

Comparaison de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et à la spectrométrie de masse en tandem pour la détermination des nitrofuranes dans les miels

Laure Tribalat-Wiest, Olivier Paisse, Marie Florence Grenier-Loustalot
Service Central d'Analyse, CNRS-USR 059, BP 22, 69360 Solaize, France
e-mail : l.wiest@sca.cnrs.fr

Résumé Dans le cadre de la mise au point d'analyses de contaminants dans les miels, nous avons comparé les données obtenues par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse et par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Pour ce faire, nous avons mis au point (i) une extraction phase solide (SPE) des métabolites des nitrofuranes et des nitrofuranes natifs, (ii) une dérivation et (iii) enfin un clean-up. Les données obtenues montrent que les limites de détection varient entre 0,2 et 0,6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour les métabolites et entre 1 et 2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pour les nitrofuranes natifs. L'application de cette méthode à des miels de fleurs différentes montre que les nitrofuranes sont des antibiotiques toujours présents dans cette matrice.

Mots Clés Nitrofurane · Miel · Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

Introduction

Les nitrofuranes sont des antibiotiques particulièrement utilisés chez les animaux. Quatre de ces nitrofuranes sont suspectés d'être cancérigènes et mutagènes et sont, par conséquent, interdits dans un grand nombre de pays: la furaltadone (Ft), la furazolidone (Fz), la nitrofurazone (Nz) et la nitrofurantoin (Nt). L'utilisation excessive d'antibiotiques a rendu les bactéries plus résistantes et a restreint le nombre d'antibiotiques efficaces ; aussi l'activité apicole a dû avoir recours à ces nitrofuranes ; aussi il est primordial de savoir les quantifier dans les miels.

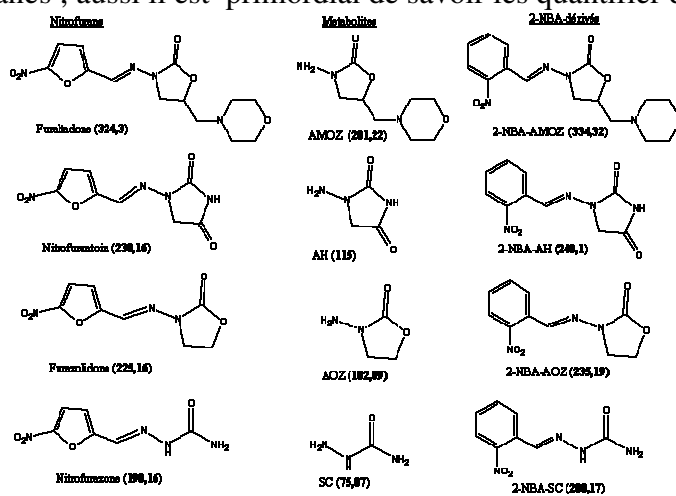


Figure 1 : Structures chimiques et masses molaires des nitrofuranes natifs, des métabolites et des métabolites dérivés

L'analyse des nitrofuranes est complexe: en effet, des études montrent que, chez les animaux, la furaltadone (Ft), la furazolidone (Fz), la nitrofurazone (Nz) et la nitrofurantoin (Nt) sont rapidement métabolisés en 3-amino-5-morpholinométhyl-1,3-oxazolidin (AMOZ), 3-amino-oxazolidinone (AOZ), semicarbazide (SC) et 1-aminohydantoin (AH) (Fig.1) respectivement (Horne E. et al.1996). Pour chromatographier ces métabolites de masses molaires faibles, il faut les dériver avec le 2-nitrobenzaldéhyde (NBA) (Fig. 1). Des méthodes d'analyse ont alors été développées pour quantifier les métabolites dérivés (respectivement notés N-AMOZ, N-AOZ, N-SC, N-AH) dans les matrices animales par LC-MS (Hormazábal V. et Asp T. N., 2004) et par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS-MS) (Cooper K.M., Glenn Kennedy D., 2005).

