

IDENTIFICATION DES CARACTÉRISTIQUES DES MÉTHODES MULTI-RÉSIDUS POUR L'ANALYSE DES SUBSTANCES ORGANIQUES DANS LES EAUX, ET DE LEURS EXIGENCES MÉTROLOGIQUES

Amélioration des méthodes d'analyse chimique

L. Amalric, P. Bados, S. Lardy-Fontan, F. Lestremau et M.-P Strub
DÉCEMBRE 2012

Programme scientifique et technique
Année 2012

Document final

En partenariat avec



Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2012

Auteur (s) :

Laurence AMALRIC
BRGM
l.amalric@brgm.fr

Philippe BADOS
IRSTEA
philippe.bados@lrstea.fr

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

François LESTREMAU
INERIS
françois.LESTREMAU@ineris.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, P. Bados, S. Lardy-Fontan, F. Lestremau et M.-P. Strub - Identification des caractéristiques des méthodes multi-résidus pour l'analyse des substances organiques dans les eaux, et de leurs exigences métrologiques - Rapport AQUAREF 2012 - BRGM/RP-61865-FR - 53 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> |

**IDENTIFICATION DES CARACTERISTIQUES DES METHODES MULTI-RESIDUS POUR L'ANALYSE DES SUBSTANCES ORGANIQUES DANS LES EAUX ET DE LEURS EXIGENCES METROLOGIQUES
L. AMALRIC, P. BADOS, S. LARDY-FONTAN, F. LESTREMAU ET M.-P. STRUB**

RÉSUMÉ

Les laboratoires d'analyse environnementale ont développé pour l'analyse des contaminants organiques des méthodes internes permettant d'identifier et de quantifier simultanément de très nombreux composés de propriétés physico-chimiques différentes. Ces méthodes sont regroupées dans le vocabulaire courant sous le nom de « méthodes multi-résidus » mais sans qu'il existe de définition précise, ou de texte de référence associé.

Hors selon les pratiques et les équipements des laboratoires, ces méthodes multi-résidus font intervenir des méthodes d'extraction et des techniques d'analyse différentes dans les laboratoires. De plus elles font appel à des techniques d'analyse sensibles et sophistiquées, pouvant être sujettes à des interférences risquant de conduire à des résultats erronés (faux positif ou faux négatif).

L'accréditation par le Cofrac en portée flexible permet aux laboratoires de faire reconnaître leur savoir-faire pour le développement et la validation de ces méthodes, et constitue un gage de qualité pour les clients et donneurs d'ordre. Cependant devant l'étendue et la variété de ces méthodes, le nombre croissant de composés organiques à suivre dans les programmes de surveillance et leur grande variété de propriétés physico-chimiques, il apparaît nécessaire de mettre en place un cadre pour favoriser la comparabilité des données issues de ces protocoles de mesures en définissant les exigences métrologiques applicables à ces méthodes quand elles sont mises en œuvre dans le cadre des programmes de surveillance.

Ce document a pour objectif d'identifier les caractéristiques principales des méthodes multi-résidus et les exigences métrologiques souhaitables pour les étapes de développement, caractérisation et validation de la méthode. Il s'est appuyé sur les différents textes disponibles (guide Sanco, NF EN ISO 22892, NF EN ISO 15680).

Les principaux éléments à considérer lors de la mise en œuvre et la validation d'une méthode multi-résidus sont :

- la nature de la matrice, en réalisant les tests dans une matrice naturelle représentative des échantillons qui seront à analyser ;
- la totalité des composés d'intérêt, en introduisant tous les composés à toutes les étapes (extraction, analyse) ;
- l'emploi d'étalons internes choisi rigoureusement et en nombre suffisant afin d'en disposer d'au moins un pour chaque famille (codification Sandre) et cela dès l'étape de préparation de l'échantillon (extraction, préconcentration) ;
- le rendement d'extraction absolu moyen ($n = 10$), en respectant une fourchette de 70-130 % avec un coefficient de variation inférieur ou égale à 20 % ;
- la séparation chromatographique, avec le respect de critères (temps de rétention minimal, tolérance sur le temps de rétention) fonction de la technique (chromatographie gazeuse ou liquide) et du mode de détection et en veillant à répartir les étalons internes tout au long du chromatogramme, avec un minimum d'un étalon interne pour 10 composés ;
- l'identification des composés, en respectant des critères selon la technique d'analyse ;
- le respect des tolérances maximales pour les intensités ioniques en spectrométrie de masse ;
- la confirmation de l'identité des composés par le calcul du nombre de points d'identification dont le score minimum est fixé à 4 avec l'attribution d'un point pour la correspondance du temps de rétention.

Ce document est un préambule à la rédaction d'un guide d'exigences applicables aux méthodes multi-résidus.

Mots clés (thématique et géographique) : validation - analyse chromatographique - méthode multi-résidus - micropolluants organiques - exigences métrologiques - eaux

**IDENTIFICATION OF THE CHARACTERISTICS OF THE MULTIRESIDUES METHODS FOR THE ANALYSIS OF ORGANIC SUBSTANCES IN WATERS AND THEIR METROLOGICAL REQUIREMENTS
L. AMALRIC, P. BADOS, S. LARDY-FONTAN, F. LESTREMAU ET M.-P. STRUB**

ABSTRACTS

Laboratory of environmental analysis developed their own internal methods for the analysis of organic contaminants allowing to identify and to quantify simultaneously very numerous compounds of different chemical properties. These methods are grouped under the name of "multiresidues methods" but there is no reference text.

Depending on the practices and the equipment of laboratories, these multi-residues methods consist in various extraction methods and various analytical techniques depending on laboratories. Furthermore they use sensitive and sophisticated analytical techniques, which could generate interferences leading to erroneous results (false negative or positive results).

With the flexible scope accreditation, the laboratories can develop and validate their own methods, showing a quality assurance for the customers and the contractors. However due to the variety of these methods, the increasing number of organic compounds to be monitored and their large of chemical properties, it seems necessary to set up a frame defining the metrological requirements applicable to these methods.

This document has for objective to identify the main characteristics of the multi-residues methods and their metrological requirements to respect during the development, characterization and validation steps. It was established using the various available standards (guide Sanco, NF IN ISO 22892, NF IN ISO 15680).

The main elements to be considered during the implementation and the validation of a multiresidues method are:

- The nature of the matrix, by realizing the tests in a representative natural matrix of the samples to analyze ;
- The totality of the compounds of interest, by introducing all the compounds in all the steps (extraction, analysis) ;
- The use of internal standards chosen strictly and in number being enough to have at least one for each family , and added at the beginning of the sample preparation (extraction) ;
- The mean recovery (n=10), with the respect of 70-130% criteria and with a coefficient of variation equal or below 20% ;
- The chromatographic separation, with the respect for criteria (minimal retention time, tolerance for the retention time) function of the analytical technique (gaseous or liquid chromatography) and the mode of detection, and by watching to distribute the internal standards throughout the chromatograms, with a minimum of one internal standard for 10 compounds ;
- The identification of compounds, by respecting criteria according to the technique of analysis ;
- The respect for the maximal tolerances for the ionic intensities in mass spectrometry ;
- The confirmation of the identity of compounds by the calculation of the number of identification points with a minimum score fixed to 4 with the attribution of 1 point for the correspondence of the retention time.

This document is an introduction of a guide of requirements applicable to the multi-residues methods.

Key words (thematic and geographical area): validation - analytical method -organic contaminants - water

| | |
|---|----|
| 1. Objectif..... | 13 |
| 2. Définition « méthode multi-résidus »..... | 15 |
| 3. Références pour la validation d'une méthode multi-résidus..... | 17 |
| 4. Eléments à considérer pour la validation des méthodes multi-résidus quantitatives..... | 19 |
| 4.1. Matrice..... | 19 |
| 4.2. Etalons internes..... | 19 |
| 4.2.1. Rôle des étalons internes..... | 19 |
| 4.2.2. Choix des étalons internes..... | 20 |
| 4.2.3. Composés étalons et solutions d'étalonnage..... | 21 |
| 4.3. Taux de récupération..... | 21 |
| 4.3.1-Détermination du rendement d'extraction du composé..... | 21 |
| 4.3.2-Prise en compte du rendement d'extraction du composé..... | 24 |
| 4.4. Limite de quantification..... | 24 |
| 4.5. Séparation chromatographique..... | 24 |
| 4.6. Méthodes d'identification des composés cibles..... | 27 |
| 4.6.1. Détection par absorption dans l'UV-visible..... | 27 |
| 4.6.2. Détection fluorimétrique..... | 27 |
| 4.6.3. Détection par spectrométrie de masse..... | 28 |
| 5. Confirmation des résultats..... | 31 |
| 5.1. Textes de référence..... | 31 |
| 5.2. Méthodes de confirmations de l'identité d'un composé..... | 32 |
| 5.2.1. Identification selon le mode de détection (guide Sanco)..... | 32 |
| 5.2.2. Système d'identification par points..... | 32 |
| 5.4. Synthèse du système de confirmation de l'identité d'une substance..... | 34 |
| 5.5. Faux négatifs /faux positifs dans le cadre de la mise en œuvre de méthode multi-résidus .. | 36 |
| 6. Cas des méthodes d'analyse qualitative..... | 39 |
| 7. Critères pour les contrôles en routine des analyses multi-résidus..... | 41 |
| 7.1. Contrôle du taux de récupération en routine..... | 41 |
| 7.2. Contrôle du blanc..... | 42 |
| 7.3. Contrôle de la limite de quantification ou du seuil de décision..... | 42 |
| 8. Conclusions..... | 43 |
| 9. Références..... | 45 |

Liste des illustrations :

| | |
|--|----|
| Illustration 1 : Nombre de publications internationales concernant l'approche multi résidus par année..... | 15 |
| Illustration 2 : Les différentes approches de la méthode multi-résidus..... | 16 |
| Illustration 3 : Chromatogramme d'une l'analyse multi-résidus de 300 pesticides par LC/MSMS. | 16 |
| Illustration 4 : Eléments de validation nécessaires pour une méthode multi-résidus, selon son objectif d'information (qualitative, quantitative)..... | 17 |
| Illustration 5 : Décision sur la présence ou non de l'analyte et risque associé. | 18 |
| Illustration 6 : Impact du volume d'élution sur le taux de récupération des composés (graphes du haut) et compensation par l'emploi d'un étalon interne approprié en calibration externe pour l'aténolol ou calibration par un étalon interne inapproprié pour le paracétamol (graphes du bas) . | 23 |
| Illustration 7 : Critères de validation pour les résultats analytiques obtenus à l'aide d'un dopage de l'échantillon avant extraction, d'un dopage de l'échantillon après extraction et d'une courbe d'étalonnage dans le solvant..... | 23 |
| Illustration 8 : Chromatogramme montrant la séparation de deux composés en mélange. | 25 |

| | |
|--|----|
| Illustration 9 : Exigences de la directive 2002/657/CE et du guide SANCO/12495/2011 pour les 2 modes de séparation chromatographique et les différentes techniques de détection (décision de la commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats et Document N°SANCO/12495/2011). | 26 |
| Illustration 10 : Les différents modes d'acquisition en spectrométrie de masse (SM) et les différents équipements. | 28 |
| Illustration 11 : Tolérances maximales admissibles pour les intensités ioniques relatives pour différentes techniques de spectrométrie de masse. | 29 |
| Illustration 12 : Paramètres requis pour l'identification pour différents type de spectres de masse (traduit et reproduit de Sanco /12495/2011). | 32 |
| Illustration 13 : Barèmes d'identification en présence de diverses classes de fragment moléculaires selon 2002/657/CE (annexe 1 de la directive 96/23/CE en annexe 2 de ce rapport). | 33 |
| Illustration 14 : Exemples d'application du barème pour un ensemble de techniques et de couplages de techniques, N : nombre d'ions présents (nombre entier). | 34 |
| Illustration 15 : Barème de points d'identification additionnels de la norme NF EN ISO 22892 [NF EN ISO 22892, 2006]. | 34 |
| Illustration 16 : Barème de points selon les recommandations d'Aquaref. | 35 |
| Illustration 17 : Influence de la matrice sur l'analyse de composés antibiotiques par LC/MSMS [Capdeville, 2012]. | 36 |
| Illustration 18 : Chromatogrammes obtenus pour un échantillon contenant de la carbamazépine (à gauche) et un échantillon vierge (à droite) en GC/MS (mode SIM) et en GC/MSMS (mode MRM) [Capdeville, 2011]. | 38 |
| Illustration 19 : Contrôle de routine à réaliser pour le suivi des performances d'une méthode multi-résidus. | 41 |

Liste des annexes :

| | |
|--|----|
| Annexe 1 : Familles chimiques sandre | 47 |
| Annexe 2 : Annexe 1 de la directive 96/23/CE qui indique les substances et groupes de résidus concernés par les mesures de contrôle de cette directive | 49 |
| Annexe 3 : Paragraphe 6.3 de la norme NF EN ISO 22892 « Qualité du sol - Lignes directrices pour l'identification de composés cibles par chromatographie en phase gazeuse », pour la recherche d'indice de concordance basée sur la source « supposition, possibilités recherche antérieure ». | 51 |

Identification des caractéristiques des méthodes multi-résidus pour l'analyse des substances organiques dans les eaux et de leurs exigences métrologiques

BRGM/RP-61865-FR

Décembre 2012

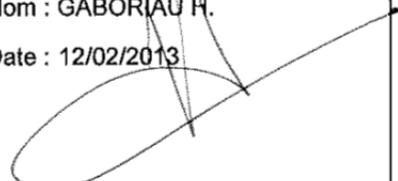
Étude réalisée dans le cadre des projets de Service public du BRGM

L. Amalric, P. Bados, S. Lardy-Fontan, F. Lestremau et M.-P. Strub

Vérificateur :
Nom : BRISTEAU S.
Date : 11/02/2013



Approbateur :
Nom : GABORIAU H.
Date : 12/02/2013



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.

