

**RÉSULTATS
DE L'ESSAI INTER-LABORATOIRES
« RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS DANS LES EAUX »
RAPPORT FINAL 2012**

**Amélioration des connaissances sur les substances
émergentes**

**L. Amalric, P. Bados, R. Charpentier, S. Lardy-Fontan
et M.-P. Strub**

DÉCEMBRE 2012

**Programme scientifique et technique
Année 2012**

Rapport final

En partenariat avec



Avec l'approbation et le soutien de



et le soutien de



Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF de l'année 2012, sous l'action *Amélioration des connaissances sur les substances émergentes* (II-A-01). Cette action a pour objectif de permettre le suivi des connaissances sur les polluants émergents et les risques associés, de développer, harmoniser et diffuser les méthodes d'analyse des substances émergentes.

Dans le contexte de la surveillance des milieux aquatiques, des campagnes de surveillance des substances émergentes dans les eaux ont été lancées à une large échelle. Il apparaît donc important de mieux connaître les performances analytiques actuelles des laboratoires prestataires. Dans ce cadre un essai interlaboratoires pour la recherche des résidus de médicaments dans les eaux a été réalisé en 2011.

Auteur (s) :

Laurence AMALRIC
BRGM
l.amalric@brgm.fr

Philippe BADOS
IRSTEA
philippe.bados@irstea.fr

Ronan CHARPENTIER
AGLAE
Ronan.CHARPENTIER@association-aglae.fr

Sophie LARDY-FONTAN
LNE
sophie.lardy-fontan@lne.f

Marie-Pierre STRUB
INERIS
Marie-Pierre.STRUB@ineris.fr

Vérification du document :

Pierre-François Staub
ONEMA
pierre-francois.staub@onema.fr

Les correspondants

Onema : *Pierre-François Staub*, pierre-francois.staub@onema.fr

BRGM : Jean-Philippe Ghestem, jp.ghestim@brgm.fr

Référence du document : L. Amalric avec la collaboration de P. Bados, R. Charpentier, S. Lardy-Fontan et M.-P. Strub - Mise en œuvre de l'essai inter-laboratoires «résidus de médicaments dans les eaux» rapport final 2012 - Rapport AQUAREF 2012 - 87 p.

Droits d'usage :	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

SOMMAIRE

1-Contexte et objectif	13
2-Les molécules et leur propriétés physico-chimiques	15
3-Préparation et déroulement de l'essai	21
3.1-Molécules et matrice	21
3.2-Étude préalable de faisabilité.....	21
3.3-Réalisation de l'essai	22
3.3.1-Préparation des échantillons d'eaux	22
3.3.2-Solution de référence.....	23
3.3.3-Réalisation des analyses par les participants	24
3.3.4-Contrôle de lot pendant l'essai	25
4-Résultats des participants	29
4.1-Valeurs observées par l'ensemble des participants.....	29
4.2-Performances de la profession	30
4.3-Performances de chaque participant	32
4.3.1 Les z-scores.....	32
4.3.2 Les incertitudes et les zéta-scores.....	36
5. Traitement général des données et comparaison avec l'essai AFSSA 2009	37
5.1-Nombre de participants	37
5.2-Performances des laboratoires.....	37
5.3-Molécules analysées par les laboratoires	38
5.4-Méthodes d'analyses.....	39
5.5-Méthodes d'extraction	40
5.6-Étalon interne.....	40
5.6.1-Nombre d'étalons internes.....	40
5.6.2-Nature des étalons internes.....	42
5.6.3 Contribution du choix des étalonnages et des étalons sur l'exactitude des mesures.....	44
5.7-Prise en compte du rendement d'extraction	48
5.8-Limites de quantification	48
5.8.1-Les valeurs des limites de quantification.....	48
5.8.2-Les méthodes de détermination des limites de quantification.....	49
5.8.3-Cohérence entre la dispersion des mesures et les limites de quantification	50
5.9-Traitement des résultats de la solution de référence.....	55
5.9.1-étude générale des résultats par les laboratoires.....	55
5.9.2- Intérêt de disposer de valeurs de référence dans les essais inter laboratoires des résultats par les laboratoires	57
5.9.3-Cohérence entre les mesures de la solution de référence et des échantillons d'eaux....	59
6-Conclusions et perspectives	63
7-Références	65
ANNEXE 1	67
ANNEXE 2	69

Liste des illustrations :

Illustration 1 : Substances sélectionnées pour l'essai, avec leurs caractéristiques intrinsèques.	17
Illustration 2 : logD en fonction du pH pour une molécule présentant une fonction chimique acide ($pK_a=8$).	17
Illustration 3 : logD en fonction du pH pour une molécule présentant une fonction chimique basique ($pK_b =8$).	17
Illustration 4 : logD en fonction du pH pour une molécule présentant une fonction chimique acide ($pK_a=7$) et une fonction chimique basique ($pK_b =5,6$).	18
Illustration 5 : logD en fonction du pH pour l'ibuprofène.	19
Illustration 6 : logD en fonction du pH pour l'ensemble des molécules de l'essai.	20
Illustration 7 : Paramètres mesurés sur site le 16/09/2011 pour.....	21
Illustration 8 : Paramètres physico-chimiques mesurés en laboratoire sur l'eau souterraine utilisée pour l'essai d'intercomparaison prélevée le 16/09/2011.	21
Illustration 9 : Échantillons constituant l'essai d'intercomparaison.	23
Illustration 10 : Chronogramme pour la réalisation des essais concernant la solution de référence.	24
Illustration 11: Valeurs de référence de la solution de vérification instrumentale.....	24
Illustration 12 : Résultats du dosage de l'estrone dans le lot 2 (valeur nominale = 2,2 ng/L) réalisé à l'IRSTEA.	25
Illustration 13 : Résultats du dosage des hormones pour le lot 3 (niveau haut) pour l'étude de stabilité réalisée à l'IRSTEA,	26
Illustration 14 : Évolution de la concentration en hormones au cours du temps pour le lot 3, observée lors de l'essai de stabilité réalisé à l'IRSTEA, pendant l'essai inter-laboratoire ; J0 = jour du dopage.	27
Illustration 15 : Résultats des participants et du contrôle de lot, pour l'ibuprofène dans le lot 3. ..	27
Illustration 16 : Résultats des participants et du contrôle de lot, pour l'ibuprofène dans le lot 2. ..	28
Illustration 17 : Concentrations initiales dans l'eau souterraine, valeurs ciblées par dopage, incertitude élargie ($k=2$) sur la valeur ciblée par dopage, valeur retrouvée par les participants avec son incertitude élargie ($k=2$), écart relatif entre la valeur ciblée par dopage et valeur observées par les participants, pour les lots dopés. L'unité est le ng/l.....	30
Illustration 18 : Valeurs de fidélités obtenues dans l'essai (AGLAE).	31
Illustration 19 : Valeurs des z-scores obtenus par chacun des 33 laboratoires pour hormones et les résidus de médicaments des 3 lots d'échantillons.	35
Illustration 20 : Incertitudes relatives élargies ($k=2$) médianes calculées à partir	36
Illustration 21 : Niveau de dopage, moyenne des participants, coefficients de variation et nombre de laboratoires des essais Aquaref 2011 et AFSSA 2009.....	38
Illustration 22 : Moyenne des participants, coefficient de variation et nombre de laboratoires de l'essai PT-WFD 2011, pour les molécules et les niveaux de concentration communs à l'essai Aquaref 2011.	38
Illustration 23 : Nombre de laboratoires ayant recherché les composés de l'essai dans au moins un échantillon d'eau, dans l'essai 2011 (33 participants) et l'essai 2009 (32 participants) ; (-) molécule absente de l'essai.	39
Illustration 24 : Méthodes d'extraction et d'analyses utilisées par les participants pour l'analyse des différents composés dans les échantillons d'eaux de l'essai 2011.	40

Illustration 25 : Pourcentage des laboratoires participants utilisant un étalon interne, dès l'extraction ou au moment de l'analyse, et type de composé employé : l'analogue de la molécule analysée, ou un composé de la même famille (médicament pour la famille des 8 résidus de médicaments ou hormone pour la famille des 3 hormones).....	41
Illustration 26 : Nombre de laboratoires analysant de 1 à 8 résidus de médicaments	41
Illustration 27 : Nombre de laboratoires analysant de 1 à 3 hormones.....	42
Illustration 28 : Pratiques d'étalonnage par les laboratoires participants à l'essai inter-laboratoires pour la détermination de la carbamazépine, le diclofénac et l'oxazépam. Autres : autres approches d'étalonnage que l'approche étalonnage interne ; EI NR : étalonnage interne mais l'étalon interne utilisé n'est pas précisé ; Carba D10: Carbamazépine D10 ; Carba D8: Carbamazépine D8 ; ATN D7 : Aténolol D7 ; ATZ 13C: Atrazine 13C ; DZP D5: Diazépam D5 ; DCL D4 : Diclofénac D4 ; KETO D3: Kétoprofène D3 ; KETO D4: Kétoprofène D4 ; OXA D5 : Oxazépam D5 ; PPZ 13C : Propazine 13C ; SDX D6 : Sulfadiméthoxine D6 ; SMZ C13 : Sulfaméthoxazole C6 ; GEM D6 : Gemfibrozil D6 ; IBU 13C : Ibuprofène 13C ; IBU D3 : Ibuprofène D3 ; NDZP D5 : Nordiazépam D5.	43
Illustration 29 : Molécules utilisées comme étalons internes pour la quantification des 3 hormones estrogéniques.....	44
Illustration 30 : Effet de la méthode de quantification et du choix de l'étalon interne sur la détermination de la carbamazépine dans la solution de référence.	45
Illustration 31 : Effet de la méthode de quantification et du choix de l'étalon interne sur la détermination du diclofénac dans la solution de référence.	46
Illustration 32 : Effet de la méthode de quantification et du choix de l'étalon interne sur la détermination de l'oxazépam dans la solution de référence.	47
Illustration 33 : Limites de quantification minimale et maximale annoncées par les laboratoires participants pour les différentes techniques employées dans l'essai de 2011 et l'essai AFSSA de 2009.	48
Illustration 34 : Représentation graphique des LQ renseignées par les laboratoires participants et niveaux de performance attendus.....	49
Illustration 35 : Répartition des méthodes de détermination de la LQ au sein des laboratoires participants pour la détermination des résidus de médicaments et des hormones, toutes molécules confondues.	50
Illustration 36 : Détermination de l'aténolol, du métoprolol, de l'oxazépam et du sulfaméthoxazole dans le matériau d'essai, niveau bas de dopage: cohérence avec les limites de quantification revendiquées par le laboratoire (NQ non quantifié).	52
Illustration 37 : Détermination de la carbamazépine, du diclofénac, du kétoprofène et de l'ibuprofène dans le matériau d'essai, niveau bas de dopage: cohérence avec les limites de quantification revendiquées par le laboratoire (NQ non quantifié).	53
Illustration 38 : Détermination des composés estrogéniques (Estrone, 17- α éthinylestradiol, 17- β estradiol) dans le matériau d'essai, niveau bas de dopage: cohérence avec les limites de quantification revendiquées par le laboratoire (NQ non quantifié).	54
Illustration 39 : Schéma représentatif de la dispersion d'un ensemble de mesures. Inexacte = ni juste, ni fidèle ; fidèle = fidèle mais pas juste ; juste = juste mais pas fidèle ; exacte = juste et fidèle.	55
Illustration 40 : Données statistiques de performances des laboratoires.	55
Illustration 41 : Résultats concernant la détermination de la carbamazépine dans la solution de référence par les laboratoires participant à l'EIL, comparaison à la valeur de référence.	56
Illustration 43 : Résultats concernant la détermination de l'oxazépam dans la solution de référence par les laboratoires participant à l'EIL, comparaison à la valeur de référence.	57
Illustration 44 : Écarts normalisés démontrant la maîtrise de chacun des laboratoires ayant participé à l'essai inter laboratoires dans la caractérisation de la solution de référence.	58

Illustration 45 : Étude de la maîtrise de l'analyse instrumentale : exactitude des mesures et sources contributives à l'inexactitude des mesures ; a) Exactitude des mesures et sources contributives à l'inexactitude des mesures de carbamazépine, oxazépam et diclofénac. b) Exactitude des mesures et sources contributives à l'inexactitude des mesures toutes molécules et tous laboratoires confondus. 59

Illustration 46 : Cohérence entre les niveaux d'incertitudes annoncées par les laboratoires et les performances, répétabilité de l'analyse instrumentale et fidélité intermédiaire (élargis avec $k=2$), obtenus au travers de l'essai inter-laboratoires. a) carbamazépine ; b) diclofénac ; c) oxazépam ; incohérence, questionnable. 61

Liste des annexes :

ANNEXE 1 : Annonce de l'essai d'intercomparaison (version française)

ANNEXE 2 : Rapport de comparaisons interlaboratoires Essai 11M57.1 - EIL Aquaref - Résidus médicamenteux dans les eaux environnementales

RÉSULTATS DE L'ESSAI INTER-LABORATOIRES RÉSIDUS DE MÉDICAMENTS DANS LES EAUX - RAPPORT FINAL 2012

Amalric L., P. Bados, R. Charpentier, S. Lardy-Fontan et M.-P. Strub

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF de l'année 2012, sous l'action *Amélioration des connaissances sur les substances émergentes* (II-A-01). Cette action a pour objectif de permettre le suivi des connaissances sur les polluants émergents et les risques associés, de développer, harmoniser et diffuser les méthodes d'analyse des substances émergentes.

Dans le contexte de la surveillance des milieux aquatiques, il est nécessaire de mieux connaître les performances analytiques des laboratoires pour les substances émergentes. Dans ce cadre la réalisation d'un essai interlaboratoires pour la recherche des résidus de médicaments dans les eaux a été proposée en 2010 et l'essai s'est déroulée en 2011. Cette étude a donné lieu à l'émission d'un cahier des charges [Amalric, 2011] et d'un rapport sur la préparation et la mise en œuvre de l'essai [Amalric *et al.*, 2011]. Le présent document présente les résultats de l'essai d'intercomparaison.

L'essai portait sur 3 échantillons d'eau souterraine naturelle de niveaux de concentration différents, contenant jusqu'à 11 molécules, 3 hormones et 8 résidus médicamenteux de famille thérapeutique différentes, ainsi qu'une solution de référence en solvant contenant l'oxazépam, le diclofénac et la carbamazépine à 50 µg/L afin de vérifier la justesse et la fidélité des analyses instrumentales.

La majorité des 30 laboratoires participant a quantifié le métoprolol, le sulfaméthoxazole, le diclofénac, le kétoprofène et l'aténolol (85 à 91 % des laboratoires selon les molécules). En revanche, seulement 55 et 58 % des participants ont recherché l'oxazépam et l'ibuprofène, respectivement. Les hormones ont été quantifiées par 42 à 52 % des laboratoires.

Les résultats montrent des coefficients de variation de l'ordre de 20 % pour le niveau de concentration de 100 ng/L et de l'ordre de 25 % pour le niveau de concentration de 25 ng/L qui s'inscrivent dans la lignée des dosages de micropolluants organiques plutôt reproductibles. Un progrès a été constaté entre l'essai de l'Anses en 2009 et celui-ci, avec des coefficients de variation plus resserrés en général. Ces niveaux de concentration sont donc mesurables par la profession. En revanche, vouloir doser des valeurs très basses pour les médicaments (< 10 ng/L) et pour les hormones (\approx 2 ng/L) apparaît encore difficile à l'échelle inter-laboratoires.

Les limites de quantification varient d'un facteur 10 à 50 selon les molécules entre les laboratoires. Les résultats de la solution de référence montrent que 2/3 des laboratoires présentent une bonne maîtrise, exactitude des mesures. Le tiers restant est constitué d'une population présentant des problèmes de fidélité de mesure (importante dispersion des répliqués) et d'une population présentant des problèmes de justesse de mesure associé ou non à des problèmes de fidélité.

L'incertitude de mesure relative élargie estimée par les laboratoires se situe aux alentours de 25 % pour une concentration de l'ordre 100 ng/L ; cependant l'examen des données relatives à la détermination des incertitudes montre que les estimations faites par les laboratoires ne sont pas toujours très fiables, et sous-estimées pour 1 laboratoire sur 3. Pour certains laboratoires il existe une très nette incohérence entre les niveaux d'incertitude revendiqués et les critères de performances démontrés dans l'essai.

Cette étude montre l'importance des essais inter-laboratoires et de leur pratique régulière, pour connaître le niveau de fidélité d'une analyse et permettre aux laboratoires de progresser dans leur pratique quotidienne.

Mots clés (thématique et géographique) : Essai inter-laboratoires - médicaments - hormones - eau souterraine.

RESULTS OF A LABORATORIES TRIAL ON DRUG RESIDUES IN WATER – FINAL REPORT 2012

Amalric L., P. Bados, R. Charpentier, S. Lardy-Fontan et M.-P. Strub

This report was produced under the program of activity of AQUAREF, under the action “Improved knowledge on emerging substances” (II-A-01). This action is intended to allow monitoring of knowledge on emerging pollutants and risks, develop, harmonize and disseminate methods of analysis of emerging substances.

In the context of the requirements of the water framework directive and the related environmental quality standards it is necessary to know better the analytical performances of laboratories for emergent substances. In this frame the realization of a proficiency testing for the analysis of pharmaceuticals in waters was proposed in 2010 and the laboratory trial took place in 2011. This study gave rise to the emission of a specifications [Amalric, on 2011] and of a report on the preparation and the implementation of the trial [Amalric *and al.*, on 2011]. The present document presents the final results (profits) of the intercomparison.

The trial concerned 3 samples of natural groundwater of different levels of concentration, containing up to 11 molecules, 3 hormones and 8 medicinal residues from different therapeutic family, as well as a reference solution in solvent containing oxazepam, diclofenac and carbamazepine at 50µg/L to verify the accuracy and the precision of the instrumental analyses.

The majority of 30 participating laboratories quantified metoprolol, sulfamethoxazole, diclofenac, ketoprofen and atenolol (85 to 91 % of laboratories, according to molecules). On the other hand, only 55 and 58 % of the participants looked for oxazepam and ibuprofen, respectively. Hormones were quantified by 42 to 52 % of the laboratories.

The results show coefficients of variation of the order of 20 % for the level of concentration of 100 ng/L and of the order of 25 % for the level of concentration of 25 ng/L which join the range of the dosages of rather reproducible organic micropollutants. A progress was noticed between the trial realized in 2009 by Anses and this one, with more narrow coefficients of variation generally. These levels of concentration are thus measurable by the profession. On the other hand, to measure very low values for medicines (< 10 ng/L) and for hormones (~ 2 ng/L) seems still difficult for the interlaboratories scale.

The limits of quantification vary of a factor 10-50 between the laboratories, according to molecules. The results of the reference solution show that 2/3 of the laboratories present good control and accuracy of the measures. The third remainder is constituted by a population presenting precision problems (important dispersal of replicats) and of a population presenting accuracy problems with or without precision problems.

The uncertainty estimated by laboratories is situated near 25 %, for a concentration of about 100 ng/L. However the examination of the data relative to the determination of the uncertainties shows that the estimations made by laboratories are not still very reliable, and are underestimated for 1 laboratory on 3. For certain laboratories there is a very clear incoherence between the claimed levels of uncertainty and the criteria of performances demonstrated in the trial.

This study shows the importance of the proficiency testing and of their regular practice, to know the level of precision of an analysis and allow the laboratories to progress in their daily practice.

Key words (thematic and geographical area): Interlaboratory trial - pharmaceutical residues - hormones - groundwater.

Résultats de l'essai interlaboratoires «résidus de médicaments dans les eaux» - Rapport final 2012

BRGM/RP-61863-FR

Décembre 2012

Étude réalisée dans le cadre des projets
de Service public du BRGM

L. Amalric, P. Bados, R. Charpentier, S. Lardy-Fontan et M.-P. Strub

Vérificateur :

Nom : BRISTEAU S.
Date : 07/01/2013



Approbateur :

Nom : GABORIAU H.
Date : 07/01/2013



En l'absence de signature, notamment pour les rapports diffusés en version numérique,
l'original signé est disponible aux Archives du BRGM.

Le système de management de la qualité du BRGM est certifié AFAQ ISO 9001:2010.

1 - Contexte et objectif

Dans la perspective d'améliorer les connaissances sur les substances émergentes et notamment les capacités des laboratoires d'analyses nationaux, la réalisation d'un essai inter-laboratoires (EIL) sur les résidus de médicaments dans les eaux avait été envisagée par Aquaref en 2010 pour une réalisation en 2011.

L'association AGLAE ayant programmé un EIL « médicaments » pour la même année, il a été jugé pertinent de regrouper les deux réalisations pour un seul essai d'intercomparaison ; cette décision a été validée par l'ONEMA.

L'EIL médicament a donc été préparé en 2010 sous forme d'un cahier des charges, puis réalisé en 2011, par AQUAREF. Le groupe de travail était composé du BRGM, INERIS, IRSTEA (CEMAGREF) et LNE pour le réseau AQUAREF et de l'ANSES et AGLAE.

La répartition des tâches au sein du groupe a été la suivante :

- LNE pour la préparation de la solution étalon de référence destinée à la vérification de l'analyse instrumentale, avec l'étude d'homogénéité et stabilité de cette solution ;
- BRGM pour la préparation des matériaux d'essai et la logistique d'envoi aux participants, la réalisation des analyses des substances médicamenteuses pour l'étude préalable d'homogénéité et de stabilité et réalisation des analyses des substances médicamenteuses pour le contrôle de lot lors de l'essai ;
- IRSTEA pour la réalisation des analyses des hormones pour l'étude préalable d'homogénéité et de stabilité et réalisation des analyses des hormones pour le contrôle de lot lors de l'essai ;
- AGLAE pour la logistique d'inscription, la distribution documentaire, la fourniture des flacons et des emballages, le traitement statistique et la rédaction du rapport d'essai ;
- l'ensemble des intervenants pour le traitement des informations générales et la rédaction du rapport final.

2 - Les molécules et leur propriétés physico-chimiques

Onze molécules ont été retenues à l'issue d'une sélection réalisée en 2010 (Amalric 2011) : 3 hormones et 8 résidus de médicaments (Illustration 1).

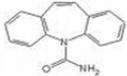
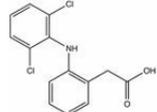
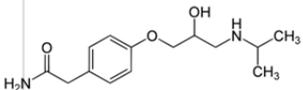
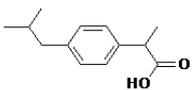
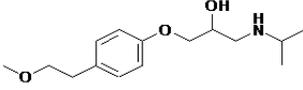
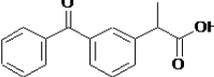
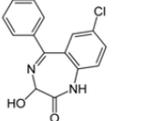
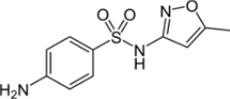
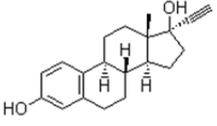
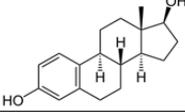
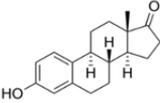
Composé n°CAS	M g.mol ⁻¹	Solubilité aqueuse (mg/L)	log Kow	pKa	Formule chimique
Carbamazépine 298-46-4	236,273	17,7 (25 °C)	2,45	13,9 ; 7	
Diclofénac 15307-86-5	318,134	2,43 (25 °C)	4,5	4,15	
Aténolol 29122-68-7	266,33	26,5 (37 °C)	-0,03 ; 0,23	9,5	
Ibuprofène 15687-27-1	206,28	0,043 (37 °C)	3,79	5,7	
Métoprolol 37350-58-6	267,37	16,9.10 ⁴ (25 °C)	2,15	9,7	
Kétoprofène 22071-15-4	254,28	51 (25 °C)	3	5,94	
Oxazépam 604-75-1	286,71	20 (22 °C)	2,24	1,7 ; 11,3	
Sulfaméthoxazole 723-46-6	253,28	3 900 (25 °C)	0,89	6	
Ethinylestradiol 57-63-6	296,41	19,1 (25 °C) ; 11,3 (27 °C)	3,67	10,4	
Estradiol 50-28-2	272,38	3,9 (25 °C)	4,01	10,71	
Estrone 53-16-7	270,36	0,8 (25 °C)	3,13	10,77	

Illustration 1 : Substances sélectionnées pour l'essai, avec leurs caractéristiques intrinsèques.

Le $\log K_{ow}$, aussi appelé $\log P$ est une mesure de la solubilité différentielle de substances dans deux solvants (coefficient de partage octanol/eau).

Le K_{ow} est égal au rapport des concentrations de la substance concernée dans l'octanol et dans l'eau :

$$K_{ow} = \frac{[C]_{oc\ tan\ ol}}{[C]_{eau}^{forme_non_ionisée}} \quad (\text{Eq. 1})$$

Cette valeur, généralement exprimée sous forme de logarithme, permet d'appréhender le caractère hydrophile ou hydrophobe (lipophile) d'une molécule. En effet, un $\log K_{ow}$ nul signifie que la molécule est aussi soluble dans un solvant que dans un autre. Si le $\log K_{ow}$ est positif et peu élevé, voire négatif, cela exprime le fait que la molécule considérée a une solubilité notable dans l'eau par rapport à celle dans l'octanol, ce qui reflète son caractère hydrophile, et inversement. Cependant, pour les molécules présentant des fonctions chimiques ionisables en fonction du pH, cette information peut ne pas être pertinente car la molécule ne se présentera pas sous forme neutre dans les milieux aquatiques, aux pH environnementaux.

Le $\log D$ est une mesure plus fine du caractère hydrophile tenant compte de :

- la modification de celui-ci en fonction du pH de la phase aqueuse, et
- la présence dans la molécule considérée d'une ou plusieurs fonctions chimiques ionisables, traduites par les pK_a correspondants.

$$\log D = \log \left(\frac{[C]_{oc\ tan\ ol}}{[C]_{eau}^{non_ionisé} + [C]_{eau}^{ionisé}} \right) \quad (\text{Eq. 2})$$

Soit, pour les composés présentant des fonctions acides :

$$\log D = \log P + \log \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}} \quad (\text{Eq. 3})$$

pour les composés présentant une fonction basique :

$$\log D = \log P + \log \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (\text{Eq. 4})$$

et, bien sûr, pour les composés neutres :

$$\log D = \log P \quad (\text{Eq. 5})$$

Le $\log D$ n'a donc pas une valeur unique pour une molécule, mais prend des valeurs différentes en fonction du pH du milieu. Pour une molécule portant une fonction acide, le $\log D$ évolue en fonction du pH comme le montre l'illustration 2.

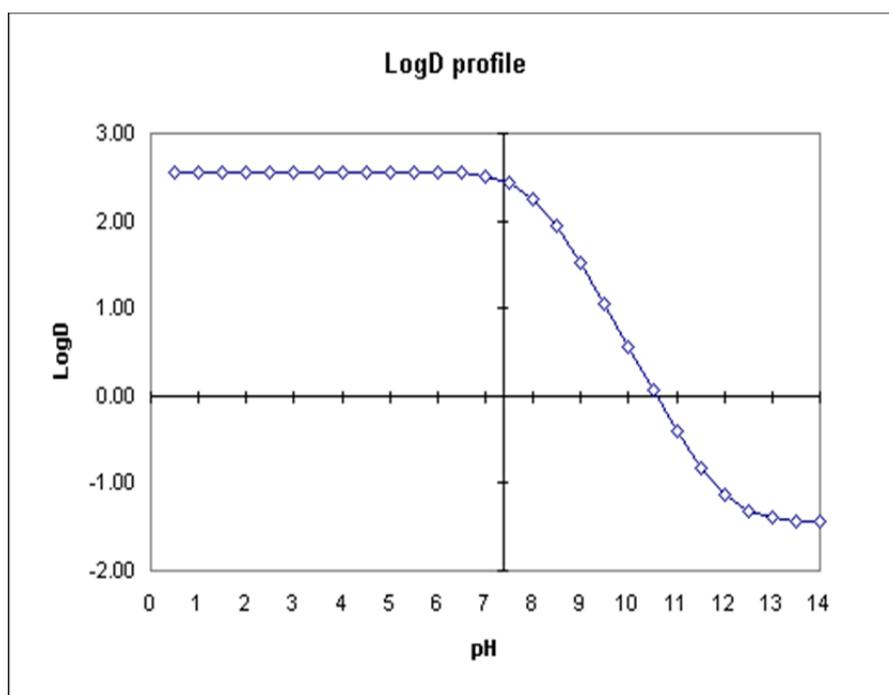


Illustration 2 : logD en fonction du pH pour une molécule présentant une fonction chimique acide ($pK_a=8$).

