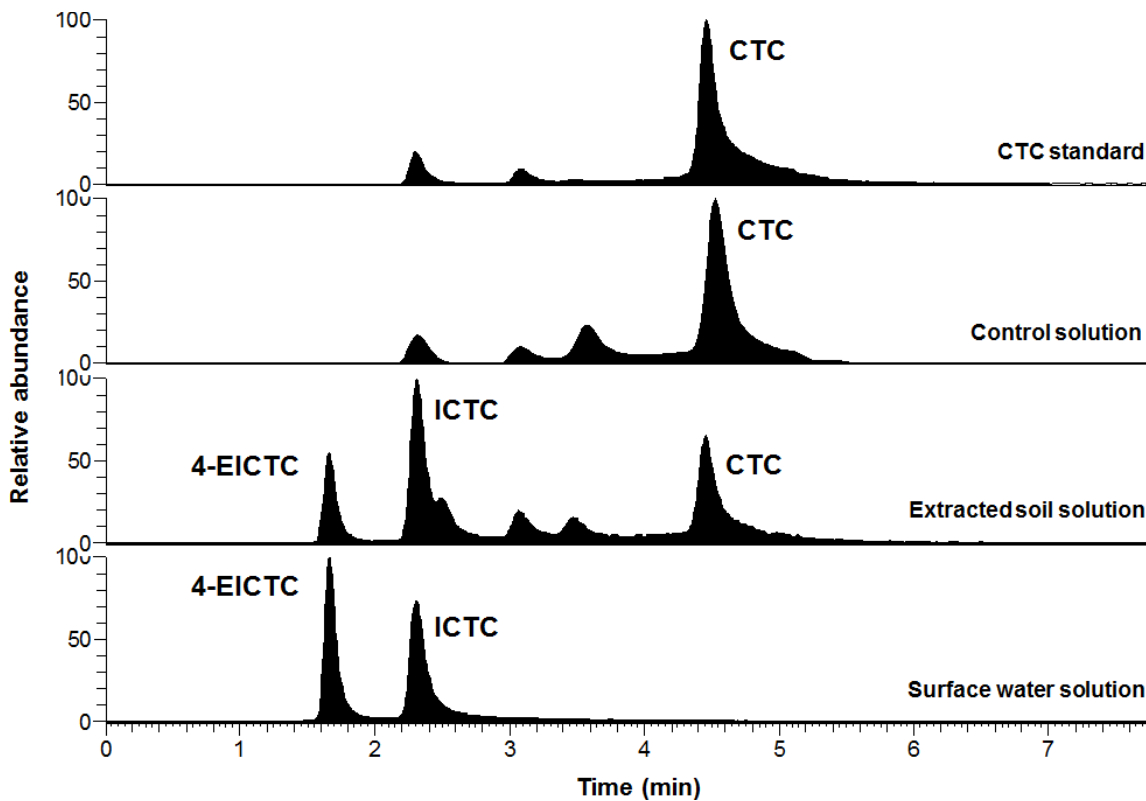
## Degradation products of tetracyclines



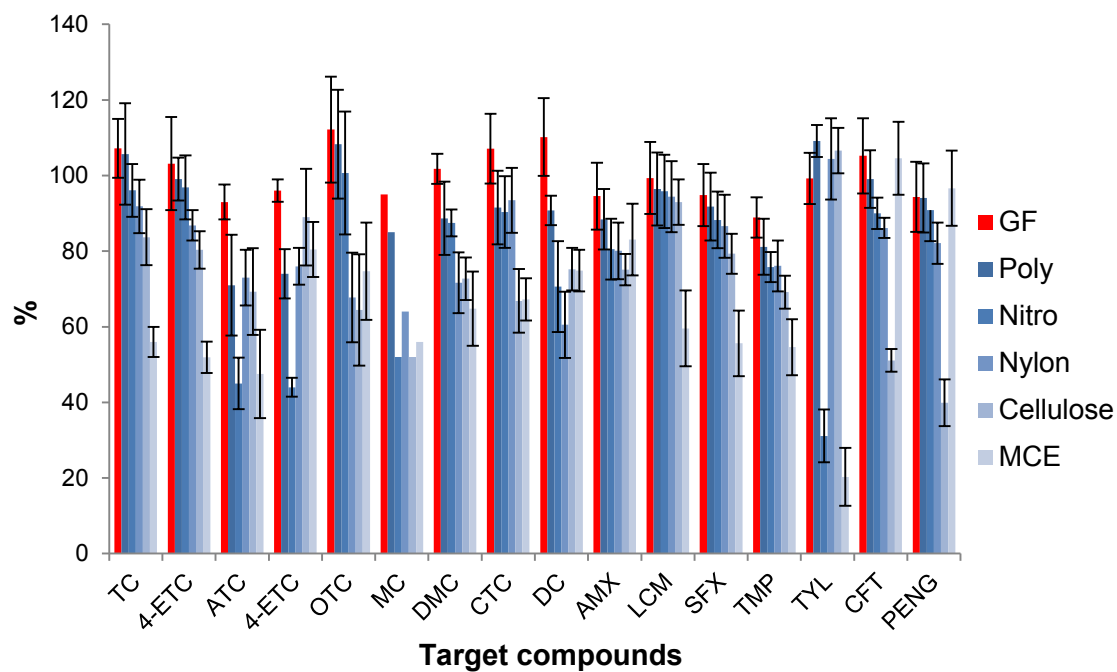
**Figure S6-1.** Chemical structures of tetracyclines and their respective degradation products.



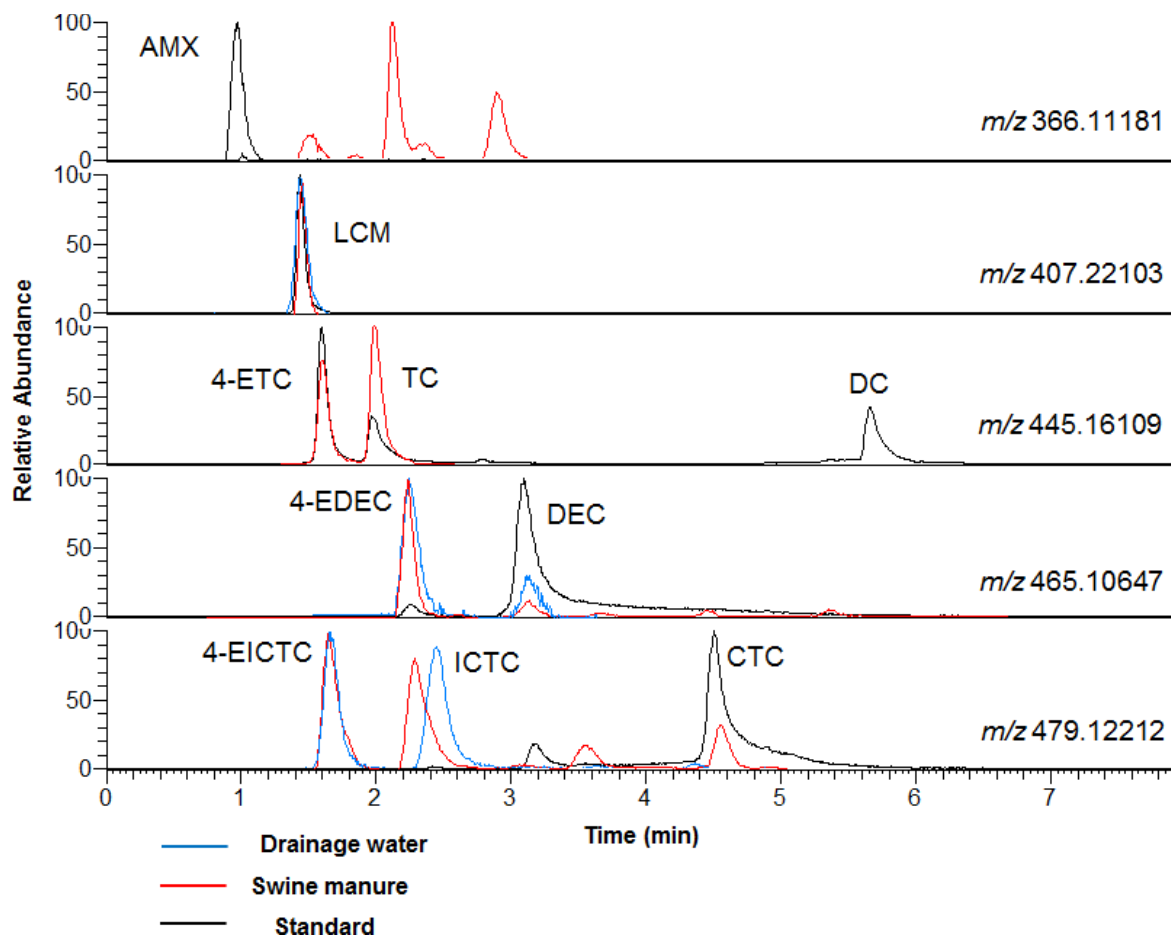
**Figure S6-2.** LC gradient.



**Figure S6-3.** Degradation of chlortetracycline (CTC) in soil, in surface water and in HPLC grade water compared to CTC standard. Chlortetracycline degradation products i.e. 4-epiisochlortetracycline (4-EICTC) and isochlortetracycline (ICTC) seem to form more rapidly in surface water than in soil.



**Figure S6-4.** Test of different filters for drainage waters filtration according with target compounds ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) recoveries ( $n = 3$ ).



**Figure S6-5.** Example of chromatographic separation of target compounds i.e. amoxicillin (AMX), lincomycin (LCM), tetracycline (TC), doxycycline (DC), demeclocycline (DEC) and chlortetracycline (CTC) and degradation compounds i.e. 4-epitetracycline (4-ETC), 4-epidemeclocycline (4-EDEC), 4-epiisochlortetracycline (4-EICTC) and isochlortetracycline (ICTC) into drainage water and swine manure compared to certified standards separation in methanol.

**Tableau S6-1.** List of inclusion of the data-dependant acquisition mode. This list included parent compounds of common veterinary antibiotics used in swine husbandry as well as degradation products of tetracyclines based on literature [277].