Glossaire

CCM 2D : chromatographie sur couche mince deux dimensions.

CI : ionisation chimique.

CLHP : chromatographie liquide haute pression.

Composé étalon : composé cible de pureté la plus élevée possible pouvant servir de référence pendant l'analyse et ne renfermant aucune impureté ayant une quelconque influence sur son spectre de masse [NF ISO 15680, 2004]. Il convient que les impuretés n'aient pas d'influence sur le spectre de masse des composés recherchés.

DAD : barrettes de diode.

ECD : détecteur à capture d'électrons.

Effet matrice : l'effet combiné de tous les composants de l'échantillon autres que l'analyte sur la mesure de la quantité. Si un composant spécifique peut être identifié comme causant un effet alors c'est ce qu'on appelle une interférence [IUPAC, Gold Book, 2006].

EI : impact électronique.

Étalon de temps de rétention : composé ajouté à l'échantillon (ou à l'extrait d'échantillon) et à la solution d'étalonnage externe et dont le temps de rétention sert à calculer les temps de rétention relatifs des composés cibles NOTE. L'étalon de temps de rétention peut être identique à l'étalon ou aux étalons internes [NF ISO 15680, 2004].

Étalon interne : substance non contenue dans l'échantillon possédant des propriétés physico-chimiques aussi proches que possible de celles de l'analyte qui doit être identifiée et ajoutée à chaque échantillon et à chaque étalon.

FID : détecteur à ionisation de flamme.

FLD : détecteur fluorimétrique.

FTMS : spectrométrie de masse à transformée de Fourier.

GC : chromatographie en phase gazeuse.

HRMS : spectrométrie de masse haute résolution.

Identification (termes relatifs à l') :

- critère d'identification : caractéristique intrinsèque d'une méthode d'analyse à satisfaire pour obtenir l'identification non équivoque d'un analyte. En particulier, investigations en spectrométrie de masse ou d'autres recherches/informations destinées à identifier un composé dans des matrices environnementales ;
- barème d'identification : attribue une valeur pondérée aux critères d'identification en fonction de leur pertinence pour une bonne identification ou une quantification adéquate ;
- points d'identification : la satisfaction d'un critère d'identification entraîne l'obtention du nombre de points prévus au barème ;

- score d'identification : l'addition des points d'identification obtenus au cours de l'examen des performances de la méthode vis-à-vis d'une substance produit le score d'identification de la substance ;
- indice de concordance : ratio entre le nombre de points d'identification obtenus et le nombre de points de d'identification maximum.

Ion de diagnostic : ion sélectionné dans le spectre de masse du composé cible qui a la plus grande spécificité.

LC : chromatographie en phase liquide.

LRMS : spectrométrie de masse basse résolution.

LQ : limite de quantification.

Méthode des ajouts dosés : méthode dans laquelle l'échantillon d'essai est divisé en deux fractions à analyser (ou plus). Une fraction est analysée en l'état et des quantités connues de l'analyte étalon sont ajoutées aux autres fractions à analyser avant l'analyse. La quantité d'analyte étalon ajoutée doit se situer entre deux et cinq fois la quantité estimée de l'analyte contenue dans l'échantillon. Cette procédure permet de déterminer la teneur d'un analyte dans un échantillon en tenant compte du taux de récupération de la procédure d'analyse.

MRC : Matériau de Référence Certifié.

MRM : Suivi de transitions multiples.

MS : spectrométrie de masse.

MS/MS : spectrométrie de masse en tandem.

NPD : détecteur azote/phosphore.

Q-TOF : spectrométrie de masse en tandem associant les technologies quadripolaire et temps de vol.

Q-Trap : spectrométrie de masse en tandem associant les technologies quadripolaire et trappe d'ions.

Rendement absolu : recouvrement de la quantité d'un composé obtenue par la droite de d'étalonnage par rapport à la quantité introduite dans l'échantillon en début de protocole.

Rendement relatif : rapport entre le rendement absolu d'un composé et de celui de son étalon interne.

SBSE : *stir bar sorption extraction*, extraction sur barreau aimanté.

SIM : suivi d'ion unique.

SPE : extraction en phase solide.

SPME : micro-extraction en phase solide (sur fibre).

SRM : suivi de transition simple.

Temps de rétention : temps écoulé entre l'injection et l'observation du maximum du pic d'un composé cible par le détecteur à la sortie de la colonne.

Temps de rétention relatif : rapport entre le temps de rétention du composé cible et le temps de rétention de l'étalon.

TOF : temps de vol (spectrométrie de masse).

UV : détecteur ultra-violet.

UV-Vis : spectroscopie UV-visible.

1. Objectif

Les méthodes dites « multi-résidus » sont des méthodes d'analyses revendiquant l'analyse simultanée de plusieurs familles chimiques de substances (au sens des familles chimiques du référentiel SANDRE, en annexe 1) sur un même échantillon. Leur essor au cours des dix dernières années est largement dû à une volonté d'optimisation des délais de réponse et de rationalisation des coûts analytiques. Ces méthodes ont été développées de manière individualisée par chaque laboratoire en fonction de la typologie des demandes qu'il traite et du matériel dont il dispose. La possibilité pour chacun d'eux de faire reconnaître sa compétence en matière de développement analytique par le biais de l'accréditation en portée flexible a favorisé l'émergence de nombreuses méthodes différentes, qualifiées de manière indifférenciée de « multi-résidus » et accréditées sans distinction, présentant néanmoins des champs d'application et des performances très variables.

Il semble pertinent maintenant de mettre en place un cadre pour favoriser la comparabilité des données issues de ces protocoles de mesures en définissant les exigences métrologiques applicables à ces méthodes quand elles sont mise en œuvre dans le cadre des programmes de surveillance.

Ce document a pour objectif de préciser les caractéristiques principales des méthodes multi-résidus appliquées à l'analyse des polluants organiques dans l'eau, et d'identifier les exigences métrologiques souhaitables lors des étapes de développement, de caractérisation, de validation et de vérification en routine de ces méthodes de mesure. Ces exigences sont fortement liées aux objectifs visés lors de l'étape de validation, en particulier en termes d'incertitudes, de limites de quantification attendues et de domaine d'application.

Il s'agit d'un document préparatoire à la rédaction future d'un recueil des exigences métrologiques applicables aux méthodes multi-résidus.

2. Définition « méthode multi-résidus »

Historiquement, les méthodes multi-résidus étaient dédiées aux analyses de résidus de pesticides dans les matrices agro-alimentaires ; ce n'est que depuis une dizaine d'années qu'elles sont appliquées dans des domaines plus larges et notamment l'environnement. Favorisées par les progrès techniques de la spectrométrie de masse et sa généralisation dans les laboratoires, et dans un contexte où les besoins de diminution des coûts sont maintenant déterminants, les méthodes multi-résidus sont devenues la pratique courante de la très grande majorité des laboratoires accrédités en portée flexible.

De la même façon, on observe une croissance de l'emploi de ces méthodes dans le domaine de la recherche scientifique, au travers du nombre de publications internationales (ill. 1).

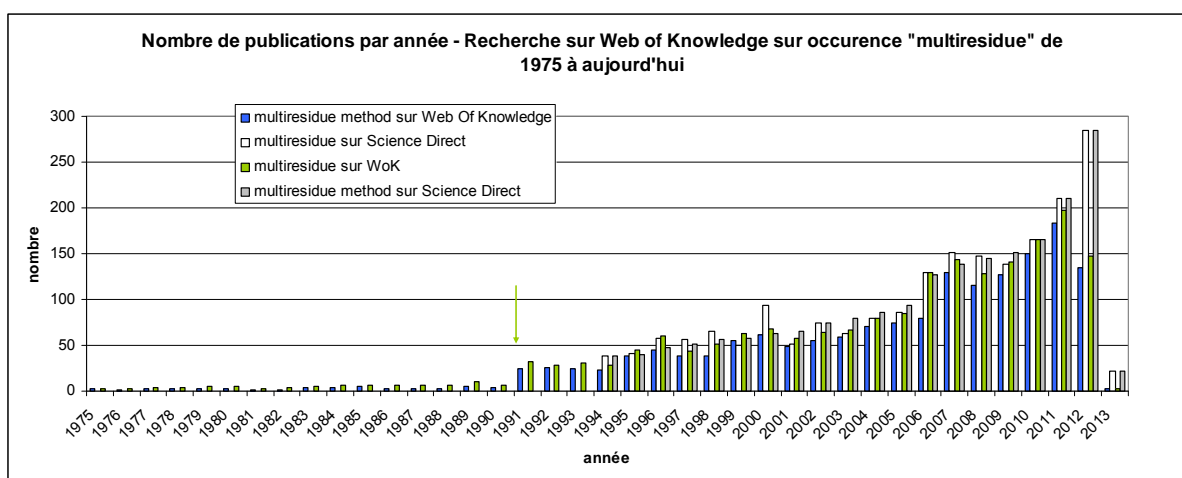


Illustration 1 : Nombre de publications internationales concernant l'approche multi résidus par année.

La définition de ce qu'est une méthode multi-résidus n'est pas chose facile dès lors qu'il n'existe aucun consensus. Dans l'usage courant, on admettra cependant que le terme s'adresse exclusivement aux analyses de molécules organiques. Ainsi, comme le montre l'illustration 2, différentes approches, de complexité variée, peuvent être regroupées sous la dénomination «méthode multi-résidus». Sur le principe, une analyse multi-résidus est une analyse de plusieurs familles de substances organiques de propriétés physico-chimiques différentes. On peut distinguer plusieurs approches multi-résidus, dans un ordre de complexité croissant :

- approche reposant sur la mise en œuvre, en parallèle sur un même échantillon, de plusieurs méthodes d'extraction et plusieurs méthodes d'analyse instrumentale ;
- approche mettant en œuvre plusieurs méthodes d'extraction et une seule méthode d'analyse instrumentale unique (par spectrométrie de masse en général) ;
- approche reposant sur la mise en œuvre d'une méthode d'extraction unique (mais à large spectre de composés) et plusieurs méthodes d'analyses instrumentales ;
- approche associant une extraction unique (mais à large spectre de composés) et une analyse instrumentale unique (par spectrométrie de masse en général).

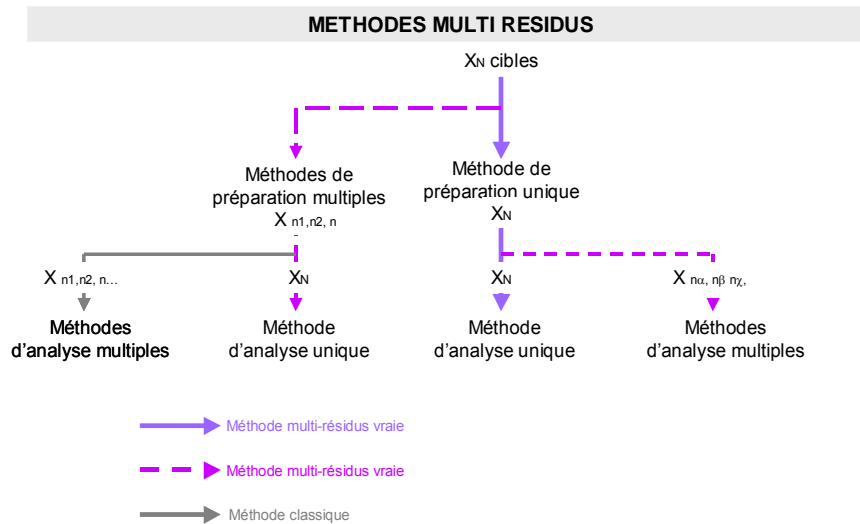
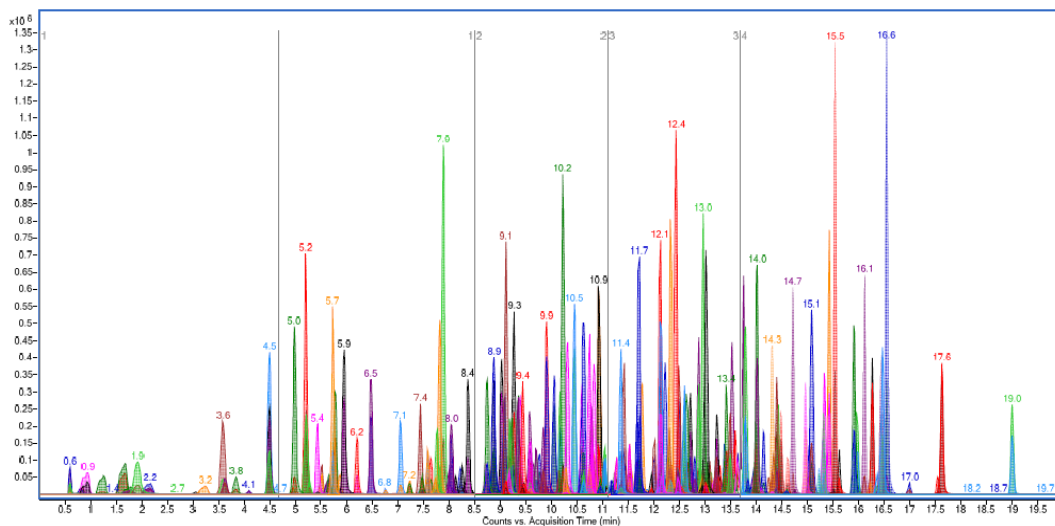


Illustration 2 : Les différentes approches de la méthode multi-résidus.

