



Méthodes

Essai inter-laboratoires sur les résidus médicamenteux dans les eaux destinées à la consommation humaine

J.-S. Py, C. Rosin, N. Rimlinger, J.-F. Munoz, Afssa, Nancy (France)

Py J.-S., Rosin C., Rimlinger N., Munoz J.-F., (2010). Essai inter-laboratoire sur les résidus médicamenteux dans les eaux destinées à la consommation humaine, EuroReference, n° 3, ER03-10M02. <http://www.afssa.fr/euroreference/numero3/PN9001.htm>



En juin 2009, le Laboratoire d'études et de recherches en hydrologie (Afssa, Nancy) a mis en œuvre un essai inter-laboratoires exploratoire en collaboration avec le réseau « Aquaref » afin de déterminer les pratiques des laboratoires et d'estimer une incertitude inter-laboratoires sur les molécules étudiées. Ces molécules étaient au nombre de 12 appartenant à six familles (hormones, antibiotiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens, bêtabloquants, neuroleptiques et autre) dont une molécule à usage vétérinaire. C'est le premier EIL sur les eaux destinées à la consommation humaine réalisé en France. Il a réuni 31 laboratoires dont quatre laboratoires non français.

Dans le cadre de la réglementation et des recommandations du Comité français d'accréditation (Cofrac) dans la norme NF EN 17025, les laboratoires doivent participer à des essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA). Ces EILA ont pour objectif de vérifier leurs aptitudes analytiques pour des paramètres et des méthodes données. Les EIL exploratoires ont pour objectif de faire un état des lieux de la profession à un instant *t* en préparation d'une standardisation de méthode.

Dans ce contexte, le Laboratoire d'études et de recherches en hydrologie de l'Afssa (Nancy), en collaboration avec le réseau Aquaref, a organisé en juin 2009 un essai inter-laboratoires sur les résidus de médicaments. En concertation avec les différents participants, une liste de 12 molécules a été définie. Cette liste prend en compte différentes familles de molécules humaines (hormones, antibiotiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens, bêtabloquants, neuroleptiques et autre), et un antibiotique spécifique au domaine vétérinaire, la tylosine. Cet essai a regroupé 27 laboratoires français et 4 laboratoires hors France. Cet essai sur les résidus de médicaments dans les eaux avait pour objectifs :

- de recenser les laboratoires ayant commencé à développer des techniques d'analyses ;
- de disposer d'éléments d'informations sur les performances analytiques et les incertitudes ;
- de créer des coopérations entre laboratoires sur les méthodes d'extraction et de détection-quantification ;
- de participer à la rédaction de futurs textes normatifs et réglementaires.

Cet EIL portait sur l'étude de cinq échantillons, une solution étalon dans un mélange 50-50 en méthanol-acétonitrile (pour permettre une injection en chromatographie en phase gazeuse ou en chromatographie liquide) qui devait être diluée au 1/10^e dans les conditions d'injection des laboratoires, une eau minérale naturelle non dopée et dopée, une eau brute et une eau traitée. Les différentes préparations avaient pour objectif de vérifier les différentes étapes analytiques :

- l'échantillon dans le solvant permet de tester le système analytique sans tenir compte de la phase d'extraction ;
- l'utilisation d'une eau minérale permet de :
 - tester la maîtrise des contaminants au travers de la solution non dopée,

- vérifier l'efficacité du protocole d'extraction par rapport aux valeurs de dopage théorique sur une matrice propre et pauvre en matières organiques,
- comparer les données à celle de l'eau brute étudiée ;
- la matrice d'eau traitée permet de mesurer l'influence du protocole de stabilisation au thiosulfate de sodium sur des valeurs proches des performances des systèmes analytiques.

Les échantillons ont été préparés et envoyés le même jour. Ils ont été conditionnés dans des flacons en verre brun d'un litre sans traitement de stabilisation à l'exception de l'eau traitée (présence de thiosulfate de sodium à une teneur de 350 mg/L). Les participants devaient extraire dans les 48 heures après préparation de l'échantillon. Dans 85 % des cas, ce calendrier a été respecté.

Le prétraitement des échantillons et la méthode d'analyse n'étaient pas imposés pour évaluer la robustesse des différentes techniques d'extractions et d'analyses sur les quatre types de matrices (solvant, eau minérale, eau brute et eau traitée). Toutefois, il était précisé que les échantillons ne devaient pas être filtrés avant analyses. Le laboratoire pouvait également mettre en œuvre plusieurs méthodes d'analyses et rendre plusieurs résultats pour une même molécule. Un laboratoire a pratiqué trois techniques (CG-SM/SM, CL-SM/SM et pré-concentration en ligne CL-SM/SM).