Classes	Compounds	Molecular formula	Exact mass [M+H] <sup>+</sup>	Triggered fragmentation in the sample extracts
Tetracyclines and associated degradation products	Tetracycline	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	445.1611	Yes
	Anhydrotetracycline*	C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	427.1505	Yes
	N-desmethyl-isotetracycline*	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	431.1454	No
	N-didesmethyl-isotetracycline*	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	416.1220	No
	Terranoic acid*	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	251.0556	No
	Chlortetracycline	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	479.1221	Yes
	Anhydrotechlortetracycline*	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	461.1116	No
	N-desmethyl-isochlortetracycline*	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	465.1065	No
	N-didesmethyl-isochlortetracycline*	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	451.0908	No
	Oxytetracycline	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	461.1560	Yes
	Demeclocycline	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	465.1065	Yes
	Doxycycline	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	445.1611	Yes
	Minocycline	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	458.1927	No
β-lactamines	Ceftiofur	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>3</sub>	524.0368	No
	Amoxicillin	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S	366.1124	Yes
	Penicillin G	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	335.1066	No
Macrolides	Tylosin A	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	916.5270	No
	Tylosin B (Desmycosin)	C <sub>39</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>14</sub>	772.4483	No
	Tylosin C (Macrocin)	C <sub>45</sub> H <sub>75</sub> NO <sub>17</sub>	902.5113	No
	Tylosin D (Relomycin)	C <sub>46</sub> H <sub>79</sub> NO <sub>17</sub>	918.5426	No
	Erythromycin	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub>	734.4690	No
	Tiamulin	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>4</sub> S	494.3305	No
	Tulathromycin	C <sub>41</sub> H <sub>79</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub>	806.5742	No
	Tilmicosin	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	869.5738	No

\*Degradation products of tetracyclines

**Table S-1 (following).** List of inclusion of the data-dependant acquisition mode. This list included parent compounds of common veterinary antibiotics used in swine husbandry as well as degradation products of tetracyclines based on literature [277].

Classes	Compounds	Molecular formula	Exact mass [M+H] <sup>+</sup>	Triggered fragmentation in the sample extracts
Diaminopyrimidine	Trimethoprim	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	291.1457	Yes
	Sulfadoxine	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	311.0814	Yes
	Sulfamethoxazol	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	254.0599	No
Sulfonamides	Sulfachloropyridazine	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	285.0213	No
	Sulfadiazine	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	251.0603	No
	Sulfamerazine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	265.0759	No
Fluoroquinolone	Enrofloxacin	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	360.1723	No
Phenicol	Chloramphenicol	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	323.0202	No
Lincosamide	Lincomycin	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	407.2216	Yes
	Apramycin	C <sub>21</sub> H <sub>41</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub>	540.2881	No
	Gentamicin	C <sub>21</sub> H <sub>43</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	478.3241	No
	Narasin	C <sub>43</sub> H <sub>72</sub> O <sub>11</sub>	765.5153	No
Aminoside	Neomycine	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub>	615.3201	No
	Salinomycin	C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>11</sub>	751.4996	No
	Streptomycin	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>7</sub> O <sub>12</sub>	582.2735	No

**Tableau S6-2.** Recovery and matrix effect (% -  $n = 5$ ) of target compounds at two concentrations (50 and 250 ng g<sup>-1</sup> in field soils, 50 and 250 µg L<sup>-1</sup> in swine manure and 50 and 250 ng L<sup>-1</sup> in drainage waters) in swine manure, field soils and drainage waters.

Compounds	Recovery + STD (%)						Matrix Effect + STD (%)					
	50			250			50			250		
	Manure	Soil	Water	Manure	Soil	Water	Manure	Soil	Water	Manure	Soil	Water
TC	81±10	120±21	98±5	95±9	121±22	97±5	110±7	101±4	100±2	112±6	102±3	101±3
4-ETC	85±9	111±18	87±4	96±5	102±19	93±6	63±4	75±5	95±1	62±4	77±5	94±2
ATC	64±6	40±9	103±9	65±4	58±3	101±8	95±4	110±8	99±2	92±3	108±7	101±1
4-EATC	65±6	41±2	102±7	70±5	53±4	109±11	101±3	103±4	100±1	106±5	109±5	98±1
DEC	62±5	58±4	99±8	66±5	62±8	102±8	89±4	85±4	93±3	95±3	83±4	96±2
OTC	75±4	89±2	92±3	69±6	92±6	103±6	65±5	76±4	87±3	68±3	79±6	89±1
MC	55±3	57±6	101±9	54±5	62±5	100±8	47±4	65±5	75±2	50±5	69±4	80±3
CTC	96±6	108±10	98±10	98±5	88±8	91±6	102±5	95±6	96±2	105±4	99±5	99±2
DC	50±7	48±1	94±5	53±6	50±1	95±4	73±3	70±5	93±4	76±4	71±3	92±1
TMP	80±8	86±3	92±3	85±7	82±4	93±2	93±6	97±4	101±5	94±5	100±2	100±3
SFX	78±6	82±6	89±4	79±6	85±5	81±3	87±5	89±3	99±2	86±3	96±3	103±1
TYL	73±5	71±8	86±3	75±4	78±7	88±3	85±4	79±5	88±2	88±3	83±6	95±1
LCM	90±4	90±5	96±2	88±5	92±5	92±2	105±5	98±4	105±4	103±4	99±2	103±4
PEG	75±6	69±3	76±5	95±3	75±3	80±3	86±3	88±2	97±2	89±4	87±3	98±2
AMX	68±4	67±9	88±3	84±2	65±7	85±2	75±4	78±2	86±1	76±3	81±2	90±2
CFT	80±6	81±6	97±5	88±5	85±5	90±2	70±5	75±3	91±2	74±5	76±3	87±3



**Tableau S6-3.** Accuracy and precision parameters of target analytes measured in swine manure, field soils and drainage waters and method interday/intraday precision measured at two concentrations (50 and 250 ng g<sup>-1</sup> in field soils, 50 and 250 µg L<sup>-1</sup> in swine manure and 50 and 250 ng L<sup>-1</sup> in drainage waters), (RSD - %, *n* = 5).

Compounds	Accuracy (%)						Interday (%)						Intraday (%)					
	50			250			50			250			50			250		
	M	S	W	M	S	W	M	S	W	M	S	W	M	S	W	M	S	W
TC	9	9	5	8	8	4	11	12	9	10	13	9	6	5	2	3	4	1
4-ETC	8	7	3	13	9	2	12	13	8	9	14	8	5	6	2	4	2	2
ATC	7	8	5	6	10	3	10	9	8	11	10	8	6	7	4	5	3	3
4-EATC	6	8	6	5	9	5	11	10	10	9	13	10	7	6	3	4	5	2
DEC	8	5	4	9	7	4	9	8	7	12	11	9	5	4	4	4	5	3
OTC	11	9	7	7	10	5	8	9	6	9	11	9	4	3	2	4	4	1
MC	15	15	7	12	15	6	11	12	8	12	10	6	8	7	5	5	6	4
CTC	9	9	5	15	10	4	9	10	7	10	11	8	5	5	4	5	6	3
DC	13	10	6	9	9	5	8	8	6	13	9	7	6	5	3	4	4	2
TMP	7	6	3	7	5	2	9	10	7	10	11	9	5	4	4	3	3	4
SFX	8	6	2	7	5	3	6	8	5	8	9	8	3	3	1	4	2	2
TYL	8	10	9	10	11	4	8	9	6	12	11	7	7	6	6	5	5	5
LCM	6	8	4	5	6	3	7	8	7	9	10	8	6	5	2	5	4	3
PEG	9	11	4	8	12	3	8	9	7	10	10	6	7	7	3	6	6	4
AMX	8	9	5	8	11	4	7	8	5	7	9	4	8	8	5	7	9	5
CFT	6	7	4	7	8	3	6	5	8	10	9	7	3	3	1	4	2	2

**Tableau S6-4.** Summary of the concentrations found in the different samples analysed i.e. swine manure from 2013 experiment, soil from 2011 and 2013 experiment and drainage water from 2013 experiment.

Compounds	Swine manure 2011 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Soil 2011 ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Soil 2013 ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Drainage water 2013 ( $\text{ng L}^{-1}$ )
Trimethoprim	ND	MLQ - 3.4	3.5 - 37	ND
Lincomycine	28	<MLQ	<MLQ	MLQ - 79
Sulfadoxine	ND	<MLQ	<MLQ	<MLQ
Tetracycline	137	<MLQ	MLQ - 17	MLQ - 9.2
4-epitetraacycline*	123	<MLQ	3.4-16	<MLQ
Anhydrotetracycline*	118	34 - 152	ND	ND
4-epianhydrotetracycline*	663	17 - 1 020	ND	ND
Oxytetracycline	ND	<MLQ	<MLQ	ND
Minocycline	ND	ND	ND	ND
Demeclocycline	<MLQ	ND	<MLQ	MLQ - 21
4-epidemeclocycline*	118	ND	81 - 154	17 - 1 159
Doxycycline	53	16-46	MLQ - 35	<MLQ
Chlortetracycline	80	<MLQ	MLQ - 333	MLQ - 29
4-epichlortetracycline*	ND	29 - 145	ND	7.0 - 29
Isochlortetracycline*	443	17 - 34	ND	192 - 3 256
4-epi-isochlortetracycline*	430	17 - 66	ND	194 - 3 290

ND: No detection; \*Degradation product of tetracyclines

## **Chapitre 7. Conclusions**

---

## 7.1 Conclusions

Depuis quelques années, l'intérêt porté au devenir des contaminants émergents est devenu un sujet d'actualité grandissant et les antibiotiques vétérinaires n'y échappent pas. L'emploi de ces molécules dans le domaine vétérinaire pour leurs propriétés antibactériennes et comme facteurs de croissance a révolutionné l'élevage moderne. Cette pratique est cependant remise en question aujourd'hui.