L'exemple du chromatogramme de l'illustration 3 montre la multitude des composés qui peuvent être analysés en une seule injection et la complexité du traitement des résultats.



Analyse multirésidus de 300 pesticides par LC/MS/MS

Illustration 3 : Chromatogramme d'une l'analyse multi-résidus de 300 pesticides par LC/MSMS.

De plus selon les objectifs, une méthode multi-résidus peut être destinée à fournir :

- un résultat qualitatif : présence ou absence de la substance ;
- un résultat quantitatif : mesure de la concentration du composé avec son incertitude associée.

Les exigences métrologiques indispensables à la mise en œuvre de ses différentes approches, et ainsi que les leviers et verrous seront différents.

3. Références pour la validation d'une méthode multi-résidus

Il n'existe à ce jour aucun support normatif encadrant spécifiquement la caractérisation et la validation des méthodes multi-résidus dans le domaine des analyses environnementales. En conséquence, les travaux réalisés dans ce rapport se sont principalement basés sur les documents répertoriés en annexe bibliographique. Leur analyse a conduit à identifier les éléments de validation nécessaires selon l'objectif de la méthode multi-résidus. Ces éléments sont reportés dans les illustrations 4 et 5.

| Objectif de la mesure | Présence / absence | Déclaration de conformité | Quantification |
|--|---|--|---|
| Valeur numérique d'intérêt | Seuil de détectabilité : plus petite concentration pour laquelle il a été démontré que l'analyte peut être détecté (sans nécessairement satisfaire aux critères d'identification sans équivoques) dans au moins X % des échantillons. | Seuil de conformité : valeur réglementaire à laquelle une donnée quantifiée doit être comparée | Quantification : résultat chiffré associé à une incertitude |
| Notion Risque | Oui | Oui | Non |
| Notion Incertitude | Non Dans ce cas Risque α : 1-X% Risque β : 1-X% | Oui Dans ce cas Risque α : 1-X% Risque β : 1-X% | Oui Incertitude U avec k=2 |
| Définition du mesurande | Oui | Oui | Oui |
| Définition du domaine d'application | En terme de concentration [C] : non En matrice : oui | En [C] : non En matrice : oui | En [C] : oui En matrice : oui |
| Éléments de caractérisation et validation : | | | |
| Étalons : identité et pureté | Oui | Oui | Oui |
| Stabilité des analytes | Oui | Oui | Oui |
| Recours à des EI | optionnel | Oui | Oui |
| Blancs méthode, réactifs | Oui | Oui | Oui |
| Spécificité | Oui | Oui | Oui |
| Répétabilité | Oui, au seuil de détectabilité | Oui, à la limite de conformité | Oui, sur tout le domaine d'application |
| Fidélité intermédiaire (temps, opérateur) | Oui | Oui, à la limite de conformité | Oui |
| Rendement | Oui (démonstration de l'adéquation entre processus mis en œuvre et analytes) | Oui, à la limite de conformité | Oui, sur tout le domaine d'application |
| Justesse | Non | Oui, à la limite de conformité | Oui, sur tout le domaine d'application |
| Étalonnage | Non | Oui, à la limite de conformité | Oui sur tout le domaine |
| Fonction d'étalonnage | Non | Oui au voisinage de la valeur réglementaire | Oui sur tout le domaine |
| Limite de quantification | Limite de détection | Non | Oui |
| Évaluation des effets matrices | Oui | Oui | Oui |

Illustration 4 : Éléments de validation nécessaires pour une méthode multi-résidus, selon son objectif d'information (qualitative, quantitative).

| | | Décision | |
|-------------------|-----------------|---|--|
| | | Pas d'analyte | Analyte présent |
| Etat de la nature | Pas d'analyte | Décision correcte Probabilité $1 - \alpha$ | Décision erronée Probabilité α |
| | Analyte présent | Décision erronée Probabilité β | Décision correcte Probabilité $1 - \beta$ |

Illustration 5 : Décision sur la présence ou non de l'analyte et risque associé.

Probabilité alpha (α) : probabilité que l'échantillon testé soit conforme, même si une mesure non conforme a été obtenue (« décision fondée sur un faux résultat non conforme »).

Probabilité bêta (β) : probabilité que l'échantillon testé soit véritablement non conforme, même si une mesure conforme a été obtenue (« décision fondée sur un faux résultat conforme »).

4. Éléments à considérer pour la validation des méthodes multi-résidus quantitatives

4.1. Matrice

Comme pour toute méthode analytique, le domaine d'application de la méthode multi-résidus doit être bien identifié et précisé. Les effets matrices sont différents selon la nature de l'eau, que ce soit au cours de l'étape d'extraction ou de celle d'analyse, et parfois en fonction des concentrations respectives des espèces en présence (effets synergiques).

La validation de la méthode multi-résidus doit donc préciser le type d'eau et ses caractéristiques physico-chimiques (MES, COT, conductivité, pH...). Elle doit être réalisée avec une matrice naturelle et avec la totalité de composés à analyser afin de bien identifier et caractériser les éventuelles interférences et effets synergiques entre molécules.

En l'absence d'une matrice réelle exempte des analytes (notamment pour la validation de la limite de quantification), on pourra diluer la matrice naturelle avec une eau minérale, par exemple, pour abaisser la concentration en composés organiques, en prenant soin de reconstituer les paramètres modifiés (MES, COT, conductivité, pH...).

Ces recommandations sont applicables à la validation de toute méthode d'analyse.

4.2. Étalons internes

4.2.1. Rôle des étalons internes

L'étalon interne est une substance non contenue, *a priori*, dans l'échantillon possédant des propriétés physico-chimiques aussi proches que possible de celles de l'analyte qui doit être identifié et/ou quantifié et qui est ajoutée à chaque échantillon et contenue dans chaque solution d'étalonnage.

En pratique l'étalon interne peut avoir deux fonctions selon l'étape du processus analytique à laquelle il est ajouté. Considérons un processus analytique comportant les étapes classiques du traitement d'un échantillon :

Préparation $\xrightarrow{2}$ extraction $\xrightarrow{1}$ séparation $\xrightarrow{\quad}$ détection $\xrightarrow{\quad}$ expression du résultat

1 = ajouté à l'extrait avant l'analyse uniquement (dans le cas où il existe une étape d'extraction préalable), l'étalon interne permet de vérifier le bon déroulement de l'analyse instrumentale (injection, séparation chromatographique et identification) et de corriger des effets en vue de la quantification : effet d'atténuation ou d'exaltation du signal due à l'ionisation lors la spectrométrie de masse, ou au mode d'injection (adsorption sur l'injecteur en GC)... Cet étalon est utilisé pour la quantification.

2 = ajouté à l'échantillon dès l'extraction, l'étalon interne permet de vérifier d'une part les effets matrices (rendement d'extraction impacté par la matrice de l'échantillon) et également les effets provenant de l'analyse. Il peut être utilisé pour la quantification et corrige alors tous les effets matrices (on garde alors le terme d'étalon interne), ou bien traité uniquement comme une information sur le bon déroulement du protocole (on parle alors de traceur ou de mouchard).

Il est préférable d'introduire l'étalon interne dans l'échantillon dès le début de l'extraction afin de compenser tous les effets matrices (extraction, analyses). Cela s'applique à toutes les techniques, que l'on soit en extraction dissociée (liquide/liquide puis LC/MS/MS par exemple), en injection directe ou en analyse en ligne (SPE-LC/MSMS, SBSE-GC, SPME-GC).

L'emploi de plusieurs étalons internes dans une même méthode, pour l'extraction d'une part et pour l'analyse instrumentale d'autre part permet de collecter des informations complémentaires.

L'utilisation d'étalons internes est fortement recommandée. Cela constitue le moyen le plus rapide de diagnostiquer et corriger des effets potentiels (matrice, analyse) sur chaque échantillon.

Une autre façon de travailler est la méthode des ajouts dosés (voir glossaire), qui nécessite des manipulations supplémentaires, plusieurs injections et l'estimation préalable de la concentration des composés d'intérêt dans l'échantillon.

4.2.2. Choix des étalons internes

L'étalon doit posséder des caractéristiques représentatives des composés à analyser afin de fournir une réponse instrumentale proche de celle engendrée par l'analyte :

- même famille chimique ;
- structurellement proche et groupements fonctionnels identiques ;
- temps de rétention proche.

Compte tenu de ces critères, pour la détection par spectrométrie de masse, qui est le mode d'analyse le plus répandu pour les méthodes multi-résidus, il est fortement recommandé d'utiliser les formes du composé d'intérêt marquées d'un isotope stable. On privilégiera les marquages au carbone 13 (^{13}C) par rapport au deutérium (^2H) en raison d'une moindre propension à la modification chimique lors de l'analyse ou par rapport aux molécules marquées à l'azote 15 (^{15}N) qui peuvent présenter actuellement des défauts de pureté. Dans le cas de l'emploi d'un analogue marqué en tant qu'étalon interne, la quantification du composé est réalisée par la technique de dilution isotopique, qui fournit *de facto* une correction de la concentration de l'analyte.

Dans le cas des analyses multi-résidus, on recherche de nombreux composés dans une même méthode ; il peut sembler difficile de disposer d'un étalon interne pour chaque molécule. Aquaref conseille alors de disposer d'un ou plusieurs étalons internes pour chaque famille de composés. Il s'agit donc de classer au préalable les composés à analyser par famille ayant des comportements analytiques similaires, vis-à-vis du mode d'extraction et du mode d'analyse. La codification SANDRE (annexe 1) peut guider cette étape. On utilisera au minimum un étalon interne par famille de composés définie, en justifiant sa représentativité par rapport à l'ensemble de la famille. De plus pour la chromatographie, on veillera à disposer de plusieurs étalons internes répartis tout au long du chromatogramme. Compte tenu des séparations chromatographiques actuelles, obtenues avec des temps très courts en raison des performances des colonnes et des équipements analytiques, on peut partir du principe qu'un étalon interne pour dix composés est un minimum pour maîtriser la partie chromatographie.

Cependant, l'utilisation systématique d'étalons marqués par les laboratoires conduira à terme à une baisse de leur prix.

Les conditions d'établissement de la pureté d'un réactif par les fournisseurs n'étant pas toujours appropriées (analyse par chromatographie liquide réalisée en mode isocratique et non en mode gradient) et rarement réalisée avec la spectrométrie de masse, on vérifiera préalablement la pureté des étalons internes retenus sur une base à la fois documentaire et expérimentale.

4.2.3. Composés étalons et solutions d'étalonnage

Pour analyser et quantifier un composé d'intérêt, on doit se procurer en premier lieu le composé avec la plus grande pureté possible, l'étalon analytique, qui peut être disponible sous la forme d'un produit pur et/ou en solution. Cet étalon va permettre de vérifier tout d'abord si l'analyse instrumentale est possible et bien maîtrisée. Par la suite, il sera utilisé pour confirmer la présence du composé et établir les fonctions d'étalonnage permettant sa quantification.

L'étalon sera également utilisé pour vérifier les performances de l'étape d'extraction (voir § 4.3). Le choix de l'étalon est donc primordial. On doit veiller à bien connaître :

- son identité : plusieurs mélanges de composés sont disponible par exemple dans le cas des nonylphénols ; plusieurs isomères distribués séparément sont commercialisés ; l'étalon est un mélange d'isomères (cas de l'endosulfan par exemple) ;
- sa pureté, pour réaliser une quantification exacte ;
- son comportement lors de l'analyse, en injection individuelle et en mélange avec les autres composés d'intérêt dans le solvant des solutions étalons, afin de vérifier des éventuels effets synergiques entre composés lors de l'analyse.

Les méthodes multi-résidus présentent en général des étalonnages comportant de très nombreux composés, notamment lors des analyses par spectrométrie de masse. Dans ce cas il est important de vérifier lors de la validation que la réponse des composés en mélange dans la solution étalon est identique à leur réponse en solution individuelle. Si les réponses diffèrent cela signifie que la méthode instrumentale n'est pas optimisée. Si cette méthode reste malgré tout la technique utilisée par le laboratoire, nous recommandons :

- d'introduire dans le mélange des étalons internes, l'homologue isotopiquement marqué de chaque composé dont la réponse présente la caractéristique évoquée ci-dessus ;
- ou d'appliquer la méthode des ajouts dosés.

Lors de la validation, on s'assurera de l'identité de l'étalon et de la justesse de d'étalonnage en employant une solution croisée, qui est une solution préparée avec le même composé mais obtenue sous une autre référence : autre fournisseur, autre numéro de lot, autre conditionnement (solide, en solvant).