Peu de publications traitent de l'analyse des nitrofuranes dans les miels (Khong S.P. et al., 2004, Jenkins K.M. et Young M.S., 2005). D'autre part, les publications précédentes ne tiennent pas compte de la présence éventuelle de nitrofuranes natifs dans les miels. Or, aucune étude n'a été réalisée sur l'évolution des nitrofuranes chez l'abeille ou dans le miel. La méthode d'extraction mise au point et validée dans cette étude, permet de quantifier à la fois les nitrofuranes natifs et leurs métabolites en une analyse. Deux méthodes d'analyse, la LC-MS et la LC-MS-MS, ont été utilisées pour identifier et quantifier les différents composés en présence, et nous avons comparé les résultats obtenus par les deux techniques.

Matériels et méthodes

Réactifs et solvants Les nitrofuranes natifs, les métabolites et le dérivant NBA ont une pureté supérieure à 99%. Les solvants sont de qualité « HPLC gradient grade ». L'eau est purifiée par un système Milli-Q water (Millipore, France). Tous les autres réactifs sont de qualité « analytical grade ».

Appareillage

LC-MS

Le système utilisé est l'appareillage Agilent HP 1100 Series LC/MSD. La colonne est une Inerstil ODS3 3 μ m (150*2)mm (Interchim, France) et sa température est fixée à 50°C. Le débit est de 0,3 mL/min et 100 μ L d'échantillon est injecté dans la colonne. La phase mobile est composée d'une phase aqueuse A {eau ultra pure à 20 mmol/L de formiate d'ammonium+acide formique (pH 3,40)} et d'un solvant B {méthanol}. Un solvant méthanol+acide formique 1% est ajouté en post-colonne à un débit de 0,2 mL/min. L'ionisation se fait par électrospray et les composés sont détectés en mode positif (Selective Ion Monitoring (SIM))

LC-MS-MS

Le système HPLC Alliance 2695 (Waters) couplé à un spectromètre de masse Micromass QuattroMicro (Waters), équipé d'une source électrospray, a été utilisé pour cette étude. La colonne, la température de colonne, le débit et la phase aqueuse sont identiques à celles utilisées en LC-MS. Le volume injecté est de 50 μ L. Le solvant B est l'acétonitrile. La détection en spectrométrie de masse est réalisée en mode positif à l'aide du mode Multiple Reaction Monitoring (MRM). Les ions parents et ions fils sélectionnés pour l'identification et la quantification sont regroupés dans le Tableau 1, ainsi que les tensions de cône et de collision optimales pour chacun.

Méthode

Extraction/dérivation

2 g de miel sont prélevés et dilués dans 5 mL d'une solution à 0.1 mol L⁻¹ d'acide chlorhydrique. Le mélange est homogénéisé pendant 1 min au vortex, 10 min aux ultrasons puis extrait par SPE (cartouche oasis HLB 3cc, 60 mg). Cette extraction nous donne deux fractions : une fraction de rinçage (H₂O) dans laquelle se trouvent les métabolites des nitrofuranes, car ils ne sont pas retenus sur la cartouche puis une fraction d'élution (dichlorométhane) dans laquelle se trouvent les nitrofuranes natifs. Les deux fractions sont rassemblées et le mélange est alors traité par une solution à 50 mmol L⁻¹ de 2-nitrobenzaldéhyde dans du DMSO (300 μ L) à 60°C, à l'abri de la lumière, pendant 17h.

Clean-up

Avant extraction, le mélange est refroidi et mis à pH entre 6 et 7 par ajout de 4 à 5 mL d'une solution tampon NH₄⁺/NH₃ {22g de formiate d'ammonium et 4 mL d'ammoniac à 20% dans 200 mL d'H₂O}. La cartouche (cartouche oasis HLB 3cc, 60 mg) est conditionnée avec 1 mL de méthanol et 1 mL d'H₂O. L'échantillon est passé sur la cartouche qui est ensuite rincée avec 3 mL d'H₂O et 2 mL d'une solution méthanol/H₂O 30/70 en volume. La cartouche est ensuite séchée sous un flux d'azote jusqu'à ce que sa couleur soit blanche et éluée avec 3 mL d'acétonitrile. L'éluat est évaporé et reconstitué dans 1 mL d'H₂O.