Pour une molécule présentant une fonction basique, l'évolution typique est présentée sur l'illustration 3.

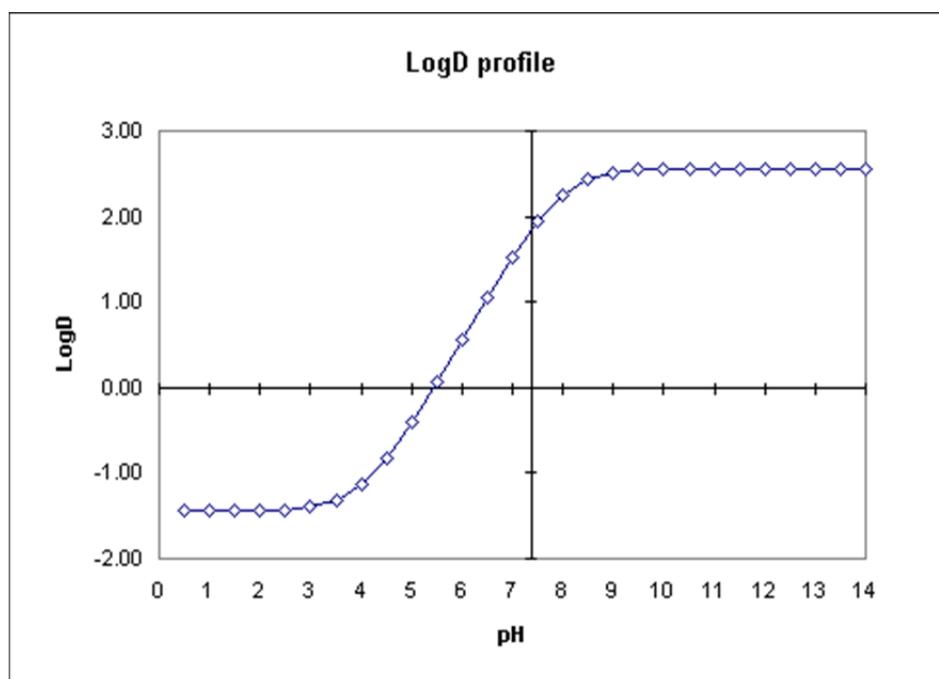


Illustration 3 : logD en fonction du pH pour une molécule présentant une fonction chimique basique ($pK_b=8$).

Enfin, pour une molécule présentant les deux types de fonction, acide et basique (zwitterion), le profil sera du type de celui présenté par l'illustration 4.

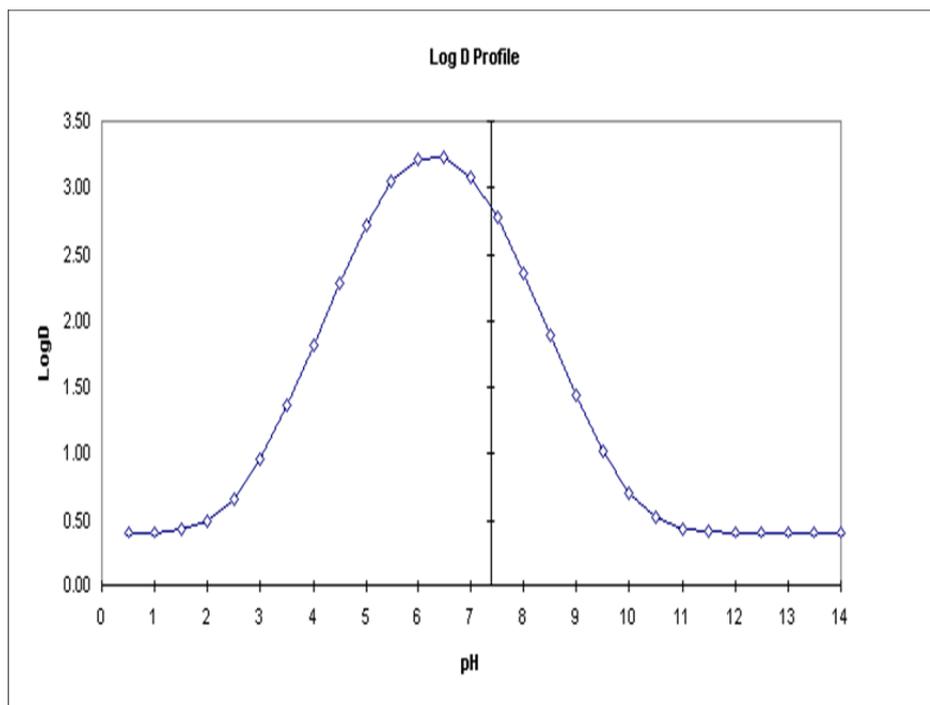


Illustration 4 : logD en fonction du pH pour une molécule présentant une fonction chimique acide ($pK_a=7$) et une fonction chimique basique ($pK_a=5,6$).

On peut donc aisément constater qu'une molécule présentant un caractère ionisable se comportera de manière pouvant aller de très hydrophile à hydrophobe en fonction du pH auquel elle est soumise dans le milieu dans lequel elle est observée. Cette propriété est largement exploitée par l'industrie pharmaceutique pour ajuster l'absorption des médicaments.

Dans les milieux aquatiques, elle a pour conséquence de modifier la partition des substances entre phase aqueuse et phase particulaire par rapport à ce que l'on pourrait attendre en se basant uniquement sur le log Kow. En chimie analytique, elle se traduit par une variabilité du rendement d'extraction en fonction du pH.

L'illustration 1 regroupe les caractéristiques intrinsèques des molécules objet de l'essai. La majorité de ces molécules présente des fonctions ionisables,

soit acide :

- ibuprofène,
- kétoprofène

soit basique :

- métropolol,
- aténolol,
- sulfaméthoxazole

et même 2 fonctions, acide et basique, dans le cas du diclofénac.

L'ibuprofène, par exemple, est une substance plus polaire à $pH > 7$ et donc plus présente dans la phase aqueuse que ne le laisserait supposer son log Kow établi sur la forme neutre de la molécule. En revanche, la zone des pH environnementaux est une zone de forte variation du log D : la robustesse de l'étape d'extraction du protocole analytique est moindre à pH 7, point d'inflexion de la courbe représentée sur l'illustration 5, qu'à pH extrême.

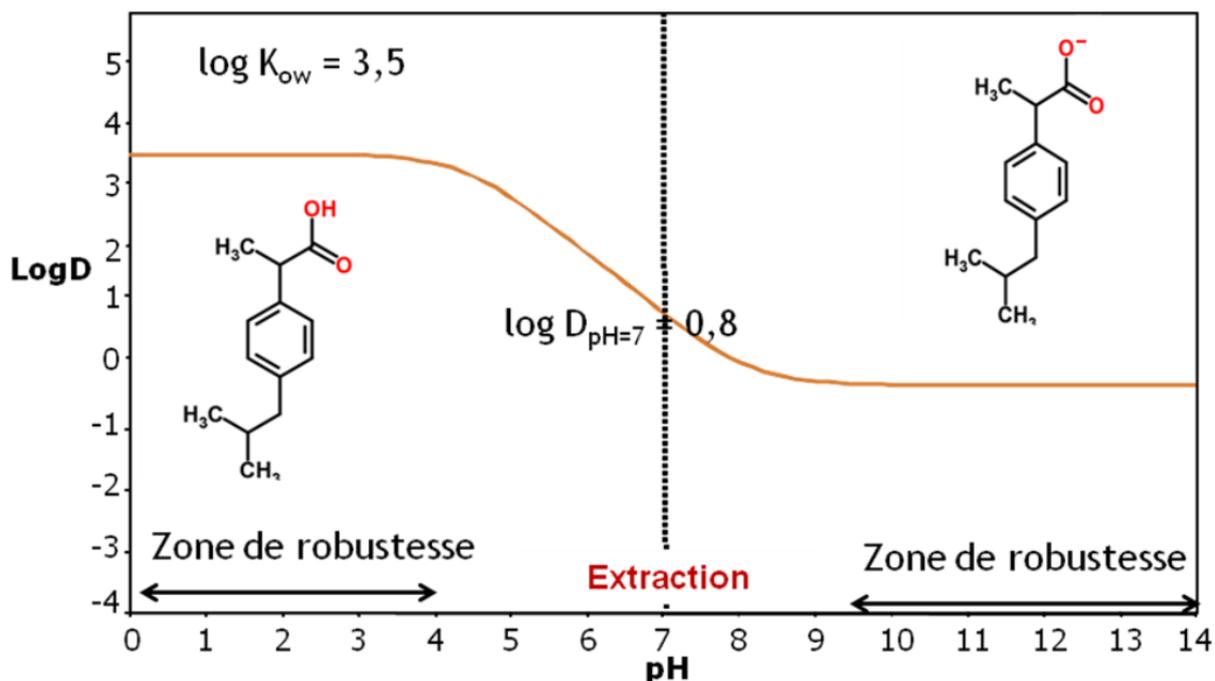
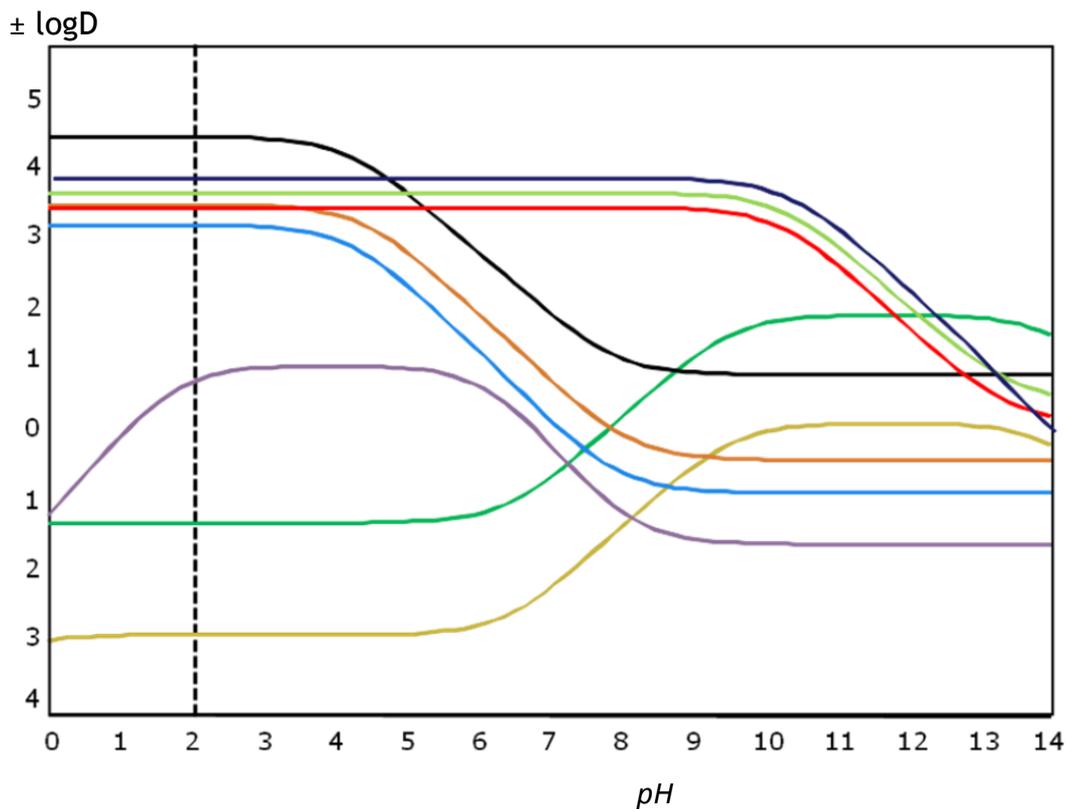


Illustration 5 : $\log D$ en fonction du pH pour l'ibuprofène.

L'illustration 6 présente les courbes respectives des substances ayant fait l'objet de l'essai, par application de leurs caractéristiques aux équations 3 et 4. On peut donc constater que, pour appliquer de manière fiable un protocole analytique comportant une étape d'extraction à l'ensemble de ces substances, il y aura lieu de sélectionner une zone de pH dans laquelle les variations des différents $\log D$ sont les plus faibles afin d'assurer une bonne répétabilité ainsi qu'une reproductibilité acceptable de la mesure.

Un pH d'extraction de 7 se situe hors de la zone de robustesse pour certaines molécules. Ceci peut expliquer certaines dispersions, dans le cas où les échantillons seraient extraits à pH neutre. Pour les molécules de cet essai, le meilleur compromis de pH pour l'extraction se situe entre 2 et 5. Le pH 2 est un des pH recommandés par le projet de norme XP T 90-223.



Légende :

Diclofénac
Kétoprofène
Ibuprofène

Métoprolol
Aténolol
Sulfométhoxazole

17- α estradiol
17- β estradiol
Estrone

Illustration 6 : $\log D$ en fonction du pH pour l'ensemble des molécules de l'essai.

3 - Préparation et déroulement de l'essai

L'information de l'essai a été diffusée auprès des laboratoires par le biais des commissions de normalisation, des associations de laboratoires, du réseau Aquaref, des pages internet Anses et de l'association AGLAE via un dépliant en versions française et anglaise (Annexe 1).

Un total de 33 organismes a répondu à l'appel à participation, aucune sélection n'a été faite parmi les organismes et la totalité des candidats a pu participer à l'essai.

La participation s'est faite de façon anonyme en codant chaque laboratoire participant.

3.1 - MOLÉCULES ET MATRICE

Afin de prendre en compte les isomères de l'estradiol et vérifier les capacités analytiques, les formes α et β ont été introduites dans les échantillons. Les laboratoires n'en ont pas été informés et ont quantifié uniquement la forme β , seule demandée.

L'eau naturelle utilisée pour l'ensemble de l'essai est une eau souterraine prélevée dans le Loiret. Les paramètres physico-chimiques ont été déterminés sur site et en laboratoire lors des prélèvements (250 litres environ) le 24 février 2011 pour l'étude de faisabilité et le 16 septembre 2011 pour la préparation des échantillons de l'essai.

Les caractéristiques de cette matrice, utilisée lors de l'essai sont indiquées dans les illustrations 7 et 8.

cond _{25°C}	pH	O ₂		Eh	T °C
$\mu\text{S/cm}$		%	mg/l	mV	
353	7,3	12,2	1,11	245,7	15,2

Illustration 7 : Paramètres mesurés sur site le 16/09/2011 pour l'eau souterraine utilisée pour l'essai d'intercomparaison.

*COT (Carbone organique total)	*Ca (Calcium)	*Cl (Chlorures)	*K (Potassium)	*MES (Matières en suspension)	*Mg (Magnésium)	*NO ₃ (Nitrates exprimés en NO ₃)	*Na (Sodium)	*SO ₄ (Sulfates)	CO ₃ (Carbonates)	HCO ₃ (Bicarbonates)
mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
2,3	41,0	47,3	4,1	3	5,7	7,4	15,6	18,2	< 5	142

Illustration 8 : Paramètres physico-chimiques mesurés en laboratoire sur l'eau souterraine utilisée pour l'essai d'intercomparaison prélevée le 16/09/2011.

3.2 - ÉTUDE PRÉALABLE DE FAISABILITÉ

Une étude de faisabilité a été réalisée en amont de l'essai notamment pour les paramètres ne figurant pas dans l'EIL Anses de février 2009, puisqu'aucun essai inter laboratoire ou étude similaire n'avait été réalisé jusqu'à présent. Cette étude de faisabilité a consisté à vérifier la stabilité des échantillons préparés et l'homogénéité des matériaux en s'appuyant sur les critères d'évaluation de l'annexe B de la norme NF ISO 13528.

Un lot homogène de 42 flacons d'eau a été préparé au BRGM le 28 mars 2011 avec deux niveaux de concentration différents (correspondant aux niveaux ciblés pour l'essai interlaboratoires); deux lots d'échantillons ont été constitués de façon aléatoire puis dopés le 4 avril 2011.

Pour chacun des lots préparés, un échantillon a été extrait le jour même du dopage afin d'analyser les composés pharmaceutiques et vérifier le dopage. Cette analyse au temps zéro n'a pas été réalisée pour les hormones en raison de l'éloignement géographique du IRSTEA par rapport au BRGM.

Tous les autres échantillons ont été mis en colis le 4 avril 2011. La moitié des échantillons a été conservée au BRGM pour analyse des médicaments après simulation d'un transport en 24h. L'autre moitié des échantillons a été envoyée à l'IRSTEA le 4 avril 2011, pour analyse des hormones.

Le plan d'essai a consisté, pour chacun des deux lots d'échantillons, à extraire chaque jour deux flacons en double (répliques), sur une durée de cinq jours (du mardi au lundi de la semaine suivante). Les extraits ont été stockés en vue d'être analysés le dernier jour, au sein d'une même série analytique pour limiter la contribution de l'étalonnage.

Outre la mesure du degré de stabilité, l'évolution des résultats par rapport à la valeur ciblée par dopage a été étudiée, en effectuant une estimation de l'incertitude sur la valeur ciblée par dopage et en déterminant les incertitudes sur les résultats d'analyse.

Les résultats de cette étude préliminaire ont montré que le dopage flacon par flacon conduit à une incertitude relative élargie de 1,3 %, ce qui est tout à fait acceptable pour conduire l'essai. Les échantillons ont montré une stabilité suffisante pour les molécules médicamenteuses avec un délai de mise en œuvre des extractions pouvant aller jusqu'à 4 jours suivant l'envoi des colis. En revanche pour les hormones, un problème d'instabilité potentiel a été constaté : la 17- α éthinylestradiol montre une tendance à la baisse ; les 17- α et β estradiol se transforment en estrone. Ce comportement est détaillé dans le paragraphe 3.3.4.

Le délai d'extraction a été fixé à 48h pour les hormones et 72h pour les résidus de médicaments.

3.3 - RÉALISATION DE L'ESSAI

3.3.1 - Préparation des échantillons d'eaux

Les flacons ont été remplis au préalable avec l'eau souterraine, du 4 au 6 octobre 2011 puis répartis de façon aléatoire en 3 lots.

Un lot constitue l'échantillon blanc (lot 1). Pour les lots 2 et 3, les dopages ont été réalisés avec une solution en solvant, par introduction d'un volume de 1ml dans chaque flacon au moyen d'un système automatique, le 10 octobre 2011.

Les équipements utilisés sont suivis métrologiquement afin de maîtriser l'incertitude sur le dopage.

Les niveaux de dopage et également le rapport des concentrations entre molécules ont été différenciés entre les 2 lots, en préparant le nombre de solutions de dopage adéquat.

En vue de calculer la valeur théorique ciblée par dopage, les teneurs initiales de chaque paramètre dans la matrice homogénéisée ont été mesurées avant dopage. Deux flacons d'eau naturelle non dopés ont donc été conservés, l'un au BRGM pour la mesure des concentrations initiales en médicaments dans la matrice. Le second a été envoyé à l'IRSTEA en même temps que les autres échantillons, afin de mesurer les concentrations initiales en hormones dans la matrice.

Les niveaux de dopage théoriques sont indiqués dans l'illustration 9.

Type d'échantillons	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Solution de référence
Matrice	Eau souterraine	Eau souterraine	Eau souterraine	Acétone
Composés	Pas de dopage	Dopage	Dopage	Dopage
Carbamazépine	pas de dopage	40,2 ng/l	115,9 ng/l	50 µg/l
Oxazépam	pas de dopage	42,6 ng/l	119,3 ng/l	50 µg/l
Sulfaméthoxazole	pas de dopage	29,7 ng/l	105,0 ng/l	/
Ibuprofène	pas de dopage	27,2 ng/l	100,8 ng/l	/
Diclofénac	pas de dopage	23,8 ng/l	99,2 ng/l	50 µg/l
Kétoprofène	pas de dopage	23,0 ng/l	97,0 ng/l	/
Aténolol	pas de dopage	22,7 ng/l	90,3 ng/l	/
Métoprolol	pas de dopage	24,8 ng/l	100,5 ng/l	/
17- α éthinylestradiol	pas de dopage	pas de dopage	35,6 ng/l	/
17- β estradiol	pas de dopage	pas de dopage	33,1 ng/l	/
17- α estradiol	pas de dopage	pas de dopage	33,8 ng/l	/
estrone	pas de dopage	2,2 ng/l	pas de dopage	/
Nombre de flacons	2x1L	2x1L	2x1L	1x1ml
Nombre de mesures	2 mesures par flacon = 4 résultats	2 mesures par flacon = 4 résultats	2 mesures par flacon = 4 résultats	3 dilutions au 1/100 ^{ème} = 3 résultats

Illustration 9 : Échantillons constituant l'essai d'intercomparaison.

Il été demandé aux laboratoires d'analyser la totalité des molécules dans les 3 lots d'échantillons, à l'exception de la 17- α estradiol. Cette molécule a été ajoutée afin de vérifier que les méthodes développées par chaque laboratoire permettent la séparation chromatographique des deux formes isomères.

L'estrone n'a pas été ajoutée dans le lot 3 afin de vérifier la dégradation de l'estradiol (17- α et 17- β) en estrone.

Les flacons ont été placés individuellement dans des sacs plastiques zippés puis positionnés de façon aléatoire dans des coques en polystyrène, avec une plaque eutectique dans chacune d'entre elles. Les flacons d'un même lot ont ensuite été répartis au hasard dans les différents colis, tout comme les solutions de référence. Les colis ont été préparés et envoyés le mardi 11 octobre 2011.

3.3.2 - Solution de référence

Afin de vérifier la justesse et la fidélité des analyses instrumentales, une solution de référence pour vérification du système analytique a été préparée par le LNE pour envoi aux participants. Cette solution représente le premier niveau de raccordement métrologique et permet d'assurer les bases de la comparabilité des données de mesure.

Elle contient trois molécules : oxazépam, diclofénac et carbamazépine. La concentration nominale est de 50 µg/l.

Pour chaque composé une solution a été préparée par gravimétrie, à partir d'un produit pur, à une concentration d'environ 1,2 mg/g. A partir de ces solutions individuelles, 200 ml d'une solution contenant les 3 résidus médicamenteux sélectionnés ont été préparés, par gravimétrie, à une concentration de 5 mg/L dans l'acétone.

Cette solution a été répartie dans différents flacons ambrés numérotés, identifiés et contenant chacun environ 1 ml de solution. L'ensemble de ces matériaux d'essai a été stocké, à l'abri de la lumière et dans des conditions de température maîtrisées (congélateur -18 °C). 40 flacons de solution de référence numérotés et emballés individuellement dans des sachets « bulle », ont été envoyés au BRGM le 5 octobre 2011. A réception le 6 octobre 2011, ces flacons ont été mis au congélateur (-20 °C) jusqu'à la préparation des colis. 10 flacons ont été renvoyés au LNE par le BRGM afin d'évaluer la stabilité des solutions de référence au cours du transport.

Les incertitudes ont été évaluées à partir de l'incertitude liée à l'analyse quantitative, à l'étude d'homogénéité (intra et inter flacons) et à l'étude de stabilité à court terme (transport) et stabilité à moyen terme (période d'ouverture de l'exercice) en suivant le calendrier (Illustration 10).

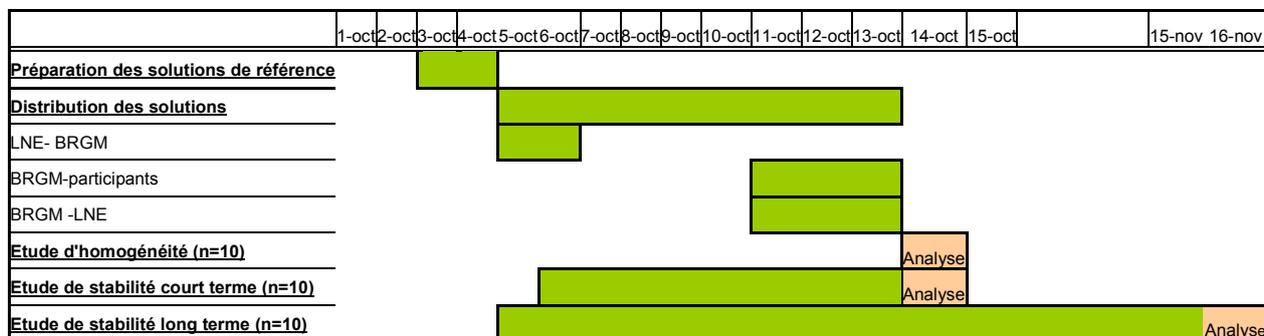


Illustration 10 : Chronogramme pour la réalisation des essais concernant la solution de référence.

Les études réalisées sur la solution de référence permettent de conclure à :

- l'homogénéité intraflacon et interflacons de la solution de référence ;
- la stabilité des analytes en solution et le respect de l'intégrité de la solution de référence au cours du transport ;
- la stabilité des analytes en solution dans les conditions de stockage spécifiées au cours de la période de déroulement de l'essai d'intercomparaison.

L'illustration 11 présente les valeurs de la solution de référence et incertitude type associé pour chacun des trois résidus médicamenteux retenus.

	Concentration (µg/ml)	Incertitude type (µg/ml)	Incertitude relative (%)
Carbamazépine	4913,03	290	5,9
Diclofénac	5281,48	180	3,4
Oxazépam	4957,48	330	6,7

Illustration 11: Valeurs de référence de la solution de vérification instrumentale.

3.3.3 - Réalisation des analyses par les participants

Les colis ont été réceptionnés par les laboratoires le mercredi 12 octobre. L'essai s'est déroulé jusqu'au 16/11/2011, avec instruction de réaliser les extractions dans les 2 jours suivant la réception pour les hormones et dans les 3 jours suivant la réception pour les médicaments.

Les participants ont reçu les consignes pour l'analyse des échantillons dans les documents fournis en amont de la date de l'essai.

Aucune méthode d'extraction ou d'analyse n'était imposée. Le prétraitement des échantillons était également laissé à l'appréciation du laboratoire ; toutefois, il était précisé que les échantillons ne doivent pas être filtrés avant analyse.

La détermination en double des deux flacons fournis par type d'échantillon a été demandée afin de réaliser une évaluation de la répétabilité et un contrôle de l'homogénéité du lot préparé.

Les résultats ont été codés pour assurer l'anonymat des laboratoires participants.

3.3.4 - Contrôle de lot pendant l'essai

L'homogénéité et la stabilité des matériaux pendant l'essai interlaboratoire ont été vérifiées :

- d'une part par des contrôles menés par le BRGM pour les médicaments et par l'IRSTEA pour les hormones : la stabilité des échantillons a été vérifiée pour les lots 2 et 3 en analysant les composés le jour de la réception des colis par les laboratoires (12/11/2011) et le jour déterminé comme fin de période raisonnable (15/11/2011 pour les médicaments, 14/11/2011 pour les hormones), avec vingt flacons issus aléatoirement des lots préparés pour l'essai ;
- et d'autre part par l'étude de la répartition des résultats des participants en fonction des dates de début de traitement des échantillons déclarées pour les 3 lots, et par l'étude des écarts entre flacons d'un même lot observés par les participants.

Les deux contrôles montrent que globalement les échantillons étaient suffisamment stables et homogènes pour être employés dans un essai interlaboratoire.

Cependant on constate des instabilités pour les hormones et l'ibuprofène, détaillées ci-dessous.