4.3. Taux de récupération

4.3.1. Détermination du rendement d'extraction du composé

Selon la norme NF T90-210 [NF T90-210, 2009], l'influence de l'étape de préparation de l'échantillon (méthode d'extraction) doit être caractérisée, lors de l'évaluation initiale des performances d'une méthode d'analyse, si elle n'est pas prise en compte dans l'étalonnage.

Ainsi dans le cas d'une analyse en gamme extraite (étalons et échantillons subissent l'intégralité de la méthode), ou par injection directe ou par extraction en ligne, l'étude des rendements n'est pas nécessaire.

Pour les méthodes où la gamme d'étalonnage ne subit pas l'ensemble du protocole, il est nécessaire de réaliser une étude des rendements d'extraction, à l'aide d'un matériau de référence certifié (MRC) contenant le composé d'intérêt ou par dopage d'une matrice représentative (en l'absence de MRC) avec l'étalon analytique, à deux niveaux de concentration, en réalisant au moins deux réplicats dans des conditions de répétabilité pendant au moins cinq jours, afin de calculer le rendement moyen et son écart-type de fidélité intermédiaire. Ce protocole prend en compte à la fois l'effet matrice et le rendement d'extraction.

En complément, nous précisons que l'eau de laboratoire (eau distillée, Milli-Q) n'est pas représentative d'une matrice naturelle et nous apportons les préconisations suivantes pour la validation des méthodes multi-résidus :

- Pour chaque niveau de concentration, obtenir un rendement absolu moyen ($n = 10$ au minimum) dans des conditions de fidélité intermédiaire, compris entre 70 et 130 % (en l'absence de critères de performances fixés par voie réglementaire) avec un coefficient de variation inférieur ou égal à 20 % (en l'absence de critères de performances fixés par voie réglementaire).
- Dans le cas où le rendement absolu est inférieur à 70%, le coefficient de variation du rendement absolu ne devra pas dépasser 10% de cette valeur (par exemple, 60 ± 6 %). Un rendement minimum est fixé à 30 %.
- Dans le cas où le coefficient de variation du rendement absolu (compris entre 70 et 130 %) est supérieur à 20 %, s'il n'est pas possible d'optimiser ce paramètre (autre méthode extraction, autre méthode d'analyse...) on emploiera l'étalon interne marqué correspondant pour pratiquer la dilution isotopique ; le rendement moyen relatif devra tomber entre les bornes 70 et 130 % avec un coefficient de variation inférieur ou égal 20 %.
- Dans le cas où le rendement absolu est supérieur à 130 %, il faudra trouver une autre alternative (autre méthode extraction, autre méthode d'analyse...).

L'importance du choix de l'étalon interne et de sa prise en compte tout au long du protocole analytique est illustrée au travers de l'étude de caractérisation de la méthode d'extraction des résidus de médicaments par SPE dans l'illustration 6 : le volume de fin de fixation (volume de fuite), qui définit le volume maximal qui peut être reconcentré par SPE sans affecter les recouvrements d'extraction, est également une source de perte de composés. Les recouvrements d'extraction de l'aténolol-D7 et du paracétamol-D4 sont fortement diminués lorsque le volume d'eau passant à travers la cartouche SPE augmente, tandis que ceux du propranolol-D7 et du diazépam-D5 sont presque inchangés. Les effets de volume de fin de fixation peuvent aussi être compensés par l'ajout de l'étalon interne correspondant exactement au composé d'intérêt. Par exemple, les recouvrements d'extraction relatifs de l'aténolol évalués en fonction de l'aténolol-D7 (dilution isotopique, étalonnage interne) sont toujours autour de 100 % (illustration 6 en bas) quel que soit le volume de percolation de l'eau, alors qu'ils diminuent fortement lorsqu'on travaille en étalonnage externe. Cela est également vrai dans le cas d'une mesure faite à l'aide d'un étalon interne inapproprié (par exemple paracétamol par rapport au diazépam-D5).

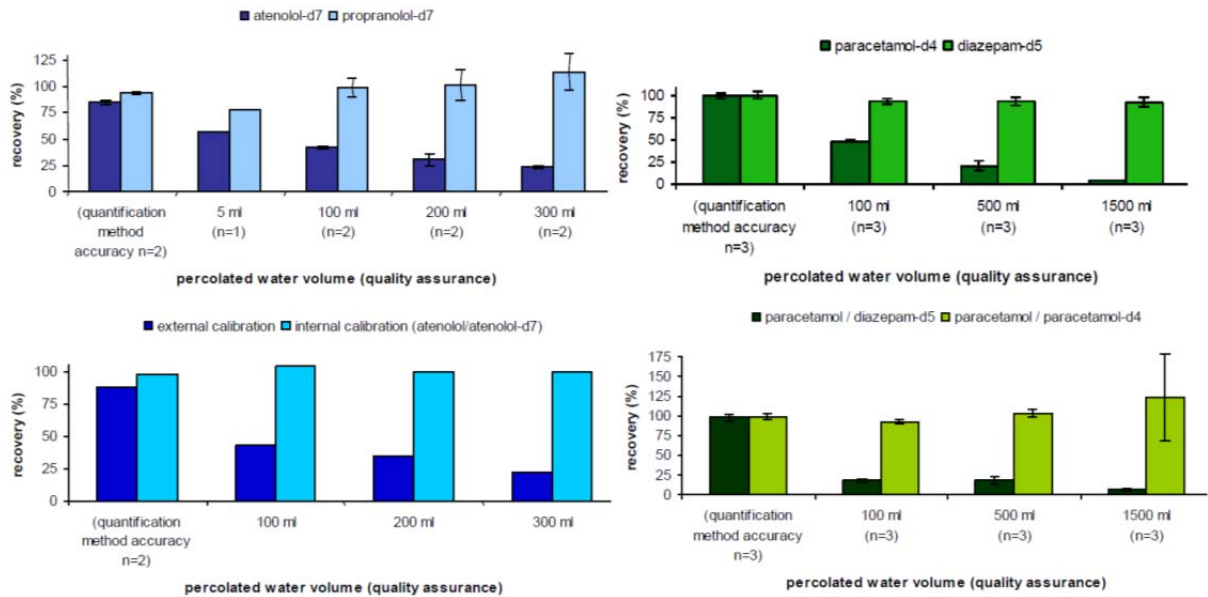


Illustration 6 : Impact du volume d'éluion sur le taux de récupération des composés (graphes du haut) et compensation par l'emploi d'un étalon interne approprié en calibration externe pour l'aténolol ou calibration par un étalon interne inapproprié pour le paracétamol (graphes du bas).

Le recouvrement obtenu pour le composé ajouté avant extraction de l'échantillon à l'aide de la courbe d'étalonnage dans le solvant, comprend à la fois l'effet matrice de l'échantillon et le rendement d'extraction du procédé (illustration 7). D'un point de vue analytique, il est intéressant de distinguer et caractériser les deux phénomènes. On peut pour cela procéder comme décrit ci-après, selon la norme NF ISO 12787 [NF ISO 12787, 2012], lors des essais d'évaluation initiale des performances basée sur la NF T90-210 [NF T 90-210, 2009] décrit ci-dessus :

- réaliser un ajout du composé après l'extraction de l'échantillon, c'est-à-dire un dopage dans l'extrait obtenu après l'extraction, qui renseignera sur l'effet matrice sur l'analyse et quantifier avec la courbe d'étalonnage en solvant ;
- réaliser le dopage dans l'échantillon avant extraction (conformément à la NF T90-210 [NF T 90-210, 2009]), et quantifier avec la courbe d'étalonnage en solvant ;
- calculer le rapport entre les deux recouvrements, qui donne le rendement d'extraction du composé dans l'échantillon.

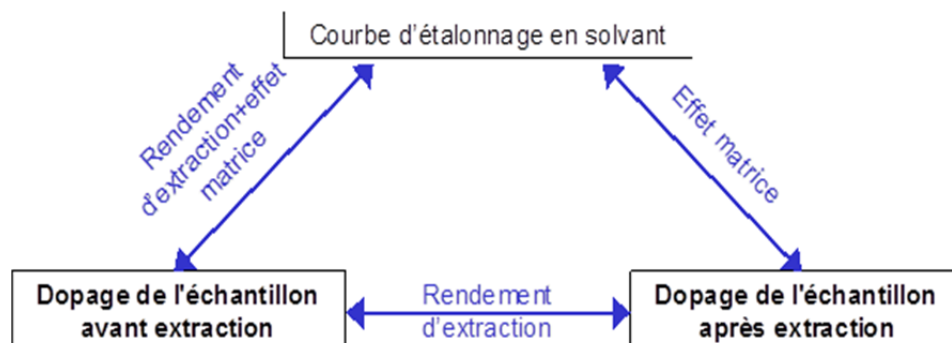


Illustration 7 : Critères de validation pour les résultats analytiques obtenus à l'aide d'un dopage de l'échantillon avant extraction, d'un dopage de l'échantillon après extraction et d'une courbe d'étalonnage dans le solvant.

Si aucun procédé d'extraction n'est utilisé, le rendement d'extraction peut être considéré comme égal à 100 % et l'effet matrice est donné par le recouvrement obtenu sur le dopage de l'échantillon et comparé à l'aide de la courbe d'étalonnage dans le solvant.

Si le recouvrement obtenu pour le composé ajouté dans l'échantillon avant extraction est significativement différent de la valeur acceptable (70-130 %), il convient de suspecter un effet matrice. Dans ces circonstances, il est recommandé d'utiliser la méthode des ajouts dosés si on ne peut répondre aux critères de validation préconisés dans ce paragraphe.

4.3.2. Prise en compte du rendement d'extraction du composé

Dans la méthode d'analyse, il doit être précisé si une correction de rendement est appliquée dans l'expression du résultat final, conformément à NF T90-210.

Dans le cas où il n'y a pas de correction de rendement, le laboratoire devra tenir compte dans le calcul des incertitudes du biais introduit par l'absence de correction de rendement.

4.4. Limite de quantification

La limite de quantification devra être établie conformément à NF T90-210 [NF T 90-210, 2009], pour chaque molécule revendiquée, et en prenant bien soin de réaliser les essais avec tous les analytes en mélange afin d'être représentatif du protocole qui sera ensuite appliqué aux échantillons.

Dans le cas des analyses par spectrométrie de masse avec une identification des molécules au moyen des ions ou transitions de quantification et de qualification, la limite de quantification doit être vérifiée pour tous les ions ou transition de quantification et de qualification (voir § 4.6.2).

4.5. Séparation chromatographique

Le mécanisme de la séparation chromatographique s'explique par les différences d'affinité des molécules des composés d'un mélange entre deux phases non-miscibles : l'une mobile (éluant ou gaz) et l'autre stationnaire (colonne chromatographique). Ce phénomène est dynamique, les molécules passant continuellement d'une phase à l'autre, ce qui crée un état d'équilibre entre la phase mobile et la phase stationnaire pour un constituant en particulier. À ce moment, le rapport des concentrations est égal au rapport des répartitions dans les deux phases ou coefficient de partage K .

Plusieurs paramètres régissent la qualité d'une séparation chromatographique (illustration 8) et reposent en fait sur le temps de rétention :

- le temps de rétention (ou volume de rétention) qui dépend de la nature de la phase stationnaire (colonne), de la longueur de la colonne, de la température de la colonne lors de l'analyse et de la nature et du débit de la phase mobile (éluant) ;
- le facteur de capacité ou coefficient de partage du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile ; il est relié mathématiquement au temps de rétention ;
- le facteur de sélectivité ou de séparation (α) qui est le rapport des facteurs de capacité de deux composés dont on veut réaliser la séparation, et qui est donc relié aux temps de rétention ;
- la résolution qui est fonction de l'écart entre les temps de rétention au sommet des pics de deux composés et la largeur des pics à la base ;

- le nombre de plateau théorique qui est fonction du temps de rétention du composé et de celui du solvant (temps de rétention d'une substance non retenue sur la colonne) et de la largeur du pic à la base ou à mi-hauteur.

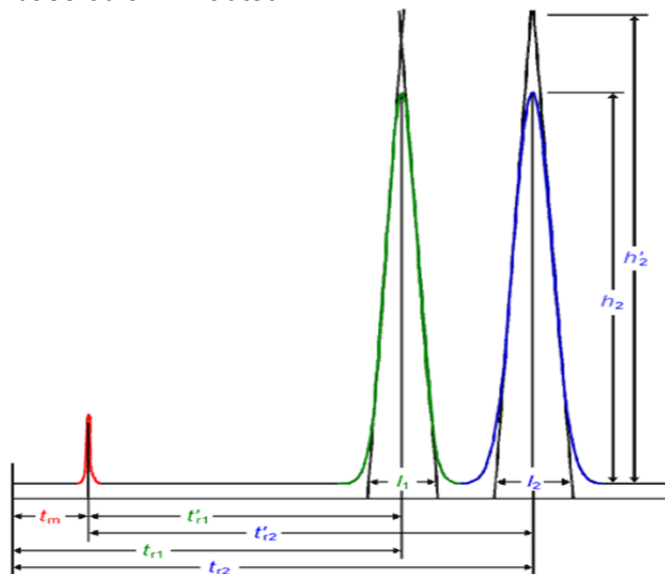


Illustration 8 : Chromatogramme montrant la séparation de deux composés en mélange.

t_m = temps de rétention d'une substance non retenue sur la colonne (aussi appelé volume mort) ; t_r = temps de rétention ; t_r' = temps de rétention corrigé par rapport à t_m ; l = largeur du pic ; h = hauteur du pic ; source : <http://www.rocler.qc.ca/pdubreui/chromatographie/generalite/chroma1.html>

La qualité d'une séparation chromatographique joue sur l'identification et la quantification du composé.

