

# Lignes directrices et recommandations pour la sélection des étalons internes pour l'analyse de substances organiques en spectrométrie de masse

Véronique Le DIOURON, Fanny GANTOIS

Février 2019

Document final

Avec le soutien de



## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2018, au titre de l'action E «Garantir la qualité des données bancarisées ».

Auteur (s) :

Véronique Le Diouron  
LNE  
[Veronique.Lediouron@lne.fr](mailto:Veronique.Lediouron@lne.fr)

Fanny Gantois  
LNE  
[Fanny.gantois@lne.fr](mailto:Fanny.gantois@lne.fr)

Approbateur :

Sophie Vaslin-Reimann  
[sophie.vaslin-reimann@lne.fr](mailto:sophie.vaslin-reimann@lne.fr)

---

Vérification du document :

Charles Pollono (Ifremer)  
[Charles.pollono@ifremer.fr](mailto:Charles.pollono@ifremer.fr)

## Les correspondants

---

AFB : Nicolas Gaury, [nicolas.gaury@afbiodiversite.fr](mailto:nicolas.gaury@afbiodiversite.fr)

Etablissement : Sophie Vaslin-Reimann, [sophie.vaslin-reimann@lne.fr](mailto:sophie.vaslin-reimann@lne.fr)

Référence du document : V. Le Diouron, F. Gantois - Lignes directrices et recommandations pour la sélection des étalons internes pour l'analyse de substances organiques en spectrométrie de masse - Rapport AQUAREF 2018 - 25 p.

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

SOMMAIRE

---

<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>2. GÉNÉRALITÉS SUR LES ÉTALONS INTERNES.....</b>	<b>7</b>
2.1 Rôle d'un étalon interne .....	7
2.2 Utilisation d'étalon marqué comme étalon interne .....	9
<b>3. INFORMATIONS NECESSAIRES POUR LA SELECTION DES HOMOLOGUES     MARQUES.....</b>	<b>10</b>
3.1 Formes de marquage.....	10
3.2 Informations disponibles par le fournisseur et éléments d'interprétation	11
<b>4. SELECTION ET RECOMMANDATIONS DANS LE CHOIX DES ETALONS MARQUES     13</b>	
4.1 Cas de la dilution isotopique .....	13
4.2 Cas de l'étalonnage interne avec des étalons marqués .....	16
4.3 Précautions d'emploi .....	20
4.4 AVANTAGES DE LA DI.....	21
<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>23</b>

**Lignes directrices et recommandations pour la sélection des étalons internes pour l'analyse de substances organiques en spectrométrie de masse**

Auteur(s) V. Le Diouron, F. Gantois

**RÉSUMÉ**

Lors d'analyses multi-résidus ou nécessitant des étapes de préparations, l'utilisation d'étalons internes, est recommandé pour diagnostiquer et corriger des effets potentiels liés à la préparation d'échantillon, mais également des effets liés à sa matrice sur la détection et la quantification de l'analyte. La mise en œuvre de la dilution isotopique (DI) est souvent la meilleure approche pour s'affranchir de ces effets et fiabiliser les analyses mais elle nécessite de travailler en spectrométrie de masse.

Ce rapport rappelle d'abord la définition d'un étalon interne et son rôle tout au long du processus analytique.

Des critères pour choisir son étalon interne sont ensuite proposés et l'intérêt d'utiliser préférentiellement des molécules marquées lors d'analyses multi-résidus en spectrométrie de masse ou nécessitant des étapes de préparations, est présenté.

Un paragraphe pour sensibiliser l'analyste aux informations à sa disposition dans le choix des molécules marquées (formes de marquage, enrichissement, pureté chimique) est ensuite proposé.

Des recommandations pour sélectionner leurs étalons internes marqués seront alors données à travers l'exemple des molécules marquées de benzène disponibles sur le marché.

Dans le cas où l'analyste ne dispose pas de molécule homologue marquée sur le marché ou fait le choix d'utiliser une molécule marquée différente de l'analyte, quelques précautions et conseils pour guider le choix d'une autre molécule marquée seront présentés et illustrés par des exemples.

Pour finir les avantages de la mise en œuvre de la DI seront discutés à travers des exemples trouvés dans la bibliographie et des études menées au LNE.

**Mots clés** (thématique et géographique) :

Etalon interne, marquage isotopique, enrichissement, homologue marqué, effet matrice, quantification.

**Guidelines and recommendations to select internal standards for analysis in mass spectrometry**

V. Le Diouron, F. Gantois

**ABSTRACTS**

In multi-residue analysis or when complex preparation is needed, the use of internal standards is recommended to diagnose and correct potential effects on a sample. The implementation of isotopic dilution is the best approach to overcome these effects and make analyses reliable, but it requires working in mass spectrometry.

This deliverable first recalls the definition of an internal standard and its role throughout the analytical process.