L'utilisation systématique et répandue de ces molécules a contribué à augmenter significativement la quantité d'antibiotiques consommée dans le monde pour accroître la production de bétail et l'aquaculture et satisfaire la consommation des marchés occidentaux. L'épandage d'effluents agricoles issus de l'élevage intensif des porcs contenant de fortes concentrations d'antibiotiques ( $\text{mg L}^{-1}$ ) sur les champs de cultures représente une source et une voie d'entrée importante de ces molécules vers l'environnement. D'après les études disponibles dans la littérature (**Chapitre 1**), les antibiotiques sont présents à plusieurs niveaux de concentrations dans les compartiments proches des zones agricoles. Les eaux de surface peuvent contenir des concentrations allant de 1 à  $10^5 \text{ ng L}^{-1}$ , alors que des concentrations variant de  $10^{-1}$  à  $10^3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  ont été retrouvées dans les sols agricoles. Ces résidus pharmaceutiques ainsi que leurs métabolites et produits de dégradation demeurent bioactifs et peuvent avoir un impact sur l'écosystème, compte tenu de l'exposition chronique des organismes terrestres ou aquatiques à ces composés. Enfin, l'utilisation abondante de ces composés dans le domaine agricole est suspectée de contribuer à la résistance bactérienne pouvant causer des infections difficilement traitables chez l'homme et rappelle qu'il est important de contrôler le devenir de ces composés biologiquement actifs. De nombreuses méthodes analytiques ont été développées au cours des dernières décennies pour analyser les antibiotiques vétérinaires dans tout type de matrices. Ces méthodes manquent parfois de sélectivité et de sensibilité et ne prennent souvent pas en compte les composés issus de la dégradation des antibiotiques. Le **tableau 7-1** résume plusieurs caractéristiques des méthodes analytiques présentées dans cette thèse et les compare aux méthodes utilisées antérieurement.

**Tableau 7-1.** Récapitulatif des méthodes analytiques développées dans cette thèse comparées aux méthodes analytiques antérieures [142, 144-148, 220].

Méthodes	Classes	MLD			Avantages	Désavantages
		Lisier ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Sols ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Eaux ( $\text{ng L}^{-1}$ )		
LC-UV-Vis et LC-FLD	$\beta$ -lactamides	-	-	-	Sensible Prix abordable	Peu sélectif : Faux positifs
	Tétracyclines	70	18	110-350		
	Sulfamides	140	1,0-18	1,0-250		
	Macrolides	3000	40	110-350		
	Lincosamides	-	-	-		
	Diaminopyrimidine	-	-	-		
LC-MS	$\beta$ -lactamides	-	-	-	Sensible Prix abordable	Peu sélectif : Faux positifs
	Tétracyclines	9,0-19	3,3-6,4	70-150		
	Sulfamides	2,0-8,0	1,0-3,9	70-150		
	Macrolides	4,0-20	-	-		
	Lincosamides	-	-	-		
	Diaminopyrimidine	1,0	0,5	-		
LC-MS/MS	$\beta$ -lactamides	-	5,0	-	Sensible Sélectif (SRM) Robuste	Prix plutôt onéreux Possibilité de faux positifs malgré la double sélectivité du mode SRM
	Tétracyclines	3,9-32	0,6-1,9	1,0-25		
	Sulfamides	2,7-8,7	0,9	2,1-83		
	Macrolides	27	1,3-4,0	27-190		
	Lincosamides	-	-	-		
	Diaminopyrimidine	-	-	-		
LDTD-MS/MS (Chapitre 3)	$\beta$ -lactamides	-	-	-	Sensible Robuste Temps d'analyse ultra rapide	Prix plutôt onéreux Pas de séparation chromatographique : risque de faux positif
	Tétracyclines	-	-	-		
	Sulfamides	8,3	-	-		
	Macrolides	2,5	-	-		
	Lincosamides	3,3	-	-		
	Diaminopyrimidine	2,5	-	-		
LC-HRMS (Chapitre 4 et 5)	$\beta$ -lactamides	3,6-12	1,1-2,2	2,9-10	Sensible Très sélectif (haute résolution) Robuste Recherche d'inconnus possible	Prix onéreux
	Tétracyclines	4,1-9,4	1,0-6,6	2,0-13		
	Sulfamides	6,3	1,8	4,4		
	Macrolides	16	3,1	27		
	Lincosamides	8,6	1,2	6,1		
	Diaminopyrimidine	4,6	1,1	2,8		

Une première méthode d'analyse, utilisant la méthode d'introduction d'échantillon LDTD-APCI couplée à un spectromètre de masse en tandem a été validée pour l'analyse de quatre antibiotiques vétérinaires de classes différentes contenus dans des échantillons de lisier de porc (**Chapitre 3**). L'interface LDTD se passe de la chromatographie liquide traditionnelle et permet ainsi d'analyser un échantillon en quelques secondes. Cette méthode alternative, couplée à un traitement d'échantillon basé sur une SPE échangeuse cationique capable d'enlever une très grande partie des composés interférents de la matrice, a permis d'obtenir des MLD comprises entre 2,5 et 8,3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  qui sont comparables à celles obtenues avec des méthodes utilisant la LC (**Tableau 7-1**). L'utilisation du couplage LDTD-APCI-MS/MS comporte néanmoins plusieurs désavantages pour l'analyse de contaminants dans des matrices chargées. Cette technique doit être couplée à un traitement d'échantillons efficace pour éliminer les composés interférents qui peuvent avoir un impact important sur la désorption des analytes. Par ailleurs, cette méthode ne dispose pas de séparation chromatographique et requiert l'utilisation du mode SRM afin de réduire les cas de faux positifs. Il serait ainsi intéressant de coupler la LDTD avec un spectromètre de masse à haute résolution pour éviter les cas de faux positifs. Enfin, l'ionisation par une source APCI et la désorption des composés polaires comme les antibiotiques est parfois difficile. C'est pourquoi le nombre d'antibiotiques qui ont pu être analysés avec l'interface LDTD-APCI est limité.

Une deuxième méthode a été développée dans le but d'analyser les tétracyclines présentes dans des échantillons de lisier de porc en utilisant le couplage LC-HESI-HRMS (**Chapitre 4**). L'utilisation d'un spectromètre de masse hybride quadripôle-Orbitrap a permis d'améliorer la sélectivité et la sensibilité des analyses. Le quadripôle a permis d'isoler les analytes tout en éliminant une partie des composés interférents avant l'étape de fragmentation (PRM) pour gagner en sélectivité et en sensibilité. En comparaison, le mode d'analyse FS est plus adapté à la recherche d'un grand nombre de contaminants sur de larges plages de masse. Cette méthode a permis d'atteindre des MLD comprises entre 1,5 et 3,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  sur des échantillons de lisier lyophilisés. Les MLD atteintes sont comparables à celles obtenues dans la littérature scientifique (**Tableau 7-1**), par ailleurs, l'utilisation d'un appareil à haute résolution diminue considérablement les possibilités de faux positifs.

Par la suite, l'objectif était de rechercher et de confirmer la présence de pharmaceutiques vétérinaires suspectés d'être présent dans ces échantillons de lisier afin de mieux cibler les analyses quantitatives. Le développement d'une extraction non spécifique est alors essentiel, grâce notamment à l'utilisation d'une cartouche SPE polymérique polyvalente capable de recueillir une grande quantité de composés polaires comprenant les pharmaceutiques vétérinaires. Cette analyse non ciblée a été rendue possible par l'utilisation du mode d'acquisition DDA ainsi qu'un logiciel adéquat capable d'extraire l'information pertinente du spectre de masse et de la mettre en relation avec des bases de données afin d'identifier des candidats potentiellement d'intérêts (**Chapitre 5**). Cette méthode a permis de révéler la présence d'antibiotiques couramment utilisés dans l'élevage porcin, mais également de la médroxyprogestérone, une hormone de croissance stéroïdienne et de l'acétaminophène, un analgésique.

Ces méthodes d'analyses développées précédemment ont par la suite été adaptées et utilisées pour quantifier par LC-HESI-HRMS les antibiotiques présents dans des échantillons de sols agricoles et des eaux de drainage d'un champ expérimental ayant reçu une fertilisation par épandage de lisier (**Chapitre 6**). L'analyse semi-quantitative de ces effluents agricoles épandus sur le champ a révélé des concentrations importantes de produit de dégradation des tétracyclines de l'ordre de plusieurs centaines de microgrammes par litre. Les sols du champ renfermaient ce mélange d'antibiotiques et de leurs produits de dégradation respectifs à des concentrations pouvant atteindre  $1\ 020\ \mu\text{g kg}^{-1}$ . Une partie de ce mélange a rejoint les eaux de drainage avec des concentrations mesurées jusqu'à  $3\ 200\ \text{ng L}^{-1}$ . Ces résultats indiquent qu'il est important de prendre en compte aussi bien les composés ciblés que leurs produits de dégradation. D'autant plus que ces produits de dégradation peuvent avoir un potentiel toxique parfois supérieur à leur molécule mère.

Cette thèse présente de nouvelles stratégies analytiques dans le but d'améliorer l'analyse des antibiotiques vétérinaires et de leurs produits de dégradation respectifs dans des matrices issues de l'activité agricole intensive. Les échantillons analysés sont souvent chargés en matière organique pouvant sensiblement altérer l'analyse par une suppression du signal qui a lieu principalement au cours de l'ionisation. Ces effets de matrice sont dépendants de la composition des échantillons et peuvent entraîner des résultats non reproductibles entre deux

types de matrices similaires. L'utilisation d'un traitement d'échantillon adapté, de la technique des ajouts dosés couplée à l'utilisation d'étalons internes, d'une séparation chromatographique et d'une acquisition du spectre de masse à haute résolution permet de contrer ces problèmes d'effet matrice et de faux positifs liés à la complexité de l'échantillon. Par ailleurs, une séparation chromatographique optimale de l'extrait d'échantillon avant l'analyse peut diminuer les chances de co-élution de composés isobares responsables des cas de faux positifs. Cette étape de séparation peut être évitée pour obtenir des méthodes d'analyse plus courte notamment en utilisant l'interface LDTD. Toutefois, il est alors important d'utiliser le spectromètre de masse dans un mode d'analyse sélectif et/ou de l'associer à la haute résolution pour éviter tout risque de faux positifs. L'introduction des spectromètres de masse à haute résolution dans le domaine de l'analyse environnementale a changé les perspectives d'analyse des contaminants émergents. Elle a permis à la fois de développer des méthodes quantitatives sélectives et sensibles, tout en facilitant le développement de méthodes analytiques non ciblées destinées à faire le criblage de petites molécules dans des matrices environnementales ou biologiques. Finalement, ces techniques d'analyse qui ont été développées dans le cadre de cette thèse contribuent à l'amélioration de l'analyse quantitative et qualitative de certaines familles d'antibiotiques couramment utilisées dans le domaine vétérinaire dans le but d'améliorer le recensement de ces molécules bioactives dans l'environnement.