Afin de mieux appréhender la séparation chromatographique et notamment les variations dues au fonctionnement des équipements analytiques et des colonnes, l'emploi d'étalons internes est très largement recommandé ; il doit s'agir d'un composé apparenté à l'analyte et dont le temps de rétention est proche. Ce peut être un étalon ajouté dès l'extraction ou juste avant l'analyse. Certains critères chromatographiques doivent être respectés :

- le temps minimal de rétention doit être égal à au moins deux fois le volume mort de la colonne afin d'éviter les interférences provenant des signaux de solvant ;
- le rapport entre le temps de rétention chromatographique de l'analyte et celui de l'étalon interne, c'est-à-dire le temps de rétention relatif de l'analyte dans l'échantillon, doit correspondre à celui observé sur la solution d'étalonnage avec une tolérance inférieure ou égale à $\pm 0,5 \%$ pour la chromatographie en phase gazeuse (la norme NF EN ISO 22892 [NF EN ISO 22892, 2006] est plus contraignante : $0,2 \%$ pour la GC) et inférieure ou égale $\pm 2,5 \%$ pour la chromatographie en phase liquide ;
- un étalon interne doit être présent dans chaque fenêtre d'acquisition afin de s'assurer en routine de l'absence de dérive de temps de rétention (cas de la spectrométrie de masse) ;
- sur l'échelle de temps d'une acquisition instrumentale, plusieurs étalons internes doivent être présents. *A minima*, il doit y avoir trois étalons internes répartis entre le début, le milieu et la fin du chromatogramme (cas des détecteurs en MS, ECD, FID, UV, FLD). Chacun ne pouvant être utilisé comme référence pour plus de 10 composés à analyser.

Ces critères sont regroupés dans l'illustration 9.

| Séparation chromatographique DéTECTEURS | Chromatographie en phase liquide | Chromatographie en phase gazeuse |
|--|--|--|
| Spectrométrie de masse | Usage d'un étalon interne avec un temps de rétention proche et structure chimique apparentée à l'analyte ; Temps de rétention minimal > 2 x temps mort de la colonne ; Fenêtre de rétention doit être proportionnelle au pouvoir de résolution de la colonne chromatographique ; Tolérance temps de rétention relatif de l'analyte $\pm 2,5 \%$ | Usage d'un étalon interne avec un temps de rétention proche et de structure chimique apparentée à l'analyte ; Temps de rétention minimal > 2 x temps mort de la colonne ; Fenêtre de rétention doit être proportionnelle au pouvoir de résolution de la colonne chromatographique ; Tolérance temps de rétention relatif de l'analyte $\pm 0,5 \%$ |
| UV visible | Usage d'un étalon interne avec un temps de rétention proche de l'analyte ; Temps de rétention en solution et en matrice doit être identique ; Temps de rétention minimal > 2 x temps mort de la colonne ; Tolérance temps de rétention relatif de l'analyte en matrice $\pm 2,5 \%$ Pour la détection à longueur d'onde fixe, le pic du composé doit être séparé du pic le plus proche par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale du pic du composé. | |
| Fluorescence | Usage d'un étalon interne avec un temps de rétention proche de l'analyte ; Temps d'élution en solution et en matrice doit être identique ; Temps de rétention minimal > 2 x temps mort de la colonne ; Tolérance temps de rétention relatif de l'analyte en matrice $\pm 2,5 \%$; Le maximum du pic le plus proche de l'analyte doit être séparé du pic de l'analyte par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale de l'analyte. | |
| ECD, FID, NPD, TSD, FPD | | Usage d'un étalon interne avec un temps de rétention proche et apparenté à l'analyte ; Tolérance temps de rétention relatif de l'analyte $\pm 0,5 \%$; Le maximum du pic le plus proche de l'analyte doit être séparé du pic de l'analyte par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale de l'analyte. Une co-chromatographie peut être utilisée pour obtenir des informations supplémentaires |

Illustration 9 : Exigences de la directive 2002/657/CE et du guide SANCO/12495/2011 pour les deux modes de séparation chromatographique et les différentes techniques de détection (décision de la commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats et Document N° SANCO/12495/2011).

Conformément à la norme NF EN ISO 22892 [NF ISO 22892, 2006], un pic chromatographique devra être défini par un minimum de sept points d'acquisition. Une fréquence d'acquisition inférieure ne permet pas de définir suffisamment précisément un pic et de ce fait peut entraîner une augmentation de des risques de mauvaises interprétations sur la présence d'un composé et/ou sur sa quantification. Cette exigence est très importante notamment pour les méthodes en multi-résidus, puisque pour disposer de méthodes rapides,

on a tendance à accumuler les co-élutions et les acquisitions par fenêtre de temps, au détriment de la fréquence d'acquisition.

4.6. Méthodes d'identification des composés cibles

Les critères d'identification complémentaires au temps de rétention sont décrits ci-dessous en fonction de la méthode de détection, sur la base du guide SANCO/12495/2011 [Guide Sanco].

4.6.1. Détection par absorption dans l'UV-visible

Ce mode de détection est couplé à la chromatographie en phase liquide. Il peut être de deux types :

- détecteur UV-visible à longueur d'onde fixe enregistrant un signal à une longueur d'onde fixe ;
- ou détecteur à barrettes de diodes, enregistrant le spectre complet, et qui permet un retraitement ultérieur à différentes longueurs d'ondes et la superposition des spectres UV du composé et de l'étalon ou de ceux de différents échantillons.

La longueur d'onde d'absorption maximale du composé dans le spectre doit être identique à celle de l'étalon, avec une marge déterminée par la résolution du système de détection : ± 2 nm pour le détecteur à barrette de diodes.

Pour les parties des deux spectres dont l'absorbance relative est égale ou supérieure à 10 %, le spectre du composé au-dessus de 220 nm ne doit pas être différent visuellement du spectre de l'étalon :

- les mêmes maxima doivent être présents dans les deux spectres ;
- et la différence entre deux spectres ne doit pas être supérieure à 10 % de l'absorbance caractéristique.

Pour la détection à longueur d'onde fixe, le pic d'un composé doit être séparé du pic le plus proche par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale du pic du composé.

Le mode de détection UV-visible à longueur d'onde fixe ne convient pas comme méthode unique de confirmation. En cas de résultat positif, celui-ci doit être vérifié avec une autre méthode ou une autre mode de détection.

4.6.2. Détection fluorimétrique

La sélection des longueurs d'onde d'excitation et d'émission en combinaison avec les conditions chromatographiques doit être effectuée de manière à minimiser l'apparition de composants perturbateurs dans les extraits blancs.

4.6.3. Détection par spectrométrie de masse

La détection par spectrométrie de masse fait appel à différentes technologies qui entraînent un mode d'acquisition différent (illustration 10).

| Mode SM | Simple SM (résolution de masse standard) | Simple SM (haute résolution) | SM/SM |
|--------------------------------|---|---|--|
| Système type (exemples) | Quadripôle, trappe d'ions, | TOF, trappe d'ions, FTMS, secteur magnétique | Triple quadripôle, trappe d'ions, SM hybride (ex. Q-TOF, Q-Trap) |
| Acquisition | Balayage complet, fenêtre m/z réduite, mode « ions sélectionnés » (SIM) | Balayage complet, fenêtre m/z réduite, mode « ions sélectionnés » (SIM) | suivi de réaction choisie/multiple (SRM /MRM), balayage complet, spectre d'ions produits |

Illustration 10 : Les différents modes d'acquisition en spectrométrie de masse (SM) et les différents équipements.

Pour chaque composé, des ions (ou des transitions ioniques) de diagnostic vont devoir être déterminés ; le choix de ces ions doit satisfaire à certains critères suivants le mode d'acquisition choisi.

En **mode d'enregistrement** des spectres complets (balayage complet ou full scan), les ions diagnostiques mesurés, trois au minimum, (ion moléculaire, adduits caractéristiques de l'ion moléculaire, ions fragments caractéristiques et ions isotopes), doivent au minimum présenter une intensité relative supérieure à 10 % dans le spectre de référence de l'étalon par rapport à la réponse de l'ion le plus intense. La variabilité des spectres induite par la matrice et les performances du détecteur doit être vérifiée.

Selon la norme ISO 22892 [NF ISO 22892, 2006], il est indiqué pour des analyses par CG/SM que pour le mode balayage complet, la gamme de masse s'établit au minimum à partir de 35 unités de masse atomique (afin d'éviter les interférences de l'oxygène et de l'azote) jusqu'à la masse du composé cible +10 unités de masse atomique.

Pour des analyses spectrométriques, le guide SANCO/12495/2011 [Guide sanco] se contente de préciser que dans la mesure du possible, les plus hautes masses moléculaires devraient être prioritairement choisies par rapport aux faibles masses moléculaires (ex : m/z <100) en LC/MSMS.

En **mode de détermination** par fragmentométrie (SIM), l'ion moléculaire doit être de préférence l'un des ions diagnostics sélectionnés (ion moléculaire, adduits caractéristiques de l'ion moléculaire, ions fragments caractéristiques et tous leurs ions isotopes). Les ions diagnostiqués ne doivent pas provenir exclusivement de la même partie de la molécule. Un barème de points, dépendant du mode d'analyse spectrométrique est utilisé (voir § 5.2).

Le rapport signal/bruit de fond (S/N) pour chaque ion de diagnostic doit être impérativement supérieur à 3. Ce dernier point est particulièrement critique car il implique qu'à la limite de quantification, tous les ions de diagnostic doivent pouvoir être détectés avec un rapport signal/bruit >3. Ainsi, l'écart maximal acceptable sur l'ion de quantification n'est pas l'unique critère définissant la limite de quantification, il doit être complété par des critères de respect d'intensité des ions de confirmations.

Pour les ions produits et considérés comme ions diagnostics en mode balayage complet et SIM, l'intensité relative des ions détectés, exprimés en pourcentage des intensités de l'ion ou de la transition le (la) plus intense, devra correspondre à celle d'un étalon, soit d'une solution

d'étalonnage soit d'un ajout dosé, à des concentrations comparables, mesuré dans les mêmes conditions, dans la gamme de tolérance exprimée dans l'illustration 11.

Ce calcul peut être facilité et réalisé de façon automatisé avec les logiciels des équipements analytiques.

| Intensité relative (% du pic de base) | EI-CG-SM | CI-CG-SM, CG-SMⁿ, CL-SM, CL-SMⁿ |
|--|-----------------|--|
| >50 % | ± 10 % | ± 20 % |
| >20 % à 50 % | ± 15 % | ± 25 % |
| >10 % à 20 % | ± 20 % | ± 30 % |
| ≤10 % | ± 50 % | ± 50 % |

Illustration 11 : Tolérances maximales admissibles pour les intensités ioniques relatives pour différentes techniques de spectrométrie de masse.

En cas d'élargissement de la liste des molécules de la méthode, la caractérisation des performances de la méthode vis-à-vis des molécules ajoutées sera réalisée en présence de la liste complète. En cas de non-respect des critères pour les molécules précédemment caractérisées, la validation de la méthode devra être actualisée en prenant en compte les nouveaux critères de performances obtenus.

5. Confirmation des résultats

Afin de pouvoir garantir l'identité d'un composé recherché, il est indispensable de mettre en place des systèmes de qualification appropriés des données qui permettra une confirmation univoque de l'identité des substances détectées.

Comme l'indique la directive 2002/657/CE, établie dans le la cadre de la surveillance des animaux vivants et de leurs produits, « *il est nécessaire d'assurer la qualité et la comparabilité des résultats d'analyse produits par les laboratoires agréés pour le contrôle officiel des résidus. Cet objectif doit être atteint en recourant à des systèmes d'assurance de la qualité et, en particulier, en appliquant des méthodes validées selon des procédures et des critères de performances communs et en veillant à la traçabilité des étalons communs ou communément admis* ».

5.1. Textes de référence

Trois textes font spécifiquement références aux critères d'identification relatifs au couplage chromatographie (en phase gazeuse ou liquide) et spectrométrie de masse :

- la décision de la commission du 12 août 2002 (2002/657/CE) portant modalités d'application de la directive 96/23/CE en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats ;
- le guide Sanco [Guide Sanco] applicable à la recherché des pesticides dans les aliments et la nourriture ;
- la norme NF EN ISO 22892 [NF ISO 22892, 2006] pour l'identification par GC/MS de composés dans les sols ;
- la norme XP T90-223 [PR XP T90-223, 2023] sur les résidus médicamenteux dans les eaux.

Cependant, aucune pratique générale n'est actuellement en vigueur. Un projet de norme de l'ISO/TC147/SC2 [ISO/TC147/SC2] spécifique aux milieux aquatiques, en préparation vise ainsi à harmoniser et définir un cadre pour les analyses par chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Il s'appuie en partie sur la norme ISO 22892 [NF ISO 22892, 2006] pour les spécifications techniques et sur les critères de la directive 2002/657/CE pour les critères d'identification.