Criteria to help the analyst in selecting its internal standard are then proposed and the advantage of preferentially using labelled molecules in multi-residue analyses or requiring preparation steps are presented.

A paragraph to sensitize the analyst against the distributors informations to provide with isotopic labelled molecules (forms of labelled, enrichment, chemical purity) is then proposed.

Using the example of commercially available benzene-labelled molecules and studies at the LNE, recommendations will be given to help laboratories in selecting their labelled internal standards and the precautions to be taken.

And in the event that the analyte does not have a labelled molecule on the market, some precautions and tips to properly choose another labelled molecule will be presented.

Finally, the benefits of implementing ID will be discussed through examples found in the bibliography and studies conducted at the LNE.

**Key words** (thematic and geographical area):

Internal standard, isotopic labelled compound, enrichment, matrix effect, quantification.

## **1. INTRODUCTION**

Lors d'analyses multi-résidus ou nécessitant des étapes de préparations, l'utilisation d'étalons internes est recommandée pour diagnostiquer et corriger des effets potentiels liés à la préparation d'échantillon, mais également des effets liés à sa matrice sur la détermination de l'analyte. La mise en œuvre de la dilution isotopique, qui consiste à utiliser les homologues marqués des analytes pour la quantification, est la meilleure approche pour s'affranchir de ces effets et fiabiliser les analyses mais elle nécessite de travailler en spectrométrie de masse.

Ce rapport rappelle d'abord la définition d'un étalon interne et son rôle tout au long du processus analytique.

Des critères pour choisir son étalon interne marqué sont ensuite proposés. Un paragraphe pour sensibiliser l'analyste aux informations nécessaires pour sélectionner ses molécules marquées (formes de marquage, enrichissement, pureté chimique) et à leur interprétation, est ensuite proposé.

Des recommandations pour sélectionner les étalons internes marqués seront alors données à travers l'exemple des molécules marquées de benzène disponibles sur le marché.

Et dans le cas où l'analyste ne dispose pas de l'homologue marquée sur le marché ou fait le choix d'utiliser une molécule marquée différente de l'analyte recherché, quelques précautions et conseils pour bien choisir cette autre molécule marquée seront présentées et illustrées par des exemples.

Pour finir les avantages de la mise en œuvre de la DI seront discutés à travers des exemples trouvés dans la bibliographie et des études menées au LNE.

## **2. GÉNÉRALITÉS SUR LES ÉTALONS INTERNES**

### **2.1 RÔLE D'UN ÉTALON INTERNE**

Un étalon interne est une substance, non contenue a priori dans un échantillon, possédant des propriétés physico-chimiques aussi proches que possible de celles de l'analyte qui doit être quantifié. Cette substance est ajoutée à l'échantillon dans l'objectif de corriger les pertes et les effets matrice pouvant subvenir lors de l'analyse.

D'après la norme XP T 90-214, deux types d'étalon interne peuvent être utilisés: l'étalon interne et l'étalon d'injection. Leurs définitions sont les suivantes :

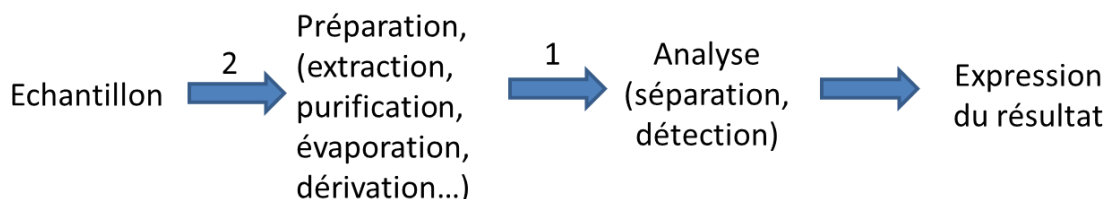
Etalon interne : composé dont une quantité connue est ajoutée à l'échantillon dès le début du protocole, dont l'analyse recouvre toute la procédure, qui permet de corriger les pertes pendant la préparation de l'échantillon et son analyse en prenant en compte les effets matrices globaux (rendement d'extraction et effet d'ionisation par exemple). La détermination du rapport de l'intensité du signal caractéristique de la molécule et de l'étalon interne permet d'obtenir le rapport de quantité de matière entre l'analyte et l'étalon interne et

donc d'en déduire la concentration de l'analyte dans l'échantillon. Pour cela une quantité identique est ajoutée aux solutions d'étalonnage et à l'échantillon.

Etalon d'injection : composé ajouté à l'extrait et à la solution d'étalonnage afin de surveiller la variabilité et de corriger la réponse de l'instrument.

En pratique un étalon interne peut avoir deux fonctions selon l'étape du processus analytiques durant laquelle il est ajouté [Rapport AQUAREF 2012 - BRGM RP-61865-FR].