Les analyses devaient être effectuées en double dans des conditions de répétabilité (deux extractions). Les résultats inférieurs à la limite de quantification pouvaient être communiqués, par exemple sous la forme : « < 5 ng/L ».

Le traitement statistique a été réalisé suivant la procédure utilisée par l'Afssa. Ce travail a permis d'obtenir tout d'abord des informations de justesse et de fidélité suivant les critères *h* et *k* de Mandel. Les tests robustes ont été privilégiés pour l'obtention de la moyenne et de l'écart-type afin de tenir compte de l'ensemble des données des laboratoires. Il n'y a pas eu d'élimination des valeurs aberrantes. La dernière étape du traitement statistique a consisté en l'étude de la performance individuelle afin d'obtenir des résultats sous la forme du calcul du *z*-score permettant d'identifier les « valeurs conformes », celles « à surveiller » et celles « non conformes » pour chaque valeur du couple molécule-matrice.



Méthodes

Les résultats obtenus permettent l'évaluation de la performance d'un laboratoire par rapport à la profession qui peut être représentée sous la forme d'un histogramme et une courbe de Gauss, comme le montre la figure 1.

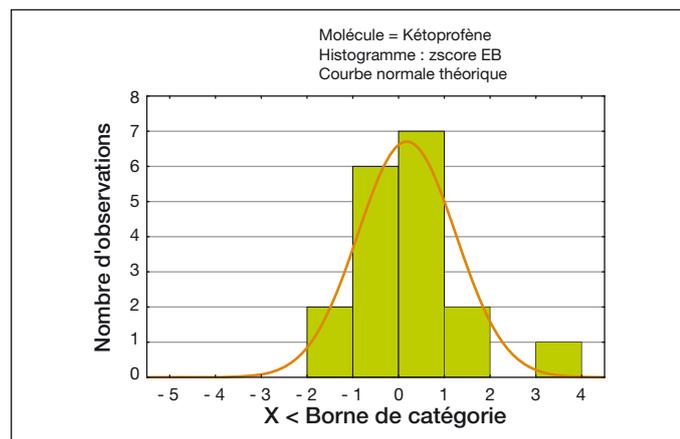


Figure 1: Histogramme des valeurs de z-score du kétoprofène dans l'eau brute

Cette figure représente le nombre de laboratoires dans chaque classe. Si l'on prend l'exemple de la classe [0-1], l'histogramme nous indique que sept laboratoires ont une valeur de z-score (différence entre la valeur du laboratoire moins la valeur moyenne des laboratoires divisés par l'écart type) compris entre 0 et 1. Les tolérances fixées par le calcul de z-score décrites dans le tableau 1, nous indiquent que dans le cas du kétoprofène, 95 % des laboratoires ayant rendu un résultat en eau brute ont des performances satisfaisantes.

Un travail similaire a été réalisé pour les 12 molécules étudiées (17- α -estradiol, 17- β -estradiol, éthinylestradiol, érythromycine, ofloxacin, tylosine, ibuprofène, diclofénac, kétoprofène, carbamazépine, aténolol, paracétamol) et les cinq échantillons.

Tableau 1: Tableau d'interprétation des valeurs de z-score

Valeur de z-score (z)	Interprétation
$ z = 0,0$	La performance correspond à la valeur assignée
$0,0 < z \leq 2,0$	La performance est acceptable/satisfaisante
$2,0 < z \leq 3,0$	La performance est suspecte/à améliorer
$3,0 < z $	La performance est inacceptable/à corriger

L'EIL a permis à chaque laboratoire de se situer par rapport à la profession, et de connaître le potentiel des laboratoires dans la perspective d'une éventuelle normalisation et réglementation dans le corpus législatif actuel.

Parmi les informations recueillies des laboratoires, il est intéressant d'examiner les rendements d'extractions vis-à-vis des critères de performances demandés dans la circulaire DGS/SD7A n° 2003-445 (2003) du ministère français de la Santé qui fixe des tolérances comprises entre 60 et 120 % sur le rendement d'extraction des pesticides et des produits apparentés. Si l'on rapproche ces exigences aux produits pharmaceutiques, la figure 2 permet d'identifier huit molécules ayant des rendements d'extraction compris entre 60 et 120 %. Cette interprétation se base sur les diagrammes de Tuckey de chaque molécule à savoir que les quartiles 1 et 3 se situent entre 60 et 120 %. Les méthodes utilisées pour deux tiers des molécules étudiées dans cet EIL respectent la circulaire du ministère français de la Santé. Nous pouvons également mettre en évidence que sur les mêmes critères, on observe que les méthodes utilisées pour 50 % des molécules ont des rendements supérieurs à 80 %.