La décision de la commission du 12 août 2002 précise que « *les méthodes de confirmation pour les résidus organiques et les contaminants doivent fournir des indications sur la structure chimique de l'analyte. Par conséquent, les méthodes basées uniquement sur l'analyse chromatographique et ne prévoyant pas l'utilisation de la détection spectrométrique ne conviennent pas seules comme méthodes de confirmation. Toutefois, si une technique déterminée ne présente pas une spécificité suffisante, la spécificité requise doit être obtenue à l'aide de procédés d'analyse consistant dans des combinaisons appropriées de purification, de séparation(s) chromatographique(s) et de détection spectrométrique* ».

Les méthodes multi-résidus qui impliquent l'analyse simultanée d'un mélange pouvant comprendre jusqu'à une centaine de substances nécessitent des méthodes de confirmation. Cependant, la directive 2002/657/CE indique également que « *les méthodes de spectrométrie de masse peuvent être prises en considération comme méthodes de confirmation uniquement à la suite d'une séparation chromatographique en ligne ou autonome* », ce qui rend indissociable la combinaison des deux techniques pour la mesure de multi-résidus.

L'étape de confirmation est de ce fait particulièrement importante dans les méthodes multi-résidus où la séparation chromatographique complète des pics (et composés) peut ne pas être totale grâce à la détection sélective fournie par la spectrométrie de masse. Les pics d'intérêt pouvant co-éluer, les temps de rétention n'apportent pas de garantie suffisante pour confirmer l'identité d'un pic d'intérêt, des critères de chromatographie et de spectrométrie de masse ont ainsi été définis par les différents textes et sont présentés dans les paragraphes suivants.

5.2. Méthodes de confirmations de l'identité d'un composé

Les différents guides divergent sur les conditions de confirmation de l'identité des composés. Les guides 2002/657/CE et la norme NF ISO 2289 partagent un système d'identification par points relativement similaire qui fait la distinction entre les différents types et mode de détection. Le guide SANCO, s'il établit des distinctions entre les détecteurs, a adopté un système de confirmation simplifié.

5.2.1. Identification selon le mode de détection (guide Sanco)

Le guide SANCO [Guide Sanco] n'a pas établi de barème de points d'identification, mais exige un nombre minimum d'ions de diagnostics ou d'ions produits suivant les modes de détection (illustration 12).

| Mode SM | Simple SM (résolution de masse standard) | Simple SM (haute résolution) | SM/SM |
|--|--|--|--|
| Système type (exemples) | Quadripôle, trappe d'ions, temps de vol (TOF) | TOF, trappe d'ions, FTSM, secteur magnétique | Triple quadripôle, trappe d'ions, SM hybride (ex. Q-TOF, Q-Trap) |
| Acquisition | Balayage complet, fenêtre m/z réduite, mode d'ions choisi (SIM) | Balayage complet, fenêtre m/z réduite, mode d'ions choisi (SIM) | Choisi/multiple suivi de réaction (SRM /MRM), full scan, spectre d'ions produits |
| Paramètres requis pour l'identification | ≥ 3 ions de diagnostic (inclure de préférence l'ion quasi-moléculaire) | ≥ 2 ions de diagnostic (inclure de préférence l'ion quasi-moléculaire) Précision de la masse mesurée < 5 ppm. Au moins un ion de fragmentation | ≥ 2 ions produits |

Illustration 12 : Paramètres requis pour l'identification pour différents type de spectres de masse (traduit et reproduit de Sanco /12495/2011).

5.2.2 Système d'identification par points

Le texte 2002/657/CE évoque le terme « points d'identification » qui est également employé dans les textes anglais (« identification points » 2002/657/CE et NF ISO 22892) alors que la version française de la norme NF ISO 22892 mentionne des « indices de concordance ». Ces deux termes ont toutefois une signification identique, c'est pourquoi AQUAREF propose la terminologie suivante :

- critère d'identification : caractéristique intrinsèque d'une méthode d'analyse à satisfaire pour obtenir l'identification non équivoque d'un analyte. En particulier, investigations en spectrométrie de masse ou d'autres recherches/informations destinées à identifier un composé dans des matrices environnementales ;
- barème d'identification : attribue une valeur pondérée aux critères en fonction de leur pertinence pour une bonne identification ou une quantification adéquate ;

- points d'identification : la satisfaction d'un critère d'identification entraîne l'obtention du nombre de points prévus au barème ;
- score d'identification : l'addition des points d'identification obtenus au cours de l'examen des performances de la méthode vis-à-vis d'une substance produit le score d'identification de la substance ;
- Indice de concordance : ratio entre le nombre de points d'identification obtenus et le nombre de points d'identification maximum.

En mode SIM, une distinction est effectuée selon les différents modes de détection utilisés. Un nombre plus importants d'ions de confirmation sera nécessaire avec des détecteurs de masse peu sélectifs, de type simple quadripôle par exemple. Un détecteur de masse haute résolution permettra par contre d'apporter une meilleure résolution massique réduisant les probabilités de confusion (faux positifs) entre composés. Une détection en mode SM/SM, en plus d'améliorer la sensibilité, permet également d'accroître la sélectivité de la détection.

Pour refléter ces différences, un système de points d'identification attribués selon la technique est utilisé. Selon 2002/657/CE, un minimum de 4 points d'identification est requis pour confirmer l'identité d'une substance. La norme NF ISO 22892:2006 n'exige cependant que trois points d'identification. Aquaref s'appuie sur ces documents et estime que quatre points d'identification sont requis en y incluant le temps de rétention.

L'illustration 13 (issue de 2002/657/CE) indique les points obtenus par technique de spectrométrie de masse. Chaque ion ne peut être compté qu'une seule fois. La CG-SM avec ionisation à impact électronique est considérée comme une technique différente de la CG-SM à ionisation chimique. Plusieurs analytes peuvent être utilisés pour accroître le nombre de points d'identification uniquement si les dérivés présentent des chimies de réaction différentes. Les produits de transition comprennent les produits fils et petit-fils. Lorsque la CL est utilisée couplée à la détection par barrettes de diodes (DAD) en balayage complet ou couplée à la détection fluorimétrique, elle peut contribuer à un seul point d'identification au maximum, pour autant que les critères applicables à ces techniques soient remplis.

| Technique SM : critères d'identification | Points d'identification obtenus par ion |
|---|---|
| Spectrométrie de masse à faible résolution (LR) | 1.0 |
| LR-SM ⁿ ion précurseur | 1.0 |
| LR-SM ⁿ produits de transition | 1.5 |
| SMHR | 2.0 |
| HR-SM ⁿ Ion précurseur | 2.0 |
| HR-SM ⁿ Produits de transition | 2.5 |

Règles d'application :

- (1) Chaque ion ne peut être compté qu'une seule fois.
- (2) La CG-SM avec ionisation à impact électronique est considérée comme une technique différente de la CG-SM à ionisation chimique.
- (3) Plusieurs analytes peuvent être utilisés pour accroître le nombre de points d'identification uniquement si les dérivés présentent des chimies de réaction différentes.
- (4) Pour les substances reprises dans le groupe A de l'annexe 1 de la directive 96/23/CE, lorsqu'une des techniques ci-après est utilisée dans la procédure d'analyse: CLHP couplée à la spectrophotométrie à réseau de diodes (DAD) en balayage complet, CLHP couplée à la détection fluorimétrique, CLHP couplée à un immunogramme, la CCM 2D couplée à la détection spectrométrique, elle peut contribuer à un seul point d'identification au maximum, pour autant que les critères applicables à ces techniques soient remplis.
- (5) Les produits de transition comprennent les produits fils et petit-fils.

Illustration 13 : Barèmes d'identification en présence de diverses classes de fragment moléculaires selon 2002/657/CE (annexe 1 de la directive 96/23/CE en annexe 2 de ce rapport).

L'illustration 14 fournit des exemples de scores d'identification par technique obtenus en additionnant les points d'identification (issue de la directive 2002/657/CE).

| Technique(s) | Nombre d'ions | Score d'identification par technique (points d'identification obtenus) |
|----------------------------|---------------------------------------|--|
| CG-SM (EI ou CI) | N | N |
| CG-SM (EI ou CI) | 2 (EI) + 2 (CI) | 4 |
| CG-SM (EI ou CI) 2 dérivés | 2 (dérivé A) + 2 (dérivé B) | 4 |
| CL-SM | N | N |
| CG-SM-SM | 1 précurseur et 2 fils | 4 |
| CL-SM-SM | 1 précurseur et 2 fils | 4 |
| CG-SM-SM | 2 précurseurs, avec 1 fils chacun | 5 |
| CL-SM-SM | 2 précurseurs, avec 1 fils chacun | 5 |
| CL-SM-SM-SM | 1 précurseur, 1 fils et 2 petits fils | 5.5 |
| SM HR | N | 2N |
| CG-SM et CL-SM | 2 +2 | 4 |
| CG-SM et SM HR | 2 +1 | 4 |

Illustration 14 : Exemples d'application du barème pour un ensemble de techniques et de couplages de techniques - N : nombre d'ions présents (nombre entier).

La norme NF EN ISO 22892 [NF EN ISO 22892, 2006] et le projet de norme ISO/TC 147/SC 2N [ISO/TC 147/SC 2] considèrent certains critères supplémentaires en discernant notamment l'utilisation de dilution isotopique ou l'ajout d'étalons (illustration 15). Il y est fait également référence à la possible attribution d'un indice de concordance basée sur la connaissance, établie précédemment, de la présence d'un composé provenant d'un même site (voir annexe 3).

| Source | Points Identification | Remarques |
|--|-----------------------|---|
| Ion de diagnostic | 1 | Tout ion S/N > 3 |
| Absence d'autres ions en mode balayage complet | 1 | Ions de diagnostic en mode balayage complet S/N > 3 |
| Colonne avec une polarité différente | 1 | Critère CG- (temps de rétention supplémentaires) |
| Dilution isotopique | 1 | |
| Composé cible ajouté/étalon | 1 | |
| Empreinte chromatographique | 1 | Par exemple PCB, HAP, dioxines |
| Autres techniques analytiques | 1/technique | Autres détecteurs sélectifs : ECD, PFPD, NPD, PID, autres SM détecteurs |
| Supposition, possibilité, recherches antérieures | 1 | Voir annexe 3 de ce rapport |

Illustration 15 : Barème de points d'identification additionnels de la norme NF EN ISO 22892 [2006].

5.4. Synthèse du système de confirmation de l'identité d'une substance

Une différence majeure est à établir entre la directive 2002/657/CE d'un côté et les normes NF EN ISO 22892 et guide SANCO/12495/2011 de l'autre concernant la spectrométrie de masse en basse résolution. La directive 2002/657/CE stipule qu'un score de 4 points est nécessaire, ce qui avec une détection exclusivement par MS simple implique 4 ions de diagnostic présentant un rapport signal/bruit > 3. Les autres guides préconisent plutôt la présence de 3 ions de diagnostic présentant un rapport signal/bruit > 3. AQUAREF privilégie ce critère de 3 ions de diagnostic.

Concernant les autres modes de détection, les 3 guides aboutissent à des critères d'identification identiques.

AQUAREF recommande ainsi d'utiliser le barème proposé par l'illustration 16 afin de déterminer le score d'identification de la méthode, et de fixer le score minimum requis à 4 en incluant le temps de rétention.

| Source | Points d'identification | Remarques |
|--|---|--|
| Ion de diagnostic | 1 | Tout ion S/N > 3 |
| Absence d'autres ions en mode balayage complet | 1 | Ions de diagnostic en mode balayage complet S/N > 3 |
| Colonne avec une polarité différente | 1 | Critère CG- (temps de rétention supplémentaires) |
| Dilution isotopique | 1 | |
| Composé cible ajouté/étalon | 1 | |
| Empreinte chromatographique | 1 | Par exemple PCB, HAP, dioxines |
| Autres techniques analytiques, hors SM | 1/technique | Autres détecteurs sélectifs : ECD, PFPD, NPD, PID, |
| GC-SM (EI et CI ; positive ou négative) | 3 | EI : 1 point - CI : 2 points |
| Mise en œuvre de la CG LR SM ⁿ | ≥ 4 (1 par ion précurseur, 1,5 par ion fils ou par transition) | Minimum 1 ion précurseur et 2 ions fils ou 2 transitions |
| Mise en œuvre de la HR-SM | 2 | |
| Mise en œuvre de la HR-SM ⁿ | ≥ 4,5 (2 par ion précurseur, 2,5 par ion fils ou transition) | Minimum 1 ion précurseur et 1 ion fils ou 1 transition |

Illustration 16 : Barème de points selon les recommandations d'Aquaref.

Ainsi, concernant l'identification d'une substance, trois cas sont distingués :

A. Absence d'une substance :

Un composé est absent d'un échantillon si :

- les exigences en termes de temps de rétention ne sont pas respectées ;
- ou aucun point d'identification n'a été obtenu.

B. Indication :

Il y a indication de la présence d'une substance si :

- les exigences concernant les temps de rétention sont respectées ;
- et au moins un point d'identification (ou ion de diagnostic/produit) a été obtenu, mais le score requis n'a pas été atteint.