Considérons un processus analytique comportant les différentes étapes possibles du traitement d'un échantillon :



1-S'il est ajouté après la préparation (dans le cas où il existe une étape d'extraction préalable), et avant l'analyse, l'étalon interne permet de vérifier le bon déroulement de l'analyse instrumentale (injection, séparation chromatographique) et de corriger, en vue de la quantification, certains phénomènes qui peuvent apparaître, par exemple:

- des variations de volumes injectés,
- des effets d'extinction ou exaltation du signal liés à la matrice lors du processus d'ionisation quand la solution de l'échantillon est introduite dans la source du spectromètre de masse (SM),
- des phénomènes d'adsorption dans un liner lors de l'injection en chromatographie en phase gazeuse (GC),
- une instabilité du signal lié à une dérive électronique de l'appareil.

2-S'il est ajouté dès l'extraction, l'étalon interne permet de vérifier d'une part les effets liés à la préparation (perte et/ou dégradation partielles de l'analyte, diminution du rendement d'extraction, effet matrice) et d'autre part de compenser les effets provenant de l'analyse (cf. point 1 précédent).

Il est préférable d'introduire l'étalon interne dans l'échantillon dès le début de la méthode afin de compenser tous les effets liés à la préparation et à l'analyse. Cela s'applique à toutes les méthodes analytiques (par exemple: l'extraction sur phase solide par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (SPE-LC-MS/MS), l'extraction par liquide pressurisé par chromatographie gazeuse couplée à la détection par ionisation de flamme PLE-GC-FID, extraction en ligne sur phase solide par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse SPE-GC-MS...).

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'emploi d'un étalon interne par analyte ou par groupe d'analytes ayant le même comportement au cours du processus d'analyse, est recommandé.

## 2.2 UTILISATION D'ETALON MARQUE COMME ETALON INTERNE

Actuellement l'un des modes de détection les plus répandus pour les analyses quantitatives dans les laboratoires prestataires de services pour l'analyse d'eaux est la spectrométrie de masse (SM) car elle présente deux qualités essentielles d'un point de vue analytique: la spécificité et la sensibilité.

Le processus d'ionisation en SM est crucial pour les analyses quantitatives par exemple par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) et peut être affecté par la matrice de l'échantillon. Une matrice complexe peut influencer le processus de formation d'ions quand la solution échantillon est introduite dans la source du spectromètre de masse. La suppression ou l'exaltation du signal est attribuée à la compétition qui se produit entre les composants de la matrice et les analytes lors de l'ionisation. Pour compenser ces effets matrice, différentes procédures peuvent être mises en œuvre :

- une préparation de l'échantillon appropriée permettant de supprimer les interférents de la matrice (diminution des prises d'essai, étape de purification de l'échantillon),
- une optimisation du gradient chromatographique pour séparer l'analyte de son interférent,
- un étalonnage sur des échantillons représentatifs de la matrice réelle,
- la méthode des ajouts dosés (ajout de quantités connues et croissantes d'étalon interne à l'échantillon),
- ou une quantification par addition d'étalon interne ou d'étalon interne marqué d'un isotope stable (dilution isotopique).

La dilution isotopique constitue la meilleure approche pour palier au mieux les effets rencontrés lors de l'ionisation en SM (analyse) mais également de compenser des effets liés à la préparation de l'échantillon (cf. point 2-).

Pour rappel, la DI est une méthode utilisant les homologues marqués des analytes comme étalons internes pour corriger les pertes pendant la préparation des échantillons et leur analyse [ISO 17858]. La détermination du rapport de l'intensité du signal caractéristique de la molécule et de la molécule analogue marquée permet d'obtenir le rapport de quantité de matière entre le composé et le composé marqué et donc d'en déduire la concentration du composé dans l'échantillon.

La détermination du rapport de l'intensité du signal caractéristique de la molécule et de la molécule analogue marquée permet au moyen de la fonction d'étalonnage de déduire la concentration de l'analyte. Pour cela, une quantité identique d'étalon interne doit être ajoutée aux solutions d'étalonnage et à l'échantillon à analyser.

Cette approche est basée sur le fait que les molécules et leurs homologues ou analogues marqués ont des formules chimiques qui ne diffèrent que par la

substitution d'un ou plusieurs atomes par leurs isotopes stables ce qui garantit un comportement chimique similaire lors de la préparation de l'échantillon. Ils possèdent des temps de rétention identiques ou à minima très proches, ce qui prouve également des comportements analytiques proches; leur détection se fait sur leurs masses moléculaires qui sont différentes. Comme les molécules et leurs homologues marqués réagissent de façon identique, les traitements que subit l'échantillon n'ont plus besoin d'être quantitatifs [CNAM 1996]. Le rapport existant initialement dans l'échantillon entre la quantité de matière du composé et celle du composé marqué est conservé tout au long du processus analytique. Comme seul le rapport des quantités des espèces intervient, il doit donc rester suffisamment de substances (marquée et non marquée) pour mesurer le rapport entre les deux espèces.