## 7.2 Perspectives

La croissance démographique mondiale entraîne une augmentation du besoin alimentaire. Ceci occasionnera une croissance de l'élevage des porcs et d'autres animaux d'élevage dans les années à venir et va nécessairement mener à une augmentation des résidus d'antibiotiques dans l'environnement. Toutefois, plusieurs possibilités sont envisageables pour limiter les quantités relâchées. L'utilisation de bioréacteurs dans le domaine agricole permet de traiter les effluents agricoles par l'intermédiaire de bactéries anaérobies capables de digérer et de dégrader les composés pharmaceutiques présents dans le lisier. Toutefois, l'activité de dégradation du bioréacteur est peut être limitée par une trop grande concentration



d'antibiotiques qui gênerait le travail de digestion des bactéries. Cette technique est étudiée par le centre de développement sur le bovin laitier et le porc d'Agriculture et Agroalimentaire Canada et est déjà utilisée par des fermes au Canada [288]. Par ailleurs, certaines classes d'antibiotiques comme les tétracyclines où les quinolones sont plus persistantes dans le lisier et plus difficiles à éliminer par cette technique [289]. Ces techniques de dégradation doivent non seulement prendre en compte les antibiotiques, mais aussi les produits de dégradation résultant de ces digestions qui peuvent garder une partie de leur activité biologique et être présents à de grandes concentrations (**Chapitre 6**). Le défi serait d'identifier les composés issus de la dégradation des antibiotiques et d'étudier leur toxicité vis-à-vis de l'écosystème comme l'ont fait Halling-Sørensen *et al.* [56]. En fin de compte, la solution la plus simple reste encore d'arrêter l'utilisation des antibiotiques vétérinaires comme préconisés par les pays européens et de les remplacer par des traitements alternatifs comme la vaccination [290].

D'un point de vue analytique, les méthodes développées ces dernières années pour l'analyse des antibiotiques et plus généralement des contaminants organiques ne se limitent plus à une analyse ciblée à une classe de composés et tentent maintenant de faire un dépistage non ciblé en faisant un criblage de plusieurs milliers de molécules simultanément. Le développement de ces méthodes d'analyses non ciblées est rendu possible notamment par l'utilisation de cartouches SPE disposant de sorbants plus performants capables de retenir une plus grande diversité d'analytes. La méthode QuEChERS, pour *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*, très utilisée dans le domaine alimentaire pour l'analyse d'antibiotiques présent dans le lait où la viande pourrait être adaptée aux échantillons environnementaux. Cette méthode se base sur le principe de la SPE dispersive (d-SPE) où le sorbant est directement ajouté dans l'extrait à analyser et va retenir les composés indésirables alors que les analytes vont rester en solution. Après centrifugation, l'extrait est prêt à être injecté. Cette méthode simplifiée d'extraction et de purification des échantillons pourrait être une alternative intéressante aux techniques de traitement d'échantillons usuelles [291]. Ces sorbants non sélectifs agissent comme des "pièges" à contaminants organiques et doivent être couplés à une analyse non sélective et non ciblée pour ne pas perdre l'information pertinente.

Récemment, l'arrivée des spectromètres de masse à haute résolution dans le domaine environnemental a changé les perspectives futures. Cette technologie en constante évolution

est capable balayer de larges plages de masse sur toute la durée d'un chromatogramme avec une mesure d'une grande précision sur la masse par l'intermédiaire du mode *full scan* qui peut également être couplé à des événements de fragmentation (DDA). Ce mode d'analyse permet de générer des patrons de fragmentation spécifiques des composés présents dans un échantillon. Ces informations peuvent alors être extraites du spectre de masse et être utilisées comme des empreintes spectrales caractéristiques à chaque composé et famille de composé pour confirmer leurs présences dans un échantillon. En mettant en relation ces patrons de fragmentation caractéristiques avec des bibliothèques de spectres de masse reliés à des candidats référencés, il est possible de faire le dépistage de contaminants organiques dans tout type de matrice environnementale. La disponibilité de ces outils pour mettre en relation ces informations a beaucoup évolué et des logiciels comme XCMS Online (Scripps Research Institute) ou encore enviMass (Eawag) sont maintenant disponibles en ligne gratuitement. L'accès aux bases de données a aussi évolué et des bibliothèques de composés comme PubChem ou encore Chemspider contiennent respectivement 54 et 30 millions de molécules répertoriées et constitue une aide précieuse pour la recherche de contaminants organiques. Celles-ci sont encore en développement aujourd'hui, mais s'avèrent prometteuses pour réaliser des analyses non ciblées et des dépistages environnementaux. Ce type de méthode d'analyse représente l'avenir de la chimie analytique environnementale et est capable de s'adapter rapidement à l'analyse de nouvelles molécules développées constamment dans le domaine pharmaceutique et donc à l'analyse de nouveaux contaminants émergents potentiels. Enfin, l'accès à ces spectromètres de masse à haute résolution dans le domaine environnemental va faciliter l'identification de métabolites et produits de dégradation insoupçonnés et ainsi permettre la découverte de nouvelles voies de dégradation des contaminants organiques dans l'environnement.

Finalement, l'analyse des antibiotiques vétérinaires dans des matrices biologiques ou environnementales, comme tous autres contaminants organiques d'origine anthropique, est un domaine de recherche en constante évolution afin de générer des informations toujours plus sensibles, spécifiques, précises et justes. Ces informations permettront aux autorités compétentes d'instaurer des réglementations adéquates afin de mieux contrôler le relâchement de ces substances potentiellement toxiques dans l'environnement.

## Références

---

1. Walsh, C., *Antibiotics: actions, origins, resistance*. 2003: American Society for Microbiology.
2. Kümmerer, K., *Significance of antibiotics in the environment*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003. **52**(1): p. 5-7.
3. Kümmerer, K., *Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I*. Chemosphere, 2009. **75**(4): p. 417-434.
4. Cohen, Y. and C. Jacquot, *Pharmacologie*. 2008: Elsevier.
5. Capasso, L., *5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics*. Lancet, 1998. **352**(9143): p. 1864-1864.
6. Bassett, E.J., et al., *Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD 350)*. Science, 1980. **209**(4464): p. 1532-1534.
7. Cook, M., E. Molto, and C. Anderson, *Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt*. American journal of physical anthropology, 1989. **80**(2): p. 137-143.
8. Aminov, R.I., *A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future*. Frontiers in Microbiology, 2010. **1**: p. 1-7.
9. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. British Journal of Experimental Pathology, 1929. **10**(3): p. 226.
10. Domagk, G., *Chemotherapie der bakteriellen Infektionen*. Angewandte Chemie, 1935. **48**(42): p. 657-667.
11. Schatz, A., E. Bugle, and S. Waksman, *Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria*. Experimental Biology and Medicine, 1944. **55**(1): p. 66-69.
12. Bunker, J.P., *The role of medical care in contributing to health improvements within societies*. International Journal of Epidemiology, 2001. **30**(6): p. 1260-1263.

13. Gustafson, R. and R. Bowen, *Antibiotic use in animal agriculture*. Journal of Applied Microbiology, 1997. **83**(5): p. 531-541.
14. Moore, P., et al., *Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick*. Journal of Biological Chemistry, 1946. **165**(2): p. 437-441.
15. Stokstad, E., et al., *The multiple nature of the animal protein factor*. Journal of Biological Chemistry, 1949. **180**(2): p. 647-654.
16. Foutaine, F. and F. Atkeson, *The effects of an APF concentrate containing aureomycin on the growth and well-being of young dairy calves*. Journal of Animal Science, 1950. **9**: p. 646-647.
17. Jukes, T.H., et al., *Growth-promoting effect of aureomycin on pigs*. Arch. Biochem., 1950. **26**: p. 324-325.
18. Addison, J., *Antibiotics in sediments and run-off waters from feedlots*, in *Residue reviews*. 1984, Springer. p. 1-28.
19. Sarmah, A.K., M.T. Meyer, and A.B.A. Boxall, *A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment*. Chemosphere, 2006. **65**(5): p. 725-759.
20. Alderman, D. and T. Hastings, *Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance—potential for consumer health risks*. International Journal of Food Science & Technology, 1998. **33**(2): p. 139-155.
21. Cromwell, G.L., *Why and how antibiotics are used in swine production*. Animal Biotechnology, 2002. **13**(1): p. 7-27.
22. Dewey, C.E., et al., *Use of antimicrobials in swine feeds in the United States*. Swine Health and Production, 1999. **7**(1): p. 19-25.
23. Barragry, T.B. and T.E. Powers, *Veterinary drug therapy*. 1994: Lea & Febiger.
24. Mellon, M.G., C. Benbrook, and K.L. Benbrook, *Hogging it: estimates of antimicrobial abuse in livestock*. 2001: Union of Concerned Scientists.
25. Boxall, A.B., et al., *Peer reviewed: are veterinary medicines causing environmental risks?* Environmental Science & Technology, 2003. **37**(15): p. 286A-294A.
26. Baker, J., *Rapport annuel - Des Canadiens et des collectivités en bonne santé dans un monde plus sain*, in PICRA, A.d.I.S.P.d. Canada, Editor. 2008.