Pour les hormones, les résultats de l'étude de stabilité du lot 2 pour l'estrone, seule hormone supplémentée pour ce lot, montrent que ce lot s'est révélé stable (illustration 12). En effet, les concentrations retrouvées 2 et 3 jours après le dopage sont identiques et non significativement différentes de la valeur nominale de dopage de 2,2 ng/L.

n=5	Concentration en estrone (ng/L)					Moyenne (ng/L)	Ecart-type
	1	2	3	4	5		
J1 (J0 + 2) Flacons C	2,0	2,2	2,0	1,9	2,1	2,1	0,1
J2 (J0 + 3) Flacons D	2,0	1,9	2,0	2,2	2,1	2,1	0,1

Illustration 12 : Résultats du dosage de l'estrone dans le lot 2 (valeur nominale = 2,2 ng/L) réalisé à l'IRSTEA.

Pour le lot 3 (Illustration 13), on constate que la 17- α éthinylestradiol paraît globalement stable sur les 3 jours de l'étude. En revanche une instabilité rédhibitoire a été mise en évidence pour le 17- α estradiol et le 17- β estradiol ; la dégradation conjointe de ces deux molécules correspond à la formation d'estrone initialement absente du lot 3 (Illustration 14). Ce comportement avait été relevé lors de l'étude préliminaire.

Cette instabilité, dégradation des 17- β estradiol et 17- α estradiol en estrone, entraîne pour l'essai une impossibilité de traiter les paramètres estrone et 17- β estradiol dans le lot 3.

Pour le suivi environnemental de ces composés, le problème du délai entre le prélèvement et l'analyse est crucial et il apparaît impossible de doser ces composés sans un prétraitement préalable de l'échantillon afin de le stabiliser.

Date de l'analyse	Molécule	Concentration					Moyenne	CV (%)	Différence avec concentration nominale initiale (ng/L)
		Flacon 1	Flacon 2	Flacon 3	Flacon 4	Flacon 5			
J1 (J0 + 2 j)	Estrone	36,6	35,7	38,2	36,2	31,3	35,6	7	35,6
	17- α éthynilestradiol	34,7	33,2	34,3	35,8	31,7	33,9	5	-1,7
	17- α estradiol	14,7	19,2	18,1	16,8	20,2	17,8	12	- 15,3
	17- β estradiol	11,6	13,4	12,0	11,4	15,6	12,8	14	-21,0
	17- α estradiol+17- β estradiol	26,3	32,6	30,1	28,2	35,8	30,6	12	-36,3
J2 (J0 + 3 j)	Estrone	43,8	49,0	34,7	46,4	39,9	42,7	13	42,7
	17- α éthynilestradiol	34,8	32,1	33,7	34,6	31,0	33,2	5	-2,4
	17- α estradiol	14,0	12,4	20,7	9,3	19,1	15,1	31	-18,0
	17- β estradiol	9,9	5,9	12,8	7,0	11,2	9,3	31	-24,5
	17- α estradiol+17- β estradiol	23,8	18,3	33,5	16,2	30,2	24,4	31	-42,5

Illustration 13 : Résultats du dosage des hormones pour le lot 3 (niveau haut) pour l'étude de stabilité réalisée à l'IRSTEA, pendant l'essai interlaboratoires ; J0 = jour du dopage.

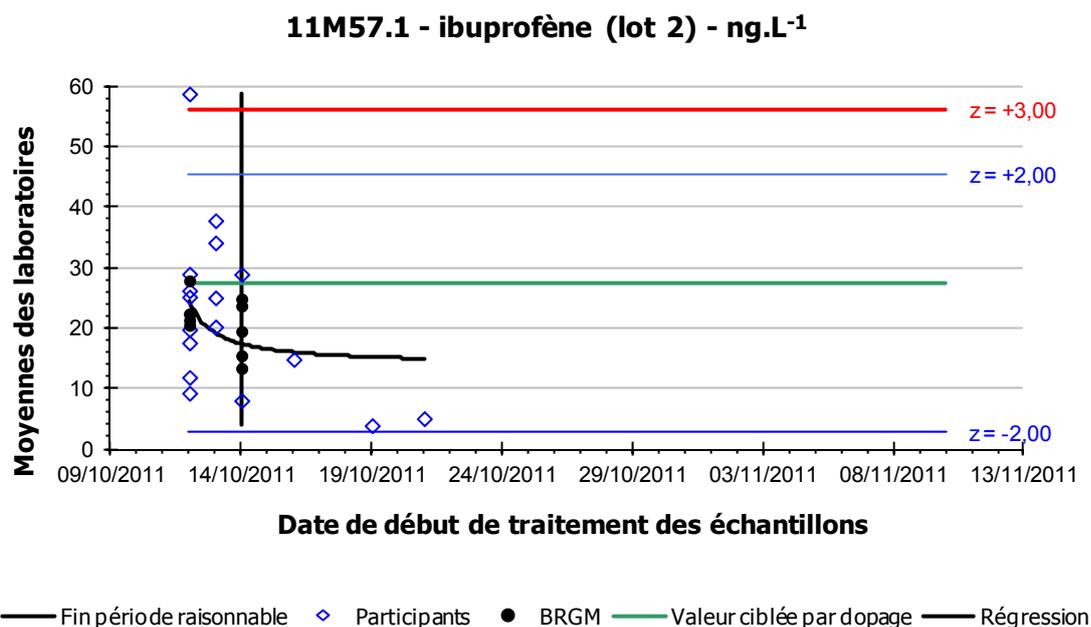


Illustration 16 : Résultats des participants et du contrôle de lot, pour l'ibuprofène dans le lot 2.

L'instabilité pour l'ibuprofène et la 17- β estradiol identifiée dans cet essai n'avait pas été rencontrée dans l'essai AFSSA en 2009. Les différentes pistes ont été explorées mais il n'a pas été possible de dégager une hypothèse satisfaisante pour expliquer cette différence.

Le rapport de l'essai européen PT-WFD de 2011 sur les résidus de médicaments [Ludwig-Baxter, 2012] examiné dans le cadre de ce rapport (voir § 5), précise que l'eau de surface naturelle utilisée a été préalablement filtrée à 0,1 μm et autoclavée afin de supprimer les phénomènes d'instabilité de certains composés observés lors des pré-tests.

Il semble donc que des phénomènes soient encore mal maîtrisés pour ces composés, ce qui laisse présager des difficultés pour leur analyse de ces composés dans des eaux plus chargées en matières en suspension.

4 - Résultats des participants

Les résultats de l'essai ont été traités par AGLAE et communiqués aux laboratoires sous la forme d'un récapitulatif des résultats le 21 novembre 2011, d'un rapport complet le 1^{er} août 2012 (Rapport de comparaisons interlaboratoires 11M57.1), puis une réunion de restitution s'est tenue le 17 septembre 2012 en présence de tous les acteurs de cet essai. Le rapport complet est joint en annexe 2.

Le traitement des résultats a fait appel aux méthodes suivantes : guide ISO 43 décrivant les lignes directrices de mise en œuvre des essais d'aptitude, guide ISO 35 détaillant les principes généraux et statistiques de détermination d'une valeur de référence, et norme ISO 5725 pour la justesse et la fidélité des résultats et méthodes de mesure. L'expression des performances analytiques des laboratoires a été réalisée selon la norme ISO 13528. Le traitement statistique des données toutes méthodes confondues n'a pas été perturbé par d'éventuels écarts entre méthodes.

4.1 - VALEURS OBSERVÉES PAR L'ENSEMBLE DES PARTICIPANTS

L'étude de stabilité (§ 3.3.4) a montré l'impossibilité de traiter les résultats pour l'ibuprofène dans les lots 1 et 3 et pour l'estrone et la 17- β estradiol dans le lot 3.

Le lot 1 n'était pas dopé, mais les dosages initiaux au BRGM et à l'IRSTEA ont montré la présence de carbamazépine (10 ng/l), oxazépam (13 ng/l), sulfaméthoxazole (7 ng/l) et diclofénac (12 ng/l). Les laboratoires ayant pour consignes de fournir des valeurs numériques, même en dessous de leur limite de quantification, des quantifications ont été fournies et traitées. Les concentrations dans ce lot (concentrations initiales dans la matrice) ont été calculées :

- à partir des résultats des participants (moyennes observées) pour la carbamazépine, l'oxazépam et le sulfaméthoxazole ;
- par régression linéaire en ajouts dosés sur les résultats des lots 2 et 3 pour l'aténolol, le diclofénac, le kétoprofène et le métoprolol, car les valeurs rendues étaient inférieures aux limites de quantification des participants ;
- par l'IRSTEA pour les hormones, puisque un seul avait été dopé.

Ces valeurs sont reportées dans l'illustration 17 qui récapitule pour chacun des paramètres des lots dopés (lots 2 et 3) : les concentrations initiales dans l'eau souterraine, les valeurs ciblées par dopage, l'incertitude élargie ($k=2$) sur la valeur ciblée par dopage, la valeur retrouvée par les participants avec son incertitude élargie ($k=2$), l'écart relatif entre la valeur ciblée par dopage et la valeur observées par les participants et indique finalement si cet écart est significatif en tenant compte des incertitudes.

Paramètre	Concentration initiale dans la matrice	Valeur ciblée par dopage ⁽¹⁾	Incertitude élargie sur la valeur ciblée par dopage	Valeur observée par les participants	Incertitude élargie sur la valeur observée par les participants	Ecart à la cible en % (m-cible)/cible	Valeur ciblée par dopage retrouvée ?
Lot n°2 – Dopage bas (ng/l)							
Carbamazépine	19,52	40,25	± 2,66	41,803	± 4,295	+4 %	OUI
Oxazépan	22,32	42,59	± 2,77	42,862	± 4,672	+1 %	OUI
Sulfaméthoxazole	9,05	29,69	± 1,22	28,826	± 2,090	-3 %	OUI
Ibuprofène	6,70	27,25	± 1,79	24,013	± 7,132	-12 %	OUI
Diclofénac	3,70	23,84	± 6,12	24,201	± 3,333	+1 %	OUI
Kétoprofène	2,82	23,04	± 5,02	25,740	± 5,075	+12 %	OUI
Aténolol	2,48	22,69	± 4,97	22,042	± 2,804	-3 %	OUI
Métoprolol	4,56	24,85	± 6,61	25,766	± 3,705	+4 %	OUI
estrone	<0,4	2,23	± 0,23	1,7414	± 2,075	-22 %	OUI
Lot n°3 – Dopage haut (ng/l)							
Carbamazépine	19,52	115,90	± 2,92	120,910	± 12,006	+4 %	OUI
Oxazépan	22,32	119,26	± 3,02	118,786	± 14,291	+0 %	OUI
Sulfaméthoxazole	9,05	105,03	± 1,71	100,633	± 8,782	-4 %	OUI
Ibuprofène	6,70	100,79	± 2,14	56,389	± 15,918	-44 %	NON
Diclofénac	3,70	99,21	± 6,24	98,880	± 16,816	+0 %	OUI
Kétoprofène	2,82	96,98	± 5,16	101,986	± 9,800	+5 %	OUI
Aténolol	2,48	90,33	± 5,09	88,912	± 8,614	-2 %	OUI
Métoprolol	4,56	100,53	± 6,72	104,585	± 16,922	+4 %	OUI
17- α éthinylestradiol	<1,2	35,584	± 0,82	35,1680	± 8,830	-1 %	OUI
17- β estradiol	<0,6	33,126	± 0,54	11,7940	± 5,383	-64 %	NON
17- α estradiol	<0,4	33,825	± 0,49	<i>Molécule pas analysée par les participants</i>			

Illustration 17 : Concentrations initiales dans l'eau souterraine, valeurs ciblées par dopage, incertitude élargie ($k=2$) sur la valeur ciblée par dopage, valeur retrouvée par les participants avec son incertitude élargie ($k=2$), écart relatif entre la valeur ciblée par dopage et valeur observées par les participants, pour les lots dopés. L'unité est le ng/l.

4.2 - PERFORMANCES DE LA PROFESSION

La performance de la profession peut être représenté par le calcul du coefficient de variation de reproductibilité (CV_R), obtenu à partir de la moyenne des valeurs des participants (valeur de référence, m) et de son écart-type.

Pour le lot 1 (non dopé), les résultats des participants n'ont pas pu être exploités pour plusieurs paramètres car les teneurs étaient trop basses pour que suffisamment de laboratoires détectent les molécules : aténolol, diclofénac, kétoprofène, métoprolol, estrone, 17- α éthinylestradiol et 17- β estradiol. Pour ces composés le coefficient de variation n'a donc pas pu être calculé. Il a toutefois pu être observé qu'un laboratoire avait rendu des faux positifs sur cet échantillon pour le kétoprofène et le 17- β estradiol dont les teneurs étaient assimilables à « zéro ». Précisons qu'un deuxième laboratoire a montré un faux positif pour le 17- β estradiol dans le lot 2 dont la teneur pour cette molécule était également assimilable à zéro.

Les coefficients de variation observés (CV_R) qui ont pu être calculés sont reportés dans l'illustration 18, pour les 3 lots.

Ils sont globalement de l'ordre de 20 % pour le niveau de concentration de 100 ng/L (lot 3) et de l'ordre de 25 % pour le niveau de concentration de 25 ng/L (lots 1 et 2). Ces valeurs s'inscrivent dans la lignée des

dosages de micropolluants organiques plutôt reproductibles. Ces niveaux de concentration sont donc mesurables par la profession.

En revanche, vouloir doser des valeurs très basses pour les médicaments (< 10 ng/l) et pour les hormones (≈ 2 ng/l) apparaît utopique à l'échelle interlaboratoires, comme le montrent les résultats obtenus sur le lot 2 et sur le lot 1 (§ 4.1 et tableaux des annexes du rapport 12M57.1 en annexe 2).

Lot n°1	Carbamazépine	Oxazépan	Sulfaméthoxazole
m ⁽¹⁾	19,521	22,322	9,054
R ⁽²⁾	14,44	11,99	6,03
CV _R % ⁽³⁾	26,0	19,0	23,5
unité	ng/L	ng/L	ng/L

Lot n°2	aténolol	carbamazépine	diclofénac	ibuprofène
m ⁽¹⁾	22,042	41,803	24,201	24,013
R ⁽²⁾	15,01	23,69	16,67	29,75
CV _R % ⁽³⁾	24,0	20,0	24,5	44,0
unité	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L

	kétoprofène	métoprolol	oxazépan	sulfaméthoxazole
m ⁽¹⁾	25,740	25,766	42,862	28,826
R ⁽²⁾	22,33	19,47	20,56	9,51
CV _R % ⁽³⁾	30,5	26,5	17,0	11,5
unité	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L

Lot n°3	aténolol	carbamazépine	diclofénac	kétoprofène
m ⁽¹⁾	88,912	120,910	98,880	101,986
R ⁽²⁾	44,95	66,32	87,58	52,83
CV _R % ⁽³⁾	18,0	19,5	31,5	18,5
unité	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L

	métoprolol	oxazépan	sulfaméthoxazole	17-α éthynilestradiol
m ⁽¹⁾	104,585	118,786	100,633	35,1680
R ⁽²⁾	89,99	62,70	46,23	35,173
CV _R % ⁽³⁾	30,5	18,5	16,0	35,5
unité	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L

⁽¹⁾ : niveau de concentration exprimé dans l'unité du paramètre

⁽²⁾ : reproductibilité R exprimée dans l'unité du paramètre

⁽³⁾ : coefficient de variation de la reproductibilité exprimé en %

Illustration 18 : Valeurs de fidélités obtenues dans l'essai (AGLAE).

Le calcul du rapport R/r des tableaux de valeurs de fidélité renseigne sur un éventuel effet « laboratoire ». R/r est le rapport de l'écart-type de reproductibilité s_R sur l'écart-type de répétabilité s_r. Ainsi :

- R/r = 1 signifie que la reproductibilité est réduite à la répétabilité ; il n'y a pas d'effet interlaboratoires ;
- R/r = 2 (par exemple) signifie que les données sont deux fois plus dispersées entre laboratoires qu'au sein du même laboratoire.

L'examen du rapport R/r des tableaux de valeurs de fidélité révèle un effet « laboratoire » raisonnable.

Très empiriquement, on considère que globalement les valeurs de $R/r < 4$ sont des valeurs normales difficilement améliorables. Lorsque les valeurs sont plus élevées, il peut être intéressant de mener une intercalibration visant à homogénéiser les pratiques analytiques ; l'objectif est alors de réduire l'erreur systématique.

Les valeurs observées au cours de cet essai se situent autour de 4,5 avec des valeurs basses pour l'oxazépam ($R/r \approx 2,5$) et la 17- α éthinylestradiol ($R/r = 3,5 - 1$ seule valeur sur le lot 3) et des valeurs élevées pour le métoprolol ($R/r \approx 7,5$).

Mis à part le cas du métoprolol, il n'est pas sûr que dans l'immédiat on puisse faire mieux que la situation observée ici.

4.3 - PERFORMANCES DE CHAQUE PARTICIPANT

Les performances analytiques de chaque participant ont été évaluées avec des z-scores, des classements qualitatifs de l'exactitude et des zéta-scores.

4.3.1 - Les z-scores

Le z-score caractérise la position du laboratoire par rapport aux performances des laboratoires participants.

Un z-score est égal à $z = \frac{(x - m)}{s_z}$.

Avec

x = moyenne des résultats du laboratoire, m = moyenne générale de l'essai et
S_z = Ecart-type de dispersion des résultats moyens des laboratoires.

Le résultat est d'autant plus satisfaisant que le z-score est proche de 0. Inversement, plus le z-score s'écarte de 0, moins le résultat est satisfaisant.

Les résultats qui s'écartent de $\pm 2S_z$ de la valeur de référence m sont jugés comme discutables, ceux qui s'écartent de $\pm 3S_z$ sont jugés comme non satisfaisants :

$ z < 2$	Résultat non différent de l'ensemble des autres
$2 \leq z < 3$	Résultat légèrement différent de l'ensemble des autres
$3 \leq z $	Résultat notablement différent de l'ensemble des autres

Le signe du z-score :

- + le laboratoire a tendance à majorer le résultat.
- le laboratoire a tendance à minorer le résultat.

Les z-scores des laboratoires participants sont indiqués dans l'illustration 19 pour les 3 lots.

Résultats de l'essai inter-laboratoires « résidus de médicaments dans les eaux »

Code Laboratoire	Carbamazépine (lot 1)	Oxazépam (lot 1)	Sulfaméthoxazole (lot 1)	aténolol (lot 2)	carbamazépine (lot 2)	diclofénac (lot 2)	ibuprofène (lot 2)
1	+0,11	+0,61	-0,60	-0,37	+0,18	+0,03	-
2	-0,59	-0,53	-1,52	+2,19	-0,62	+0,25	-1,14
3	+1,40	-	+5,87	+0,23	+1,81	+1,00	+1,29
4	+0,25	+1,46	+0,21	-0,72	+0,43	-0,54	-
5	-1,73	-	-2,18	-2,57	-2,07	-	-
6	+1,03	-	-0,18	+0,73	+0,87	-1,48	+0,94
7	+0,20	-0,95	+0,10	+0,01	0,00	+0,11	+0,11
8	+1,43	+1,19	-0,14	+1,24	+0,93	+0,43	+0,46
9	+1,32	-0,90	+0,24	+0,42	+1,47	+0,47	+0,09
10	-1,81	+3,13	-0,63	-1,37	-1,98	-2,74	-
11	-3,01	-1,95	-	-1,70	-3,88	-2,83	-1,89
12	+0,17	-0,57	+1,79	-0,55	-0,20	+1,46	+0,20
13	+21,84	+23,15	+11,32	-	+18,31	+18,70	-
14	-1,02	+0,05	-4,35	+4,05	-0,26	+1,13	-1,50
15	-2,40	-	entre -4,35 et +0,45	-	-3,05	+0,25	-1,78
16	-0,77	-	-	-	-0,65	-	-
17	0,00	-	+0,81	-1,11	-1,13	-	-
18	-1,61	-2,74	-1,13	-2,22	-2,01	-1,57	-0,86
19	-0,68	-	-0,23	-0,74	-0,52	-1,87	-1,38
20	-0,57	+0,29	+0,09	+14,21	-0,80	+1,60	-0,61
21	+2,03	-	-0,64	-0,04	+1,59	0,00	-
22	-0,26	-	entre -4,35 et +0,45	-0,93	-0,04	+0,27	-
23	-0,12	-	+1,85	-	-0,97	-1,34	-
24	+9,27	-	+8,14	+2,72	+12,53	+18,15	-0,36
25	-	-	-	-	-	-	-
26	+0,60	-0,21	+0,70	+0,04	+0,36	+0,05	-
27	entre -3,93 et +0,10	entre -5,61 et +6,96	entre -4,35 et +5,26	+0,32	-0,82	entre -4,16 et -0,72	-
28	-0,81	-	-2,07	+13,27	-1,43	-0,42	-
29	-0,05	-	-	-0,60	+0,24	-	-
30	+0,88	-	-1,40	-2,06	+1,61	entre -4,16 et -2,44	entre -1,64 et -1,40
31	-0,51	-0,65	+0,09	-0,88	-0,52	-0,81	-0,40
32	-0,95	-1,02	+1,21	-0,09	-1,39	-0,05	+0,45
33	-1,02	-	-1,15	-	+4,98	-1,79	+3,25

Synthèse des z-scores (laboratoires 1 à 33) - Partie 1/3

Résultats de l'essai inter-laboratoires « résidus de médicaments dans les eaux »

Code Laboratoire	kétoprofène (lot 2)	métoprolol (lot 2)	oxazépam (lot 2)	sulfaméthoxazole (lot 2)	aténolol (lot 3)	carbamazépine (lot 3)
1	-0,26	+0,24	+0,92	-0,17	-0,12	+0,20
2	-0,19	+0,81	-0,05	-1,91	-0,52	-1,33
3	+0,57	+1,18	-	+13,00	-0,68	+1,74
4	-0,19	-0,75	-0,73	-0,11	-0,91	+0,63
5	-2,33	-1,99	-	-3,97	-2,66	-1,81
6	+0,25	0,00	-	+0,05	+0,55	+0,47
7	-0,74	-0,48	-0,94	+0,62	+0,23	+0,70
8	+0,82	+0,51	+1,00	-0,18	+3,21	+1,36
9	-0,05	-1,25	-0,08	+0,28	+1,04	+2,31
10	+0,03	-1,73	+6,25	-0,66	-2,27	-1,94
11	-2,10	-2,57	-1,82	-	-2,34	-4,11
12	-0,68	-1,29	-0,70	+1,59	-0,58	-0,05
13	+11,80	+19,03	+17,93	+44,02	-	+24,97
14	-3,27	+0,21	+1,30	-9,21	+6,32	+0,11
15	-1,26	-0,83	-	-5,29	-	-3,12
16	-	-	-	-	-	-0,44
17	-	-	-	-2,19	-	-
18	-1,09	-	-2,90	-1,98	-2,63	-2,08
19	+0,25	+0,46	-	-0,20	-1,03	-0,53
20	-0,55	+6,52	-0,01	+0,58	+0,26	-0,74
21	-0,47	+0,16	-	-1,25	-0,36	+1,22
22	-0,86	-0,48	-	+0,85	+1,11	-0,31
23	-	-1,15	-	+0,45	-	-0,06
24	-	+4,64	-	+15,30	+4,09	+11,65
25	-	-	-	-	-0,87	-2,69
26	-1,68	+0,55	-0,13	+2,29	+2,29	+0,34
27	entre -3,27 et +3,09	-0,57	entre -6,36 et +1,06	-1,73	+0,13	-0,39
28	-0,95	+5,22	-	-5,22	+17,96	-1,62
29	-0,42	+0,51	-	-	-0,27	+0,39
30	-1,82	+0,64	-	-1,68	-0,01	+1,83
31	+0,76	-1,95	-0,72	+0,62	-0,93	-1,05
32	+3,11	-0,31	-1,23	+0,17	+0,35	-1,14
33	+2,73	+5,92	-	+1,36	-	+0,10

Synthèse des z-scores (laboratoires 1 à 33) - Partie 2/3

Résultats de l'essai inter-laboratoires « résidus de médicaments dans les eaux »

Code Laboratoire	diclofénac (lot 3)	kétoprofène (lot 3)	métoprolol (lot 3)	oxazépam (lot 3)	sulfaméthoxazole (lot 3)	17- α éthinylestradiol (lot 3)
1	+0,59	-0,59	+0,77	+0,81	-0,15	+0,33
2	-1,07	-1,32	-0,03	-0,65	-1,77	-
3	+3,31	+1,27	+1,18	-	+7,60	-
4	-0,21	-0,45	-0,38	-0,79	-0,19	+2,58
5	-	-2,62	-1,81	-	-2,40	-
6	-0,97	-0,32	-0,25	-	-0,29	+0,38
7	+0,19	+0,05	-0,14	-0,23	+1,90	+0,13
8	+0,95	+0,92	+1,40	+1,57	+0,84	-0,25
9	+1,16	+0,84	-0,75	+0,32	+0,33	-0,97
10	-1,69	+0,76	-1,40	+3,39	-0,54	-2,32
11	-1,91	-3,41	-2,10	-1,34	-	-1,86
12	-0,03	-0,89	-0,97	-0,50	+0,06	-
13	+9,43	+20,74	+17,97	+23,35	+24,16	entre +3,90 et +7,99
14	+0,93	+1,11	+0,69	+0,67	-6,25	+0,10
15	+0,56	-2,99	-0,61	-	-3,56	-1,68
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-0,81	-1,53	-	-2,48	-1,68	-
19	-0,96	+0,56	+0,84	-	+0,06	-2,21
20	+1,34	-0,68	+0,60	+0,61	+0,54	-
21	-0,10	-0,56	-0,25	-	-0,86	+0,63
22	-0,05	+0,48	-0,38	-	+0,50	-0,57
23	-0,34	-	-0,53	-	-2,54	-
24	+12,36	-	+7,81	-	+12,33	-
25	-0,33	+0,32	-2,65	-	+8,90	entre -2,87 et +1,21
26	+0,60	-2,56	+0,84	-0,06	+0,81	+1,21
27	-0,17	-1,64	-0,26	-1,13	-1,28	-
28	-0,56	-2,13	-	-	-4,22	-
29	-	+0,31	+1,19	-	-	-
30	entre -3,13 et -3,05	-2,45	+1,33	-	-1,13	-
31	-0,43	-0,41	-1,72	-1,28	-0,30	entre -2,87 et +5,30
32	+0,13	+2,39	-0,18	-0,58	+0,07	-
33	-1,80	+0,02	+0,50	-	-3,41	-

Synthèse des z-scores (laboratoires 1 à 33) - Partie 3/3

Illustration 19 : Valeurs des z-scores obtenus par chacun des 33 laboratoires pour hormones et les résidus de médicaments des 3 lots d'échantillons.

Deux laboratoires (13 et 24) présentent pour toutes les molécules des résultats très significativement surestimés. Mais la plupart des laboratoires (55 %) présentent des performances satisfaisantes.

4.3.2 - Les incertitudes et les zéta-scores

Lors de cet essai les laboratoires devaient rendre leurs résultats accompagnés de leurs incertitudes. La grande majorité des laboratoires a rendu une incertitude, ce qui a permis de calculer les incertitudes médianes pour chaque paramètre et pour chaque lot (Illustration 20).

	Lot n° 1 (pas de dopage)	Lot n° 2 (niveau dopage bas)	Lot n° 3 (niveau de dopage haut)
Aténolol	25 %	25 %	20 %
Carbamazépine	25 %	25 %	22 %
Diclofénac	30 %	28 %	23,5 %
Ibuprofène	24 %	24 %	24 %
Kétoprofène	35 %	25 %	25 %
Métoprolol	25 %	22 %	22 %
Oxazépam	25 %	25 %	21 %
Sulfaméthoxazole	27 %	25 %	22 %
Estrone	44 %	44 %	30 %
17- α éthinylestradiol(EE2)	28 %	28 %	29 %
17- β estradiol (Eb2)	17 %	20 %	26 %
Moyenne	28 %	27 %	24 %

Illustration 20 : Incertitudes relatives élargies (k=2) médianes calculées à partir des incertitudes transmises par les laboratoires.

Globalement (à l'échelle de la profession), l'incertitude relative élargie se situe autour de 25 %, avec des valeurs légèrement plus faibles sur le lot 3 plus concentré.