Ainsi la DI est la seule méthode de quantification qui permet de corriger au mieux les effets liés à une matrice complexe que ce soit au niveau de la préparation d'échantillons que de l'analyse. Il est donc fortement conseillé de la mettre en œuvre comme méthode de quantification.

### **3. INFORMATIONS NECESSAIRES POUR LA SELECTION DES HOMOLOGUES MARQUES**

Aujourd'hui, de nombreux fournisseurs proposent un choix important de molécules marquées. Pour faire le meilleur choix, il est nécessaire de disposer de certaines informations et de bien les interpréter [site web de Cambridge Isotope Laboratories].

#### **3.1 FORMES DE MARQUAGE**

Les molécules marquées sont des formes synthétiques de la molécule native dans laquelle un ou plusieurs atomes ont été remplacés par un isotope stable. Un isotope est une forme d'un élément chimique qui diffère seulement par le nombre de neutrons dans son nucléon. Il a les mêmes propriétés chimiques mais une masse différente. Par exemple, un atome de carbone (avec une abondance naturelle de  $^{12}\text{C}$ ) peut être remplacé par son isotope  $^{13}\text{C}$ . Cette substitution atomique est appelée « marquage isotopique ». Pour une même molécule, plusieurs sites (ou plusieurs atomes de cette molécule) peuvent être marqués.

Il existe plusieurs formes de marquage des molécules organiques : le marquage au carbone  $^{13}\text{C}$ , au deutérium  $^2\text{H}$  ou D, et à l'azote  $^{15}\text{N}$  sont les plus courants.

Actuellement sur le marché, les molécules marquées au deutérium puis au carbone  $^{13}\text{C}$  sont les plus fréquemment proposées.

Des molécules marquées à l'azote  $^{15}\text{N}$  sont depuis peu également commercialisées mais elles couvrent principalement les nouveaux besoins liés à l'analyse des protéines dans les échantillons biologiques.

### 3.2 INFORMATIONS DISPONIBLES PAR LE FOURNISSEUR ET ÉLÉMENTS D'INTERPRÉTATION

Lors de la sélection d'une molécule marquée, une fiche d'information est généralement fournie par le distributeur ou fabricant. Si ce n'est pas le cas, elle doit être demandée. Les informations, que cette fiche contient, doivent être bien interprétées par l'analyste pour lui permettre de faire le choix le plus adapté à son étude.

Pour illustrer la démarche à suivre, l'exemple de la molécule de benzène, pour laquelle plusieurs homologues marqués sont disponibles sur le marché, sous forme du composé pur ou dilué dans un solvant, est développé.

- Composé pur : Benzène marqué au  $^{13}\text{C}$


	BENZENE ( $^{13}\text{C}_6$ , 99%)
Chemical Formula	*C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> 
Unlabeled CAS#	71-43-2
Labeled CAS#	32488-44-1
Molecular Weight	84.07
Chemical Purity	98%

Tableau 1: exemple d'étalon de benzène marqué au  $^{13}\text{C}$  disponible dans le commerce

La première information donnée correspond au nombre maximum d'atomes ou de sites marqués dans la molécule. Dans cet exemple  $^{13}\text{C}_6$ , 6 carbones/sites au maximum seront marqués au carbone  $^{13}\text{C}$  dans la molécule.

Le taux d'enrichissement isotopique de la molécule est ensuite donné. Il représente le pourcentage de molécules qui ont subi au moins un marquage et non pas au pourcentage de molécules marquées sur le maximum de sites disponibles. Dans cet exemple, le taux d'enrichissement isotopique du benzène est de 99%. Il tient compte des molécules marquées sur les 6 sites possibles de la molécule ( $^{13}\text{C}_6$ ) et également des molécules plus faiblement enrichies ( $^{13}\text{C}_5$ ,  $^{13}\text{C}_4$ ,  $^{13}\text{C}_3$ ,  $^{13}\text{C}_2$ ,  $^{13}\text{C}_1$ ).

Il existe des modèles mathématiques pour évaluer la distribution des combinaisons des molécules marquées sur leurs différents sites. Le Tableau 2 indique les différentes combinaisons possibles dans le cas du benzène et leur abondance relative correspondante.