27. Jensen, J., C. Daughton, and T. Jones-Lepp. *Veterinary medicines and soil quality: the Danish situation as an example*. in *American Chemical Society Symposium Series*. 2001.
28. Commission, E., *70/524/EEC of 23 November 1970 concerning additives in feeding stuffs*, in *Official Journal*, D. Council, Editor. 1970. p. 12.
29. Casewell, M., et al., *The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003. **52**(2): p. 159-161.
30. Alder, A., et al., *Determination of antibiotics in Swiss wastewater and in surface water*. *Antibiotics in the Environment*, Cranfield, UK, 2000.
31. Kay, P. and A. Boxsall, *Environmental risk assessment of veterinary medicines in slurry*. Cranfield University, 2000.
32. Kiser, J., *A perspective on the use of antibiotics in animal feeds*. *Journal of Animal Science*, 1976. **42**(4): p. 1058-1072.
33. Bloom, R., *Use of veterinary pharmaceuticals in the United States*, in *Pharmaceuticals in the Environment*. 2004, Springer. p. 149-154.
34. Russell, A.D. and I. Chopra, *Understanding antibacterial action and resistance*. Ellis Horwood, 1990.
35. Tenson, T., M. Lovmar, and M. Ehrenberg, *The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome*. *Journal of Molecular Biology*, 2003. **330**(5): p. 1005-1014.
36. Bush, K., *Beta-lactam antibiotics: Penicillins*. *Antibiotic and chemotherapy: anti-infective agents and their use in therapy*. 8th edn. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003: p. 224-258.
37. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001. **65**(2): p. 232-260.
38. Rawlings, B.J., *Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides)*. *Natural Product Reports*, 1999. **16**(4): p. 425-484.

39. Leclercq, R., *Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications*. *Clinical Infectious Diseases*, 2002. **34**(4): p. 482-492.
40. Mitscher, L.A., *Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents*. *Chemical Reviews*, 2005. **105**(2): p. 559-592.
41. Henry, R.J., *The mode of action of sulfonamides*. *Bacteriological Reviews*, 1943. **7**(4): p. 175.
42. PICRA, *Liste des limites maximales de résidus (LMR) de drogues pour usage vétérinaire dans les aliments*, S. Canada, Editor. 2015.
43. Rolinson, G., *6-APA and the development of the  $\beta$ -lactam antibiotics*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1979. **5**(1): p. 7-14.
44. Radetsky, M., *The discovery of penicillin*. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 1996. **15**(9): p. 811-818.
45. Martineau, G.-P., *Maladies d'élevage des porcs*. 1997: France Agricole Editions.
46. Bo, G., *Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2000. **6**(S3): p. 6-8.
47. Bryskier, A., *Antimicrobial agents*. American Society for Microbiology. 2005.
48. Hamscher, G., et al., *Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(7): p. 1509-1518.
49. Kolpin, D.W., et al., *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance*. *Environmental Science & Technology*, 2002. **36**(6): p. 1202-1211.
50. Erickson, B.E., *Analyzing the ignored environmental contaminants*. *Environmental Science & Technology*, 2002. **36**(7): p. 140A-145A.
51. Halling-Sørensen, B., et al., *Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review*. *Chemosphere*, 1998. **36**(2): p. 357-393.
52. Hirsch, R., et al., *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*. *Science of the Total Environment*, 1999. **225**(1): p. 109-118.

53. La Farre, M., et al., *Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(11): p. 991-1007.
54. Lützhøft, H.-C.H., B. Halling-Sørensen, and S. Jørgensen, *Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1999. **36**(1): p. 1-6.
55. Bager, A.J., J. Jensen, and P.H. Krogh, *Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna*. Chemosphere, 2000. **40**(7): p. 751-757.
56. Halling-Sørensen, B., G. Sengeløv, and J. Tjørnelund, *Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002. **42**(3): p. 263-271.
57. Chevalier, P., *L'usage des substances antimicrobiennes en production animale : position des experts et des gouvernements*. 2012, Institut National de la Santé Publique du Québec.
58. Hamscher, G., et al., *Different behavior of tetracyclines and sulfonamides in sandy soils after repeated fertilization with liquid manure*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005. **24**(4): p. 861-868.
59. Boxall, A., et al., *Veterinary medicines in the environment*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2004, Springer. p. 1-91.
60. Hamscher, G., et al., *Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: a new source of health hazard for farmers?* Environmental Health Perspectives, 2003. **111**(13): p. 1590.
61. Campagnolo, E.R., et al., *Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations*. Science of the Total Environment, 2002. **299**(1): p. 89-95.
62. Haller, M.Y., et al., *Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2002. **952**(1): p. 111-120.
63. Kuchta, S., et al., *Transport of lincomycin to surface and ground water from manure-amended cropland*. Journal of Environmental Quality, 2009. **38**(4): p. 1719-1727.

64. Kemper, N., *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*. Ecological Indicators, 2008. **8**(1): p. 1-13.
65. Kim, K.-R., et al., *Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environment*. Water, Air, & Soil Pollution, 2011. **214**(1-4): p. 163-174.
66. Thiele-Bruhn, S., *Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review*. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2003. **166**(2): p. 145-167.
67. CAS, *Scifinder*, in *American Chemical Society*. 2015.
68. Qiang, Z. and C. Adams, *Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK<sub>a</sub>) for human and veterinary antibiotics*. Water Research, 2004. **38**(12): p. 2874-2890.
69. Yalkowsky, S.H. and R.M. Dannenfelser, *Aquasol database of aqueous solubility*. College of Pharmacy, University of Arizona, Tucson, AZ, 1992.
70. Hansch, C., et al., *Exploring Qsar*. 1995: American Chemical Society Washington, DC.
71. Advanced Chemistry Development, I., *ACD/Labs*. 1994: Toronto, Ontario, Canada.
72. Tolls, J., *Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review*. Environmental Science & Technology, 2001. **35**(17): p. 3397-3406.
73. Rabølle, M. and N.H. Spliid, *Sorption and mobility of metronidazole, olaquinox, oxytetracycline and tylosin in soil*. Chemosphere, 2000. **40**(7): p. 715-722.
74. Loke, M.-L., J. Tjørnelund, and B. Halling-Sørensen, *Determination of the distribution coefficient (logK<sub>d</sub>) of oxytetracycline, tylosin A, olaquinox and metronidazole in manure*. Chemosphere, 2002. **48**(3): p. 351-361.
75. Kolz, A.C., S.K. Ong, and T. Moorman, *Sorption of tylosin onto swine manure*. Chemosphere, 2005. **60**(2): p. 284-289.
76. Boxall, A.B., et al., *The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems*. Toxicology Letters, 2002. **131**(1): p. 19-28.
77. Sukul, P. and M. Spiteller, *Sulfonamides in the environment as veterinary drugs*, in *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 2006, Springer. p. 67-101.
78. Thiele-Bruhn, S., et al., *Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particle-size fractions*. Journal of Environmental Quality, 2004. **33**(4): p. 1331-1342.



79. Thiele-Bruhn, S., *Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess Chernozem*. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2000. **163**(6): p. 589-594.
80. Halling-Sørensen, B., et al., *Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000. **46**(suppl 1): p. 53-58.
81. Nowara, A., J. Burhenne, and M. Spiteller, *Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997. **45**(4): p. 1459-1463.
82. Nham, H.T.T., et al., *Modeling the transport behavior of 16 emerging organic contaminants during soil aquifer treatment*. Science of The Total Environment, 2015. **514**: p. 450-458.
83. Jury, W., W. Spencer, and W. Farmer, *Behavior assessment model for trace organics in soil: I. Model description*. Journal of Environmental Quality, 1983. **12**(4): p. 558-564.
84. Gu, C., et al., *Complexation of the antibiotic tetracycline with humic acid*. Chemosphere, 2007. **66**(8): p. 1494-1501.
85. Pils, J.R. and D.A. Laird, *Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K and Ca saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes*. Environmental Science & Technology, 2007. **41**(6): p. 1928-1933.
86. Figueroa, R.A., A. Leonard, and A.A. MacKay, *Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays*. Environmental science & technology, 2004. **38**(2): p. 476-483.
87. Kulshrestha, P., R.F. Giese, and D.S. Aga, *Investigating the molecular interactions of oxytetracycline in clay and organic matter: Insights on factors affecting its mobility in soil*. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2004. **228**: p. U629-U629.
88. Anderson, C.R., H.S. Rupp, and W.-H. Wu, *Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2005. **1075**(1): p. 23-32.
89. Hu, X.G., Q.X. Zhou, and Y. Luo, *Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic*

- vegetable bases, northern China*. Environmental Pollution, 2010. **158**(9): p. 2992-2998.
90. Kay, P., P.A. Blackwell, and A. Boxall, *Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004. **23**(5): p. 1136-1144.
91. Kay, P., P.A. Blackwell, and A.B. Boxall, *Transport of veterinary antibiotics in overland flow following the application of slurry to arable land*. Chemosphere, 2005. **59**(7): p. 951-959.
92. Boxall, A.B., *Targeted monitoring study for veterinary medicines in the environment*. 2006: Environment Agency.
93. Krapac, I., et al. *Long-term monitoring of the occurrence of antibiotic resistance genes in groundwater near swine confinement facilities*. in *Proceedings of 4th International Conference on Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Chemicals in Water*. 2004. Minneapolis, MN.
94. Ashton, D., M. Hilton, and K. Thomas, *Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom*. Science of the Total Environment, 2004. **333**(1): p. 167-184.
95. Sacher, F., et al., *Pharmaceuticals in groundwaters: analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany*. Journal of Chromatography A, 2001. **938**(1): p. 199-210.
96. Clive, D., *Chemistry of tetracyclines*. Quaterly Reviews Chemistry Society, 1968. **22**(4): p. 435-456.
97. Zhang, H. and C.-H. Huang, *Oxidative transformation of fluoroquinolone antibacterial agents and structurally related amines by manganese oxide*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(12): p. 4474-4483.
98. Chee-Sanford, J.C., et al., *Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(4): p. 1494-1502.
99. Meyers, E. and D.A. Smith, *Microbiological degradation of tetracyclines*. Journal of Bacteriology, 1962. **84**(4): p. 797-802.