La molécule pour laquelle les incertitudes sont les plus élevées est l'estrone. Les autres hormones, bien qu'ayant des teneurs beaucoup plus basses que les médicaments ont des incertitudes relativement comparables.

À partir de ces incertitudes, les zéta-scores sont calculés pour vérifier la fiabilité des estimations des laboratoires. Le zéta-score caractérise la qualité du bilan d'incertitude et de la capacité avec ce bilan à recouvrir la valeur « vraie ».

Avoir un bon zéta-score et un mauvais z-score indique que le laboratoire a bien identifié et intégré dans ses calculs toutes les sources d'incertitude de son processus analytique. Mais cela n'enlève pas le fait que le résultat d'analyse est trop éloigné de la valeur de référence assignée (relativement à la dispersion des résultats des participants). Cependant, le travail d'identification des sources d'erreur réalisé lors du calcul de l'incertitude de mesure doit pouvoir permettre au laboratoire d'identifier sur quelle partie de l'analyse les actions correctives doivent être menées.

En moyenne, le pourcentage de zéta-scores supérieurs à 2 en valeur absolue est de 36 % : 9 laboratoires sont concernés en moyenne. Ce pourcentage relativement élevé indique que la profession ne maîtrise pas encore totalement son incertitude de mesure. Les estimations faites par les laboratoires de leur propre incertitude de mesure ne sont pas toujours très fiables ; en moyenne, 1 laboratoire sur 3 sous-estime ses incertitudes. Mais on peut gager que la situation évolue rapidement avec notamment la participation régulière à des campagnes d'essais interlaboratoires.

5 - Traitement général des données et comparaison avec l'essai AFSSA 2009

En plus du traitement statistique d'AGLAE, les résultats et les métadonnées renseignées par les laboratoires ont été exploités en vue d'obtenir des informations sur la pratique de la profession. Une comparaison de ces informations avec celles relevées lors du premier essai interlaboratoires de 2009 organisé par l'Anses a été réalisé [Py, 2010]. De la même façon lorsque cela a été possible, les informations sont confrontées à celle de l'essai interlaboratoire européen PT-WFD qui a été réalisé en novembre 2011 [Ludwig-Baxter, 2012]. Cet essai a réuni 35 laboratoires issus de 3 pays (Allemagne 35, Hongrie 2, Finlande 1 – mais 28 seulement ont fourni des résultats) mais aucun laboratoire français, et portait sur l'analyse de 11 résidus de médicaments dans une eau de surface dont quatre composés communs à notre essai (carbamazépine, diclofénac, ibuprofène et sulfaméthoxazole).

Les points détaillés ci-après ont été présentés lors de la réunion de restitution afin d'en discuter et d'obtenir plus de précisions. Cependant, peu de commentaires ou réponses supplémentaires ont été apportés aux questions posées en vue d'aider au traitement des données de la part des 12 laboratoires qui se sont rendus disponibles pour être présents. En revanche les laboratoires ont fait part de l'absence de commande pour l'analyse des résidus de médicaments. Cela peut expliquer en partie l'absence de certaines informations demandées, telles que les quelques incertitudes manquantes, les laboratoires n'ayant pas eu le besoin de valider les méthodes pour tous les paramètres.

5.1 - NOMBRE DE PARTICIPANTS

Le nombre de participants, à savoir les organismes inscrits ayant rendus des résultats, est de 33 avec 91 % d'organismes nationaux. Cette participation est identique à celle de l'essai AFSSA de 2009 qui comptait 32 participants avec 91 % de laboratoires français. Le nombre de laboratoires étrangers est identique (3 laboratoires). 18 laboratoires nationaux ont participé à ces deux essais.

5.2 - PERFORMANCES DES LABORATOIRES

Par rapport à l'essai AFSSA de 2009, les niveaux de dopages de 2011 encadrant le niveau de dopage de 2009, on peut conclure que les coefficients de variation en 2011 sont plus faibles pour l'aténolol et la carbamazépine ou identiques pour le kétoprofène et le diclofénac (Illustration 21).

Il est difficile de se prononcer pour la 17- α éthinylestradiol car les 2 niveaux de dopage sont trop différents.

Pour interpréter le dosage des hormones du lot 3, on peut éventuellement se référer à une nouvelle valeur cible pour l'estrone correspondant à celle obtenue à J0 +2 (qui englobe la majeure partie des participants dans le cas du dosage des hormones) soit 35,6 ng/L d'estrone. La moyenne de valeurs obtenues par les participants (valeurs prises comme étant supérieures aux LQ renseignées par les participants et non aberrantes), est de 37,2 ng/L avec un CV_R de 43 %, légèrement supérieur à ceux obtenus en 2009.

Pour la 17 α éthinylestradiol, les résultats de 2009 avaient été particulièrement « bons » pour le niveau haut (CV_R = 16 %). En 2011, on observe un CV inter de 36 % bien que dans ce cas il n'y ait pas de dégradation.

Eau brute	Aténolol	Carbamazépine	Diclofénac	Ibuprofène	Kétoprofène	17 β estradiol	17 α éthinil estradiol
Dopage (ng/l) 2009	50	60	60	60	60	80	80
Moyenne (ng/l) 2009	59,1	71,3	68,8	68,8	74,6	88,6	83,9
Nombre de labos 2009	19	22	20	17	19	15	13
CV 2009	39%	30%	33%	28%	31%	37%	16%
Dopage (ng/l) 2011	90,3	115,9	99,2	100,8	97,0	33,1	35,6
Moyenne 2011	88,9	120,9	98,9	56,4	102,0	11,8	35,2
nb labos 2011	27	32	29	18	29	14	17
CV 2011	18%	20%	32%	instabilité	19%	instabilité	36%
Dopage (ng/l) 2011	22,7	40,3	23,8	27,3	23,0		
Moyenne (ng/l) 2011	22,0	41,8	24,2	24,0	25,7		
Nombre de labos 2011	27	32	28	18	28		
CV 2011	24%	20%	25%	44%	31%		

Illustration 21 : Niveau de dopage, moyenne des participants, coefficients de variation et nombre de laboratoires des essais Aquaref 2011 et AFSSA 2009.

On peut conclure globalement que les performances des laboratoires se sont améliorées entre 2009 et 2011.

Dans l'essai européen [Ludwig-Baxter, 2012], les coefficients de variation se situent entre 10 et 35 % selon les molécules, pour des niveaux concentrations de 110 à 400 ng/L, donc plus élevés que dans les deux essais français. Pour les molécules et des niveaux de concentration équivalents, les coefficients de variation sont compris entre 10 et 21 % (Illustration 22). Il faut préciser que l'essai a été réalisé avec une eau de surface naturelle mais préalablement filtrée.

Ces valeurs sont globalement du même ordre de grandeur que celles observées dans le présent essai.

Eau filtrée (0,1 μ m)	Carbamazépine	Ibuprofène	Ibuprofène	Sulfaméthoxazole
Moyenne (ng/l)	126	139	114	158
Nombre de labos	25	24	20	21
CV	10%	21%	19%	18%

Illustration 22 : Moyenne des participants, coefficient de variation et nombre de laboratoires de l'essai PT-WFD 2011, pour les molécules et les niveaux de concentration communs à l'essai Aquaref 2011.

5.3 - MOLÉCULES ANALYSÉES PAR LES LABORATOIRES

Parmi les 33 laboratoires, 18 (55 %) ont analysé les deux familles, hormones et résidus de médicaments, (tout ou partie des composés) et 15 (45 %) ont analysé les résidus de médicaments uniquement (1 à 8 composés).

Lors de l'essai AFSSA 2009, le nombre de laboratoires ayant analysé uniquement les médicaments était identique (40 et 45 % selon les échantillons) et 10 % des participants n'avaient recherché que les hormones. Le nombre de laboratoires ayant recherché les 2 familles a donc un peu augmenté en 2011 (18 contre 15 en 2009).

Parmi les 11 molécules, la carbamazépine a été quantifiée par tous les laboratoires (dans au moins un flacon, mais pas forcément dans les deux échantillons). C'était également la molécule la plus largement analysée en 2009 (illustration 23).

Pour les autres résidus de médicaments, la majorité des laboratoires a quantifié le métoprolol, le sulfaméthoxazole, le diclofénac, le kétoprofène et l'aténolol (85 à 91 % des laboratoires selon les molécules). En revanche, seulement 55 et 58 % des participants ont recherché l'oxazépam et l'ibuprofène, respectivement.

Les hormones ont été quantifiées par 42 à 52 % des laboratoires.

Par rapport à 2009, le nombre de laboratoires capables de rechercher ces molécules a largement augmenté, notamment pour les résidus pharmaceutiques.

	EIL 2011	EIL 2009
Par famille de composés		
Famille des médicaments	45%	40 et 45%
Familles de hormones	0%	10%
Les deux familles	55%	50 et 45%
Par molécule		
Carbamazépine	100%	72%
Métoprolol	91%	-
Sulfaméthoxazole	91%	-
Diclofénac	88%	63%
Kétoprofène	88%	59%
Aténolol	85%	59%
Ibuprofène	58%	53%
Oxazépam	55%	-
17 a éthinyl estradiol	52%	47%
Estrone	48%	-
17 b estradiol	42%	50%

Illustration 23 : Nombre de laboratoires ayant recherché les composés de l'essai dans au moins un échantillon d'eau, dans l'essai 2011 (33 participants) et l'essai 2009 (32 participants) ; (-) molécule absente de l'essai.

5.4 - MÉTHODES D'ANALYSES

Pour les 3 hormones, les 18 laboratoires ont appliqué chacun une seule et même technique analytique (LC ou GC), à l'exception d'un laboratoire qui a analysé l'estrone d'une part (GC/MSMS) et la 17-β estradiol et 17-α éthinylestradiol d'autre part (LC/MSMS).

Pour les résidus de médicaments les 33 laboratoires ont employé une seule et même technique pour toutes les molécules analysées, à l'exception d'un seul laboratoire qui a employé deux techniques, une pour l'ibuprofène (L/L et GC/MS) et une autre pour les 7 autres composés (SPE en ligne et LC/MSMS).

Pour l'ensemble des 11 composés, un maximum de 3 techniques a été déployé par un laboratoire. Deux laboratoires ont employé 2 techniques tandis que les autres (15 laboratoires) n'ont mis en œuvre qu'une seule et même technique.

La méthode de détermination largement majoritaire parmi les participants, pour toutes les molécules, est la chromatographie en phase liquide, LC/MSMS. Seuls 2 laboratoires sur les 33 ont employé la chromatographie en phase gazeuse ; les 2 ont employé la GC/MSMS pour le dosage des hormones et un seul des 2 a employé la GC/MS pour le dosage de l'ibuprofène.

En 2009 la technique LC/MSMS était également la plus répandue parmi les laboratoires participants.

Cette technique est également la plus pratiquée par les laboratoires européens ; l'essai PT-WDF [Ludwig-Baxter, 2012] a montré que seuls 3 laboratoires sur les 28 ayant rendu des résultats pratiquent la GC/MS pour la carbamazépine, le diclofénac, l'ibuprofène et le naproxène

5.5 - MÉTHODES D'EXTRACTION

La technique d'extraction la plus utilisée par les laboratoires est une extraction sur cartouche (extraction solide liquide S/L) suivie d'une quantification par LC/MSMS, quelles que soient les molécules (Illustration 24). Cette pratique concerne plus de 60 % des laboratoires.

La technique d'extraction sur cartouche en ligne couplée à la LC/MSMS est utilisée par 14 à 25 % des laboratoires selon les résidus de médicaments, mais très peu pour les hormones.

L'injection directe (avec analyse par LC/MSMS) est pratiquée par 10 % environ des laboratoires pour l'ensemble des composés.

En revanche, dans l'essai européen, la méthode par injection directe est largement plus employée : elle est appliquée pour toutes les molécules et jusqu'à 70 % des laboratoires et par 52 à 60 % des laboratoires pour les 4 molécules communes à notre essai. Précisons que les concentrations des échantillons sont plus élevées que celles des 2 essais français, de 110 à 400 ng/L, avec une exigence de limite de quantification à 25 ng/L.

	SPE et LC/MSMS	SPE en ligne LC/MSMS	Injection directe en LC/MSMS	SPE en ligne et LC/QTOF	SPE et LC/MS	L/L et LC/MSMS	Extraction L/L et GC/MS	Extraction L/L et GC/MSMS
Aténolol	61%	25%	11%	4%				
Carbamazépine	64%	21%	9%	3%	3%			
Diclofénac	66%	21%	10%	3%				
Ibuprofène	69%	5%	16%	5%			5%	
Kétoprofène	66%	21%	10%	3%				
Métoprolol	69%	17%	10%	3%				
Oxazépam	67%	22%	6%	6%				
Sulfaméthoxazole	68%	16%	13%	3%				
17 b estradiol	67%	7%	12%			7%		7%
17 a éthyne estradiol	72%	6%	10%			6%		6%
Estrone	70%	6%	12%					12%

Illustration 24 : Méthodes d'extraction et d'analyses utilisées par les participants pour l'analyse des différents composés dans les échantillons d'eaux de l'essai 2011.

5.6 - ÉTALON INTERNE

5.6.1 - Nombre d'étalons internes

La majorité des laboratoires utilise un étalon interne, 64 à 79 % selon les molécules (illustration 25). La pratique la plus répandue est l'ajout des étalons internes dès l'extraction : 70 à 80 % des laboratoires pour les résidus de médicaments et 83 à 91 % pour les hormones.

Résultats de l'essai inter-laboratoires « résidus de médicaments dans les eaux »

	Emploi d'un Standard Interne	Dès l'extraction	A l'analyse	Analogue marqué	Analogue marqué même famille	Autre molécule marquée	Nature du SI non précisée
Aténolol	64%	78%	22%	28%	50%	17%	6%
Carbamazépine	76%	80%	20%	40%	40%	12%	8%
Diclofénac	76%	77%	23%	32%	50%	9%	9%
Ibuprofène	74%	71%	29%	64%	29%	7%	0%
Kétoprofène	76%	77%	23%	41%	36%	14%	9%
Métoprolol	79%	76%	24%	5%	71%	14%	10%
Oxazépan	76%	69%	31%	23%	54%	15%	8%
Sulfaméthoxazole	77%	78%	22%	30%	48%	13%	9%
17 b estradiol	67%	90%	10%	30%	20%	40%	10%
17 a éthynil estradiol	71%	83%	17%	25%	25%	42%	8%
Estrone	69%	91%	9%	36%	9%	45%	9%

Illustration 25 : Pourcentage des laboratoires participants utilisant un étalon interne, dès l'extraction ou au moment de l'analyse, et type de composé employé : l'analogue de la molécule analysée, ou un composé de la même famille (médicament pour la famille des 8 résidus de médicaments ou hormone pour la famille des 3 hormones) ou autre composé.

Le nombre d'étalons internes varie considérablement d'un laboratoire à l'autre pour un même nombre de molécules analysées.

Pour les médicaments, la pratique généralisée est plutôt de 1 à 2 étalons internes, même pour une recherche de 7 à 8 composés (Illustration 26). Cependant 7 laboratoires, soit 23 % des participants, n'emploient aucun étalon interne pour les résidus de médicaments et analysent de 3 à 8 résidus.

Pour les hormones, 5 laboratoires (28 % des participants) n'emploient aucun étalon interne alors qu'ils dosent les 3 hormones (illustration 27).

Molécules	SI	8	7	6	5	4	3	2	1	0	totaux
8		1	1	1				2	2	2	9
7			1			2		1	3	3	10
6					1			3	2	1	7
5										1	1
4						1			1		2
3											0
2											0
1									1		1
totaux		1	2	1	1	3	0	6	9	7	

Illustration 26 : Nombre de laboratoires analysant de 1 à 8 résidus de médicaments en fonction du nombre d'étalons internes utilisés.

SI	3	2	1	0	totaux
Molécules					
3	3	1	4	5	13
2		2	1		3
1			1		1
totaux	3	3	6	5	

Illustration 27 : Nombre de laboratoires analysant de 1 à 3 hormones en fonction du nombre d'étalons internes utilisés.

5.6.2 - Nature des étalons internes

On remarque parmi les laboratoires une grande diversité dans le choix des étalons marqués que ce soit pour les médicaments (exemples donnés Illustration 28) ou les hormones (Illustration 29).

Les étalons internes sont quasi systématiquement des molécules marquées (deutérium ou carbone 13). La proportion de laboratoires utilisant l'analogue de la molécule analysée est comprise entre 23 et 40 % selon les molécules, sauf pour le métoprolol avec 5 % et l'ibuprofène avec 64 % (illustration 25).

Même si la majorité des analogues marqués mis en œuvre sont des analogues de substances pharmaceutiques, bien souvent appartenant à la même classe chimique-thérapeutique que les molécules quantifiées, il peut cependant être constaté que certains laboratoires mettent en œuvre des analogues marqués de pesticides ; cela concerne 3 laboratoires et dès l'extraction pour 2 d'entre eux.

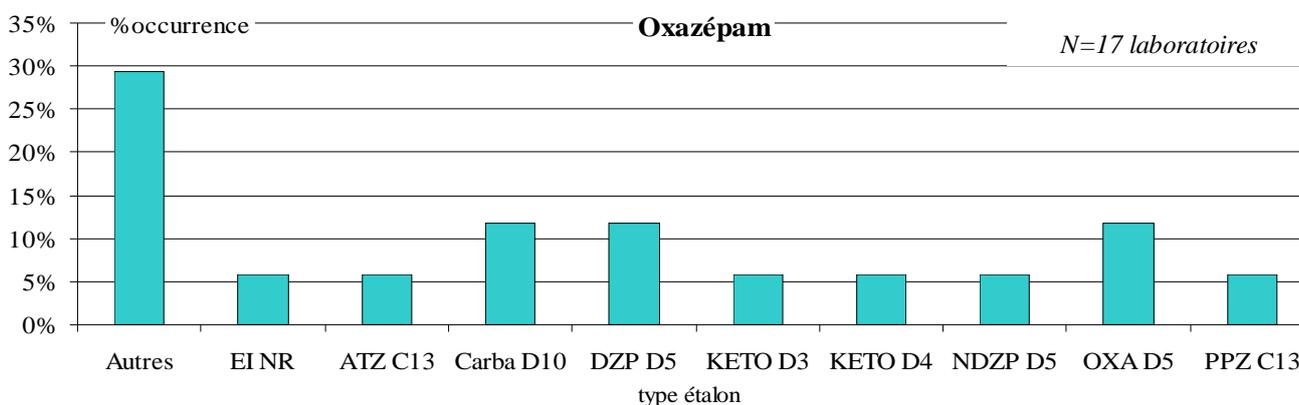
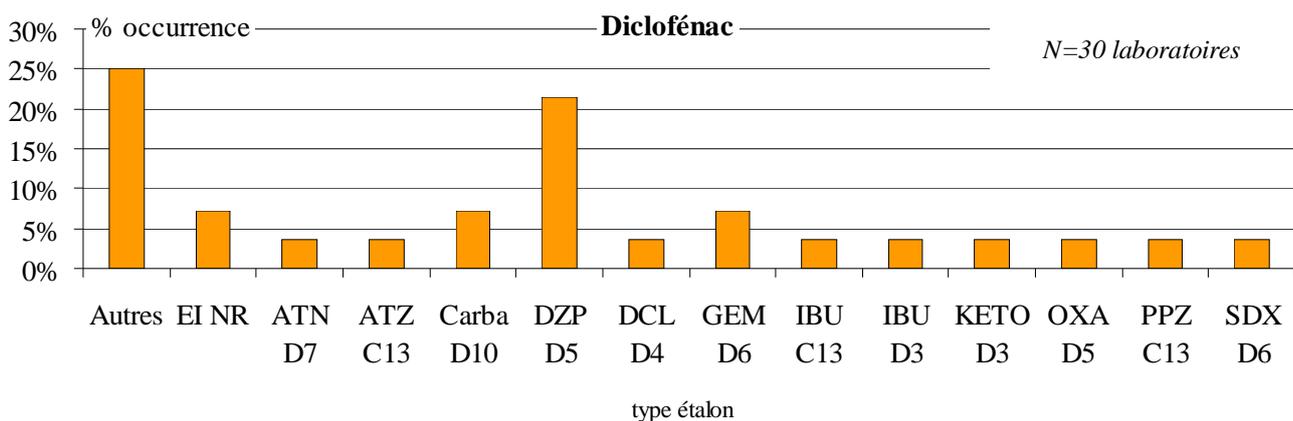
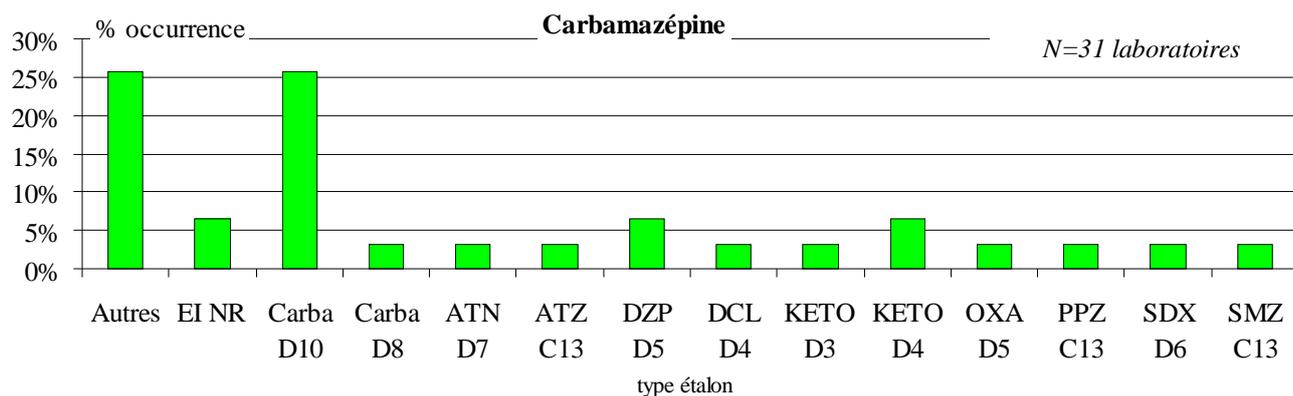


Illustration 28 : Pratiques d'étalonnage par les laboratoires participants à l'essai inter-laboratoires pour la détermination de la carbamazépine, le diclofénac et l'oxazépam. Autres : autres approches d'étalonnage que l'approche étalonnage interne ; EI NR : étalonnage interne mais l'étalon interne utilisé n'est pas précisé ; Carba D10: Carbamazépine D10 ; Carba D8: Carbamazépine D8 ; ATN D7: Aténolol D7 ; ATZ 13C: Atrazine 13C ; DZP D5: Diazépam D5 ; DCL D4: Diclofénac D4 ; KETO D3: Kétoprofène D3 ; KETO D4: Kétoprofène D4 ; OXA D5 : Oxazépam D5 ; PPZ 13C : Propazine 13C ; SDX D6 : Sulfadiméthoxine D6 ; SMZ C13 : Sulfaméthoxazole C6 ; GEM D6 : Gemfibrozil D6 ; IBU 13C : Ibuprofène 13C ; IBU D3 : Ibuprofène D3 ; NDZP D5 : Nordiazépam D5.

Molécules quantifiée Type	Estrone	17 α Ethynilestradiol	17 β Estradiol
équivalents marqués aux isotopes stables de C ou H	Estrone ^{13}C	17 α Ethynilestradiol ^{13}C	17 β Estradiol ^{13}C
	Estrone D2	17 α Ethynilestradiol D4	17 β Estradiol D2
	estrone D4		17 β Estradiol D3
ces hormones marquées aux isotopes stables de C ou H	17 β Estradiol D3	17 β Estradiol D3	
	Estradiol $^{13}\text{C}2$	Estradiol $^{13}\text{C}2$	Estradiol $^{13}\text{C}2$
		Estrone D2	Estrone D2
Autres molécules pharmaceutiques utilisées marquées aux isotopes stables de C ou H		Atenolol D7	Atenolol D7
	Bisphénol A D16		
		Gemfibrozil D6	Gemfibrozil D6
	Ibuprofene D3	Ibuprofène ^{13}C	
	Ketoprofen D3		
	Kétoprofène D4	Ketoprofen D4	Ketoprofen D5
	Nonylphenol $^{13}\text{C}6$	Nonylphenol $^{13}\text{C}6$	Nonylphenol $^{13}\text{C}6$
Propazine ^{13}C	Propazine ^{13}C	Propazine ^{13}C	

Illustration 29 : Molécules utilisées comme étalons internes pour la quantification des 3 hormones estrogéniques.

Pour les résidus de médicaments un nombre rarissime de laboratoires emploient un analogue marqué pour chaque composé recherché.

De la même façon pour les hormones l'emploi d'un seul étalon interne est assez répandu. Selon l'hormone considérée, seuls 25 à 46 % des laboratoires utilisent comme étalon interne l'analogue marqué. Dans ce cas, paradoxalement, pour la majorité des participants (de 54 % à 76 % d'entre eux, selon la molécule d'intérêt à quantifier), le choix de l'étalon interne s'est porté sur une molécule autre que la molécule équivalente marquée aux isotopes stables de C ou de H.

5.6.3 - Contribution du choix des étalonnages et des étalons sur l'exactitude des mesures

Les illustrations 30 à 32 présentent les performances des laboratoires dans la quantification des solutions instrumentales en fonction des choix d'étalonnage et pour chacune des molécules. Bien que le nombre de participants à l'essai soit supérieur à 30 et donc, en théorie, suffisant pour permettre des analyses statistiques, la diversité des pratiques et donc le faible nombre de valeurs par paramètres rend délicate voire même impossible toute interprétation.

Il apparaît cependant que l'exactitude des résultats de mesures rendus est davantage conditionnée par l'expérience et la maîtrise du laboratoire plutôt que par ses choix méthodologiques. Même si au travers de ces résultats, aucune corrélation entre les performances et étalons/méthode de quantification ne peut être établie, l'hétérogénéité des pratiques alerte sur le besoin de « borner les pratiques ».

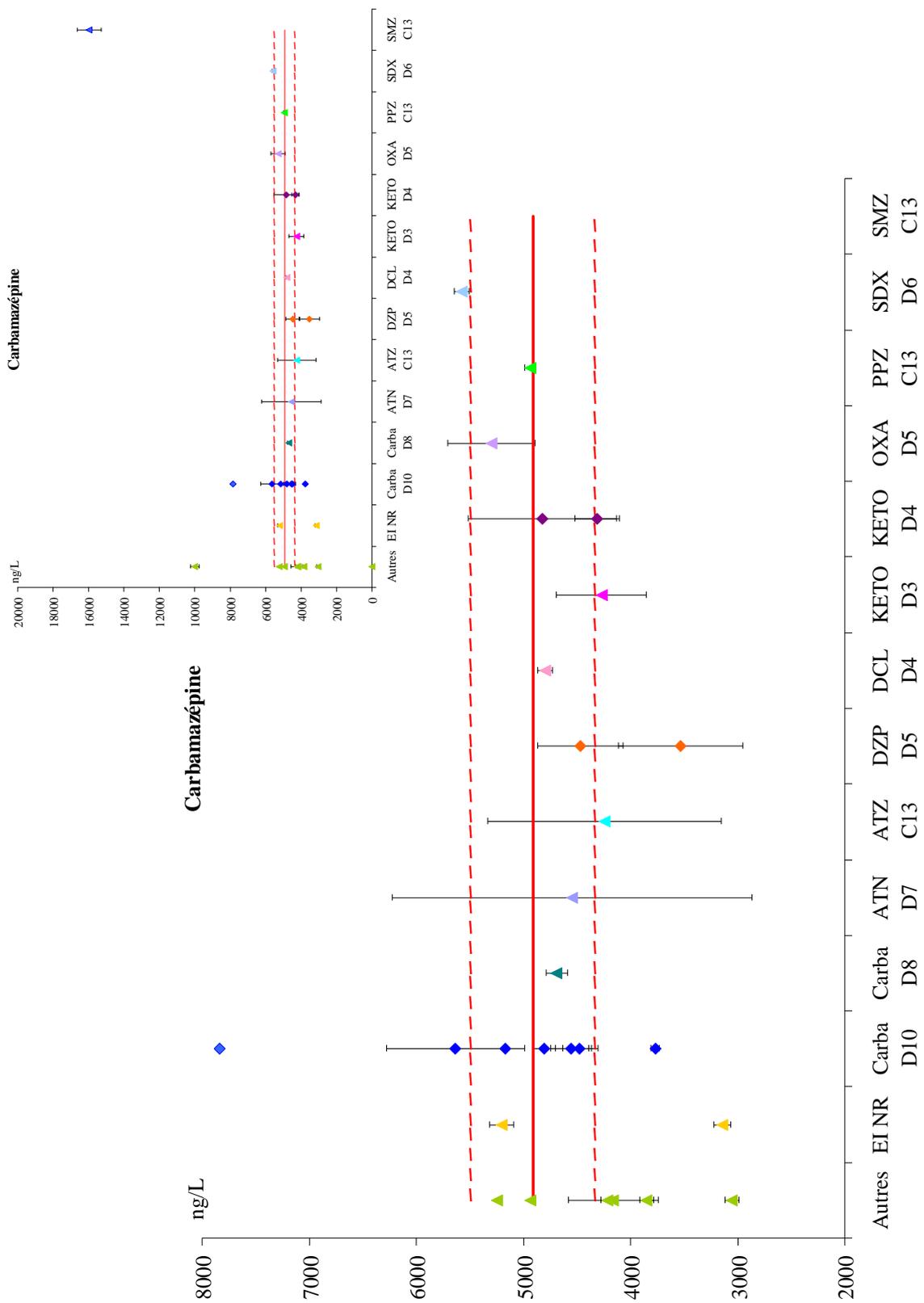


Illustration 30 : Effet de la méthode de quantification et du choix de l'étalon interne sur la détermination de la carbamazépine dans la solution de référence.