La description des protocoles par les laboratoires a permis d'établir un schéma des phases analytiques sur la base de quatre facteurs impactant le résultat: le prétraitement de l'échantillon à réception, le protocole d'extraction, le mode de conservation et le mode de détection-quantification. La figure 3 reprend les pratiques majoritaires des laboratoires

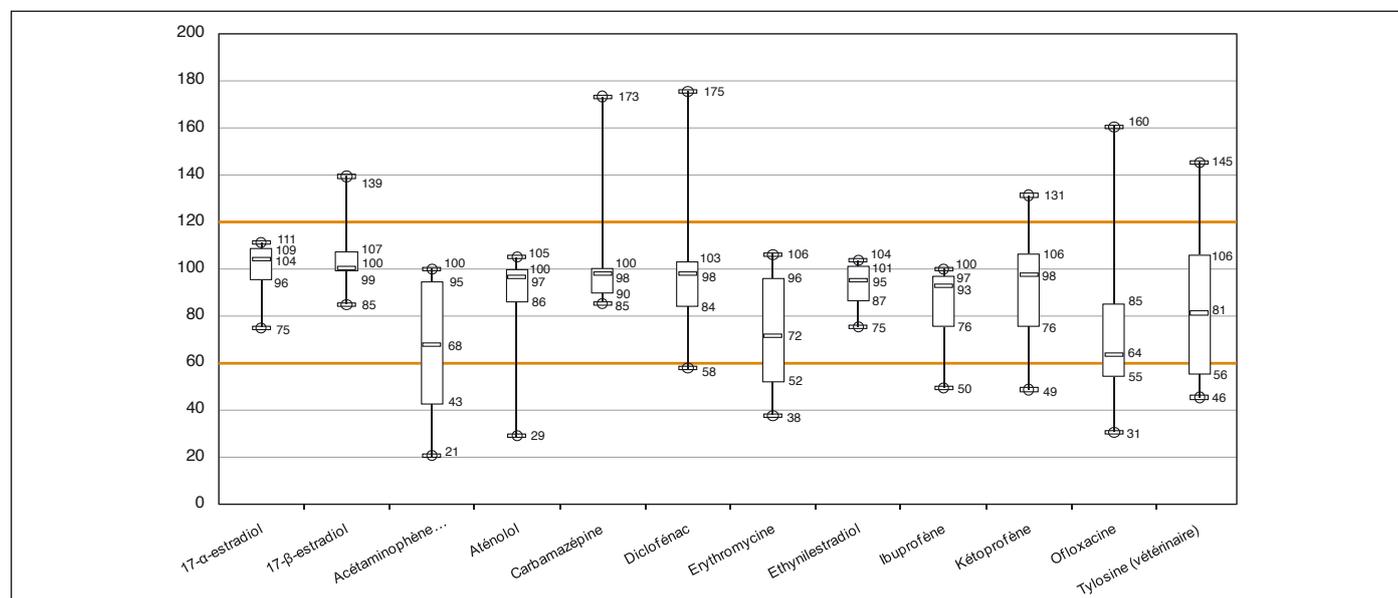


Figure 2: Illustration graphique des rendements suivant le diagramme de Tuckey



Méthodes

sans tenir compte de l'aspect performance car il n'y avait pas suffisamment de réponse par méthodologie type pour réaliser un traitement statistique.

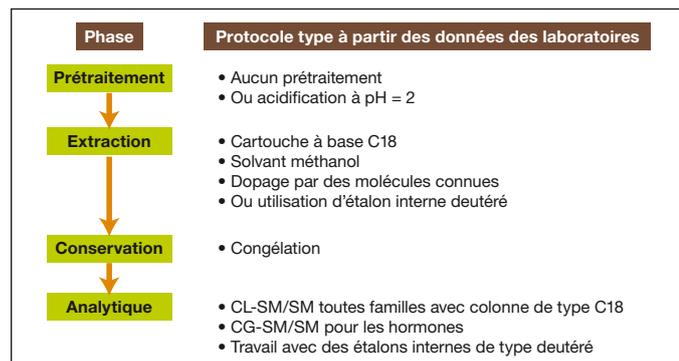


Figure 3 : Schéma type des phases analytiques à partir des informations fournies par les laboratoires