Résultats et discussion

Transformation des natifs en métabolites

Des solutions de métabolites et des solutions de natifs de concentrations, en moles, identiques aux solutions de métabolites ont été traitées selon la méthode décrite ci-dessus. Dans ces conditions, les natifs se métabolisent, puis les métabolites formés sont dérivés. Les rendements de réaction en partant des natifs et des métabolites ont été comparés : ils sont identiques pour Nz et SC, Nt et AH et, Ft et AMOZ. Le rendement de Fz est deux fois moins bon par rapport à celui de AOZ mais reste quand même correct. Cette méthode permet donc bien de quantifier à la fois les nitrofuranes natifs et leurs métabolites.

LC-MS vs LC-MS-MS

Nous avons porté sur la Fig. 2 les chromatogrammes d'un miel toutes fleurs dopé à $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en métabolites, obtenus avec les deux techniques, LC-MS et LC-MS-MS. On remarque les gains importants en sélectivité et en sensibilité apportés par la technique LC-MS-MS.

Nous avons alors développé l'analyse par LC-MS-MS. Les performances obtenues nous ont permis de valider la méthode sur un miel toutes fleurs de France. Ont été déterminés la sélectivité, la répétabilité, la linéarité et les limites de détection et de quantification pour les métabolites et les nitrofuranes natifs. Dans ce manuscrit, seulement la validation des trois derniers paramètres sera détaillée.

Tableau 1 : Conditions de spectrométrie de masse en tandem et paramètres de validation (concentrations en $\mu\text{g.kg}^{-1}$)

Compound	Parent ion (m/z)	Cone Voltage (V)	Fragment ions (m/z)	Collision Voltage (V)	Curve range	R ²	LOD	LOQ	LOD Natifs	LOQ Natifs
N-SC	209	26	192 (1) 166 (2)	11 11	0.5-10	> 0.994	0.2	0.8	1.1	3.8
N-AOZ	236	26	134 (1) 149 (2)	12 12	0.5-10	> 0.993	0.6	2.1	2.1	7.1
N-AH	249	26	134 (1) 178 (2)	13 15	0.5-5	> 0.997	0.15	0.5	1.0	3.3
N-AMOZ	335	25	291 (1) 262 (2)	12 17	0.5-5	> 0.996	0.2	0.6	1.0	3.3

Linéarité, limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ)

Ces trois paramètres ont été déterminés avec 5 échantillons dopés entre $0,5$ et $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en SC et AH et entre $0,5$ et $5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en AMOZ et AOZ ou entre 1 et $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en Nt et Nz et entre 1 et $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en Ft et Fz. La linéarité est vérifiée grâce à la valeur des coefficients de régression R². Pour chaque composé, les limites de détection et de quantification sont déterminées par l'écart type de l'ordonnée à l'origine "s(b)" et de la pente "a" des 5 droites de régression, calculés à l'aide de la méthode des moindres carrés. Les formules suivantes ont été utilisées:

$$\text{LOD} = 3*s(b)/a \text{ et } \text{LOQ} = 10*s(b)/a$$

Pour tous les composés, les coefficients de régression sont corrects (Tableau 1). Les LOD et LOQ de SC, AMOZ et AOZ sont satisfaisants. Les LOD et LOQ des nitrofuranes natifs respectifs sont plus élevées ; ceci peut s'expliquer par un rendement plus faible de l'extraction des natifs. Les limites de détection et quantification de AH et Nt sont plus importantes car l'écart type sur l'ordonnée à l'origine de ces composés est assez élevé. Les LOD et LOQ de AH restent tout de même acceptables pour l'analyse de résidus au niveau de $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Celles de Nt sont à améliorer afin de satisfaire les performances requises par les normes européennes.