Notation	« C <sub>0</sub> »	« C <sub>1</sub> »	« C <sub>2</sub> »	« C <sub>3</sub> »	« C <sub>4</sub> »	« C <sub>5</sub> »	« C <sub>6</sub> »
Combinaison d'atomes	<sup>13</sup> C <sub>0</sub> <sup>12</sup> C <sub>6</sub>	<sup>13</sup> C <sup>12</sup> C <sub>5</sub>	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>12</sup> C <sub>4</sub>	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>12</sup> C <sub>3</sub>	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> <sup>12</sup> C <sub>2</sub>	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> <sup>12</sup> C <sub>1</sub>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>12</sup> C <sub>0</sub>
Abondance relative (%)	6.9 x 10 <sup>-12</sup>	2.1 x 10 <sup>-9</sup>	3.4 x 10 <sup>-7</sup>	3.0 x 10 <sup>-3</sup>	0.20	6.59	93.21

Tableau 2 : Combinaisons d'atomes pouvant être marquées au <sup>13</sup>C et abondances relatives des molécules de benzène marquées au <sup>13</sup>C avec un enrichissement de 99%

Il est à noter que le pourcentage d'atomes marqués (enrichissement de 99%) est plus important que le pourcentage de molécules totalement enrichie (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) qui n'est finalement que de 93%. Mais la molécule totalement enrichie reste l'espèce majoritaire. Les espèces moins enrichies (par exemple les combinaisons de molécules en « C<sub>5</sub> ») pourront également être observées lors de l'analyse en SM selon leur abondance.

Sur le marché, il est possible de trouver également du benzène <sup>13</sup>C<sub>6</sub> dont l'enrichissement n'est que de 98%. Le Tableau 3 montre que dans ce cas, l'abondance relative des combinaisons d'atomes est très différente. En particulier, l'abondance des molécules complètement enrichies (<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) est fortement diminuée (86%) alors que le taux d'enrichissement n'a baissé que de 1%.

Notation	« C <sub>0</sub> »	« C <sub>1</sub> »	« C <sub>2</sub> »	« C <sub>3</sub> »	« C <sub>4</sub> »	« C <sub>5</sub> »	« C <sub>6</sub> »
Combinaison d'atomes	<sup>13</sup> C <sub>0</sub> <sup>12</sup> C <sub>6</sub>	<sup>13</sup> C <sup>12</sup> C <sub>5</sub>	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>12</sup> C <sub>4</sub>	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>12</sup> C <sub>3</sub>	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> <sup>12</sup> C <sub>2</sub>	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> <sup>12</sup> C <sub>1</sub>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>12</sup> C <sub>0</sub>
Abondance relative (%)	4.4 x 10 <sup>-10</sup>	6.4 x 10 <sup>-8</sup>	5.3 x 10 <sup>-6</sup>	2.6 x 10 <sup>-2</sup>	0.76	12.40	86.81

Tableau 3 : Combinaisons d'atomes pouvant être marquées au <sup>13</sup>C et abondances relatives des molécules de benzène marquées au <sup>13</sup>C avec un enrichissement de 98%

La formule chimique, la masse molaire et le numéro CAS de la molécule marquée sont ensuite généralement donnés ainsi que le numéro CAS de la molécule native. Ces informations permettent de s'assurer de l'identification de la molécule marquée.

La pureté chimique est également indiquée (« Chemical purity »). Ce pourcentage rend compte des impuretés contenues dans le composé natif qui a été enrichi. Une pureté chimique de 98% signifie que le composé natif contenait 2% d'impuretés (eau, solvants résiduels, traces de catalyseur, traces de composés ayant servi à la synthèse). Il ne renseigne pas sur la proportion de molécule qui n'a pas été enrichie (molécule non marquée) qui est fonction de l'enrichissement isotopique et qui est donnée en exemple dans les Tableaux 2 et 3.

- Composé pur : Benzène marqué au D

Il existe également des molécules de benzène marquées au deutérium. Trois exemples de marquages possibles sont présentés dans le Tableau 4.

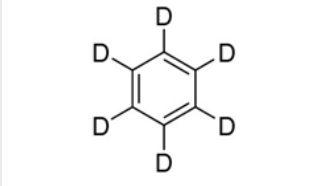
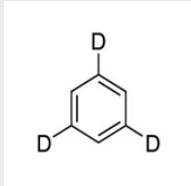
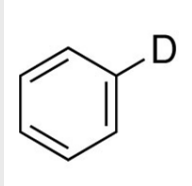
	BENZENE-D6 (D, 99.5%)	BENZENE (1,3,5-D3, 98%)	BENZENE (D1, 98%)
Chemical Formula	C6D6 	C6H3D3 	C6H5D 
Unlabeled CAS#	71-43-2	71-43-2	71-43-2
Labeled CAS#	1076-43-3	1684-47-5	1120-89-4
Molecular Weight	84.15	81.13	79.12
Chemical Purity	99.5%	98%	98%

Tableau 4: exemples d'étalon de benzène marqué au D disponibles dans le commerce

Les molécules de benzène marquées au D sont disponibles avec les six hydrogènes enrichis, trois hydrogènes enrichis ou un hydrogène enrichi, et des enrichissements différents.