À partir des résultats des participants (moyenne et écart type), des coefficients de variation (CV) ont été calculés pour chaque molécule et au sein de chaque matrice, suivant la norme NF EN ISO 16140 de 2003. L'incertitude inter-laboratoires de la profession a été obtenue en appliquant la formule d'incertitude étendue. Les résultats présentés dans le tableau 2 mettent en évidence une incertitude comprise entre 47 % et 157 %, où 6 % des données sont inférieures à 50 %, 15 % des données sont comprises entre 50 % et 60 % et 35 % des données ont une incertitude supérieure à 100 %. Ces variations ont au moins deux explications :

- l'état d'avancement des laboratoires par rapport à la méthode (développement, validation, en démarche d'accréditation, accrédité) peut induire des variations importantes des résultats ;
- comme il n'existe pas de guide sur le dosage des produits pharmaceutiques dans l'eau, les laboratoires adaptent ou développent leur propre protocole, même s'il a été démontré une pratique comparable dans l'analyse de ces composés. Cette démarche non concertée entraîne des biais sur les résultats.

Conclusion

Ce premier essai inter-laboratoires français dans le domaine des eaux de consommation a permis d'avoir une meilleure vision des niveaux de performances actuels et de la pratique des laboratoires. Cette dernière semble assez uniforme d'un laboratoire à l'autre.

La forte participation illustre l'intérêt des laboratoires publics et privés pour ces nouveaux développements analytiques. L'étude de la comparabilité des résultats est d'autant plus importante que se multiplient actuellement les campagnes d'occurrences dans les eaux.

Cet essai met également en avant des points sensibles comme le nombre de molécules étudiées par rapport au nombre de molécules utilisées en France (12/3 000). Les incertitudes inter-laboratoires ont indiqué une forte variabilité des performances entre les laboratoires qui montrent une nécessité d'harmoniser les pratiques analytiques.

Ces travaux vont être poursuivis par :

- des travaux collaboratifs entre laboratoires en vue d'échanges sur les retours d'expériences et de la préparation d'un protocole normalisé qui devrait débiter durant le second semestre 2010 ;
- une estimation des incertitudes intra-laboratoire afin de vérifier la compatibilité des méthodes par rapport à la Directive 2009/90/CE dans le cadre d'un prochain essai.

D'autres essais inter-laboratoires sont prévus, et notamment un essai sur des eaux naturelles, qui va être mené en lien avec le réseau Aquaref. La sollicitation des laboratoires devrait débiter durant le deuxième semestre 2010 et l'essai devrait être réalisé durant le premier trimestre 2011.

Références bibliographiques

Circulaire DGS/SD7A n° 2003-445, du 17 septembre 2003 concernant les modalités d'application de l'arrêté relatif aux méthodes d'analyse d'échantillons d'eau et à leurs caractéristiques de performance.

Directive 2009/90/CE de la Commission, du 31 juillet 2009 établissant, conformément à la directive 2000/60/CE du parlement européen et du conseil, des spécifications techniques pour l'analyse chimique et la surveillance de l'état des eaux.

Norme NF EN ISO 16140 : 2003, Microbiologie des aliments - Protocole pour la validation des méthodes alternatives.

Tableau 2: Concentration moyenne et incertitude par molécule et par matrice

Familles	Molécules	Solution standard		Point de contrôle		Eau traitée		Eau brute	
		Moyenne en µg/L	Incertainitude	Moyenne en ng/L	Incertainitude	Moyenne en ng/L	Incertainitude	Moyenne en ng/L	Incertainitude
AINS	Diclofénac	277	47 %	27,15	63 %	19,09	54 %	68,77	67 %
	Ibuprofène	255	55 %	38,07	88 %	27,59	119 %	68,80	56 %
	Kétoprofène	255	52 %	31,61	73 %	25,60	109 %	74,60	62 %
Antibiotiques	Erythromycine	356	157 %	36,07	98 %	21,76	113 %	75,50	143 %
	Ofloxacin	201	92 %	33,49	102 %	24,13	101 %	67,07	113 %
	Tylosine	283	130 %	26,67	97 %	17,54	106 %	44,93	107 %
Bêtabloquants	Aténolol	239	101 %	29,09	56 %	14,80	93 %	59,10	79 %
Divers	paracétamol	251	48 %	31,94	70 %	22,80	61 %	78,60	57 %
Hormones	17-α-estradiol	244	139 %	39,91	96 %	31,45	76 %	94,26	79 %
	17-β-estradiol	277	100 %	36,22	108 %	25,35	75 %	86,40	88 %
	Ethinylestradiol	234	121 %	30,91	90 %	27,29	70 %	81,54	47 %
Neuroleptique	Carbamazépine	225	103 %	31,26	77 %	18,20	70 %	71,30	59 %