100. Kümmerer, K., A. Al-Ahmad, and V. Mersch-Sundermann, *Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test*. Chemosphere, 2000. **40**(7): p. 701-710.
101. Hasan, T., M. Allen, and B.S. Cooperman, *Anhydrotetracycline is a major product of tetracycline photolysis*. The Journal of Organic Chemistry, 1985. **50**(10): p. 1755-1757.
102. Kühne, M., et al., *Formation of anhydrotetracycline during a high-temperature treatment of animal-derived feed contaminated with tetracycline*. Food Chemistry, 2001. **75**(4): p. 423-429.
103. McCormick, J., et al., *Studies of the reversible epimerization occurring in the tetracycline family. The preparation, properties and proof of structure of some 4-epi-tetracyclines*. Journal of the American Chemical Society, 1957. **79**(11): p. 2849-2858.
104. Al-Ahmad, A., F. Daschner, and K. Kümmerer, *Biodegradability of cefotiam, ciprofloxacin, meropenem, penicillin G, and sulfamethoxazole and inhibition of waste water bacteria*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1999. **37**(2): p. 158-163.
105. Halling-Sørensen, B., *Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001. **40**(4): p. 451-460.
106. Loke, M.-L., et al., *Stability of tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography*. Chemosphere, 2000. **40**(7): p. 759-765.
107. Loftin, K.A., et al., *Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics*. Journal of environmental quality, 2008. **37**(2): p. 378-386.
108. Jiang, M., L. Wang, and R. Ji, *Biotic and abiotic degradation of four cephalosporin antibiotics in a lake surface water and sediment*. Chemosphere, 2010. **80**(11): p. 1399-1405.
109. Ingerslev, F., et al., *Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems*. Chemosphere, 2001. **44**(4): p. 865-872.
110. Kümmerer, K., *Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II*. Chemosphere, 2009. **75**(4): p. 435-441.

111. Samuelsen, O., et al., *Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions*. Aquaculture, 1994. **126**(3): p. 283-290.
112. Samuelsen, O., *Degradation of oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of oxytetracycline in the sediment from a fish farm*. Aquaculture, 1989. **83**(1): p. 7-16.
113. Paesen, J., et al., *Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1995. **13**(9): p. 1153-1159.
114. Kühne, M., et al., *Stability of tetracycline in water and liquid manure*. Journal of Veterinary Medicine Series A, 2000. **47**(6): p. 379-384.
115. Gilbertson, T.J., et al., *Environmental fate of ceftiofur sodium, a cephalosporin antibiotic. Role of animal excreta in its decomposition*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990. **38**(3): p. 890-894.
116. Winckler, C. and A. Grafe, *Use of veterinary drugs in intensive animal production*. Journal of Soils and Sediments, 2001. **1**(2): p. 66-70.
117. Gavalchin, J. and S.E. Katz, *The persistence of fecal-borne antibiotics in soil*. Journal of AOAC international, 1994. **77**(2): p. 481-485.
118. De Liguoro, M., et al., *Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil*. Chemosphere, 2003. **52**(1): p. 203-212.
119. Schlüsener, M.P. and K. Bester, *Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil*. Environmental Pollution, 2006. **143**(3): p. 565-571.
120. Witte, W., *Medical consequences of antibiotic use in agriculture*. Science, 1998. **279**(5353): p. 996-997.
121. Klevens, R.M., et al., *Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States*. Jama, 2007. **298**(15): p. 1763-1771.
122. Khachatourians, G.G., *Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria*. Canadian Medical Association Journal, 1998. **159**(9): p. 1129-1136.
123. Smith, T.L., et al., *Emergence of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus*. New England Journal of Medicine, 1999. **340**(7): p. 493-501.

124. Nwosu, V.C., *Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms*. Research in Microbiology, 2001. **152**(5): p. 421-430.
125. Berger, K., B. Petersen, and H. Buening-Pfaue, *Persistence of drugs occurring in liquid manure in the food chain*. Archiv fuer Lebensmittelhygiene (Germany, FR), 1986.
126. Sengeløv, G., et al., *Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry*. Environment international, 2003. **28**(7): p. 587-595.
127. Simeoni, D., et al., *Antibiotic resistance genes and identification of staphylococci collected from the production chain of swine meat commodities*. Food microbiology, 2008. **25**(1): p. 196-201.
128. Sack, K., *Infection killed 19,000 in 2005*, in *The New York Times*. 2007.
129. Sebaugh, J., *Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation*. Pharmaceutical Statistics, 2011. **10**(2): p. 128-134.
130. Westergaard, K., et al., *Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community*. Soil Biology and Biochemistry, 2001. **33**(15): p. 2061-2071.
131. Batchelder, A., *Chlortetracycline and oxytetracycline effects on plant growth and development in liquid cultures*. Journal of Environmental Quality, 1981. **10**(4): p. 515-518.
132. Boxall, A.B., et al., *Uptake of veterinary medicines from soils into plants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006. **54**(6): p. 2288-2297.
133. Migliore, L., et al., *Effect on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (Panicum miliaceum, Pisum sativum and Zea mays)*. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1995. **52**(2): p. 103-110.
134. Boxall, A.B., et al., *Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment*. Toxicology Letters, 2003. **142**(3): p. 207-218.
135. Wollenberger, L., B. Halling-Sørensen, and K.O. Kusk, *Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to Daphnia magna*. Chemosphere, 2000. **40**(7): p. 723-730.
136. Søbørg, T., F. Ingerslev, and B. Halling-Sørensen, *Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water*. Chemosphere, 2004. **57**(10): p. 1515-1524.

137. García-Galán, M.J., M.S. Díaz-Cruz, and D. Barceló, *Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(11): p. 1008-1022.
138. Colinas, C., E. Ingham, and R. Molina, *Population responses of target and non-target forest soil organisms to selected biocides*. Soil Biology and Biochemistry, 1994. **26**(1): p. 41-47.
139. Halling-Sørensen, B., et al., *Reduced antimicrobial potencies of oxytetracycline, tylosin, sulfadiazin, streptomycin, ciprofloxacin, and olaquinox due to environmental processes*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003. **44**(1): p. 0007-0016.
140. Migliore, L., et al., *Effect of sulphadimethoxine contamination on barley (*Hordeum distichum* L., Poaceae, Liliopsida)*. Agriculture, Ecosystems & Environment, 1996. **60**(2): p. 121-128.
141. Stolker, A. and U.T. Brinkman, *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review*. Journal of Chromatography A, 2005. **1067**(1): p. 15-53.
142. Lindsey, M.E., M. Meyer, and E. Thurman, *Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2001. **73**(19): p. 4640-4646.
143. Tong, L., et al., *Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS*. Chemosphere, 2009. **74**(8): p. 1090-1097.
144. Jacobsen, A.M. and B. Halling-Sørensen, *Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006. **384**(5): p. 1164-1174.
145. Blackwell, P.A., et al., *Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection*. Talanta, 2004. **64**(4): p. 1058-1064.

146. Martínez-Carballo, E., et al., *Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria*. Environmental Pollution, 2007. **148**(2): p. 570-579.
147. Jacobsen, A.M., et al., *Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2004. **1038**(1): p. 157-170.
148. Raich-Montiu, J., et al., *Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence*. Journal of Chromatography A, 2007. **1172**(2): p. 186-193.
149. Dean, J.R. and G. Xiong, *Extraction of organic pollutants from environmental matrices: selection of extraction technique*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2000. **19**(9): p. 553-564.
150. Cross, R.F., J.L. Ezzell, and B.E. Richter, *The supercritical fluid extraction of polar drugs (sulphonamides) from inert matrices and meat animal products*. Journal of Chromatographic Science, 1993. **31**(5): p. 162-169.
151. O'Connor, S. and D.S. Aga, *Analysis of tetracycline antibiotics in soil: Advances in extraction, clean-up, and quantification*. TrAC-Trends in Analytical Chemistry, 2007. **26**(6): p. 456-465.
152. Prat, M., et al., *Determination of flumequine and oxolinic acid in sediments and soils by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-fluorescence*. Analytica Chimica Acta, 2006. **567**(2): p. 229-235.
153. Giergielewicz-Możajska, H., Ł. Dąbrowski, and J. Namieśnik, *Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples—some aspects of theory and practice*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2001. **31**(3): p. 149-165.
154. Schlüsener, M.P., M. Spiteller, and K. Bester, *Determination of antibiotics from soil by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2003. **1003**(1): p. 21-28.
155. Ensminger, D. and F.B. Stulen, *Ultrasonics: data, equations and their practical uses*. 2014: CRC Press.

156. García-Galán, M.J., M.S. Díaz-Cruz, and D. Barceló, *Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography–tandem mass spectrometry (SPE-LC–MS/MS)*. *Talanta*, 2010. **81**(1): p. 355-366.
157. Bayen, S., et al., *Analysis of selected antibiotics in surface freshwater and seawater using direct injection in liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1338**: p. 38-43.
158. Skoog, D.A., F.J. Holler, and T.A. Nieman, *Principes d'analyse instrumentale*. 2003: De Boeck Supérieur.
159. Rouessac, F. and A. Rouessac, *Analyse chimique: méthodes et techniques instrumentales modernes*. 1997: Masson.
160. Picard, P., P. Tremblay, and E.R. Paquin, *Laser diode thermal desorption ionization source (LDTD): fundamental aspects*, in *56th ASMS Conference on Mass Spectrometry*. 2008.
161. Fayad, P.B., M.I. Prévost, and S. Sauvé, *Laser diode thermal desorption/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry analysis of selected steroid hormones in wastewater: method optimization and application*. *Analytical chemistry*, 2009. **82**(2): p. 639-645.
162. Wu, J., et al., *High-throughput cytochrome P450 inhibition assays using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(12): p. 4657-4665.
163. Daves Jr, G.D., *Mass spectrometry of involatile and thermally unstable molecules*. *Accounts of Chemical Research*, 1979. **12**(10): p. 359-365.
164. Viglino, L., M. Prévost, and S. Sauvé, *High throughput analysis of solid-bound endocrine disruptors by LDTD-APCI-MS/MS*. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011. **13**(3): p. 583-590.
165. Boisvert, M., P.B. Fayad, and S. Sauvé, *Development of a new multi-residue laser diode thermal desorption atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry method for the detection and quantification of pesticides and pharmaceuticals in wastewater samples*. *Analytica chimica acta*, 2012. **754**: p. 75-82.