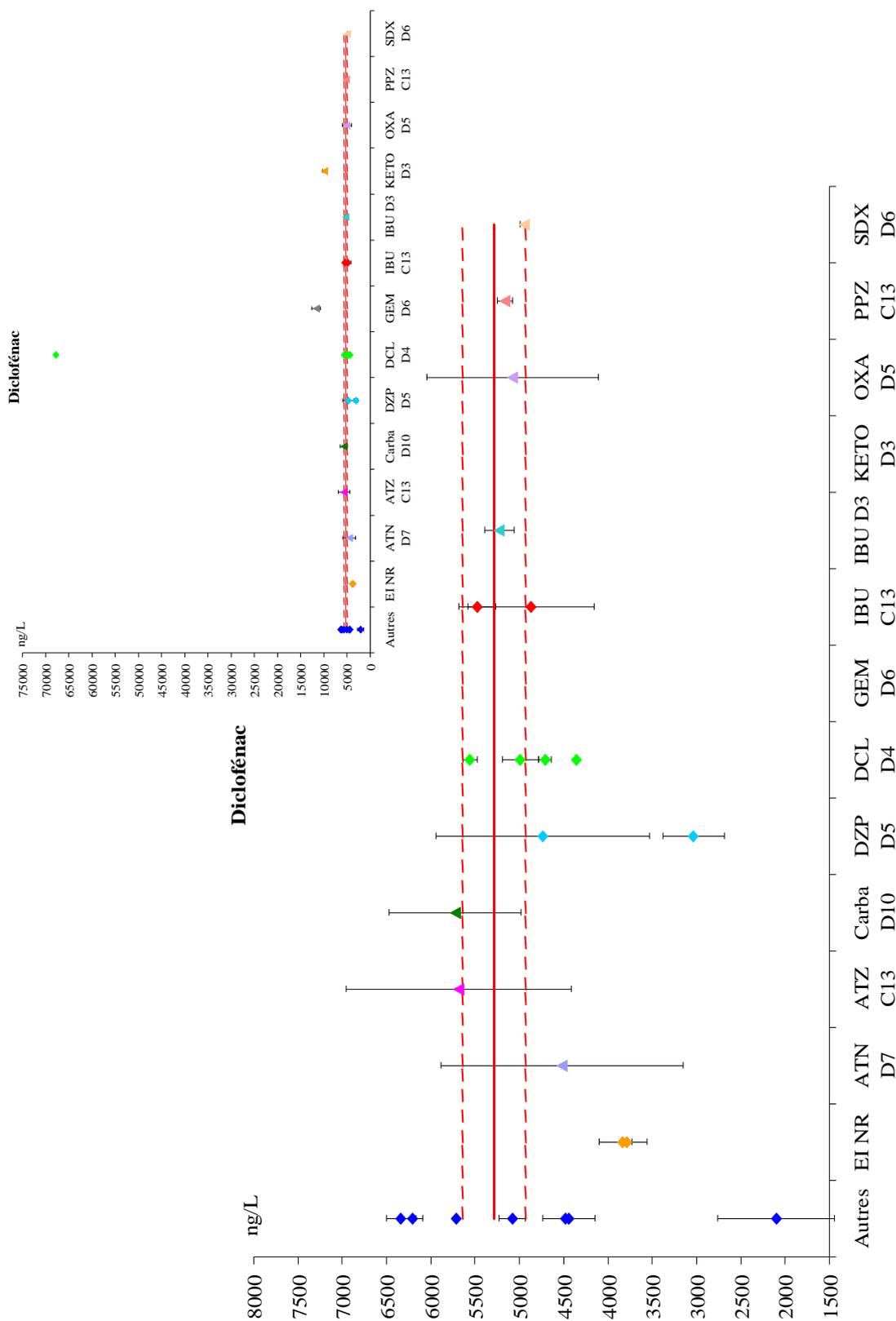


Illustration 31 : Effet de la méthode de quantification et du choix de l'étalon interne sur la détermination du diclofénac dans la solution de référence.

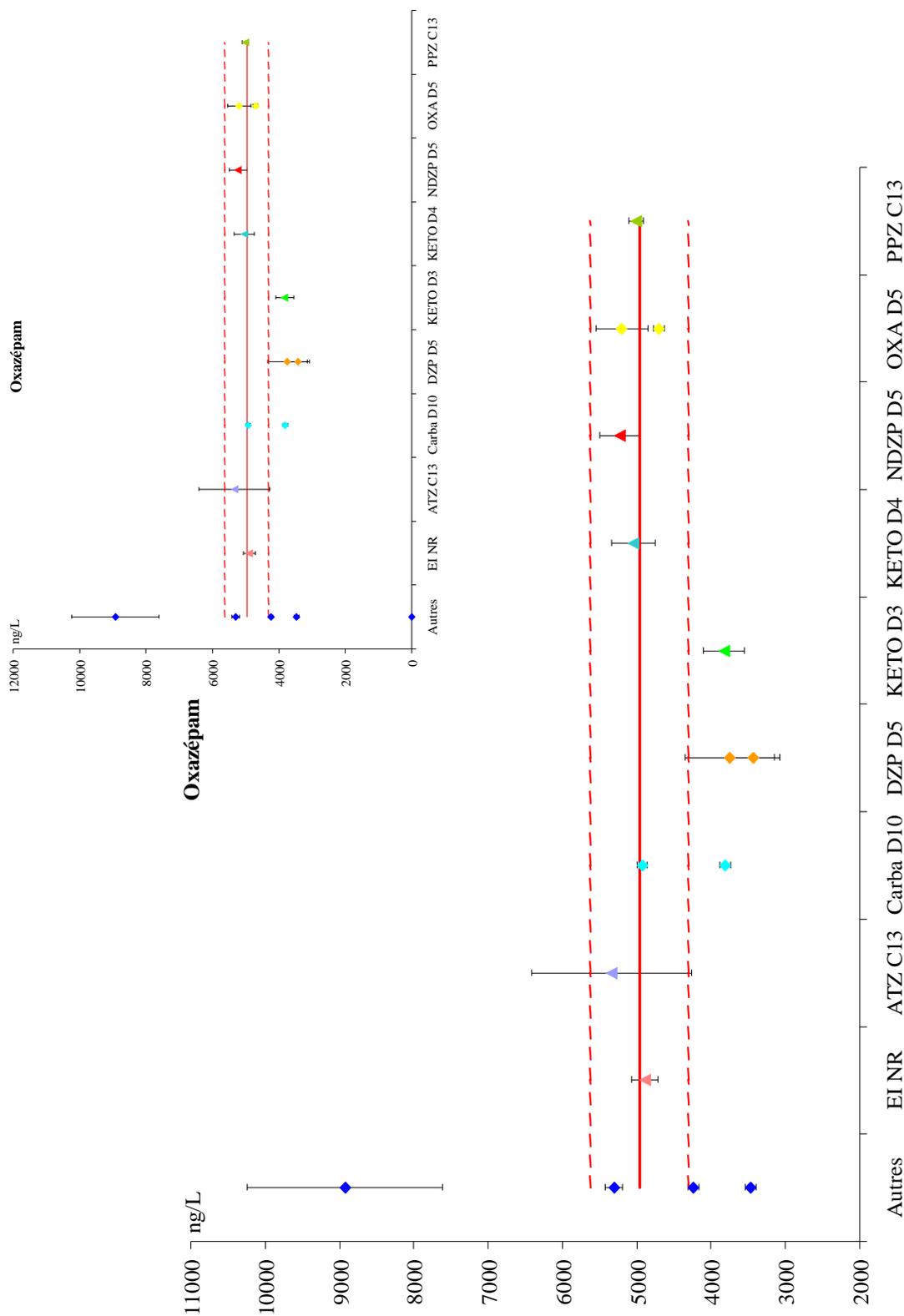


Illustration 32 : Effet de la méthode de quantification et du choix de l'étalon interne sur la détermination de l'oxazépam dans la solution de référence.

5.7- PRISE EN COMPTE DU RENDEMENT D'EXTRACTION

L'examen des données pour la carbamazépine, molécule la plus largement analysée, montre que 88 % des laboratoires prennent en compte le rendement d'extraction que ce soit par une correction du résultat ou une compensation directe (étalonnage subissant le même traitement que l'échantillon - injection directe ou SPE en ligne).

Quatre laboratoires (12 %) déclarent ne pas prendre en compte le rendement d'extraction pour exprimer leurs résultats mais nous n'avons pas réussi à obtenir d'explications (rendement suffisamment élevé ? compris dans l'incertitude...).

Les biais inhérents aux différentes méthodes sont donc pris en compte par la majorité des laboratoires dans l'expression du résultat.

5.8 - LIMITES DE QUANTIFICATION

La très grande majorité des laboratoires a transmis ses limites de quantification. Il reste encore 7 à 13 % de laboratoires selon les molécules, qui n'ont pas déterminé leur LQ pour les composés analysés. Cela concerne uniquement les résidus de médicaments, toutes les LQ ayant été fournies pour les hormones (Illustration 33).

5.8.1 - Les valeurs des limites de quantification

Abstraction faite des 3 laboratoires présentant les LQ les plus basses et du laboratoire affichant une LQ à 100 ng/l, les LQ sont comprises entre 0,5 et 50 ng/l pour les résidus de médicaments et les hormones. La valeur la plus fréquente est 10 ng/l pour les médicaments et 5 ng/l pour les hormones. Pour une même molécule, les LQ déterminées en LC/MSMS varient d'un facteur 10 à 50.

Par rapport à l'essai 2009, les LQ annoncées en 2011 sont du même ordre de grandeur sauf pour le diclofénac et les hormones qui présentent des valeurs plus importantes en 2011 (Illustration 33). Les techniques de GC/MS ou GC/MSMS pratiquées en 2011 ont des LQ plus fortes qu'en 2009 mais cela ne concerne que 2 laboratoires. Certains laboratoires ont peut être réévalué leur LQ ou bien les laboratoires les plus « performants » n'ont pas participé à l'essai de 2011.

LQ en ng/l	LC/MSMS 2011	LC/MSMS 2011 LQ la plus fréquente	LC/MSMS 2009	GC/MS 2011	GC/MS 2009	GC/MSMS 2011	GC/MSMS 2009
Aténolol	(0,09) 1-20	10	0,2-25				
Carbamazépine	(0,07) 1-30 (100)	10	0,1-50		10		
Diclofénac	(0,5) 1-56 (100)	10	1-2		20		
Ibuprofène	(1) 5-50 (153)	10	1-50	10	1		26
Kétoprofène	(0,17) 2-50 (100)	10	0,2-20		25		
17 β estradiol	3-50	5	0,2-100		3-10	20	3,2
17 α éthyneil estradiol	1-100	10	0,2-417		3	20	5,4
Estrone	1-50 (100)	5	-		-		-
Métoprolol	(0,12) 1-20 (100)	10	-		-		-
Oxazépam	0,4-50 (100)	10	-		-		-
Sulfaméthoxazole	(0,14) 1-20	10	-		-		-

Illustration 33 : Limites de quantification minimale et maximale annoncées par les laboratoires participants pour les différentes techniques employées dans l'essai de 2011 et l'essai AFSSA de 2009.

Concernant les hormones, pour l'ensemble des participants, on observe que :

- les LQ de l'estrone sont comprises entre 1 et 100 ng/L avec une moyenne de 21 ng/L et une médiane de 8 ng/L ;
- les LQ de la 17- α éthinylestradiol sont comprises entre 1 et 100 ng/L avec une moyenne de 24 ng/L et une médiane de 10 ng/L ;
- les LQ de la 17- β estradiol sont comprises entre 1 et 50 ng/L avec une moyenne de 14 ng/L et une médiane de 10 ng/L.

L'ensemble des réponses des laboratoires pour les hormones et leurs dispersions sont représentées dans l'illustration 34.

On remarque, en l'état de l'instabilité du lot 3 pour les hormones, que les limites de quantification requises ont évoluées au cours du temps. En effet, si une limite de quantification d'environ 35 ng/L était exigible au moment du dopage pour la 17- β estradiol, celle-ci est abaissée à 10 ng/L à J0+2. Au vu des limites de quantification renseignées, ce niveau de performance est néanmoins atteint par une majorité de participants.

Concernant l'estrone, pour le lot 2, seuls 3 laboratoires sur les 16 ayant répondu étaient en mesure de quantifier cette molécule. Alors que dans le lot 3, les 3/4 étaient en mesure de le faire du fait de l'apparition de l'estrone à une concentration supérieure à 35 ng/L (J0+2) et 42 ng/L (J0+3).

Aucun laboratoire n'ayant relevé la présence de la 17- α estradiol, de fait, aucune métadonnée relative à cette molécule n'a été collectée.

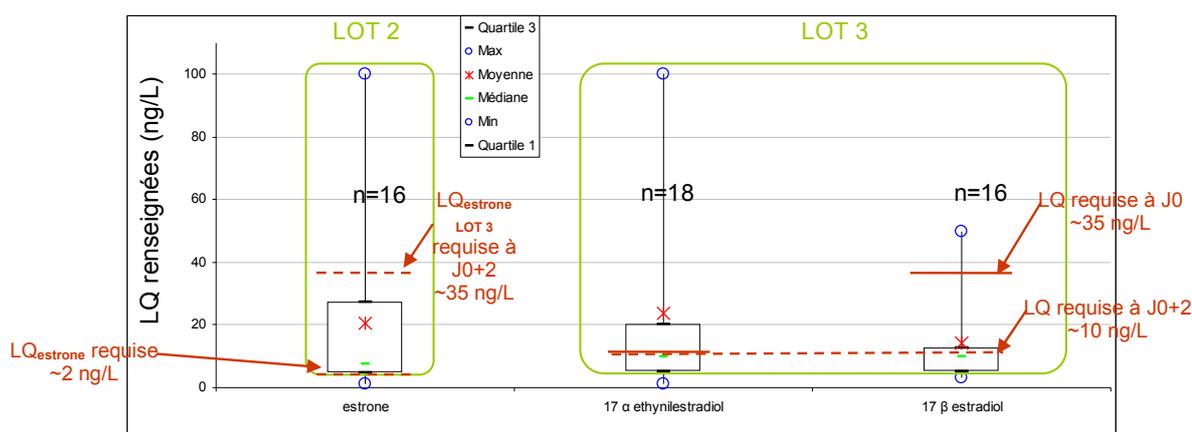


Illustration 34 : Représentation graphique des LQ renseignées par les laboratoires participants et niveaux de performance attendus.

5.8.2 - Les méthodes de détermination des limites de quantification

Les laboratoires ont indiqué les méthodes utilisées pour déterminer leur LQ à partir d'un menu déroulant proposant les différentes approches des deux normes ISO/TS 13530 et NF T 90-210 (illustration 35).

	Pourcentage de laboratoires	
	Médicaments	Hormones
1/ ISO/TS 13530:2009 : méthode utilisant le rapport signal/bruit (LQ = 3LD)	16 à 28 %	40 à 43 %
2/ ISO/TS 13530:2009 : LD basée sur l'écart-type de la méthode et LQ = 3LD	0	0
3/ NF T 90-210 (09) : méthode par vérification d'une LQ présumée	31 à 43 %	7 à 14 %
4/ XP T 90-210 (99) : méthode utilisant les résultats obtenus lors de l'étude de linéarité	11 à 21 %	14 à 21 %
5/ XP T 90-210 (99) : méthode issue de l'étude du blanc de matrice	0	0
6/ XP T 90-210 (99) : méthode par vérification d'une LQ choisie	21 à 27 %	27 à 29 %
7/ autre, préciser :	0	0
Méthodes 3/ et 6/ : par vérification d'une LQ choisie	56 à 67%	36 à 43%

Illustration 35 : Répartition des méthodes de détermination de la LQ au sein des laboratoires participants pour la détermination des résidus de médicaments et des hormones, toutes molécules confondues.

Les LQ ont été estimées avec 4 méthodes, parmi les 6 méthodes possibles :

- ISO/TS 13530:2009 : méthode utilisant le rapport signal/bruit (LQ = 3LD) ;
- NF T 90-210 (2009) : méthode par vérification d'une LQ présumée ;
- XP T 90-210 (1999) : méthode utilisant les résultats obtenus lors de l'étude de linéarité ;
- XP T 90-210 (1999) : méthode par vérification d'une LQ choisie.

Les approches basées sur l'écart-type de la méthode (LQ = 3LD) de la norme ISO/TS 13530 (2009) et la méthode issue du blanc de la norme XP T 90-210 (1999) ne sont pas employées.

On distingue deux pratiques selon les familles de molécules. Pour les médicaments, la méthode par vérification de la LQ sur toute la procédure (dopage d'une eau représentative), que ce soit la version de 1999 en répétabilité ou la version de 2009 en condition de fidélité intermédiaire de la norme 90:210, est majoritairement employée par les laboratoires (illustration 35). Pour les hormones deux méthodes sont généralement mises en œuvre: la méthode utilisant le rapport signal/bruit (ISO/TS 13530:2009) et la méthode par vérification de la LQ sur toute la procédure.

La quasi-totalité des laboratoires (sur les 28 réponses), qu'ils analysent une ou les deux familles de molécules, emploient une seule méthode de détermination de la LQ, qu'ils mettent en œuvre une technique analytique ou jusqu'à 3 techniques (L/L avec GC/MSMS, L/L avec LC/MSMS et SPE en ligne avec LC/MSMS). Un seul laboratoire emploie deux méthodes de détermination de la LQ (1/ et 6/) et met en œuvre 3 techniques analytiques (SPE en ligne, injection directe et S/L, toutes avec la LC/MSMS). Le choix de la méthode de détermination de la LQ est donc un choix du laboratoire ; il n'est pas fonction de la méthode d'analyse ou du composé.

5.8.3 - Cohérence entre la dispersion des mesures et les limites de quantification

Sur la base des méta-données et des mesures restituées par les laboratoires dans le cadre de cet essai inter-laboratoires, une étude de la cohérence entre la dispersion des mesures pour le niveau bas de dopage, la limite de quantification, méthode de détermination/estimation de la limite de quantification. Les résultats sont présentés dans les illustrations 36 à 38.

Sur cette base, les observations/constats suivants peuvent être tirés :

- *a priori*, il n'existe pas de corrélation avec la méthode de quantification choisie ni avec la nature des étalons mis en œuvre ;
- certains laboratoires présentent une approche de dilution isotopique systématique ; preuve que le coût de mise en œuvre n'est pas un verrou systématique mais qu'il doit être mis en perspectives des objectifs et besoins de fiabilité des données ;
- beaucoup de laboratoires ont un étalon interne pour toutes les molécules qui dans certains n'a aucune relation structurelle avec les molécules ciblées. Ces laboratoires ne sont pas ressortis comme aberrants ou discriminés. La faible complexité de la matrice mise en œuvre dans l'essai : eau souterraine faiblement chargée pourrait en partie expliquer cette observation ;
- pas d'effets avec le temps de dopage avant / après extraction. Là encore, la faible charge matricielle de la matrice mise en œuvre dans l'essai : eau souterraine faiblement chargée permet en partie d'expliquer cette observation ;
- il ne semble pas y avoir de corrélation évidente avec les méthodes de détermination des limites de quantification ;
- des coefficients de variation très élevés sont obtenus par certains laboratoires mais il n'y pas de limite de quantification annoncée par le laboratoire. On peut donc supposer que cette dernière soit en cours de détermination et que cela soit réalisé au travers du présent essai interlaboratoires ;
- certains laboratoires présentent une convergence de limite de quantification déterminée par l'approche NF T90-210 et limites de quantification présupposées par le rapport S/N. Là encore, il est possible que certains laboratoires aient participé à cet essai inter-laboratoires avec des couples molécules-méthodes à différents niveaux de validation et qu'ils n'aient, par conséquent, disposé que d'une limite de quantification estimée (rapport S/N) pour remplir le tableau des méta-données ;
- certains laboratoires ont apparemment très prudemment estimé leur limite de quantification réelle ou prennent une marge de sécurité, comme semble l'indiquer les coefficients de variation très faibles de certains laboratoires alors que la valeur cible de l'essai est très largement inférieure à leur limite de quantification annoncée ;
- certains laboratoires, une minorité, semblent avoir très nettement surestimé leurs limites de quantifications réelles ce qui pose la question de la représentativité des matrices mises en œuvre dans le cadre de la caractérisation de la méthode selon la norme NF T90-210.

code labo	Aténolol				Métoprolol				Oxazépam				Sulfaméthoxazole			
	C. cible (ng/L)	CV niv. bas	LQ (ng/L)	Dét. LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas	LQ (ng/L)	Dét. LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas	LQ (ng/L)	Dét. LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas	LQ (ng/L)	Dét. LQ
1	23	6%	10		25	3%	10		43	2%	10		30	2%	10	
2	23	9%	10		25	5%	5		43	8%	5		30	11%	5	
3	23	5%			25	6%			43				30	2%		
4	23	37%	20		25	6%	10		43	13%	10		30	2%	10	
5	23	2%			25	0%			43				30	3%		
6	23	6%	0,5		25	6%	0,5		43				30	4%	0,5	
7	23	5%	4		25	5%	2		43	13%	5		30	4%	3	
8	23	6%	2		25	5%	3		43	3%	0,5		30	9%	0,5	
9	23	8%	1,8		25	5%	5,3		43	5%	0,4		30	9%	0,3	
10	23	0%	5		25	21%	5		43	7%	10		30	2%	5	
11	23	6%	5		25	4%	5		43	3%	5		30			
12	23	6%	20		25	13%	20		43	14%	20		30	8%	20	
13	23				25	17%	100		43	55%	100		30	18%	20	
14	23	2%	20		25	3%	20		43	9%	20		30	NQ	20	
15	23				25	4%	10		43	NQ	10		30	5%	10	
16	23				25				43				30			
17	23	9%	10		25				43	NQ	15		30	1%	10	
18	23	5%	10		25				43	3%	10		30	6%	11	
19	23	5%	10		25	6%	10		43				30	8%	10	
20	23	4%	5		25	19%	5		43	6%	5		30	1%	5	
21	23	3%	1		25	4%	1		43				30	5%	1	
22	23	19%	10		25	13%	10		43				30	7%	10	
23	23				25	6%			43				30	2%		
24	23	16%	10		25	5%	10		43				30	13%	10	
25	23	NQ	0,089		25	NQ	0,118		43				30	NQ	0,141	
26	23	8%	5		25	14%	5		43	7%	5		30	6%	5	
27	23	1%	20		25	2%	20		43		50		30	0%	20	
28	23	7%	20		25	10%			43				30	24%	10	
29	23	9%	5		25	3%	5		43				30			
30	23	21%	10		25	6%	10		43				30	3%	10	
31	23	3%	10		25	5%	10		43	6%	10		30	8%	10	
32	23	4%	5		25	19%	10		43	2%	10		30	8%	5	
33	23				25	64%	2		43				30	72%	6	

Illustration 36 : Détermination de l'aténolol, du métoprolol, de l'oxazépam et du sulfaméthoxazole dans le matériel d'essai, niveau bas de dosage : cohérence avec les limites de quantification revendiquées par le laboratoire (NQ non quantifié).

code labo	Carbamazépine				Diclofénac				Ibuprofène				Kétoprofène			
	C. cible (ng/L)	CV niv. bas (%)	LQ (ng/L)	Dét.LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas (%)	LQ (ng/L)	Dét.LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas (%)	LQ (ng/L)	Dét.LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas (%)	LQ (ng/L)	Dét.LQ
1	40	3%	10		24	6%	10		27				23	8%	10	
2	40	11%	5		24	17%	10		27	14%	5		23	6%	5	
3	40	2%			24	4%			27	44%			23	4%		
4	40	2%	10		24	14%	10		27				23	5%	10	
5	40	1%			24				27				23	5%		
6	40	6%	0,5		24	5%	0,5		27	46%	1		23	6%	0,5	
7	40	5%	2		24	33%	3		27	14%	5		23	9%	4	
8	40	7%	3		24	8%	2		27	24%	10		23	9%	3	
9	40	8%	0,2		24	10%	1,7		27	NQ	25		23	6%	9	
10	40	2%	5		24	50%	20		27		50		23	8%	5	
11	40	3%	10		24	22%	5		27	17%	10		23	6%	5	
12	40	13%	20		24	22%	20		27	16%	20		23	13%	20	
13	40	69%	100		24	24%	100		27				23	9%	100	
14	40	4%	20		24	2%	20		27	118%	40		23		50	
15	40	11%	10		24	5%	10		27	1%	10		23	8%	10	
16	40	2%	2,5		24				27				23			
17	40	2%	30		24				27				23			
18	40	1%	5		24	2%	6		27	10%	13		23	3%	13	
19	40	2%	10		24	3%	10		27	8%	10		23	6%	10	
20	40	5%	5		24	4%	5		27	13%	20		23	3%	5	
21	40	0%	1		24	6%	1		27				23	6%	2	
22	40	1%	10		24	22%	10		27				23	12%	10	
23	40	4%			24	7%			27				23			
24	40	6%	10		24	15%	10		27	6%	10		23			
25	40	NQ	0,067		24	NQ	4,53		27		153		23	NQ	0,166	
26	40	9%	5		24	8%	5		27	NQ	5		23	14%	5	
27	40	5%	20		24	NQ	20		27				23		50	
28	40	5%	10		24	27%	10		27				23	7%	10	
29	40	5%	5		24				27				23	4%	10	
30	40	3%	10		24		10		27	92%	10		23	13%	10	
31	40	6%	5		24	5%	5		27	12%	10		23	3%	10	
32	40	4%	2		24	6%	10		27	18%	5		23	2%	10	
33	40	43%	2		24	60%	56		27	4%	11		23	76%	6	

Illustration 37 : Détermination de la carbamazépine, du diclofénac, du kétoprofène et de l'ibuprofène dans le matériel d'essai, niveau bas de dopage : cohérence avec les limites de quantification revendiquées par le laboratoire (NQ non quantifié).

code labo	Estrone				17 α éthynilestradiol (EE2)				17 β estradiol (Eb2)			
	C. cible (ng/L)	CV niv. bas	LQ (ng/L)	Dét. LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas	LQ (ng/L)	Dét. LQ	C. cible (ng/L)	CV niv. bas	LQ (ng/L)	Dét. LQ
1	2				36	8%	10		33			
2	2				36				33			
3	2				36				33			
4	2		50		36	22%	50		33	5%	50	
5	2				36				33			
6	2	NQ	1		36	9%	1		33			
7	2	9%	4		36	35%	6		33	7%	5	
8	2	46%	2		36	9%	5		33	40%	5	
9	2		5		36	17%	20		33	6%	8	
10	2		5		36	14%	5		33	29%	5	
11	2		5		36	7%	10		33	NQ	10	
12	2				36				33			
13	2		100		36	6%	100		33	25%	20	
14	2				36	27%	20		33	23%	20	
15	2		10		36	7%	10		33	NQ	10	
16	2				36				33			
17	2				36				33			
18	2				36				33			
19	2		10		36	6%	10		33	19%	10	
20	2				36				33			
21	2	7%	1		36	10%	3		33	4%	3	
22	2		20		36	28%	10		33	18%	10	
23	2				36				33			
24	2		10		36	NQ	10		33	NQ	10	
25	2		50		36		50		33		50	
26	2	22%	5		36	8%	5		33	20%	5	
27	2				36				33			
28	2				36				33			
29	2				36				33			
30	2				36				33			
31	2	60%	50		36		100		33	43%	10	
32	2				36				33			
33	2				36				33			

Illustration 38 : Détermination des composés estrogéniques (Estrone, 17- α éthynilestradiol, 17- β estradiol) dans le matériel d'essai, niveau bas de dosage : cohérence avec les limites de quantification revendiquées par le laboratoire (NQ non quantifié).