Dans le cas du benzène D<sub>3</sub>, l'annotation 1,3,5 précise la position des carbones du benzène sur lesquels le marquage a été réalisé.

- Composé en solution : Benzène marqué au <sup>13</sup>C ou au D

Pour l'achat de benzène marqué en solution, les seules informations généralement disponibles sont la forme du marquage et la concentration ou la fraction massique de la solution ainsi que le solvant de dilution. Les informations concernant l'enrichissement isotopique et la pureté chimique du produit pur devront être demandées au fournisseur.

Il existe également sur le marché des molécules marquées avec plusieurs formes de marquages sur une même molécule : <sup>13</sup>C et D ; <sup>13</sup>C, D et <sup>15</sup>N.

#### **4. SELECTION ET RECOMMANDATIONS DANS LE CHOIX DES ETALONS MARQUES**

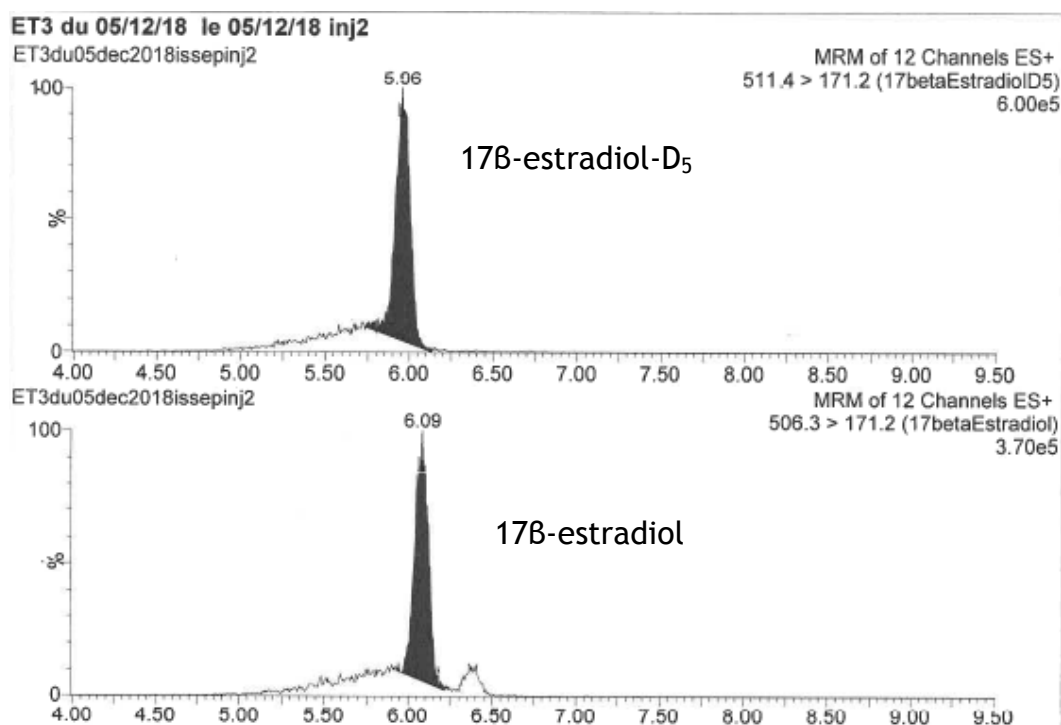
##### **4.1 CAS DE LA DILUTION ISOTOPIQUE**

Pour la détection par SM, il est fortement recommandé d'utiliser comme étalons internes les analogues marqués des analytes lorsqu'ils sont disponibles.

Pour des matrices complexes susceptibles d'engendrer de fortes interférences, il est conseillé de disposer d'un analogue marqué pour chaque analyte subissant ces interférences, par exemple exaltation du signal, suppression du signal, ou modification du temps de rétention.

La concentration ou la réponse des étalons internes doit se situer dans le domaine de la gamme d'étalonnage [XP T90-214].

Lorsque le choix est possible, on privilégiera les marquages au  $^{13}\text{C}$  (ou au  $^{15}\text{N}$ ) par rapport au deutérium, et ce pour plusieurs raisons [Rapport AQUAREF 2012 - BRGM RP-61865-FRErreur ! Signet non défini.]. L'isotope  $^{13}\text{C}$  est plus stable et est donc moins soumis à d'éventuelles modifications chimiques lors de la préparation ou l'analyse, que le deutérium. Il permet donc une meilleure identification après fragmentation en SM. De plus, les molécules marquées au  $^{13}\text{C}$  possèdent des propriétés physico-chimiques plus proches des molécules non marquées ( $^{12}\text{C}$ ) que les mêmes molécules marquées au deutérium. Cela s'observe notamment par des temps de rétention des molécules marquées au  $^{13}\text{C}$  généralement identiques à ceux des molécules natives alors qu'un léger décalage des temps de rétention est observable entre les molécules marquées au D et les molécules natives (figure 1).