166. Segura, P.A., et al., *High-throughput quantitation of seven sulfonamide residues in dairy milk using laser diode thermal desorption-negative mode atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010. **58**(3): p. 1442-1446.
167. Gross, J.H., *Mass spectrometry: a textbook*. 2004: Springer Science & Business Media.
168. De Hoffmann, E., J. Charette, and V. Stroobant, *Spectrométrie de masse*. 1994.
169. Badjagbo, K., et al., *Direct atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry for the continuous real-time trace analysis of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in ambient air*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(5): p. 829-836.
170. Horning, E., et al., *New picogram detection system based on a mass spectrometer with an external ionization source at atmospheric pressure*. Analytical Chemistry, 1973. **45**(6): p. 936-943.
171. Horning, E., et al., *Atmospheric pressure ionization mass spectrometry: Studies of negative ion formation for detection and quantification purposes*. Journal of Chromatography A, 1977. **142**: p. 481-495.
172. Sangster, T., et al., *Unexpected observation of ion suppression in a liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric bioanalytical method*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2004. **18**(12): p. 1361-1364.
173. Díaz-Cruz, M.S., M.J.L. de Alda, and D. Barcelo, *Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(6): p. 340-351.
174. Ye, Z., H.S. Weinberg, and M.T. Meyer, *Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(3): p. 1135-1144.
175. Bogialli, S. and A. Di Corcia, *Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **395**(4): p. 947-966.
176. Commission, E.U., *Decision 657/2002/EC*. 2002.

177. Hirsch, R., et al., *Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1998. **815**(2): p. 213-223.
178. Kaufmann, A., et al., *Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry): "Where is the crossover point?"*. Analytica Chimica Acta, 2010. **673**(1): p. 60-72.
179. Schürmann, A., et al., *False-positive liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmation of sebuthylazine residues using the identification points system according to EU directive 2002/657/EC due to a biogenic insecticide in tarragon*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(8): p. 1196-1200.
180. Xian, F., C.L. Hendrickson, and A.G. Marshall, *High resolution mass spectrometry*. Analytical chemistry, 2012. **84**(2): p. 708-719.
181. Michalski, A., et al., *Ultra high resolution linear ion trap Orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Elite) facilitates top down LC MS/MS and versatile peptide fragmentation modes*. Molecular & Cellular Proteomics, 2012. **11**(3): p. 1-11.
182. Makarov, A., E. Denisov, and O. Lange, *Performance evaluation of a high-field Orbitrap mass analyzer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(8): p. 1391-1396.
183. Hu, Q., et al., *The Orbitrap: a new mass spectrometer*. Journal of Mass Spectrometry, 2005. **40**(4): p. 430-443.
184. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Analytical chemistry, 2000. **72**(6): p. 1156-1162.
185. Hurtaud-Pessel, D., T. Jagadeshwar-Reddy, and E. Verdon, *Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument*. Food Additives & Contaminants: Part A, 2011. **28**(10): p. 1340-1351.
186. Michalski, A., et al., *Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer*. Molecular & Cellular Proteomics, 2011. **10**(9): p. M111. 011015.

187. Scientific, T.F., *Improved sensitivity through enhanced ion transmission using an S-Lens on the LTQ Velos linear ion trap*. Thermo Scientific: Product Support Bulletin 128, 2009. **PBS 128**.
188. Gallien, S., et al., *Technical considerations for large-scale parallel reaction monitoring analysis*. Journal of proteomics, 2014. **100**: p. 147-159.
189. Fedorova, G., et al., *Comparison of the quantitative performance of a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer with that of a triple quadrupole tandem mass spectrometer for the analysis of illicit drugs in wastewater*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2013. **27**(15): p. 1751-1762.
190. Wang, J., et al., *Ultrahigh-performance liquid chromatography electrospray ionization Q-Orbitrap mass spectrometry for the analysis of 451 pesticide residues in fruits and vegetables: method development and validation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(42): p. 10375-10391.
191. Weiss, J.M., et al., *Identification strategy for unknown pollutants using high-resolution mass spectrometry: Androgen-disrupting compounds identified through effect-directed analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011. **400**(9): p. 3141-3149.
192. Mathew, A.G., R. Cissell, and S. Liamthong, *Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: A United States perspective of livestock production*. Foodborne Pathogens and Disease, 2007. **4**(2): p. 115-133.
193. Masse, D.I. and R.L. Droste, *Comprehensive model of anaerobic digestion of swine manure slurry in a sequencing batch reactor*. Water Research, 2000. **34**(12): p. 3087-3106.
194. Cai, Z.X., et al., *Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1200**(2): p. 144-155.
195. Dousa, M., et al., *HPLC determination of lincomycin in premixes and feedstuffs with solid-phase extraction on HLB OASIS and LC-MS/MS confirmation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **40**(4): p. 981-986.
196. Boscher, A., et al., *Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(41): p. 6394-6404.

197. Chen, Y.S., et al., *Occurrence and assessment of veterinary antibiotics in swine manures: A case study in East China*. Chinese Science Bulletin, 2012. **57**(6): p. 606-614.
198. Karci, A. and I.A. Balcioğlu, *Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey*. Science of the Total Environment, 2009. **407**(16): p. 4652-4664.
199. Beattie, I., et al., *Evaluation of laser diode thermal desorption (LDTD) coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) for support of in vitro drug discovery assays: Increasing scope, robustness and throughput of the LDTD technique for use with chemically diverse compound libraries*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2012. **59**: p. 18-28.
200. Lemoine, P., et al., *Ultra-fast analysis of anatoxin-A using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry: Validation and resolution from phenylalanine*. Toxicon, 2013. **61**: p. 165-174.
201. Bergh, J.J., J.C. Breytenbach, and P.L. Wessels, *Degradation of Trimethoprim*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1989. **78**(4): p. 348-350.
202. Kerr, B.J., et al., *Manure composition of swine as affected by dietary protein and cellulose concentrations*. Journal of Animal Science, 2006. **84**(6): p. 1584-1592.
203. Teeter, J.S. and R.D. Meyerhoff, *Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta*. Environmental Research, 2003. **93**(1): p. 45-51.
204. Kolz, A.C., et al., *Degradation and metabolite production of tylosin in anaerobic and aerobic swine-manure lagoons*. Water Environment Research, 2005. **77**(1): p. 49-56.
205. Saim, N., et al., *Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil using Soxhlet extraction, pressurised and atmospheric microwave-assisted extraction, supercritical fluid extraction and accelerated solvent extraction*. Journal of Chromatography A, 1997. **791**(1-2): p. 361-366.
206. Geiser, L., et al., *Determination of pK(a) values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(17): p. 2374-2380.

207. Cherlet, M., et al., *Quantitation of tylosin in swine tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2002. **473**(1-2): p. 167-175.
208. Schwarz, S. and E. Chaslus-Dancla, *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*. *Veterinary Research*, 2001. **32**(3-4): p. 201-225.
209. Brenton, A.G. and A.R. Godfrey, *Accurate mass measurement: terminology and treatment of data*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010. **21**(11): p. 1821-1835.
210. Wang, J., et al., *Application of ultrahigh-performance liquid chromatography and electrospray ionization quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry for determination of 166 pesticides in fruits and vegetables*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. **60**(49): p. 12088-12104.
211. Bateman, K.P., et al., *Quantitative-qualitative data acquisition using a benchtop Orbitrap mass spectrometer*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2009. **20**(8): p. 1441-1450.
212. Kumar, P., et al., *Targeted analysis with benchtop quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometer: Application to determination of synthetic hormones in animal urine*. *Analytica Chimica Acta*, 2013. **780**: p. 65-73.
213. Jia, A., et al., *Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2009. **1216**(22): p. 4655-4662.
214. Yang, S.W., J.M. Cha, and K. Carlson, *Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electro spray ionization tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2005. **1097**(1-2): p. 40-53.
215. Yang, S.W., J.M. Cha, and K. Carlson, *Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004. **18**(18): p. 2131-2145.
216. Ramanathan, R., et al., *It is time for a paradigm shift in drug discovery bioanalysis: from SRM to HRMS*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2011. **46**(6): p. 595-601.

217. van der Heeft, E., et al., *Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and Orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(3): p. 451-463.
218. Jiwan, J.L.H., P. Wallemacq, and M.F. Herent, *HPLC-high resolution mass spectrometry in clinical laboratory?* Clinical Biochemistry, 2011. **44**(1): p. 136-147.
219. McAlister, G.C., et al., *A proteomics grade electron transfer dissociation-enabled hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer*. Journal of Proteome Research, 2008. **7**(8): p. 3127-3136.
220. Blackwell, P.A., et al., *Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection*. Journal of Chromatography A, 2004. **1045**(1-2): p. 111-117.
221. Liang, Y.L., M.B. Denton, and R.B. Bates, *Stability studies of tetracycline in methanol solution*. Journal of Chromatography A, 1998. **827**(1): p. 45-55.
222. Lee, K.A., et al., *24-hour lock mass protection*. Journal of Proteome Research, 2011. **10**(2): p. 880-885.
223. Olsen, J.V., et al., *Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap*. Molecular & Cellular Proteomics, 2005. **4**(12): p. 2010-2021.
224. Pena, A., et al., *Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline and tetracycline residues in honey by HPLC with fluorescence detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(10): p. 3784-3788.
225. Bakhtiarian, A., R. Khosrokhavar, and M.J. Hosseini, *Validation of an analytical methodology for determination of oxytetracycline residue in milk by HPLC with UV detection*. Annals of Nutrition and Metabolism, 2009. **55**: p. 162-162.
226. Jezowskaboiczuk, M., et al., *Metal ion-tetracycline interactions in biological-fluids*. Inorganic Chemistry, 1993. **32**(4): p. 428-437.
227. Aga, D.S., et al., *Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and*

- liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. **53**(18): p. 7165-7171.
228. Oka, H., et al., *Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods*. Journal of Chromatography A, 1998. **812**(1-2): p. 309-319.
229. Kellmann, M., et al., *Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: how much resolving power is required?* Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2009. **20**(8): p. 1464-1476.
230. Caban, M., et al., *Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of beta-blockers and beta-agonists in environmental samples*. Journal of Chromatography A, 2012. **1258**: p. 117-127.
231. Antignac, J.P., et al., *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue*. Analytica Chimica Acta, 2005. **529**(1-2): p. 129-136.
232. Courtheyn, D., et al., *Recent developments in the use and abuse of growth promoters*. Analytica Chimica Acta, 2002. **473**(1): p. 71-82.
233. Yang, Y., et al., *Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(5): p. 489-496.
234. Kaufmann, A., et al., *Quantitative and confirmative performance of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry compared to tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(7): p. 979-992.
235. Sauvé, S. and M. Desrosiers, *A review of what is an emerging contaminant*. Chemistry Central Journal, 2014. **8**: p. 1-7.
236. Sollicec, M., A. Roy-Lachapelle, and S. Sauvé, *Quantitative performance of liquid chromatography coupled to Q-Exactive high resolution mass spectrometry (HRMS) for the analysis of tetracyclines in a complex matrix*. Analytica Chimica Acta, 2015. **853**: p. 415-424.
237. Kaufmann, A., et al., *Reliability of veterinary drug residue confirmation: High resolution mass spectrometry versus tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2015. **856**: p. 54-67.