Légende

Méthode de Détermination

- NF T 90-210 (09) : méthode par vérification d'une LQ pré-supposée
- XP T 90-210 (99) : méthode utilisant les résultats obtenus lors de l'étude de linéarité
- NF T 90-210 (09) : méthode par vérification d'une LQ choisie
- ISO/TS 13530:2009 : méthode utilisant le rapport signal/bruit (LQ = 3LD)
- LQ=3LD basée sur S/N (PtP) analyse eau enrichie avec les composés d'intérêt

Mesures restituées



5.9 - TRAITEMENT DES RÉSULTATS DE LA SOLUTION DE RÉFÉRENCE

Les résultats du dosage de la solution de référence ont été traités afin d'en déduire des informations quant à la justesse des mesures et les incertitudes des laboratoires.

De manière générale, on notera qu'à l'exception de 2 laboratoires, les participants ont effectivement analysé cette solution de vérification instrumentale en respectant les consignes fournies par l'organisateur. Lorsque cette solution n'a pas été caractérisée, les laboratoires justifient l'absence de résultats par une incompatibilité avec la méthode mise en œuvre (incompatibilité entre solvants) ou une incapacité avec la technique d'analyse employée (SPE en ligne).

5.9.1 - Étude générale des résultats par les laboratoires

Selon son positionnement par rapport à la cible, un ensemble de mesure peut être exacte ou inexacte, fidèle ou juste (Illustration 39).

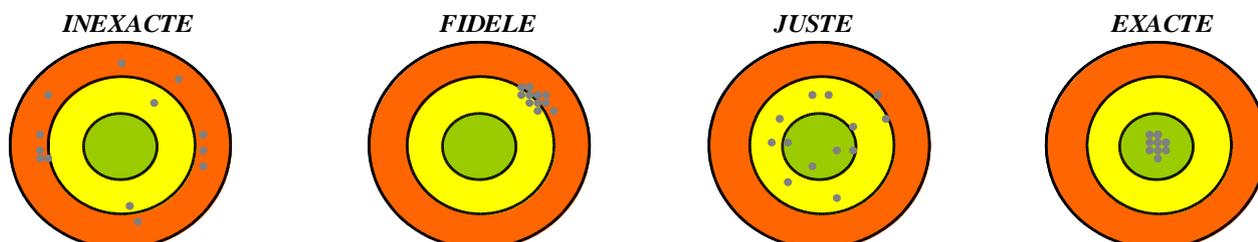


Illustration 39 : Schéma représentatif de la dispersion d'un ensemble de mesures.
 Inexacte = ni juste, ni fidèle ; fidèle = fidèle mais pas juste ; juste = juste mais pas fidèle ; exacte = juste et fidèle.

Les résultats des déterminations rendues par les laboratoires participants à cet essai inter laboratoires pour la carbamazépine, le diclofénac et l'oxazépan sont traités dans les illustrations 40 à 43. Au regard du caractère "exploratoire" de cet essai, les laboratoires présentant des valeurs "a priori" aberrantes ont été recontactés pour vérification et confirmation des résultats initiaux. En conséquence, aucun laboratoire n'a été exclu.

	Carbamazépine (n= 31 laboratoires)	Diclofénac (n= 29 laboratoires)	Oxazépan (n= 17 laboratoires)
Exacte (juste et fidèle)	58 %	38 %	47 %
Problème de fidélité mais juste	6 %	14 %	12 %
Problème de justesse mais fidèle	32 %	45 %	41 %
Problème de justesse et de fidélité	3 %	3 %	0 %

Illustration 40 : Données statistiques de performances des laboratoires.

Résultats de l'essai inter-laboratoires «résidus de médicaments dans les eaux»

Une première observation des résultats (illustrations 40 à 43) permet de conclure en l'existence de trois sous populations dans les laboratoires selon le degré de maîtrise :

- une première population de laboratoire (encadré vert) qui présente une bonne maîtrise, exactitude des mesures, dans la caractérisation de la solution de référence ;
- une seconde population de laboratoire (encadré jaune) qui présente des problèmes de fidélité de mesure (importante dispersion des réplicats) ;
- et enfin une troisième population de laboratoire (encadré rouge) qui présente des problèmes de justesse de mesure associé ou non à des problèmes de fidélité.

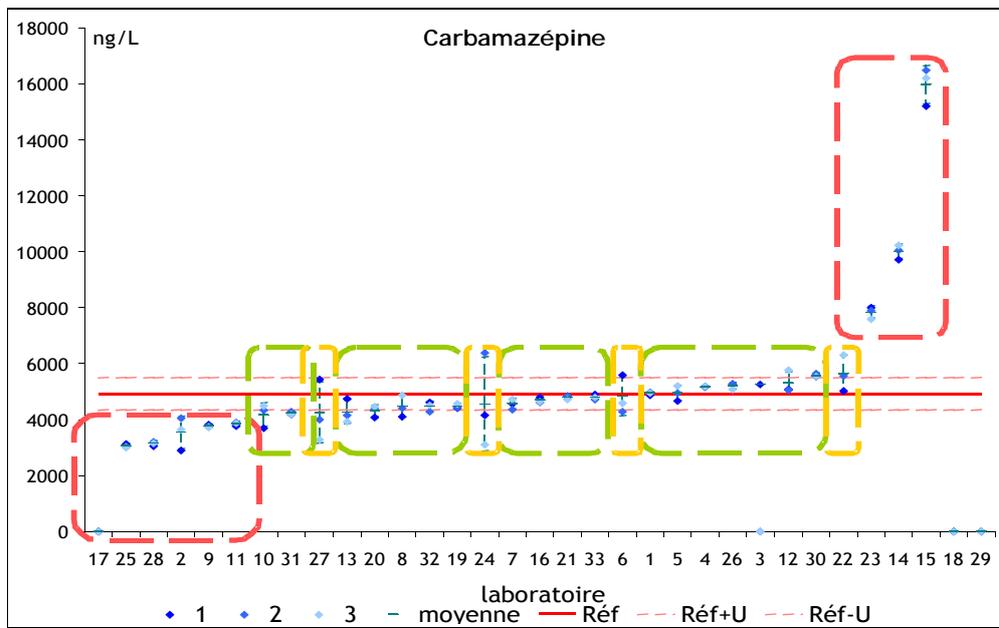


Illustration 41 : Résultats concernant la détermination de la carbamazépine dans la solution de référence par les laboratoires participant à l'EIL, comparaison à la valeur de référence.

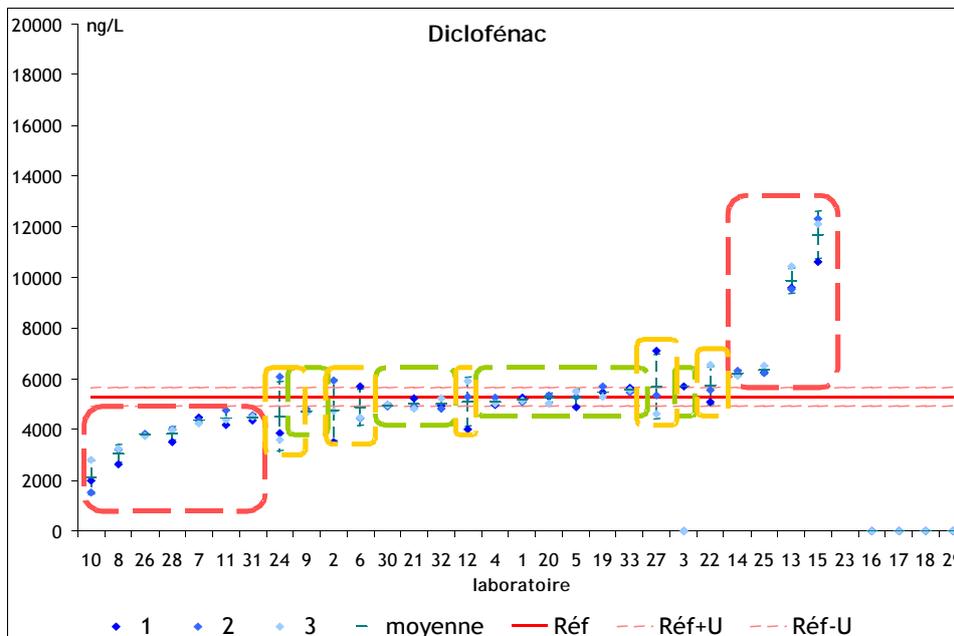


Illustration 42 : Résultats concernant la détermination du diclofénac dans la solution de référence par les laboratoires participant à l'EIL, comparaison à la valeur de référence.

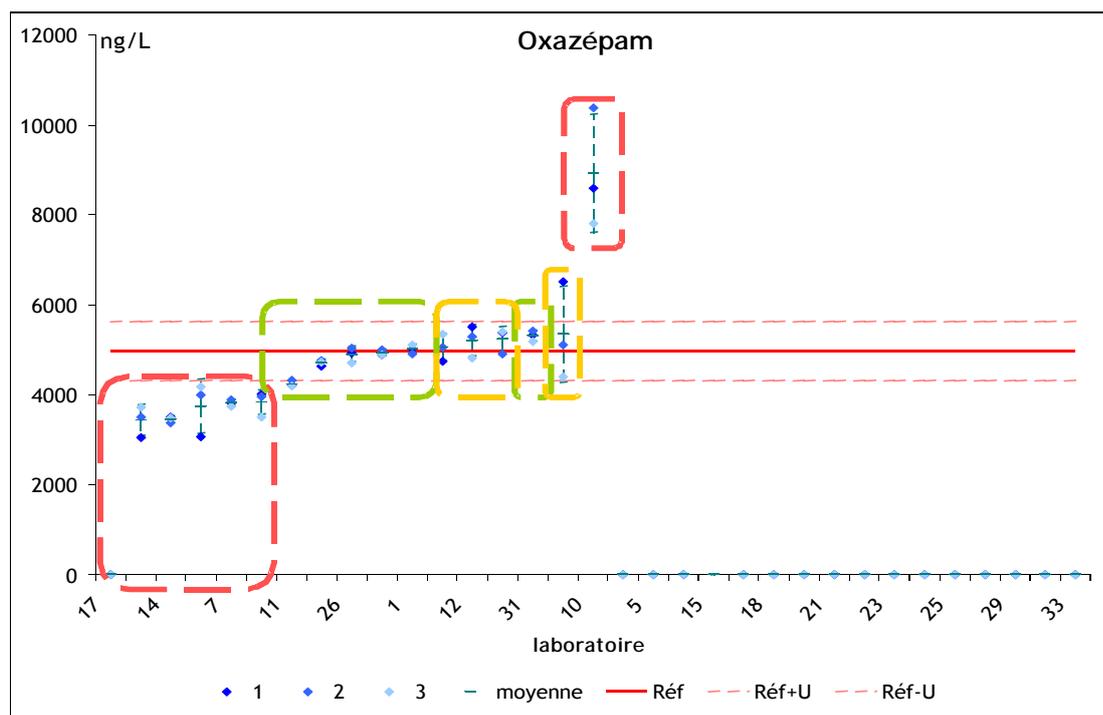


Illustration 43 : Résultats concernant la détermination de l'oxazépam dans la solution de référence par les laboratoires participant à l'EIL, comparaison à la valeur de référence.

5.9.2 - Intérêt de disposer de valeurs de référence dans les essais inter laboratoires des résultats par les laboratoires

La valeur assignée se définit comme la valeur attribuée à une grandeur particulière et reconnue, parfois par convention, comme ayant une incertitude appropriée à un usage donné. Dans le cadre des comparaisons interlaboratoires, elle peut être issue de 2 façons :

- valeur consensuelle lorsqu'elle est obtenue à partir des résultats des laboratoires participants à comparaisons interlaboratoires ;
- valeur de référence par un laboratoire de référence ou un matériau de référence certifié.

Pour chaque laboratoire et chaque substance de la solution de référence, un écart normalisé a été calculé sur la base des éléments disponibles :

- moyenne et répétabilité des résultats des déterminations de chaque participant ;
- valeur de référence et incertitude de la solution de référence.

Cette approche a été retenue en considérant, à dire d'experts, que dans une étape d'analyse instrumentale la répétabilité est un bon estimateur de l'incertitude.

Les résultats statistiques ont été ensuite soumis au groupe de travail ; les expertises conduites (sur la base de leur connaissance des processus analytiques) ont abouti aux observations et conclusions suivantes.

Pour résumer, on retiendra qu'en moyenne 1 laboratoire sur 2 rend des résultats de mesures exacts c'est à dire justes et fidèles. Ainsi l'intérêt de disposer de valeurs de référence, externes à l'essai inter-laboratoires, pour permettre de conduire avec pertinence une estimation de la justesse des mesures est évident.

Comme le met en évidence la lecture des éléments des illustrations 44 et 45 qui complètent les informations précédemment mises en évidence, les points suivants peuvent être cités :

Résultats de l'essai inter-laboratoires «résidus de médicaments dans les eaux»

- l'écart normalisé permet de mettre en évidence que la très grande majorité des données de mesure rendue par les laboratoires souffre d'un manque de justesse ;
- une maîtrise croissante dans la détermination est observée entre oxazépam, diclofénac et carbamazépine ;
- selon les molécules, la source d'inexactitude majoritaire est la justesse avec une contribution observée plus importante pour le diclofénac que pour la carbamazépine.

CARBAMAZÉPINE		DICLOFÉNAC		OXAZÉPAM	
17	16.9	10	4.7	10	2.9
25	6.3	11	2.4	11	2.1
11	3.6	31	3.8	14	4.4
10	1.5	4	0.9	17	15.0
31	2.3	3	2.4	31	1.0
5	0.1	14	4.3	26	0.2
3	1.2	25	4.3	27	0.3
14	13.3	26	7.9	7	3.4
28	5.9	28	4.5	9	0.1
26	0.9	24	0.6	2	1.8
24	0.2	27	0.3	8	3.2
27	0.6	22	0.6	13	2.6
33	0.3	8	5.7	20	0.2
32	1.3	2	0.4	32	0.6
19	1.5	33	1.4	12	0.5
9	3.9	9	2.9	4	0.8
7	1.0	32	1.1	1	0.2
23	8.2	23	20.8		
16	0.7	7	4.3		
4	0.9	21	1.1		
22	1.0	15	6.7		
2	2.1	19	0.7		
8	0.9	20	0.2		
21	0.4	6	0.6		
13	1.3	13	8.6		
20	1.7	12	0.2		
6	0.1	1	0.6		
12	0.8	30	1.8		
1	0.1	5	0.1		
30	2.2				
15	14.9				

APPROCHE ECART NORMALISE E_N

$$E_N = \frac{|\bar{x}_i - x_{réf}|}{\sqrt{u_i^2 + u_{réf}^2}}$$

$E_N < 2 \rightarrow$ pas de problème de justesse

$E_N > 2 \rightarrow$ problème de justesse

Illustration 44 : Écarts normalisés démontrant la maîtrise de chacun des laboratoires ayant participé à l'essai inter laboratoires dans la caractérisation de la solution de référence.

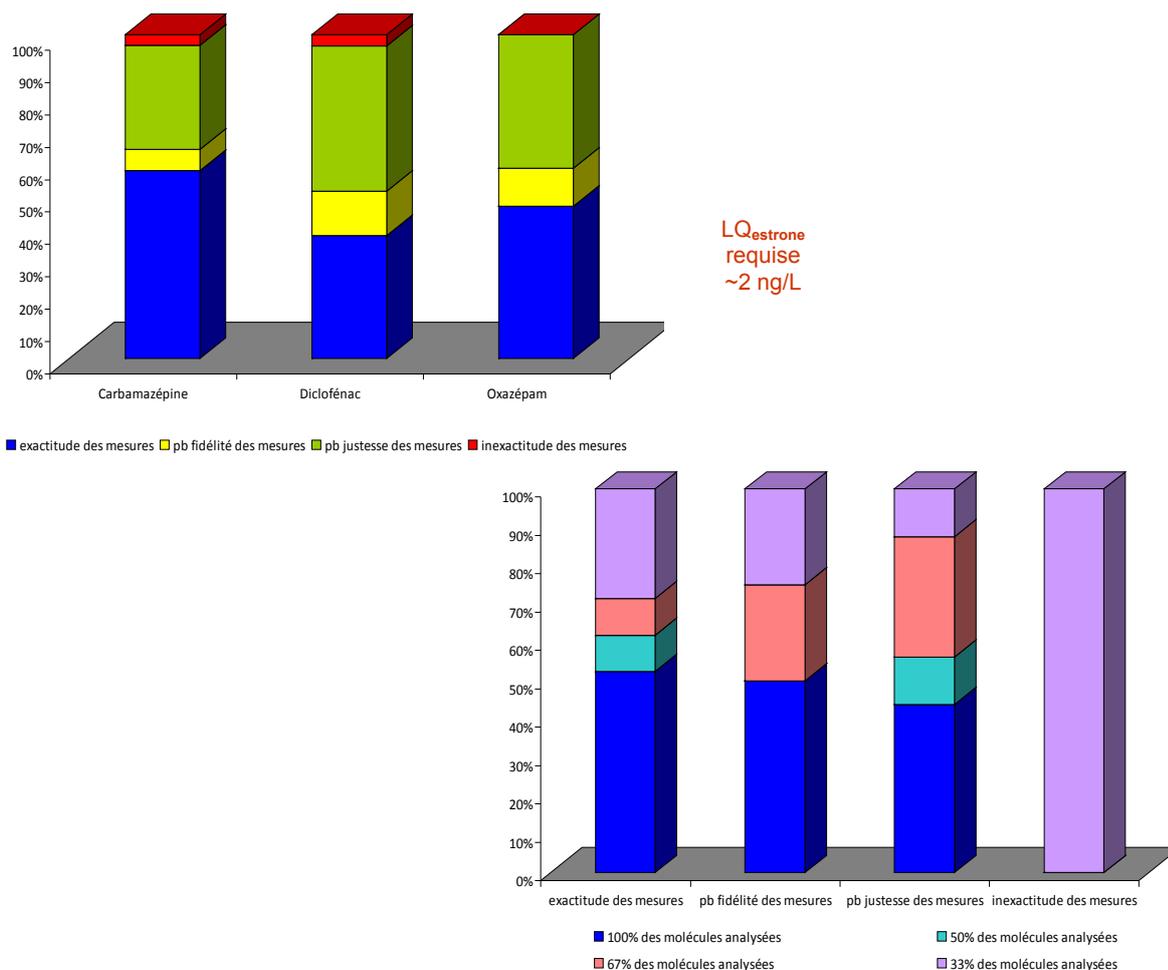


Illustration 45 : Étude de la maîtrise de l'analyse instrumentale : exactitude des mesures et sources contributives à l'inexactitude des mesures ; a) Exactitude des mesures et sources contributives à l'inexactitude des mesures de carbamazépine, oxazépam et diclofénac. b) Exactitude des mesures et sources contributives à l'inexactitude des mesures toutes molécules et tous laboratoires confondus.

Pour résumer, les observations acquises au travers de cet exercice d'intercom paraison permettent d'affirmer qu'en moyenne un laboratoire sur deux rend des résultats de mesure exactes c'est à fidèles et justes.

L'ensemble de ces observations permet également de mettre en avant le caractère critique des enjeux liés à l'étalonnage des instruments de mesure.

Pour compléter ces observations et les repositionner dans le contexte plus global du processus de mesure, une analyse plus fine des résultats de cet essai inter-laboratoires a été conduite.

5.9.3 - Cohérence entre les mesures de la solution de référence et des échantillons d'eaux

Une étude de la cohérence entre la dispersion des mesures pour la solution instrumentale, le niveau bas et haut de dopage et niveaux d'incertitude revendiqués par chacun des laboratoires a été menée pour les 3 molécules pour lesquelles cela était possible.

La restitution au travers de l'illustration 46 permet de mettre en exergue les faits notables suivant :

- de manière générale, cette analyse conforte les conclusions du traitement par AGLAE montrant la sous-estimation des incertitudes par les laboratoires ;

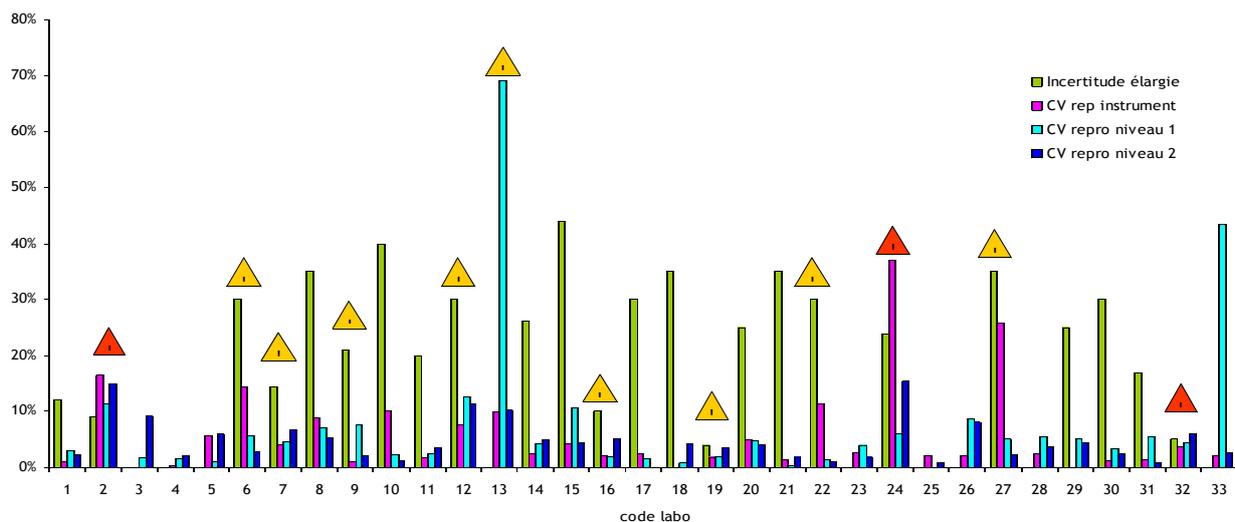
Résultats de l'essai inter-laboratoires «résidus de médicaments dans les eaux»

- pour certains laboratoires, on note une très nette incohérence entre niveaux d'incertitudes élargies revendiquées et critères de performances démontrées dans l'essai (▲). Il n'est pas mis en évidence de relation avec la méthode de détermination des incertitudes ;
- pour certains laboratoires, les niveaux incertitudes élargies et les critères de performances en terme de fidélité sont très proches et apparaissent comme étant questionnables (▲).

Plus largement, sur l'ensemble des molécules adressées au travers de cet EIL, il pourra être utile de mettre en avant les points suivants :

- la méthode 5M n'est pas une méthode d'estimation des incertitudes mais une approche pour en dresser les sources ;
- un nombre important de laboratoire n'a pas fourni d'informations concernant leurs incertitudes. Ainsi, il peut raisonnablement être supposé qu'au travers de cet essai inter-laboratoire, un certain nombre d'entre eux finalisera sa démarche de caractérisation et validation de méthode ;
- au regard des suspicions quant à la stabilité, en matrice et à très faibles niveaux de concentrations, de certaines molécules (ibuprofène et 17-β) regard des suspicions quant à la stabilité, en matrice et à très faibles niveaux de concentrations, de certaines -220 approche par plan d'expériences spécifiques dont on sait qu'elle repose sur des échantillons réels stables dans le temps (*«Le temps de stabilité de l'échantillon correspond au temps de mise en œuvre de l'analyse fixée depuis le prélèvement et la réception des échantillons au laboratoire selon les critères, soit indiqués dans les méthodes de référence, soit selon les recommandations de la norme NF EN ISO 5667-3, soit définis et justifiés par le laboratoire s'il n'existe pas de critères»* NF T90-220 (03)) ;
- de la même manière, le fait que la très grande majorité des laboratoires participants à l'essai inter-laboratoires mettent en œuvre la norme NF T90-220 approche contrôle interne, est notable. Pour cette approche, on sait que *«si elle est réalisée sur un matériau synthétique à un niveau de concentration, l'incertitude représente a priori une incertitude minimisée qui ne tient pas compte entre autre de l'effet matrice de l'échantillon à ce niveau de concentration»* ; il faut donc veiller à la nature de la matrice utilisée.

L'ensemble de ces éléments laisse à penser que deux populations de laboratoires diffèrent par leurs niveaux d'expérience dans la détermination de résidus médicamenteux en matrice cohabitent, ce qui ne devra pas être omis dans les conclusions qui en seront tirées.