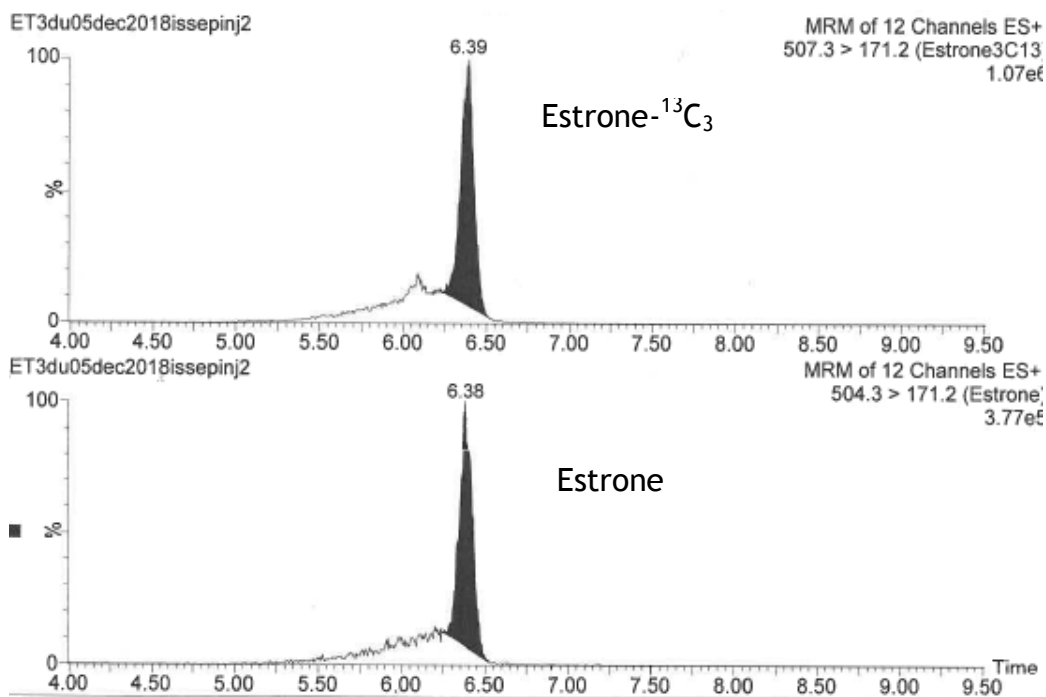


Figure 1: Chromatogrammes de la 17 $\beta$ -estradiol et son homologue marqué en D<sub>5</sub> et de l'estrone et son homologue marqué au  $^{13}\text{C}_3$

Dans les deux premiers chromatogrammes, un faible décalage des temps de rétention entre la 17 $\beta$ -estradiol et son homologue marqué en D<sub>5</sub> est observé traduisant une légère différence d'affinité et donc de comportement de ces deux molécules vis-à-vis du support chimique de la colonne chromatographique. Dans les deux autres chromatogrammes, l'estrone et son homologue marqué au  $^{13}\text{C}_3$  ont les mêmes temps de rétention. Cette similitude de comportement observée sur les temps de rétention laisse à penser que leur comportement sera également similaire au cours de l'analyse.

Il est préférable de choisir la molécule marquée dont l'enrichissement isotopique est le plus grand possible pour :

- obtenir la plus grande abondance relative de la molécule d'intérêt enrichie en  $^{13}\text{C}$  ou D (cf exemple 99% contre 98%),
- améliorer la réponse en SM de la molécule marquée,
- et rendre négligeable l'apport de non marqué par ajout du composé marqué dans l'échantillon.

Pour qu'il n'y ait pas de « chevauchement spectral » entre la molécule marquée et la molécule native, il est conseillé que la différence de masse entre les deux espèces soit d'au moins 3 uma [XP T90-214].

Il est donc préférable de choisir la molécule marquée avec un marquage le plus grand possible afin d'améliorer la spécificité de la détection en SM (différence de uma plus importante) que ce soit pour les  $^{13}\text{C}$  ou le deutérium.

Cependant, plus le marquage est grand et plus la molécule est potentiellement instable (cf 4.3).

Les molécules marquées peuvent être vendues sous forme de composé pur (poudre ou liquide pur) ou en solution dans un solvant. Dans ce dernier cas, il appartiendra à l'analyste de s'assurer que le solvant dans lequel se trouve la

molécule marquée est compatible avec sa méthode d'analyse et que la concentration de la solution est adaptée à ses besoins. Lorsque les molécules marquées sont sous forme de composé pur, l'analyste dispose, lors de la fabrication de ses solutions d'étalons internes marqués, d'un plus grand choix de solvant de dilution (après vérification de son taux de solubilité dans le solvant souhaité). Il aura également la possibilité d'adapter au mieux leur concentration aux besoins de l'analyse.