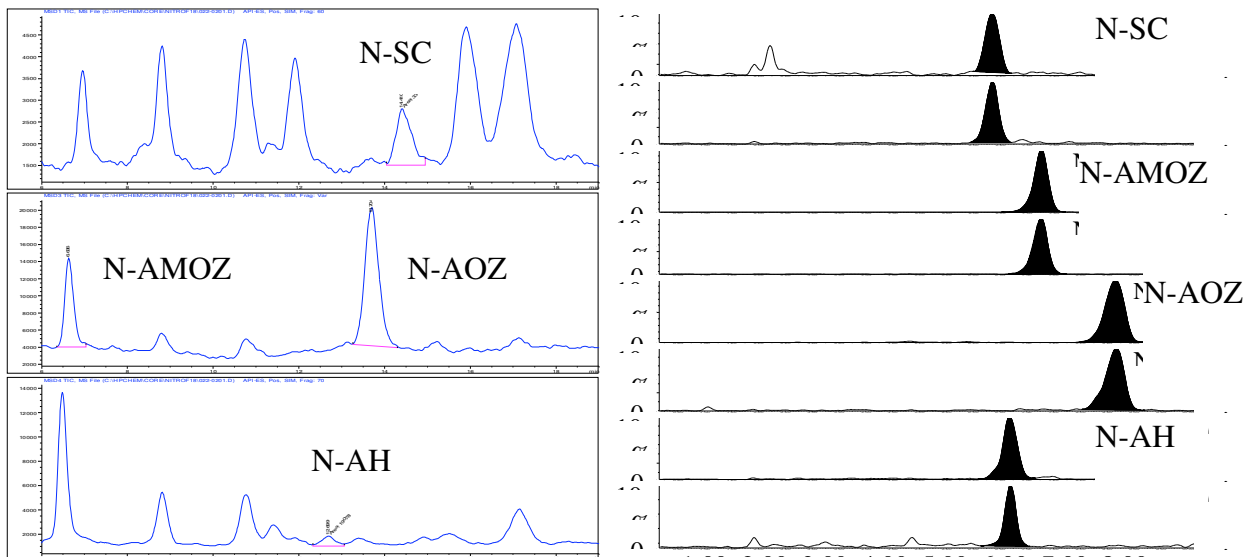


Figure 2: Chromatogrammes d'un miel dopé obtenus par LC-MS (à gauche) et LC-MS-MS

Application

La méthode mise au point a été appliquée à 23 échantillons de miels de fleurs (toutes fleurs et tournesol) provenant d'Espagne et du Vénézuéla. Sur les 23, 14 ont été trouvés positifs en Nz, 3 en Fz, 0 en Ft et 0 en Nt. SC (métabolite de Nz) peut provenir d'autres composés que l'antibiotique nitrofurazone (Khong S.P. et al., 2004), ce qui explique le nombre élevé d'échantillons positifs trouvés. Les concentrations maxima rencontrées sont de l'ordre de $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en furazolidone et de $3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en nitrofurazone, ce qui reste assez faible.

Conclusion

Les techniques de LC-MS et LC-MS-MS ont été étudiées et comparées pour la détermination de résidus de nitrofuranes dans les miels. La LC-MS donne une bonne sensibilité mais n'est pas assez sélective pour quantifier les nitrofuranes à des concentrations de l'ordre de $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Cette sélectivité est nettement améliorée en utilisant la LC-MS-MS, ce qui permet de valider la méthode. La validation donne des résultats très satisfaisants en ce qui concerne les métabolites mais il reste des limitations pour les natifs. Enfin, la méthode est appliquée à des miels de fleurs de différentes origines. Les résultats montrent que les nitrofuranes les plus rencontrés sont la furazolidone et la nitrofurazone.

Références bibliographiques

- Cooper K.M., Glenn Kennedy D., 2005. Nitrofurantoin antibiotic metabolites detected at parts per million concentration in retina of pigs-a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurantoin abuse. *Analyst*, n°130, page466-468.
- Hormazábal V., Asp T. N., 2004. Determination of the Metabolites of Nitrofurantoin Antibiotics in Meat by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, vol. 27, n°17, page2759-2770.
- Horne E, Cadogan A, O'Keefe M, Hoogenboom LAP, 1996. Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, n°121, page1463-1468
- Jenkins K.M., Young M.S., 2005. LC-MS-MS Determination of Nitrofurantoin Metabolite Residues in Honey, *The Applications Book*. Waters Corp., Massachusetts (USA), page19-20.
- Khong S.P. et al., 2004. Analysis of Matrix-Bound Nitrofurantoin Residues in Worldwide-Originated Honeys by Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n°52, page5309-5315