Résultats de l'essai inter-laboratoires « résidus de médicaments dans les eaux »

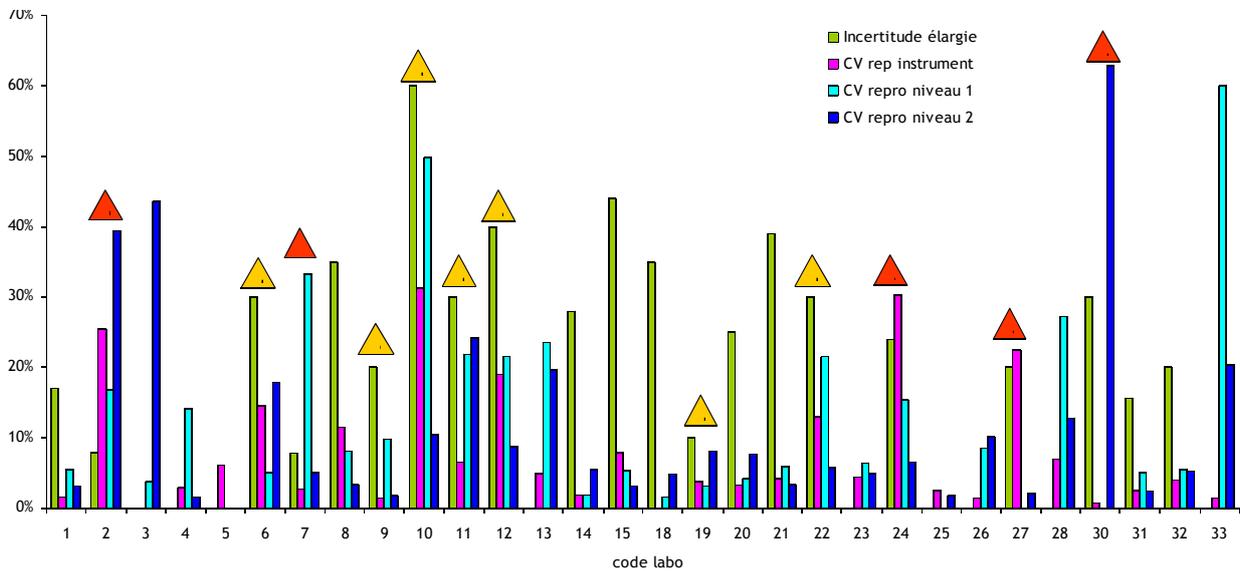
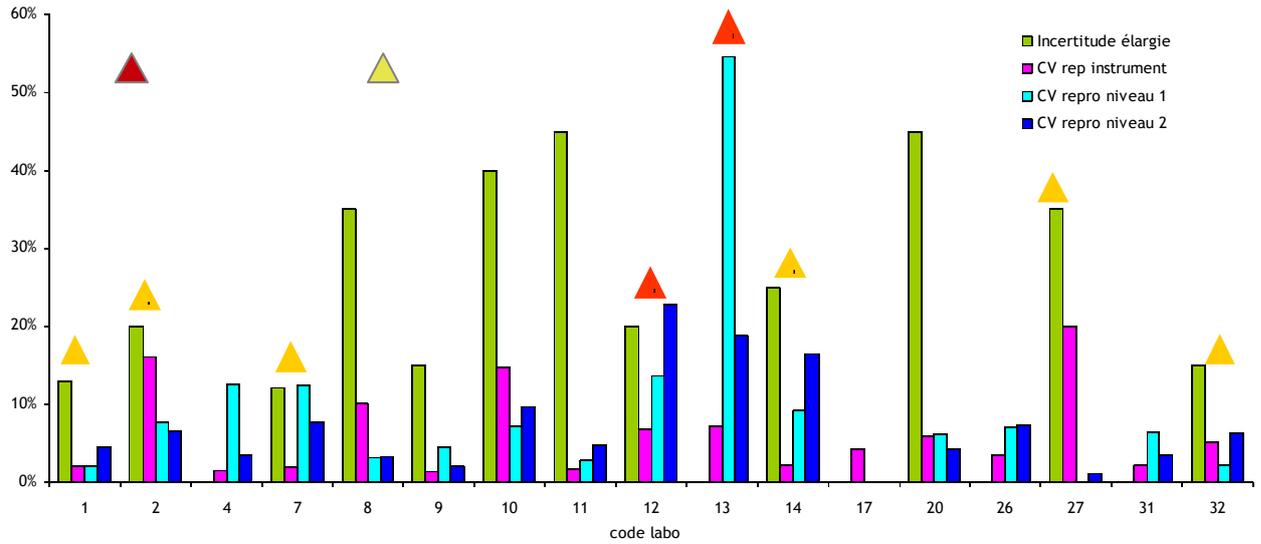


Illustration 46 : Cohérence entre les niveaux d'incertitudes annoncées par les laboratoires et les performances, répétabilité de l'analyse instrumentale et fidélité intermédiaire (élargis avec $k=2$), obtenus au travers de l'essai inter-laboratoires. a) carbamazépine ; b) diclofénac ; c) oxazépam ; ▲ incohérence, ▲ questionnable.

6 - Conclusions et perspectives

Les résultats de cet essai interlaboratoires portant sur le dosage de résidus de médicaments et d'hormones dans une eau naturelle sont particulièrement riches en enseignements.

Il apparaît tout d'abord que la plupart des résidus de médicaments sont relativement stables dans l'eau (exempte de matière en suspension), et que les délais de conservation avant analyse de 3 jours sont a priori globalement convenables si les échantillons sont réfrigérés. On peut de plus constater que 3 médicaments étaient présents dans l'eau souterraine utilisée comme matrice pour préparer les échantillons : carbamazépine, oxazépam et sulfaméthoxazole, malgré le délai entre le prélèvement du volume d'eau et la réception des échantillons par les laboratoires (4 semaines). En revanche, la 17- β estradiol et la 17- α estradiol se dégradent en estrone de manière caractérisée ; cela a été constaté 48h après la préparation des échantillons. Un délai plus court doit être fixé pour l'analyse des hormones, ou une méthode de stabilisation doit être recherchée. On peut recommander un traitement de l'échantillon dans les 24 h suivant son prélèvement, ou une congélation immédiate (pendant 7 jours) suivie d'une décongélation sur 24 h ou encore une extraction sur site. Ce problème de stabilité et de conservation de l'échantillon est d'autant plus critique pour les eaux plus chargées en matières en suspension.

En ce qui concerne la pratique des laboratoires nationaux, on constate pour la justesse, estimée grâce à la réalisation d'ajouts dosés métrologiquement contrôlés, que les valeurs de dopage sont en moyenne retrouvées par les laboratoires aux incertitudes expérimentales près, sauf pour le 17- β estradiol (dégradation) et l'ibuprofène (écart de -44 %). Cependant, l'analyse de la solution de référence (carbamazépine, diclofénac et oxazépam) montre un panel plus détaillé, avec une population de laboratoire majoritaire présentant une bonne maîtrise de l'analyse (juste et fidèle), une seconde présentant des problèmes de fidélité, et une troisième présentant des problèmes de justesse associé ou non à des problèmes de fidélité. En moyenne 1 laboratoire sur 2 rend des résultats exacts c'est-à-dire justes et fidèles.

Ce point renforce l'intérêt de disposer de valeurs de référence, externes à l'essai inter-laboratoires, pour permettre de conduire avec pertinence une estimation de la justesse des mesures.

L'incertitude de mesure relative élargie estimée par les laboratoires se situe aux alentours de 25 % pour une concentration de l'ordre 100 ng/L. Cependant l'examen des données relatives à la détermination des incertitudes montre que les estimations faites par les laboratoires ne sont pas toujours très fiables, et sous-estimées pour 1 laboratoire sur trois. Pour certains laboratoires il existe une très nette incohérence entre les niveaux d'incertitude revendiqués et les critères de performances démontrés dans l'essai ; il n'a pas été mis en évidence de lien avec la méthode de détermination des incertitudes. Cependant, le fait que la très grande majorité des laboratoires mettent en œuvre l'approche contrôle interne de la norme NF T90-220 dont on sait que *« si elle est réalisée sur un matériau synthétique à un niveau de concentration, l'incertitude représente a priori une incertitude minimisée qui ne tient pas compte entre autre de l'effet matrice de l'échantillon à ce niveau de concentration »* est peut-être lié. Cela devrait être très bientôt modifié par la parution en français de la norme ISO 11352 « Qualité de l'eau — Estimation de l'incertitude de mesure basée sur des données de validation et de contrôle qualité » qui remplacera la norme actuelle NF T90-220.

Les protocoles appliqués par les laboratoires sont variés, même si on constate une prédominance de l'emploi de la LC/MSMS, notamment en ce qui concerne l'emploi d'étalons internes. Même s'il apparaît que l'exactitude des résultats est plus conditionnée par l'expérience et la maîtrise du laboratoire plutôt que par ses choix méthodologiques, on peut souligner que lorsqu'un analogue marqué de la molécule à quantifier est employée (dilution isotopique), des mesures présentant un degré de fidélité et de justesse plus important sont obtenues. Ainsi, même si au travers de ces résultats, aucune corrélation entre les performances et les étalons ou les méthodes de quantification n'a pu être établie, l'hétérogénéité des pratiques alerte sur le besoin de « borner les pratiques ». Il ne faut pas oublier la faible charge matricielle de la matrice mise en œuvre dans l'essai (eau souterraine

faiblement chargée) qui peut permettre en partie d'expliquer la cohérence observée entre les résultats des laboratoires.

L'examen des coefficients de variation montre que les laboratoires maîtrisent globalement bien les techniques de mesure disponibles. Un progrès a été relevé entre l'essai de 2009 et celui-ci, avec des coefficients de variation plus resserrés en général.

Cependant il semble utopique aujourd'hui de vouloir doser les résidus de médicaments en deçà de 10 ng/l en routine, ou les hormones (problème de stabilité mis à part) en deçà de 2 ng/L. Il faut donc être vigilant sur la compatibilité des performances actuelles de laboratoires avec les exigences de la directive cadre sur l'eau révisée avec l'ajout des 3 produits pharmaceutiques 17- α éthinylestradiol, 17- β -estradiol et diclofénac, et donc des normes de qualité environnementale qui seront fixées lors du prochain examen de la Commission européenne.

Gageons que cette liste de produits médicamenteux étant établie, les laboratoires se focalisent dès maintenant sur l'amélioration de leurs performances, l'absence de liste établie ayant été mise en avant par les laboratoires pour justifier l'absence de certaines informations (limite de quantification, incertitude).

Au final on ne peut que recommander la réalisation des essais interlaboratoires en matrice, à des niveaux de concentration variés et représentatifs des teneurs environnementales, assortis de valeurs de référence, et leur pratique régulière. Des avancées technologiques, une normalisation plus poussée du processus et une sélection de la technique la moins empreinte d'erreur aléatoire permettront également d'améliorer la qualité de la donnée.

7 - Références

Amalric L. (2011) - Cahier des charges pour la préparation en 2011 d'un essai d'inter-comparaison sur l'analyse des résidus de médicaments dans les eaux. Rapport BRGM/RP-59504-FR, 23 p., 13 ill.

Amalric L., Bados P., Lardy-Fontan S., Strub M.-P. et Charpentier R. (2011) - Mise en œuvre de l'essai inter-laboratoires «résidus de médicaments dans les eaux» rapport d'étape 2011 – Rapport AQUAREF 2011 – Rapport BRGM/RP-60987-FR.

Guide ISO 35 (2006) - Certification des matériaux de référence – Principes généraux et statistiques.

Guide ISO/CEI 43-1 (1997) - Essais d'aptitude des laboratoires par intercomparaison – partie 1 : Développement et mise en œuvre de système d'essais d'aptitude.

ISO/TS 13530 (2009) - Qualité de l'eau : guide pour les contrôles qualité pour l'analyse de l'eau.

Ludwig-Baxter K. (2012) - PT-WFD Pharmaceuticals in Surface Water 11/2011.

NF EN ISO 5667-3 Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 3: Conservation et manipulation des échantillons d'eau (ISO/DIS 5667-3:2010).

NF ISO 13528 2005) - Méthodes statistiques utilisées dans les essais d'aptitude par comparaison interlaboratoires.

NF ISO 5725-2 (1994) - Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure. Partie 2 : Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une mesure normalisée.

NF T 90-210 (2009) - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire.

Py J.-S. (2010) - Rapport de synthèse de l'essai inter-laboratoire : résidus médicamenteux dans l'eau destinée à la consommation humaine.

XP T90 220 (2003) - Qualité de l'eau - Protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes physico-chimiques.

XP T90-223 Qualité de l'eau - Dosage de certains résidus médicamenteux dans la fraction dissoute des eaux - Méthode par extraction en phase solide et analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) Publication Mars 2013.

ANNEXE 1

Annonce de l'essai d'intercomparaison (version française)

Essai inter-laboratoires
Octobre 2011



Résidus médicamenteux dans les
eaux environnementales

En partenariat avec :



L'inscription à cet essai est gratuite. Pour assurer le succès de cet exercice, les participants s'engagent à :

- restituer les résultats en toute intégrité sans falsification ni collusion,
- remettre les résultats selon le calendrier prévu,
- fournir les métadonnées associées telles que demandées.

Dans le cas où un participant ne fournirait pas les informations demandées, les organisateurs se réservent le droit de ne pas lui délivrer les conclusions (résultats et évaluations de performances) issues du traitement des données de l'essai.

Attention : le nombre de participants est limité. En cas de nombre trop élevé de candidats, une sélection des participants sera réalisée. Seront retenus par ordre de priorité :

1. les laboratoires d'analyses nationaux prestataires dans le cadre des programmes de surveillance de l'environnement ou de la santé,
2. les organismes académiques nationaux,
3. les laboratoires étrangers susceptibles d'œuvrer dans le cadre de l'agrément ministériel,
4. les organismes académiques étrangers.

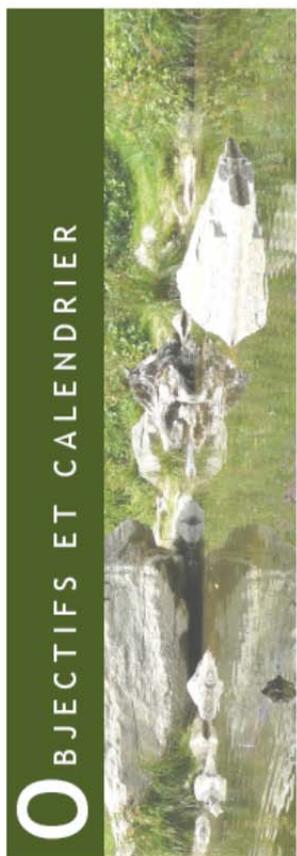
**Inscriptions : contact@association-aglae.fr
Contact et expression d'intérêt : l.amalric@brgm.fr**

AQUAREF, laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques, est né de la nécessité de renforcer l'expertise française dans le domaine de la surveillance des milieux aquatiques à partir de la mise en réseau des compétences et des capacités de recherche des cinq établissements publics directement concernés :

BRGM, CEMAGREF, IFREMER, INERIS et LNE
Organisé autour de 2 des axes forts de la directive cadre sur l'eau (DCE), la chimie et l'hydrobiologie, le laboratoire de référence a pour objectif d'appuyer les pouvoirs publics autour de 2 domaines au cœur de la surveillance des milieux aquatiques :

La qualité de la donnée
Le devenir de la surveillance des milieux aquatiques

Plus d'informations sur www.aquaref.fr, www.anses.fr, www.association-aglae.fr



L'analyse des paramètres émergents dans les eaux se heurte à la connaissance des performances des méthodes d'analyses en l'absence de textes normatifs et d'essais collaboratifs associés. Des campagnes d'analyses de résidus médicamenteux dans les eaux de consommation ont d'ores et déjà été réalisées et il apparaît nécessaire aujourd'hui de fiabiliser les protocoles associés, et de disposer d'éléments d'informations sur eaux environnementales. C'est dans cette optique qu'

AQUAREF, en coopération avec l'ANSES et AGLAE,

organise un

Essai inter-laboratoires

qui aura pour objectif :

- De permettre à l'ensemble des laboratoires ayant développé des techniques d'analyses sur les résidus de médicaments dans les eaux de s'inter-comparer ;
- De disposer d'éléments d'informations sur les performances analytiques et incertitudes concernant l'analyse de ces substances dans les eaux environnementales, à des niveaux de concentration habituellement constatés ;
- De collecter des données en support à la normalisation française,

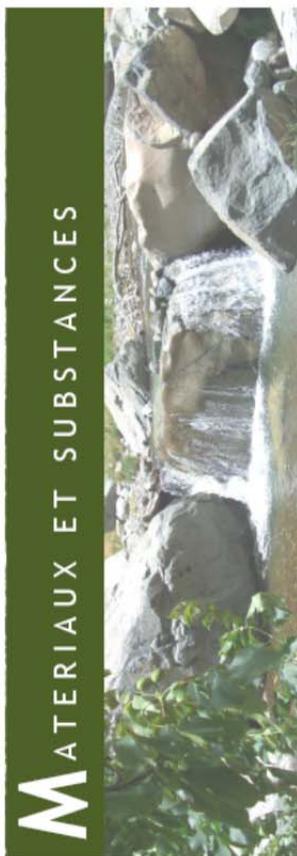
selon les modalités suivantes :

- **Essai gratuit pour les laboratoires participants**
- **Traitement des résultats de façon anonyme.**

Les établissements invités à participer à cet essai sont tous les laboratoires ayant développé une compétence en analyse des résidus médicamenteux dans les eaux autres que celles destinées à la consommation humaine, prestataires ou académiques, français ou étrangers. Ils mettront en œuvre leur méthodologie habituelle, et/ou la méthodologie proposée par les organisateurs dans le cadre des travaux de normalisation en cours.

Calendrier prévisionnel de l'essai :

30 juin 2011	clôture des inscriptions
11 octobre 2011	distribution du matériel d'essai
14 novembre 2011	limite de remise des résultats
9 février 2012	réunion de clôture de l'essai
31 mars 2012	distribution du rapport d'essai



Les substances suivantes feront l'objet de l'essai :

- Carbamazépine - Oxazépam
- Sulfaméthoxazole
- Ibuprofène - Diclofénac - Ketoprofène
- Aténolol - Métoprolol
- 17 α éthinylestradiol (EE2) - 17 β estradiol (Eb2) - Estrone.

Les matériaux d'essai seront constitués par :

- **1 solution de référence pour vérification instrumentale**
- **3 échantillons d'eaux naturelles**

Les participants recevront :

- **2 flacons d'un litre par échantillon d'eau et réaliseront 2 mesures par flacon**
- **1 flacon de solution de référence et réaliseront 3 mesures dans des conditions de répétabilité**

Le traitement des résultats fera appel aux méthodes statistiques classiques, relevant des guides ISO 43 et ISO 35 et des normes ISO 5725 et ISO 13528

Le rapport d'essai précisera le déroulement de l'essai, les résultats des tests de stabilité et d'homogénéité des lots, et l'exploitation statistique des données :

- niveau de concentration observé m (moyenne générale des résultats observés par les participants),
- niveau de concentration réalisé (par dopage métrologiquement maîtrisé),
- répétabilité r , et reproductibilité R ,
- tableaux et graphiques de l'ensemble des résultats de l'exploitation statistique,
- z-score et classement qualitatif de l'exactitude de la mesure
- zéto-score (paramètre statistique caractérisant la pertinence de l'estimation de l'incertitude de mesure associée au résultat).

ANNEXE 2

Rapport de comparaison interlaboratoire

Essai 11M57.1

EIL Aquaref – Résidus médicamenteux dans les eaux environnementales



RAPPORT DE COMPARAISONS INTERLABORATOIRES

Essai 11M57.1

**EIL AQUAREF – Résidus médicamenteux
dans les eaux environnementales**

Association A.G.L.A.E.
Parc des Pyramides - Bâtiment D
427 Rue des Bourreliers
59320 HALLENES LEZ HAUBOURDIN
☎ 03 20 16 91 40
@ contact@association-aglae.fr
www.association-aglae.fr

**VERSION DÉFINITIVE APPROUVÉE LE
MERCREDI 17 JUILLET 2013 PAR RONAN
CHARPENTIER, RESPONSABLE
D'EXPLOITATION**

SOMMAIRE

OBJECTIF DE L'ESSAI	74
PRÉSENTATION DE L'ESSAI.....	74
PRÉPARATION DES MATÉRIAUX	74
PLAN D'ESSAI	75
ENVOI DES ÉCHANTILLONS	76
QUALITÉ DES MATÉRIAUX	76
APPROCHE DE LA JUSTESSE	78
CORRECTION DES RÉSULTATS.....	80
EXPLOITATION STATISTIQUE DES RESULTATS	81
INCERTITUDES DE MESURE	81
ECARTS ENTRE MÉTHODES.....	82
CONCLUSION	82
ANNEXES JOINTES (FAISANT PARTIES INTÉGRANTES DU RAPPORT)	84

OBJECTIF DE L'ESSAI

L'analyse des paramètres émergents dans les eaux se heurte à la connaissance des performances des méthodes d'analyses en l'absence de textes normatifs et d'essais collaboratifs associés. Des campagnes d'analyses de résidus médicaments dans les eaux de consommation ont d'ores et déjà été réalisées et il apparaît nécessaire aujourd'hui de fiabiliser les protocoles associés, et de disposer d'éléments d'informations sur eaux environnementales.

C'est dans cette optique qu'**AQUAREF, en coopération avec l'ANSES et AGLAE, a organisé cet Essai inter-laboratoires** qui aura pour objectif :

- De permettre à l'ensemble des laboratoires ayant développé des techniques d'analyses sur les résidus de médicament dans les eaux de s'inter-comparer ;
- De disposer d'éléments d'informations sur les performances analytiques et incertitudes concernant l'analyse de ces substances dans les eaux environnementales, à des niveaux de concentration habituellement constatés ;
- De collecter des données en support à la normalisation française.

PRÉSENTATION DE L'ESSAI

Période d'essai : octobre – novembre 2011

Date de clôture : 16 novembre 2011

Nature des matériaux : eau souterraine

Nombre de lots préparés : 3

Paramètres mis en œuvre : Carbamazépine, oxazépam, sulfaméthoxazole, ibuprofène, diclofénac, kétoprofène, aténolol, métoprolol, 17 α éthinylestradiol (EE2), 17 β estradiol (Eb2), estrone

Nombre de participants : 33

PRÉPARATION DES MATÉRIAUX

Dans la cadre du partenariat Aquaref / AGLAE, le BRGM s'est chargé de la préparation des matériaux.

B.R.G.M.

Service Métrologie, Monitoring, Analyse MMA/ENV

3, Avenue Claude Guillemin

B.P. 36009

45060 ORLEANS CEDEX 2

Responsable Exécutif : Madame AMALRIC

Le tableau ci-dessous résume la préparation des matériaux :

	Lot 1 (Flacons A et B)	Lot 2 (Flacons C et D)	Lot 3 (Flacons E et F)
Matrice utilisée	Eau souterraine		
Traitement de la matrice	Pas de traitement		
Fractionnement	Soutirage sous agitation mécanique continue, d'un seul trait, flacon par flacon (tous les flacons étiquetés aléatoirement A, B, C, D, E et F ont été soutirés en même temps)		
Conditionnement	Flacons en verre blanc de 1000 ml		
Mode de dopage	Dopage réalisé directement dans les flacons		
Paramètres dopés	Pas de dopage	Dopage (niveau bas) pour tous les paramètres sauf EE2 et Eb2	Dopage (niveau haut) pour tous les paramètres sauf estrone + dopage interférant en 17 α estradiol (Ea2)
Date de dopage	10/10/2011		

Caractérisation de la matrice :

Paramètre	valeur	Date d'analyse	Unité
pH à 20°C	7,30	16/09/2011	unité de pH
DCO	<30	21/09/2011	mg d'O ₂ .L ⁻¹
MEST	3,3	23/09/2011	mg.L ⁻¹
Na⁺	15,6	28/09/2011	mg.L ⁻¹
Ca²⁺	41,0	28/09/2011	mg.L ⁻¹
Mg²⁺	5,74	28/09/2011	mg.L ⁻¹
NO₃⁻	7,44	03/10/2011	mg.L ⁻¹
Cl⁻	47,3	03/10/2011	mg.L ⁻¹

PLAN D'ESSAI

Sur chacun des échantillons appariés (A avec B, C avec D et E avec F), deux analyses devaient être réalisées dans des conditions de répétabilité (plan à 2 répliques sur 2 échantillons appartenant au même lot).

Une solution de référence avait également été envoyée pour contrôler l'étalonnage des instruments mis en œuvre pour la quantification des matériaux d'essai. La préparation de cette solution a été réalisée par le LNE¹. L'exploitation et l'interprétation des résultats de cette solution de référence seront intégrées dans le rapport AQUAREF de valorisation de l'essai d'inter laboratoires sur les résidus pharmaceutiques.

ENVOI DES ÉCHANTILLONS

Les matériaux d'essai ont été envoyés le 11 octobre 2011. Tous les participants ont reçu leur colis le lendemain.

QUALITÉ DES MATÉRIAUX

La qualité des matériaux envoyés a été contrôlée pour l'ensemble des paramètres mis en œuvre lors de la Période Reasonnable pour le Début de Traitement des échantillons (P.R.D.T.).

Cependant, pour plusieurs paramètres du lot 1 (flacons A et B), sur lequel aucun dopage n'a été effectué, les teneurs observées inférieures à la limite de quantification (LQ) ne permettaient aucune exploitation statistiques des données. Il s'agit de l'aténolol, du diclofénac, du kétoprofène, du métoprolol, de l'estrone, du 17 α éthinylestradiol et du 17 β estradiol.

La stabilité des matériaux a été vérifiée par l'étude de la répartition des résultats des participants en fonction des dates de début de traitement des échantillons déclarées. De plus, un contrôle mené par le BRGM pour les médicaments et par le CEMAGREF² pour les hormones a permis de compléter cette évaluation pour les lots 2 et 3.

L'homogénéité des lots préparés a été évaluée à travers l'étude des données des participants. Comme pour le contrôle de la stabilité, une étude complémentaire a été mise en œuvre par le BRGM et le CEMAGREF pour les lots 2 et 3.

Globalement, les lots d'échantillons étaient suffisamment stables et homogènes pour être employés lors d'un essai interlaboratoires d'aptitude, comme le montrent les résultats des contrôles statistiques présentés en annexe 1.

Pour quelques paramètres la qualité des matériaux n'était toutefois pas suffisante.

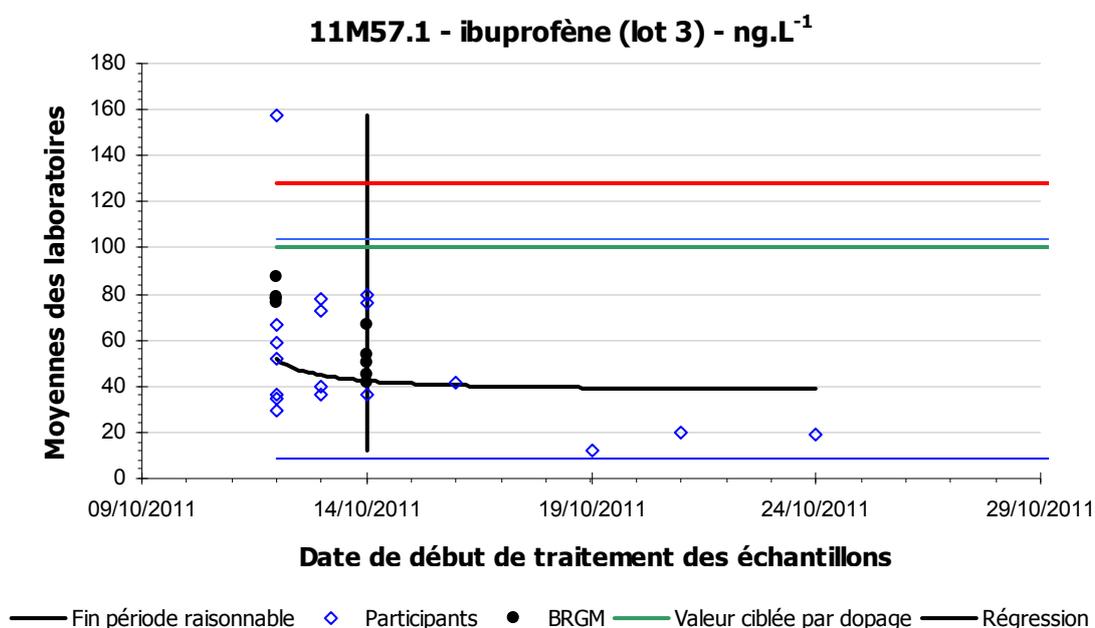
Pour l'ibuprofène (lot 1), les écarts entre flacons observés par les participants sont trop importants par rapport à l'erreur de mesure interlaboratoires et intralaboratoire (répétabilité) pour pouvoir évaluer les performances analytiques des participants. En conséquence, nous n'avons pas calculé de z-scores et de classements d'exactitude.

¹LNE- Département Biomédical et Chimie Organique- 1 rue Gaston Boissier-75724 Paris cedex 15. Personne contact : Sophie Lardy-Fontan

² Mr BADOS – CEMAGREF – 3bis quai Chauveau - CP 220 – 69336 LYON CEDEX 09

Pour l'ibuprofène (lot 2), l'hétérogénéité de lot apparaît suffisamment réduite devant l'erreur de mesure interlaboratoires bien que significative.

Pour l'ibuprofène (lot 3), le contrôle du BRGM a montré une forte tendance à la baisse des résultats entre le 12/10/2011 et le 14/10/2011. Cette tendance n'est pas observée sur les résultats des participants, hormis les quelques résultats obtenus en dehors de la PRDT. Toutefois, l'écart à la valeur ciblée par dopage atteste de l'hypothèse d'une instabilité. Ce paramètre a donc été écarté de l'essai.