C. Identification :

Les composés cibles sont identifiés si :

- le score d'identification minimum de 4 (incluant le temps de rétention) a été atteint ;
- et les temps de rétention relatifs sont en accord avec les critères fixés ;
- et les intensités relatives des ions sélectionnés sont compatibles avec les critères fixés.

5.5. Faux négatifs /faux positifs dans le cadre de la mise en œuvre de méthode multi-résidus

Les deux exemples décrits dans ce paragraphe ont pour objectif d'illustrer les cas de résultats non conformes, « faux positif » ou « faux négatif » pouvant être observés dans des méthodes par spectrométrie de masse.

Faux négatifs

L'application d'une méthode multi résidus sur l'analyse de composés antibiotiques dans des échantillons d'entrée de station d'épuration [Capdeville, 2012] a montré la distorsion de pics chromatographiques des fluoroquinolones (ciprofloxacine et l'ofloxacine) d'une part, et la variation du temps de rétention des antibiotiques de type macrolides (clarithromycine, érythromycine et roxithromycine) d'autre part (illustration 17). En revanche, aucun changement n'a été observé lors de l'application de cette méthode à des échantillons de type effluent de station d'épuration.

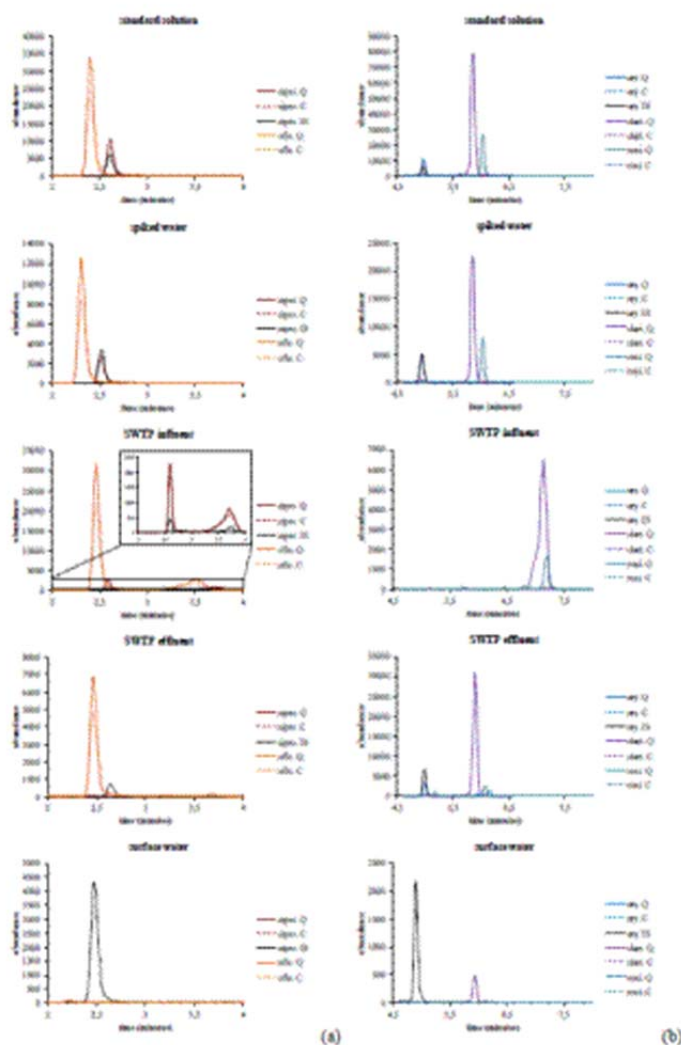


Figure 11: Influence de la matrice sur le temps de rétention des fluoroquinolones (a) et macrolides (b) (cipro.: ciprofloxacine, oflo.: ofloxacine, ery.: érythromycine, clari.: clarithromycine, roxi.: roxithromycine, Q: quantification transition, C: confirmation transition, IS: internal standard).

Illustration 17 : Influence de la matrice sur l'analyse de composés antibiotiques par LC/MSMS [Capdeville, 2012].

Habituellement, en LC/MSMS, les composés sont identifiés par leur temps de rétention et leurs transitions en mode MRM et leurs rapports caractéristiques. Ainsi, lorsque le temps de rétention varie de plus de 1 minute, il est très difficile d'être certain de l'identité des composés et cela en dépit des 2 transitions et du bon rapport entre eux. La présence du composé peut être confirmée grâce à l'étalon interne (ex. ciprofloxacine-¹³C2-¹⁵N dans l'échantillon d'entrée de station d'épuration, illustration 17) qui évolue de la même manière que le composé natif. Une autre option pour confirmer la présence de ces composés est la méthode d'ajouts dosés : l'extrait est d'abord injecté directement puis une seconde fois dopé par la solution des 30 composés. La dernière option pour confirmer l'identité des composés est l'analyse de l'échantillon avec des systèmes de haute résolution en masse (ex. LC/ QTOF).

Faux positif

Dans le cas d'interférences chromatographiques, une autre façon de déterminer si le composé observé est réellement le composé d'intérêt est d'appliquer une autre méthode, en changeant le système d'analyse ou le mode d'analyse. Un échantillon suspecté de contenir de la carbamazépine a été analysé par LC/MSMS et GC/MSMS. Dans les deux cas, les quatre critères d'identification (temps de rétention, les signaux des deux transitions et bon rapport entre les deux transitions) ont été satisfaits et ont permis de montrer la présence de carbamazépine dans l'eau [Capdeville, 2011].

Un échantillon suspecté de ne pas contenir de carbamazépine a été analysé sur le même équipement, mais cette fois utilisé comme un simple GC/MS (mode SIM), puis comme GC/MSMS (mode MRM). Les résultats de ce test sont présentés dans l'illustration 18 : un pic chromatographique au temps de rétention attendu pour la carbamazépine est observé sur les 2 chromatogrammes (TIC Total Ion current). Mais le composé qui présente l'ion 193 caractéristique de la carbamazépine, ne présente pas en revanche la transition 193 >165 (spécifique de la carbamazépine), ce qui conduit finalement à conclure que l'eau était exempte de carbamazépine ; donc seul le mode GC/MSMS permet dans ce cas d'éviter un faux positif.

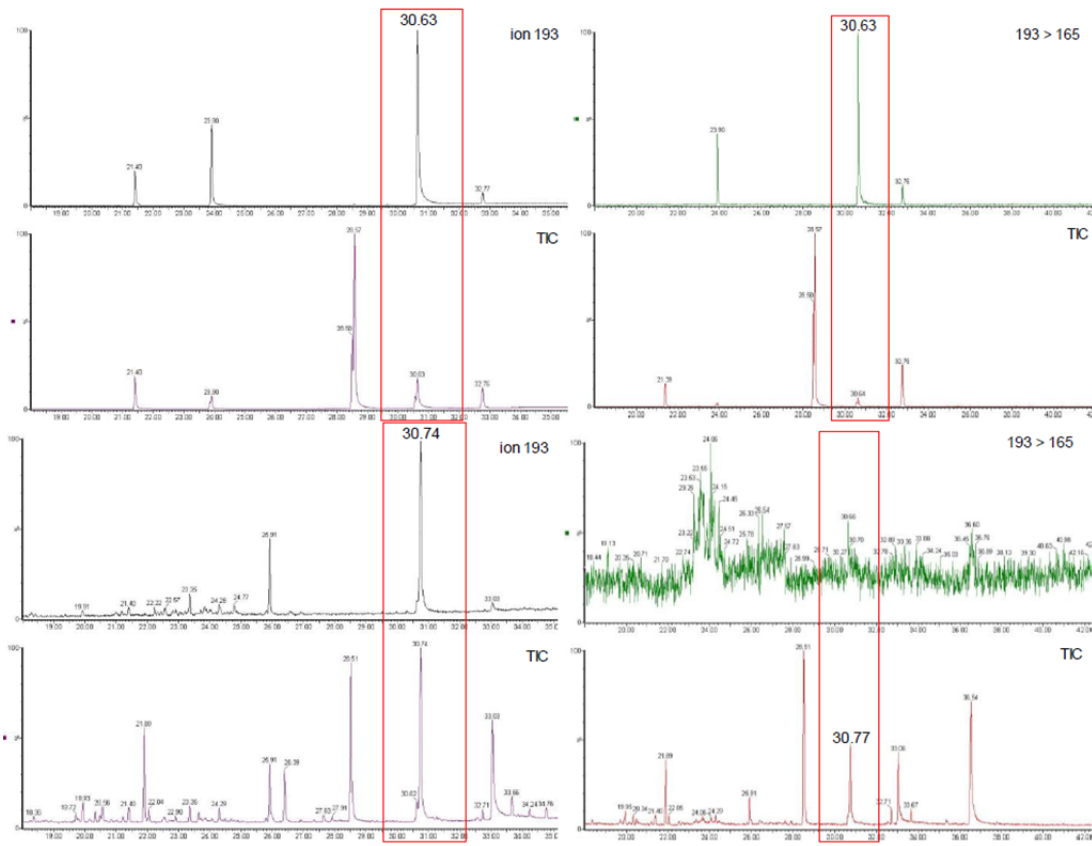


Illustration 18 : Chromatogrammes obtenus pour un échantillon contenant de la carbamazépine (en haut) et un échantillon vierge (en bas) en GC/MS (mode SIM) et en GC/MSMS (mode MRM) [Capdeville, 2011].

Les problèmes matriciels rencontrés en analyse sont molécules dépendants, matrices dépendants et méthodes dépendants [d'après communication Hélène Budzinski - Séminaire ONEMA, 2009]. Pour assurer la fiabilité de l'analyse, les points suivants doivent être considérés :

- intérêt de disposer d'étalons internes (analogues marquées des molécules à quantifier) en nombre suffisants pour compenser les phénomènes matriciels ;
- intérêt de disposer de techniques alternatives reposant sur la mise en œuvre de principes chromatographiques et/ou de détection différents et cela même si des techniques ultraperformantes de type LC/ESI/MSMS sont mises en œuvre ;
- intérêt des ajouts dosés lorsque des analogues marqués ne seraient pas utilisés ou disponibles commercialement.

6. Cas des méthodes d'analyse qualitative

L'analyse qualitative est mentionnée dans le guide SANCO [Guide Sanco] et repose sur les principes détaillés ci-après. Nous insistons sur le fait que cette approche renseigne uniquement sur la présence ou l'absence d'un composé et ne peut en aucun cas fournir un résultat chiffré pour connaître la concentration de celui-ci.

Il est nécessaire d'établir la confiance dans la détection d'un analyte à un certain niveau de concentration. La validation est focalisée sur la détectabilité. Il n'y a pas d'exigence concernant l'existence d'une fonction d'étalonnage ou de rendement.

On considère la notion de « *Screening Detection Limit, SDL* » qui est définie comme la plus petite concentration pour laquelle il a été démontré que l'analyte peut être détecté (sans nécessairement satisfaire sans équivoque aux critères d'identification) dans au moins 95 % des échantillons.

En respect des critères de sélectivité, la présence de faux doit être vérifiée en utilisant des échantillons non dopés. Pour chaque groupe de produits, une validation « basique » doit impliquer un minimum de 20 échantillons dopés au niveau de la SDL présumée. Les échantillons doivent inclure différentes matrices par groupe de produits avec au moins deux échantillons par matrice.

Pour les molécules qui ne faisaient pas initialement partie du domaine d'application de la méthode qualitative, l'indice de confiance dans la détection à un certain niveau de concentration ne peut pas être assuré (pas de SDL).

7. Critères pour les contrôles en routine des analyses multi-résidus

Le guide SANCO/12495/2011 [Guide Sanco] décrit des contrôles de performance à respecter lors de la réalisation des analyses en routine. Nous reprenons certains de ces critères que nous préconisons pour le contrôle des analyses multi-résidus.

7.1. Contrôle du taux de récupération en routine

Le taux de récupération des composés analysés doit être vérifié à chaque série. Cela implique de réaliser des dopages régulièrement, en raison de l'absence de matériau de référence pour les eaux et de matériaux d'essais interlaboratoires contenant toutes les molécules d'intérêt.

Compte tenu du nombre important de composés à analyser que cela peut représenter, on peut tolérer que le contrôle de routine à chaque série analytique se fasse sur une partie seulement des composés, qualifiés alors de représentatifs. Le laboratoire effectuera alors un contrôle réduit à chaque série et un contrôle complet à une fréquence de 6 mois minimum (illustration 19). Le choix des composés représentatifs est fixé à au moins 10% des composés par technique analytique avec un minimum de 5 composés. Ce contrôle du taux de récupération doit être réalisé pour toutes les matrices concernées (types d'eaux), et au moins au niveau de concentration de la limite de quantification.

| Vérification du rendement d'extraction | Analytes représentatifs de la méthode famille chimique | Tous les analytes de la méthode |
|--|--|--|
| Nombre d'analyses | 10 % des analytes et au minimum 5 analytes, par famille chimique et par système de détection | Tous les 6 mois |
| Fréquence | chaque série d'analyses | Tous les 6 mois |
| Niveau | Pour chaque matrice concernée et au moins au niveau de la limite de quantification | Pour chaque matrice concernée et au moins au niveau de la limite de quantification |

Illustration 19 : Contrôle de routine à réaliser pour le suivi des performances d'une méthode multi-résidus.