238. Kaufmann, A., et al., *Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-microm particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1194**(1): p. 66-79.
239. Petrovic, M., M. Gros, and D. Barcelo, *Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2006. **1124**(1-2): p. 68-81.
240. Gómez, M., et al., *A new gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous analysis of target and non-target organic contaminants in waters*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(18): p. 4071-4082.
241. Cotton, J., et al., *High-resolution mass spectrometry associated with data mining tools for the detection of pollutants and chemical characterization of honey samples*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. **62**(46): p. 11335-11345.
242. Draper, J., et al., *Metabolite signal identification in accurate mass metabolomics data with MZedDB, an interactive m/z annotation tool utilising predicted ionisation behaviour'rules'*. BMC bioinformatics, 2009. **10**(1): p. 227.
243. Kind, T. and O. Fiehn, *Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry*. BMC Bioinformatics, 2007. **8**(1): p. 105.
244. Varanda, F., et al., *Solubility of antibiotics in different solvents. Part I: Hydrochloride forms of tetracycline, moxifloxacin, and ciprofloxacin*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2006. **45**(18): p. 6368-6374.
245. Caço, A.I., et al., *Solubility of antibiotics in different solvents. Part II: Non-hydrochloride forms of tetracycline and ciprofloxacin*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2008. **47**(21): p. 8083-8089.
246. Smith, C.A., et al., *XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(3): p. 779-787.
247. Hollender, J., et al., *Exploring the behaviour of emerging contaminants in the water cycle using the capabilities of high resolution mass spectrometry*. CHIMIA International Journal for Chemistry, 2014. **68**(11): p. 793-798.



248. Chiaia-Hernandez, A.C., et al., *Suspect and nontarget screening approaches to identify organic contaminant records in lake sediments*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(28): p. 7323-7335.
249. Katajamaa, M., J. Miettinen, and M. Orešič, *MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data*. Bioinformatics, 2006. **22**(5): p. 634-636.
250. Kamleh, A., et al., *Metabolomic profiling using Orbitrap Fourier transform mass spectrometry with hydrophilic interaction chromatography: a method with wide applicability to analysis of biomolecules*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(12): p. 1912-1918.
251. Lohne, J.J., et al., *Application of single stage Orbitrap mass spectrometry and differential analysis software to non-targeted analysis of contaminants in dog food: Detection, identification, and quantification of glycoalkaloids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015.
252. Schymanski, E.L., et al., *Strategies to characterize polar organic contamination in wastewater: exploring the capability of high resolution mass spectrometry*. Environmental Science & Technology, 2014. **48**(3): p. 1811-1818.
253. André, F., et al., *Trends in the identification of organic residues and contaminants: EC regulations under revision*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2001. **20**(8): p. 435-445.
254. McIlvaine, T., *A buffer solution for colorimetric comparison*. Journal of Biological Chemistry, 1921. **49**(1): p. 183-186.
255. Sadygov, R.G., F. Martin Maroto, and A.F. Hühmer, *ChromAlign: a two-step algorithmic procedure for time alignment of three-dimensional LC-MS chromatographic surfaces*. Analytical Chemistry, 2006. **78**(24): p. 8207-8217.
256. Tahboub, Y.R., M.F. Zaater, and Z.A. Al-Talla, *Determination of the limits of identification and quantitation of selected organochlorine and organophosphorous pesticide residues in surface water by full-scan gas chromatography/mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2005. **1098**(1): p. 150-155.

257. Kaufmann, A., et al., *Semi-targeted residue screening in complex matrices with liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: current possibilities and limitations*. *Analyst*, 2011. **136**(9): p. 1898-1909.
258. Pence, H.E. and A. Williams, *ChemSpider: an online chemical information resource*. *Journal of Chemical Education*, 2010. **87**(11): p. 1123-1124.
259. Bolton, E.E., et al., *PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities*. *Annual Reports in Computational Chemistry*, 2008. **4**: p. 217-241.
260. Kaufmann, A. and S. Walker, *Evaluation of the interrelationship between mass resolving power and mass error tolerances for targeted bioanalysis using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2013. **27**(2): p. 347-356.
261. Krauss, M., H. Singer, and J. Hollender, *LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010. **397**(3): p. 943-951.
262. Liu, S., et al., *Steroids in a typical swine farm and their release into the environment*. *Water Research*, 2012. **46**(12): p. 3754-3768.
263. Del Castillo, J., et al., *Interindividual variability in plasma concentrations after systemic exposure of swine to dietary doxycycline supplied with and without paracetamol: a population pharmacokinetic approach*. *Journal of Animal Science*, 2006. **84**(11): p. 3155-3166.
264. Kennedy, D., et al., *Iso-and epi-iso-chlortetracycline are the principal metabolites of chlortetracycline in the hen's egg*. *Journal of Chromatography A*, 1998. **812**(1): p. 327-337.
265. Balizs, G. and A. Hewitt, *Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. **492**(1): p. 105-131.
266. Vartanian, V.H., B. Goolsby, and J.S. Brodbelt, *Identification of tetracycline antibiotics by electrospray ionization in a quadrupole ion trap*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1998. **9**(10): p. 1089-1098.
267. AFSSA-ANMV, *Index des médicaments vétérinaires autorisés en France*, in *Journal officiel de la République Française*. 2009. p. 77.

268. Fenner, K., et al., *Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities*. Science, 2013. **341**(6147): p. 752-758.
269. Zeng, T., Y.-P. Chin, and W.A. Arnold, *Potential for abiotic reduction of pesticides in prairie pothole porewaters*. Environmental Science & Technology, 2012. **46**(6): p. 3177-3187.
270. Mohatt, J.L., et al., *Microbially mediated abiotic transformation of the antimicrobial agent sulfamethoxazole under iron-reducing soil conditions*. Environmental Science & Technology, 2011. **45**(11): p. 4793-4801.
271. Chen, W.-R. and C.-H. Huang, *Adsorption and transformation of tetracycline antibiotics with aluminum oxide*. Chemosphere, 2010. **79**(8): p. 779-785.
272. Dams, R., et al., *Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2003. **14**(11): p. 1290-1294.
273. Kim, S.C. and K. Carlson, *Quantification of human and veterinary antibiotics in water and sediment using SPE/LC/MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **387**(4): p. 1301-1315.
274. Mamani, M.C.V., F.G.R. Reyes, and S. Rath, *Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD*. Food Chemistry, 2009. **117**(3): p. 545-552.
275. Negreira, N., et al., *Degradation of the anticancer drug erlotinib during water chlorination: Non-targeted approach for the identification of transformation products*. Water Research, 2015. **85**: p. 103-113.
276. Little, J.L., C.D. Cleven, and S.D. Brown, *Identification of "known unknowns" utilizing accurate mass data and chemical abstracts service databases*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011. **22**(2): p. 348-359.
277. Chen, W.-R. and C.-H. Huang, *Transformation kinetics and pathways of tetracycline antibiotics with manganese oxide*. Environmental Pollution, 2011. **159**(5): p. 1092-1100.
278. Berendsen, B.J., et al., *The assessment of selectivity in different quadrupole-Orbitrap mass spectrometry acquisition modes*. Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 2015. **26**(2): p. 337-346.

279. Wessels, J., et al., *The complexation of tetracycline and anhydrotetracycline with Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>: a spectroscopic study*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(46): p. 9323-9331.
280. Commission, E., *2002/657/EC of 12 August 2002 concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*, in *Official Journal*. 2002.
281. Englert, B., *Method 1694: pharmaceuticals and personal care products in water, soil, sediment, and biosolids by HPLC/MS/MS*. US Environmental Protection Agency (EPA), 2007: p. 1-72.
282. Cherlet, M., P. De Backer, and S. Croubels, *Control of the keto-enol tautomerism of chlortetracycline for its straightforward quantitation in pig tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2006. **1133**(1-2): p. 135-141.
283. Nagele, E. and R. Moritz, *Structure elucidation of degradation products of the antibiotic amoxicillin with ion trap MSn and accurate mass determination by ESI TOF*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(10): p. 1670-1676.
284. Du, F., et al., *Qualitative–(semi) quantitative data acquisition of artemisinin and its metabolites in rat plasma using an LTQ/Orbitrap mass spectrometer*. Journal of Mass Spectrometry, 2012. **47**(2): p. 246-252.
285. Sassman, S.A. and L.S. Lee, *Sorption of three tetracyclines by several soils: Assessing the role of pH and cation exchange*. Environmental Science & Technology, 2005. **39**(19): p. 7452-7459.
286. Pfizer, *Environmental assessment doramectin 1 % injectable solution for the treatment of parasitic infections in cattle*. 1996: on USFDA website.
287. Côté, D., T.S. Tran, and A. N'Dayegamiye, *Efficacité fertilisante du lisier de porc épandu en post-levée du maïs*. 1996, Agrosol.
288. Côté, C., D.I. Massé, and S. Quessy, *Reduction of indicator and pathogenic microorganisms by psychrophilic anaerobic digestion in swine slurries*. Bioresource Technology, 2006. **97**(4): p. 686-691.
289. Massé, D.I., N.M.C. Saady, and Y. Gilbert, *Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: an overview*. Animals, 2014. **4**(2): p. 146-163.

290. Allen, H.K., et al., *Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals*. Trends in Microbiology, 2013. **21**(3): p. 114-119.
291. Wilkowska, A. and M. Biziuk, *Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology*. Food Chemistry, 2011. **125**(3): p. 803-812.