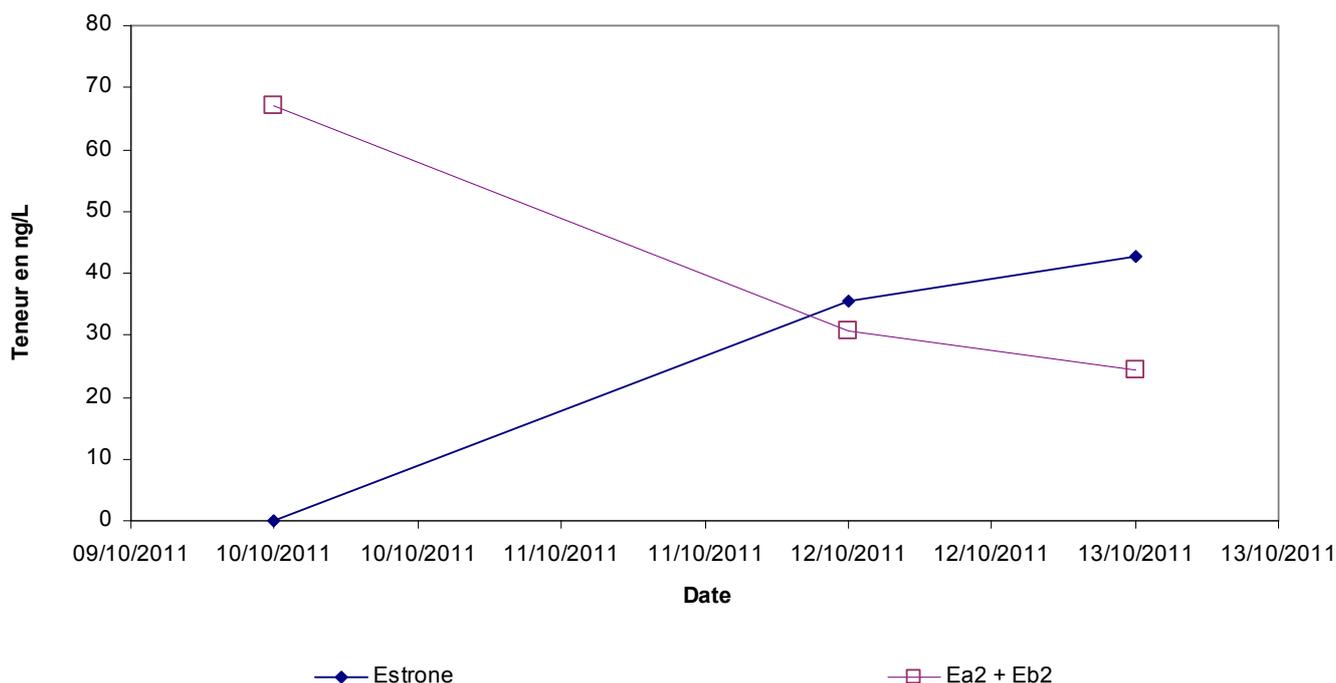
Enfin, **pour l'estrone et le 17 β estradiol sur le lot 3** nous avons mis en évidence une instabilité rédhibitoire.

Une étude préliminaire et les contrôles mis en œuvre lors de cet essai ont montré que le 17 β estradiol ainsi que le 17 α estradiol se dégradent en estrone.

Pour le lot 3 nous avons effectué un dopage en 17 β estradiol et en 17 α estradiol à des teneurs ciblées autour de 33 ng.L⁻¹. Aucun dopage n'a été réalisé en estrone, composé par ailleurs non détecté dans l'eau souterraine utilisée comme matrice (concentration inférieure à 0,4 ng.L⁻¹). A J+2, c'est-à-dire le 12/10/2011, le CEMAGREF a contrôlé la teneur de ces trois composés en analysant 5 flacons différents.

Ce contrôle a été renouvelé à J+3 le 13/10/2011. Les résultats ont été reportés dans le graphique ci-après.

Evolution de l'estrone et de la somme Ea2 et Eb2 - Lot 3 (flacons E et F)



Il apparaît de manière évidente qu'il y a une symétrie entre l'évolution de la teneur en estrone et l'évolution de la somme des teneurs en 17 β estradiol et en 17 α estradiol.

La teneur en estradiol a diminué de 43 ng/L alors que la teneur en estrone a augmenté de 43 ng/L.

Le tableau ci-dessous est peut-être plus explicite encore :

Date	Perte en Ea2 par rapport au dopage	Perte en Eb2 par rapport au dopage	Perte en Ea2 + Eb2	Gain en Estrone
12/10/2011	-16	-20	-36	+36
13/10/2011	-19	-24	-43	+43

Teneurs en ng.L⁻¹

APPROCHE DE LA JUSTESSE

Le tableau ci-après compare la valeur ciblée par dopage avec la valeur moyenne observée par les participants, en tenant compte de leur intervalle de confiance associé. Le dopage a été effectué en dopant les échantillons directement dans chaque flacon.

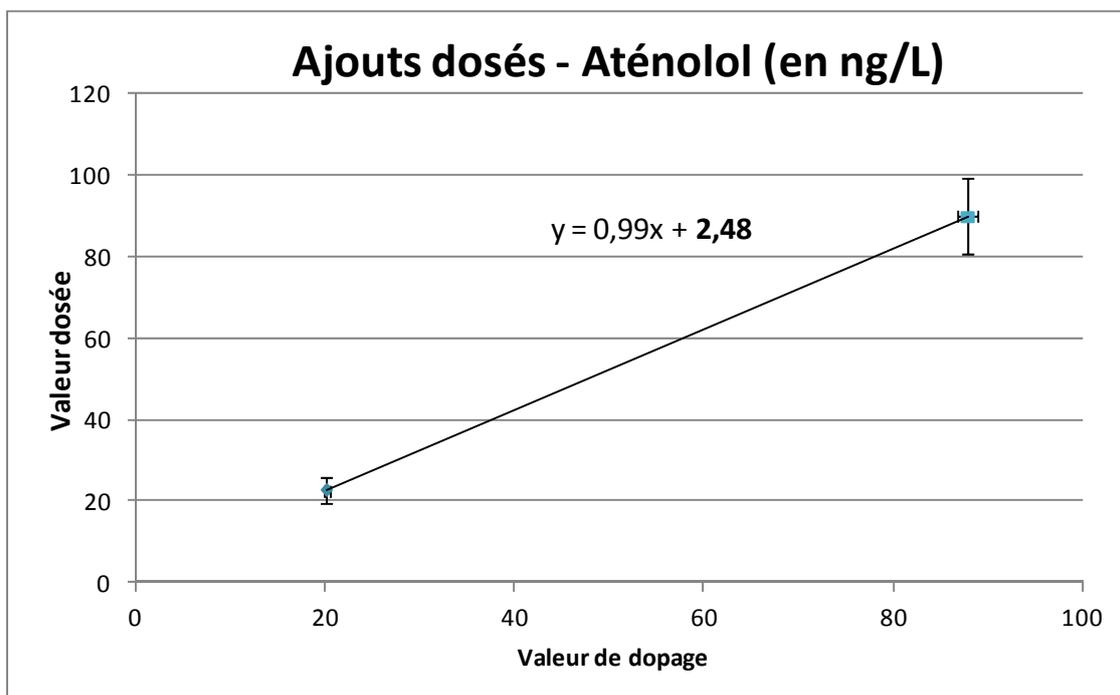
Note : L'incertitude sur la valeur ciblée par dopage a été calculée métrologiquement selon la norme NF ENV 13005 : 1999 (Guide pour l'expression de l'incertitude de mesure).

Calcul des concentrations initiales dans la matrice :

La concentration initiale dans la matrice correspond aux teneurs moyennes observées par les participants pour la carbamazépine, l'oxazépam et le sulfaméthoxazole.

Pour l'aténolol, le diclofénac, le kétoprofène et le métoprolol, il a fallu procéder par régression linéaire en ajouts dosés sur les résultats observés sur les lots 2 et 3. En effet, pour ces paramètres les teneurs dans la matrice étaient inférieures aux limites de quantification des participants et du laboratoire ayant contrôlé les matériaux (le BRGM).

Ci-dessous, l'exemple de l'aténolol pour lequel la concentration initiale a été estimée à 2,48 ng/L.



Le tableau ci-dessous présente les concentrations initiales ainsi calculées et leur intervalle de confiance pour les 4 paramètres concernés :

	Borne inférieure à 95 % (en ng/L)	Concentration initiale (en ng/L)	Borne supérieure à 95 % (en ng/L)
Aténolol	-2,48	2,48	7,45
Diclofénac	-2,42	3,70	9,82
Kétoprofène	-2,19	2,82	7,84
Métoprolol	-2,04	4,56	11,16

A noter que l'intervalle de confiance à 95 % chevauche le zéro pour tous les paramètres. Nous ne pouvons donc pas rejeter l'hypothèse que la concentration initiale de chacun de ces paramètres était à 0 ng/L au risque α de 5 %.

Pour les hormones, un seul lot a été dopé ; nous n'avons donc pas pu procéder de la même façon. Pour ces paramètres, la concentration initiale a été estimée à partir des résultats du laboratoire ayant contrôlé les matériaux (le CEMAGREF).

Le tableau ci-dessous reprend pour chacun des paramètres sur les lots dopés (lots 2 et 3) : les concentrations initiales dans l'eau souterraine, les valeurs ciblées par dopage, l'incertitude élargie (k=2) sur la valeur ciblée par dopage, la valeur retrouvée par les participants avec son incertitude élargie (k=2), l'écart relatif entre la valeur ciblée par dopage et la valeur observées par les participants. Il indique finalement si cet écart est significatif en tenant compte des incertitudes.

Paramètre	Concentration initiale dans la matrice	Valeur ciblée par dopage ⁽¹⁾	Incetitude élargie sur la valeur ciblée par dopage	Valeur observée par les participants	Incetitude élargie sur la valeur observée par les participants	Ecart à la cible en % (m-cible)/cible	Valeur ciblée par dopage retrouvée ?
Lot n°2 – Dopage bas							
Carbamazépine	19,52	40,25	± 2,66	41,803	± 4,295	+4 %	OUI
Oxazépam	22,32	42,59	± 2,77	42,862	± 4,672	+1 %	OUI
Sulfaméthoxazole	9,05	29,69	± 1,22	28,826	± 2,090	-3 %	OUI
Ibuprofène	6,70	27,25	± 1,79	24,013	± 7,132	-12 %	OUI
Diclofénac	3,70	23,84	± 6,12	24,201	± 3,333	+1 %	OUI
Kétoprofène	2,82	23,04	± 5,02	25,740	± 5,075	+12 %	OUI
Aténolol	2,48	22,69	± 4,97	22,042	± 2,804	-3 %	OUI
Métoprolol	4,56	24,85	± 6,61	25,766	± 3,705	+4 %	OUI
estrone	<0,4	2,23	± 0,23	1,7414	± 2,075	-22 %	OUI
Lot n°3 – Dopage haut							
Carbamazépine	19,52	115,90	± 2,92	120,910	± 12,006	+4 %	OUI
Oxazépam	22,32	119,26	± 3,02	118,786	± 14,291	+0 %	OUI
Sulfaméthoxazole	9,05	105,03	± 1,71	100,633	± 8,782	-4 %	OUI
Ibuprofène	6,70	100,79	± 2,14	56,389	± 15,918	-44 %	NON
Diclofénac	3,70	99,21	± 6,24	98,880	± 16,816	+0 %	OUI
Kétoprofène	2,82	96,98	± 5,16	101,986	± 9,800	+5 %	OUI
Aténolol	2,48	90,33	± 5,09	88,912	± 8,614	-2 %	OUI
Métoprolol	4,56	100,53	± 6,72	104,585	± 16,922	+4 %	OUI
17 α éthinylestradiol	<1,2	35,584	± 0,82	35,1680	± 8,830	-1 %	OUI
17 β estradiol	<0,6	33,126	± 0,54	11,7940	± 5,383	-64 %	NON
17 α estradiol	<0,4	33,825	± 0,49	<i>Molécule pas analysée par les participants</i>			

Unité en ng.L⁻¹

⁽¹⁾ **Attention** : les valeurs ciblées par dopage sont les teneurs visées par l'Opérateur ; les niveaux de concentration réalisés sont probablement voisins, mais elles ne doivent en aucun cas servir de référence.

CORRECTION DES RÉSULTATS

Lors du traitement statistique initial des résultats il est apparu que plusieurs laboratoires avaient fait des erreurs grossières dans le rendu de leurs résultats (erreurs d'unité, inversion des résultats de plusieurs molécules lors de la saisie). Cet essai sortant du cadre habituel des essais d'aptitude, nous avons recontacté ces laboratoires pour qu'ils nous confirment ou corrigent les résultats qu'ils nous ont rendus. Le cas échéant, les résultats ont été corrigés et les paramètres ont été retraités.

EXPLOITATION STATISTIQUE DES RÉSULTATS

La valeur de référence assignée au matériau a été estimée à partir des résultats des participants ayant débuté le traitement de leurs échantillons dans la période raisonnable pour le début de traitement des échantillons (trois jours après l'envoi des matériaux pour les médicaments et deux jours pour les hormones). Cette valeur a été calculée avec une version améliorée de l'algorithme A de la norme ISO 13528.

A noter que pour cet essai nous avons exceptionnellement demandé aux laboratoires participants de rendre une valeur numérique même si leur résultat se trouvait en dessous de leur limite de quantification. Les laboratoires n'ayant pas détecté la molécule ont *a priori* indiqué une valeur nulle. L'objectif était de mieux intégrer les résultats de type « inférieur à » dans le traitement statistique car d'un point de vue uniquement statistique il est plus intéressant d'avoir un résultat numérique, même empreint d'incertitude, qu'un résultat de type « inférieur à » qui représente une donnée moins intéressante. A noter que certains laboratoires ont tout de même rendu leur résultats sous forme de limite de quantification ; ces données n'ont pas été prises en compte dans l'établissement des valeurs de référence et dans le calcul de la fidélité.

Les performances analytiques des participants ont été évaluées avec :

- des z-scores ;
- des classements qualitatifs de l'exactitude ;
- des zéta-scores.

Pour plusieurs paramètres les résultats des participants n'ont pas pu être exploités pour déterminer une valeur de référence et un écart-type pour l'évaluation de l'aptitude.

Pour l'aténolol (lot 1), le diclofénac (lot 1), le kétoprofène (lot 1), le métoprolol (lot 1), l'estrone (lot 1), le 17 α éthinylestradiol (lots 1 et 2), le 17 β estradiol (lots 1 et 2), **les teneurs étaient trop basses** pour que suffisamment de laboratoires détectent les molécules. En conséquence, les résultats n'ont pas pu être exploités (pas de calcul de z-score, de zéta-score, ni de classement qualitatif). Nous avons toutefois pu observer que le laboratoire 31 et le laboratoire 24 avaient rendu des **faux positifs** sur ces échantillons pour lesquels les teneurs étaient assimilables à « zéro » (uniquement pour le 17 β estradiol lot 2 pour le code 24). Ces résultats ont été surlignés en rouge dans les tableaux de résultats.

Notes :

- *pour l'aténolol (lot 1), le diclofénac (lot 1), le kétoprofène (lot 1) et le métoprolol (lot 1) nous avons une valeur de référence disponible (calcul des concentrations par ajouts dosés) et il était donc possible de calculer des zéta-scores. Toutefois, l'incertitude sur cette valeur de référence est trop importante pour pouvoir l'utiliser à bon escient. En conséquence, nous n'avons pas calculé de zéta-scores pour ces paramètres.*
- *pour l'estrone (lot 2), nous n'avons pas assez de résultats pour réaliser l'exploitation statistique.*

Enfin, pour l'ibuprofène (lots 1 et 3), l'estrone (lot 3) et le 17 β estradiol (lot 3) **la qualité des matériaux n'était pas suffisante** pour évaluer les performances analytiques des participants (Cf. § « Qualité des matériaux »). Pour ces paramètres également nous ne ferons qu'un rendu de résultats sans évaluation.

INCERTITUDES DE MESURE ET ZETA-SCORES

Lors de cet essai les laboratoires devaient rendre leurs résultats accompagnés de leurs incertitudes. La grande majorité des laboratoires a rendu une incertitude ; nous avons donc pu calculer les incertitudes médianes pour chaque paramètre et pour chaque lot (voir tableau ci-après).

	Incertitudes relatives élargies (k=2) médianes rendues		
	Lot n°1 (pas de dopage)	Lot n°2 (niveau dopage bas)	Lot n°3 (niveau de dopage haut)
Aténolol	25 %	25 %	20 %
Carbamazépine	25 %	25,5 %	22,5 %
Diclofénac	30 %	28 %	23,5 %
Ibuprofène	24 %	24 %	24 %
Kétoprofène	35 %	25 %	25 %
Métoprolol	25 %	22 %	22 %
Oxazépam	25 %	25 %	21 %
Sulfaméthoxazole	27 %	25 %	22,5 %
Estrone	44 %	44,5 %	30 %
17 α éthinylestradiol(EE2)	28 %	28 %	29 %
17 β estradiol (Eb2)	17,5 %	20 %	26,55 %
Moyenne	28 %	27 %	24 %

Globalement (à l'échelle de la profession), l'incertitude relative élargie se situe autour de 25 %, avec des valeurs peut-être un peu plus faibles sur le lot 3 plus concentré.

La molécule pour laquelle les incertitudes sont les plus élevées est l'estrone. Les autres hormones, bien qu'ayant des teneurs beaucoup plus basses que les médicaments ont des incertitudes relativement comparables.

A partir de ces incertitudes, nous avons calculé des zéta-scores pour vérifier la fiabilité de leurs estimations. Pour le calcul et l'interprétation de cet indicateur, merci de vous reporter à l'aide à l'interprétation des rapports d'essai située en annexe.

Il faut toutefois faire bien attention, le zéta-score ne remplace pas le z-score !

Avoir un bon zéta-score et un mauvais z-score indique que vous avez bien identifié et intégré dans vos calculs toutes les sources d'incertitude de votre processus analytique. Mais cela n'enlève pas le fait que votre résultat d'analyse est trop éloigné de la valeur de référence assignée (relativement à la dispersion des résultats des participants). Cependant, le travail d'identification des sources d'erreur réalisé lors du calcul de votre incertitude de mesure doit pouvoir vous permettre d'identifier sur quelle partie de l'analyse les actions correctives doivent être menées.

Pour résumer, le zéta-score caractérise la qualité de votre bilan d'incertitude et votre capacité avec ce bilan à recouvrir la valeur « vraie ». Le z-score caractérise la position de votre laboratoire par rapport aux performances des laboratoires participants.

En moyenne, le pourcentage de zéta-scores supérieurs à 2 en valeur absolue est de 36 % : 9 laboratoires sont concernés en moyenne. Ce pourcentage relativement élevé indique que la profession ne maîtrise pas encore totalement son incertitude de mesure.

ECARTS ENTRE MÉTHODES

Le traitement statistique des données toutes méthodes confondues n'a pas été perturbé par d'éventuels écarts entre méthodes. Les graphiques de répartition des résultats en fonction des modalités analytiques sont disponibles dans le fichier Excel « Graphiques Méthodes - 11M571 ».

CONCLUSION

Les résultats de cet essai interlaboratoires portant sur le dosage de résidus de médicaments et d'hormones dans une eau naturelle sont particulièrement riches en enseignements.

Il apparaît tout d'abord que **la plupart des paramètres sont relativement stables dans l'eau**. On peut même constater que 3 médicaments étaient présents dans l'eau souterraine utilisée comme matrice pour préparer les échantillons : carbamazépine, oxazépam et sulfaméthoxazole.

En revanche, de toute évidence ibuprofène et 17 β estradiol se dégradent ; 17 β estradiol (et 17 α estradiol) se dégradent en estrone de manière caractérisée.

Les délais de conservation avant analyse de 3 jours pour les médicaments et de 2 jours pour les hormones sont donc a priori globalement cohérents si les échantillons sont réfrigérés.

Pour ibuprofène, Eb2 (et Ea2) et par conséquent estrone, des délais plus courts doivent être recherchés.

Il apparaît aussi que **l'exactitude de mesure peut être considérée comme bonne compte-tenu des niveaux de concentration**.

Concernant la justesse, estimée grâce à la réalisation d'ajouts dosés métrologiquement contrôlés : abstraction faite des 3 composés présentant des problèmes de stabilité, les valeurs de dopage sont en moyenne retrouvées par les laboratoires aux incertitudes expérimentales près.

Concernant la fidélité : avec des CVR % globalement de l'ordre de 20 % à 100 ng.L⁻¹, et de l'ordre de 25 % à 25 ng.L⁻¹, ces mesures s'inscrivent dans la lignée des dosages de micropolluants organiques plutôt reproductibles. En revanche, vouloir doser l'estrone à 2 ng.L⁻¹ apparaît utopique à l'échelle interlaboratoires, comme le montre le tableau des résultats obtenus sur le lot 2.

Par ailleurs, il apparaît que les laboratoires maîtrisent globalement bien les techniques de mesure disponibles.

En effet, l'examen du rapport R/r des tableaux de valeurs de fidélité (voir en annexe) révèle un effet « laboratoire » raisonnable.

Rappelons que R/r est le rapport de l'écart-type de reproductibilité s_R sur l'écart-type de répétabilité s_r .

Ainsi :

- R/r = 1 signifie que la reproductibilité est réduite à la répétabilité ; il n'y a pas d'effet interlaboratoires.
- R/r = 2 (par exemple) signifie que les données sont deux fois plus dispersées en reproductibilité qu'en répétabilité.

Très empiriquement, nous considérons que globalement les valeurs de R/r < 4 sont des valeurs normales difficilement améliorables. Lorsque les valeurs sont plus élevées, il peut être intéressant de mener une intercalibration visant à homogénéiser les pratiques analytiques ; l'objectif est alors de réduire l'erreur systématique.

Les valeurs observées au cours de cet essai se situent autour de 4,5 (médiane des R/r observés au cours de cet essai), avec :

- des valeurs basses pour l'oxazépam (R/r \approx 2,5) et EE2 (R/r = 3,5 – 1 seule valeur sur le lot 3) ;
- des valeurs élevées pour le métoprolol (R/r \approx 7,5).

Mis à part le cas du métoprolol, il n'est pas sûr que dans l'immédiat on puisse faire mieux que la situation observée ici.

Evidemment, des avancées technologiques, une normalisation plus poussée du processus et une sélection de la technique la moins empreinte d'erreur aléatoire peuvent permettre d'améliorer la qualité de la donnée.

Enfin, il apparaît que les estimations faites par les laboratoires de leur propre incertitude de mesure ne sont pas toujours très fiables. En moyenne, 1 laboratoire sur 3 sous-estime ses incertitudes.

Mais on peut gager que la situation évolue rapidement avec notamment la participation régulière à des campagnes d'essais interlaboratoires.

ANNEXES JOINTES (FAISANT PARTIES INTÉGRANTES DU RAPPORT)

Objet du document	Nature	Nb de pages
Valeurs de fidélité	Tableaux	3
Classement qualitatif des résultats	Tableaux	3
Synthèse des z-scores	Tableaux	3
Synthèse des incertitudes rendues par les participants	Tableaux	3
Aide à l'interprétation des rapports d'essai	-	4
Aténolol (lot 1) : Résultats des participants	1 tableau	1
Carbamazépine (lot 1) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Diclofénac (lot 1) : Résultats des participants	1 tableau	1
Ibuprofène (lot 1) : Résultats des participants	1 tableau	1
Kétoprofène (lot 1) : Résultats des participants	1 tableau	1
Métoprolol (lot 1) : Résultats des participants	1 tableau	1
Oxazépam (lot 1) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Sulfaméthoxazole (lot 1) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Estrone (lot 1) : Résultats et performances des participants	1 tableau	1
17 α éthinylestradiol – EE2 (lot 1) : Résultats et performances des participants	1 tableau	1
17 β estradiol – Eb2 (lot 1) : Résultats et performances des participants	1 tableau	1
Aténolol (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Carbamazépine (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Diclofénac (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Ibuprofène (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Kétoprofène (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Métoprolol (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Oxazépam (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Sulfaméthoxazole (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Estrone (lot 2) : Résultats des participants	1 tableau	1
17 α éthinylestradiol – EE2 (lot 2) : Résultats des participants	1 tableau	1
17 β estradiol – Eb2 (lot 2) : Résultats des participants	1 tableau	1
Aténolol (lot 3) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Carbamazépine (lot 3) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Diclofénac (lot 3) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Ibuprofène (lot 3) : Résultats des participants	1 tableau	1
Kétoprofène (lot 3) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Métoprolol (lot 3) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Oxazépam (lot 3) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Sulfaméthoxazole (lot 3) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
Estrone (lot 3) : Résultats des participants	1 tableau	1
17 α éthinylestradiol – EE2 (lot 2) : Résultats et performances des participants	2 tableaux + 2 graphiques	4
17 β estradiol – Eb2 (lot 2) : Résultats des participants	1 tableau	1
Fiche de synthèse	-	5

ANNEXES

(FAISANT PARTIES INTEGRANTES DU RAPPORT)

Essai interlaboratoires 11M57.1

Fiche de synthèse

Sujet de l'essai : EIL AQUAREF – Résidus médicamenteux dans les eaux environnementales

Paramètres : Carbamazépine, oxazéпам, sulfaméthoxazole, ibuprofène, diclofénac, kétoprofène, aténolol, métoprolol, 17 α éthynelestadiol (EE2), 17 β estradiol (Eb2), estrone

Période : octobre – novembre 2011

Nombre de participants : 33

Nature des matériaux mis en œuvre : eau souterraine

Qualité des matériaux (stabilité et homogénéité de lot) : Instabilité rédhibitoire pour l'ibuprofène (lot 3), l'estrone (lot 3) et le 17 β estradiol (lot 3). Hétérogénéité de lot rédhibitoire pour l'ibuprofène (lot 1).

Reproductibilité observée :

Lot n°1	Carbamazépine (lot 1)	Oxazéпам (lot 1)	Sulfaméthoxazole (lot 1)
m ⁽¹⁾	19,521	22,322	9,054
R ⁽²⁾	14,44	11,99	6,03
CV _R % ⁽³⁾	26,0	19,0	23,5
unité	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹

Lot n°2	aténolol (lot 2)	carbamazépine (lot 2)	diclofénac (lot 2)	ibuprofène (lot 2)
m ⁽¹⁾	22,042	41,803	24,201	24,013
R ⁽²⁾	15,01	23,69	16,67	29,75
CV _R % ⁽³⁾	24,0	20,0	24,5	44,0
unité	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹

Lot n°2 (suite)	kétoprofène (lot 2)	métoprolol (lot 2)	oxazéпам (lot 2)	sulfaméthoxazole (lot 2)
m ⁽¹⁾	25,740	25,766	42,862	28,826
R ⁽²⁾	22,33	19,47	20,56	9,51
CV _R % ⁽³⁾	30,5	26,5	17,0	11,5
unité	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹

⁽¹⁾ : niveau de concentration exprimé dans l'unité du paramètre

⁽²⁾ : reproductibilité R exprimée dans l'unité du paramètre

⁽³⁾ : coefficient de variation de la reproductibilité exprimé en %

Lot n°3	aténolol (lot 3)	carbamazépine (lot 3)	diclofénac (lot 3)	kétoprofène (lot 3)
m ⁽¹⁾	88,912	120,910	98,880	101,986
R ⁽²⁾	44,95	66,32	87,58	52,83
CV _R % ⁽³⁾	18,0	19,5	31,5	18,5
unité	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹

Lot n°3 (suite)	métoprolol (lot 3)	oxazépam (lot 3)	sulfaméthoxazole (lot 3)	17 α éthinylestradiol (lot 3)
m ⁽¹⁾	104,585	118,786	100,633	35,1680
R ⁽²⁾	89,99	62,70	46,23	35,173
CV _R % ⁽³⁾	30,5	18,5	16,0	35,5
unité	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹	ng.L ⁻¹

⁽¹⁾ : niveau de concentration exprimé dans l'unité du paramètre

⁽²⁾ : reproductibilité R exprimée dans l'unité du paramètre

⁽³⁾ : coefficient de variation de la reproductibilité exprimé en %

Classement qualitatif de vos résultats, paramètre par paramètre :

Onema
Hall C - Le Nadar
5, square Félix Nadar

94300 Vincennes
01 45 14 36 00
www.onema.fr

BRGM
MMA
3, avenue Claude Guillemin
BP 36009
45060 Orléans Cedex 2
02 38 64 34 34
www.brgm.fr