Le choix des composés représentatifs doit être justifié et prendre en compte les différentes méthodes d'extraction, de purification et d'analyse. On pourra privilégier les composés les plus difficiles (LQ, interférents, variation importante) ou ceux régulièrement présents dans les échantillons avec les logiciels de traitement automatisés des différents équipements, le calcul du taux de récupération peut être fait rapidement pour l'ensemble des composés, avec des indications visuelles du respect ou non des bornes d'acceptation.

Pour le contrôle réduit, le laboratoire doit établir une stratégie afin de préciser l'impact sur tous les composés de la méthode, en cas de contrôle du taux de récupération non conforme pour un ou plusieurs analytes représentatifs. Si le contrôle réduit sort des bornes d'acceptation, un contrôle complet doit être réalisé pour la série impactée.

7.2. Contrôle du blanc

L'absence de composés dans le blanc matrice sur toute la procédure doit être vérifiée pour tous les composés, à chaque série analytique.

Le laboratoire établira la conduite à tenir en cas de blanc positif.

7.3. Contrôle de la limite de quantification ou du seuil de décision

La limite de quantification ou le seuil de décision doit être vérifié à chaque série, par dopage dans une matrice représentative des échantillons.

8. Conclusions

Devant l'absence de texte normatif définissant les méthodes multi-résidus et encadrant leur mise en œuvre, et l'absence de référentiel pour l'harmonisation de l'évaluation de ces « méthodes internes » dans le cadre de l'accréditation, ce document a pour ambition d'être un préambule à la rédaction de guides à l'usage des laboratoires d'une part et des donneurs d'ordre d'autre part, destinés à harmoniser les pratiques et les exigences pour la validation des méthodes d'analyse multi-résidus.

Les éléments et critères identifiés dans ce document pour les étapes de mise en œuvre des méthodes et leur validation sont des recommandations. Dans tous les cas, le choix des méthodes et techniques à appliquer est du ressort de l'analyte, qui doit connaître les verrous et difficultés liés à l'analyse de ses propres couples substances/matrices, et les maîtriser en démontrant les performances initiales de la méthode développée et leur maintien pour chacune des substances revendiquée par la méthode.

L'analyte doit veiller à l'adéquation entre la méthode mise en œuvre et le besoin de performances nécessaires pour satisfaire les objectifs du donneur d'ordre.

Pour aller plus loin dans l'harmonisation des pratiques et des critères de validation et obtenir l'approbation de la profession, il apparaît important de poursuivre ces travaux par la rédaction des exigences métrologiques des méthodes multi-résidus, en lien avec la commission de normalisation en charge de l'assurance qualité (Afnor T90Q ou T91M). Une réflexion sur la façon de formaliser ces exigences sera nécessaire et il est souhaitable qu'elle se fasse en concertation avec le Cofrac.

9. Références

Capdeville M.J. and Budzinski Y. (2011) - Problems and solutions of trace level analysis of organic contaminants in drinking and ground waters, review and experience feedback trends in analytical chemistry, 30 (4), p. 586-606

Capdeville Y., Pardon Y., Miège Y, Coquery Y. and Budzinski Y. - Development of a method for the simultaneous extraction of antibiotics, β -blockers, antineoplastics and antivirals by solid-phase extraction followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis – application to sewage treatment plant effluents . En soumission pour Journal of Chromatography A.

Décision de la commission du 12 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats [notifiée sous le numéro C(2002) 3044] (2002/657/CE) Journal officiel des Communautés européennes, 17/08/2002, 221/8-221/36.

Furlong E.T., Werner S.L., Anderson B.D. and Cahill J.D. (2008) - Determination of human-health pharmaceuticals in filtered water by chemically modified styrene-divinylbenzene resin-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry: U.S. Geological Survey Techniques and Methods, book 5, sec. B, chapitre B5, 56 pages.

Guide SANCO - Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document N° SANCO/12495/2011, implemented by 01/01/2012.

Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis CAC/GL 40-1993, Amendment 2010, Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR), 36 pages.

Huber L. (Ed.) - Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Interpharm Press, East Englewood, CO, USA, 1998.

ISO/TC 147/SC 2 spécification technique spécifique aux milieux aquatiques, actuellement en préparation – Qualité de l'eau- Lignes directrices pour l'identification des composés cibles par chromatographie et spectrométrie de masse.

IUPAC - Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.

Method 1694 - Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS EPA-821-R-08-002 December 2007.

NF EN ISO 15680, 2004, Qualité de l'eau - Dosage par chromatographie en phase gazeuse d'un certain nombre d'hydrocarbures aromatiques monocycliques, du naphthalène et de divers composés chlorés par dégazage, piégeage et désorption thermique.

NF EN ISO 22892, 2006 Qualité du sol - Lignes directrices pour l'identification de composés cibles par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

NF ISO 12787, 2012 Cosmétiques Méthodes analytiques - Critères de validation pour les résultats analytiques utilisant des techniques chromatographiques.

NF T 90-210, 2009, Qualité de l'eau - Protocole d'évaluation initiale des performances d'une méthode dans un laboratoire

NORMAN Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants Protocol for the validation of chemical and biological monitoring methods, February 2009 (Version 2.0), 99 pages.

PR XP T90-223, 2013 Water quality - Determination of selected residues medical compounds in the water dissolved fraction - Method using solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection

Séminaire onema 2009 - Résidus de médicaments dans les milieux aquatiques : besoins et outils pour la surveillance, et évaluation des risques. <http://www.onema.fr/Residus-de-medicaments-dans-les,349>

TC 230 WI 00230296 - Validation of analytical methods

XP ENV ISO 13530, 1998, Qualité de l'eau Guide de contrôle qualité analytique pour l'analyse de l'eau

Annexe 1

Familles chimiques sandre

De nombreuses directives européennes imposent à la France, comme aux autres États membres, de rendre compte de leurs activités pour pouvoir évaluer l'atteinte des objectifs fixés par ces directives et le respect des échéances. La directive cadre sur l'eau adoptée en 2000 fixe ainsi un objectif de bon état des eaux d'ici 2015. La France a pour obligation de mettre en œuvre un programme de surveillance sur les milieux aquatiques afin d'évaluer l'impact du programme de mesures sur l'état général de ses masses d'eau.

Un système d'évaluation de l'état des eaux, outil en cours d'élaboration, permettra d'« évaluer » cet état des masses d'eau à partir des données élémentaires recueillies au cours des programmes de surveillance. Il sera intégré dans le système d'information sur l'eau (SIE).

Ainsi le SIE permettra de préparer les données requises pour le ministère en charge de l'écologie qui rendra compte à la Commission européenne de l'avancée de notre politique de l'eau. Le SIE permet aussi de rassembler les connaissances nécessaires pour la mise en œuvre des autres directives européennes : nitrates, eaux résiduaires urbaines, eau potable, habitats¹.

Le Service d'administration national des données et référentiels sur l'eau (Sandre) établit et met à disposition le référentiel² des données sur l'eau du SIE. Ce référentiel se compose de spécifications et de l'ensemble structuré d'informations utilisés pour l'exécution du système d'information, constituant un cadre commun à plusieurs applications. Dans le cadre de ces activités, il a été amené à développer une classification des principales familles chimiques de micropolluants faisant l'objet de programmes de surveillance.

¹ <http://www.onema.fr/IMG/pdf/DossierSIE.pdf>

² <http://www.sandre.eaufrance.fr/>

| Famille chimique | Code SANDRE |
|--|-------------|
| Alcools et polyols | 51 |
| Aldéhydes et cétones | 52 |
| Alkylphénols, nonylphénols et bisphénols A | 53 |
| Autres phénols | 55 |
| Anilines et dérivés | 54 |
| Benzène et dérivés | 56 |
| Carbamates | 57 |
| Chloroalcane SCCP | 58 |
| Chlorobenzène et mono-aromatiques halogénés | 59 |
| COHV, solvants chlorés, fréons | 60 |
| Composés bilantiels de l'eau | 74 |
| Micropolluants organiques Divers (autres organiques) | 61 |
| HAP (Hydrocarbures aromatiques polycyclique, pyrolytique et dérivés) | 62 |
| Hydrocarbures et indices liés | 63 |
| Indices globaux (AOX, DCO...) | 43 |
| Métaux et métalloïdes | 44 |
| Autres éléments minéraux | 46 |
| Opiacés | 89 |
| Micropolluants organiques Organochlorés | 64 |
| Organométalliques | 45 |
| Micropolluants organiques Organophosphorés | 65 |
| Paramètres azotés | 47 |
| Paramètres phosphorés | 48 |
| PBDE et PBB | 66 |
| PCB (arochlors), PCT, Dioxines, Furanes (PCDD, PCDF) | 67 |
| PFC (PFOA, PFOS) | 68 |
| Phtalates | 69 |
| Physico-chimique in situ | 79 |
| Physique | 32 |
| Radioactifs, isotopes et traceurs | 49 |
| Stéroles et stéroïdes (oestrogènes, progestogènes) | 70 |
| Triazines et métabolites | 71 |
| Urées et métabolites | 72 |

Annexe 2

Annexe 1 de la directive 96/23/CE qui indique les substances et groupes de résidus concernés par les mesures de contrôle de cette directive

ANNEXE I

GROUPE A - Substances ayant un effet anabolisant et substances non autorisées

- 1) Stilbènes, dérivés de stilbènes et leurs sels et esters
- 2) Agents antithyroïdiens
- 3) Stéroïdes
- 4) Resorcylic Acid Lactones (y compris Zeranol)
- 5) α -agonistes
- 6) Substances incluses dans l'annexe IV du règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil du 26 juin 1990

GROUPE B - Médicaments vétérinaires (1) et contaminants

- 1) Substances antibactériennes, y compris sulfamides, quinolones
 - 2) Autres médicaments vétérinaires
 - a) Anthelminthiques
 - b) Anticoccidiens, y compris nitroimidazoles
 - c) Carbamates et pyréthroïdes
 - d) Tranquillisants
 - e) Anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)
 - f) Autres substances exerçant une activité pharmacologique
 - 3) Autres substances et contaminants environnementaux
 - a) Composés organochlorés, y compris PCB's
 - b) Composés organophosphorés
 - c) Éléments chimiques
 - d) Mycotoxines
 - e) Colorants
 - f) Autres
- (1) Y compris les substances non enregistrées qui pourraient être utilisées à des fins vétérinaires.

Annexe 3

Paragraphe 6.3 de la norme NF EN ISO 22892 « Qualité du sol – Lignes directrices pour l'identification de composés cibles par chromatographie en phase gazeuse », pour la recherche d'indice de concordance basée sur la source « supposition, possibilités recherche antérieure ».

6.2 Autres informations

L'interprétation de données environnementales fait toujours appel à une combinaison d'analyses de données, aux connaissances se rapportant à l'origine de l'échantillon et à celles relatives au comportement des contaminants et des processus qui interviennent ou peuvent intervenir. Cela est également vrai pour l'interprétation d'une analyse par CG-SM. Comme indiqué, un composé est identifié si 3 indices de concordance sont obtenus. Si seulement 1 ou 2 ions de diagnostic sont présents, d'autres indices de concordance sont nécessaires. Dans la présente Norme internationale, le recueil d'indices de concordance supplémentaires à l'aide des modes opératoires d'analyse fait partie de l'Étape 2. L'exploitation d'informations relatives à l'échantillon et l'interprétation desdites informations est réalisée lors de l'Étape 3. Un autre indice de concordance est obtenu si un ou plusieurs des critères suivants sont remplis.

NOTE En principe, un indice de concordance obtenu lors de l'Étape 3 n'est pas de même nature que les indices de concordance obtenus lors de l'Étape 1 et de l'Étape 2. Ils sont obtenus par l'interprétation d'informations supplémentaires non analytiques. Dans la présente Norme internationale, le terme « indice de concordance » (3.7) désigne les indices obtenus lors des trois étapes.

Étape 2: recueil des indices de concordance sur la base des modes opératoires d'analyse.

- Aucun autre ion n'est visible en mode de balayage complet et cela est conforme au spectre de masse du composé pur (par exemple HAP).
- L'identification est conforme à un modèle chromatographique normalement rencontré ou rencontré sur ce site (par exemple PCB ou HAP).
- Pour les composés volatils, la spécificité des fragments de masse en combinaison avec leur temps de rétention sera généralement suffisante. Leur volatilité correspond à une faible masse moléculaire, ce qui limite le nombre possible de résultats faussement positifs: il ne peut exister de composés de faible masse moléculaire ayant à la fois des temps de rétention identiques sur une colonne de CG et des spectres de masse similaires.

Étape 3: recueil d'indices de concordance supplémentaires à partir d'informations connues relatives à l'échantillon ou au site d'échantillonnage, et de l'interprétation de ces informations. Si des indices de concordance sont obtenus lors de l'Étape 3, cela doit être consigné.

- Le composé a été identifié dans des échantillons précédents provenant du même site (par exemple, si l'échantillon étudié présente une faible concentration et qu'un ou deux ions de diagnostic ont un rapport S/B < 3 après biodégradation).
- L'historique du site a montré que la présence du composé était attendue.
- D'autres échantillons provenant du même site conduisent à une identification positive.

Onema
Hall C – Le Nadar
5, square Félix Nadar

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

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