Fort de ces recommandations, dans le cas de cet exemple sur le benzène, notre choix se porterait d'abord sur la molécule  $^{13}\text{C}$  avec un enrichissement de 99% puis vers le benzène  $\text{D}_6$ , du fait de son enrichissement, de sa pureté chimique, de son taux de marquage (6 atomes).

Mais le choix final reviendra toujours à l'analyste qui tiendra compte principalement de ses besoins (coût de l'étude) et de ses exigences analytiques (performance de la méthode).

#### 4.2 CAS DE L'ETALONNAGE INTERNE AVEC DES ETALONS MARQUES

- Mise en œuvre

Toutes les molécules ne disposent pas, dans le commerce, de leurs homologues marqués. De même, si de nombreux composés sont quantifiés dans une même méthode (analyse multi-résidus), il n'est pas envisageable pour un laboratoire d'utiliser un homologue marqué par analyte.

Dans ces deux cas, pour quantifier l'analyte, un autre composé marqué autre que son homologue, peut être utilisé. De nombreux documents (Norme XP T90-214, Rapport AQUAREF 2012 - BRGM RP-61865-FR) recommandent de choisir cet étalon de substitution selon certains critères. Notamment, le composé marqué devra présenter un comportement analytique similaire à celui de l'analyte :

- au cours de l'analyse : temps de rétention les plus proches possibles, mode d'ionisation identique, mêmes variations de signal...
- mais surtout au cours de la préparation: rendements d'extraction similaires, des comportements proches à l'évaporation et/ou à la dérivation...

En règle générale, le laboratoire recourra à l'utilisation au minimum d'une molécule marquée par famille de composés définie et justifiera de sa représentativité au sein de la famille en vue de la quantification du composé.

Les étalons internes marqués devront également être si possible répartis tout au long du chromatogramme.

Ces critères constituent des éléments de base pour sélectionner un étalon marqué de substitution, mais ne suffisent pas toujours (cf. § 4.3). Aussi, le prérequis pour s'assurer de l'exactitude de la méthode est de vérifier que la molécule marquée de substitution choisie présente le même comportement que l'analyte au cours de l'étape de préparation et de l'analyse.



- Exemple de vérification du choix des étalons marqués : cas des pesticides

Une étude de faisabilité de MRC de pesticides dans l'eau a été réalisée de 2008 à 2010 au LNE. Cette étude concernait 19 pesticides pour lesquels une méthode d'extraction par SPE suivie d'une analyse par DI-LC-MS/MS a été développée. Pour mettre en œuvre la DI, des molécules marquées adaptées à l'étude ont été recherchées dans le commerce. Parmi ces 19 pesticides, seuls 12 d'entre eux possédaient leur homologue marqué. Pour les 7 autres, une étude a été menée pour sélectionner, parmi les molécules marquées acquises, la plus adaptée comme étalon de substitution.

Les premiers éléments pour sélectionner un étalon marqué de substitution lors de l'analyse sont en général, les suivants :

- le temps de rétention le plus proche de l'analyte,
- les mêmes comportements analytiques (mêmes variations de signal)
- et le même mode d'ionisation.

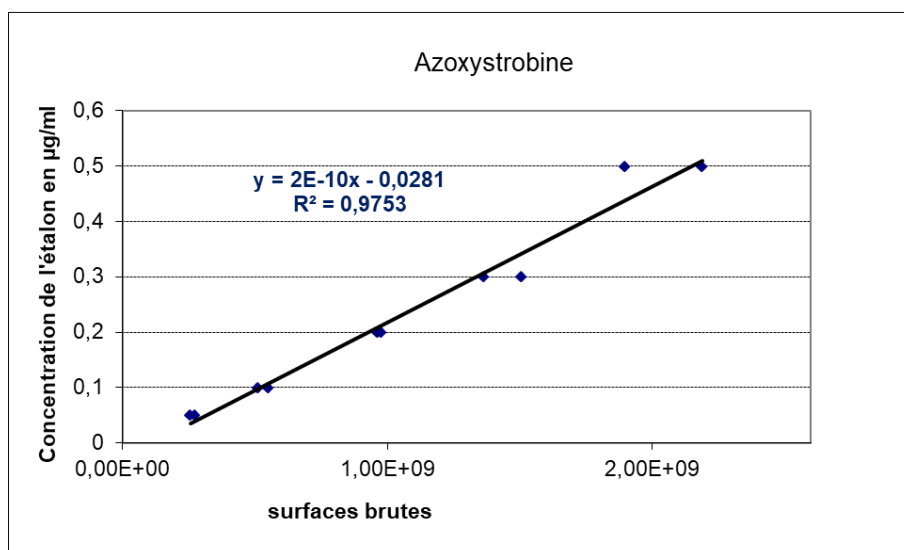
Afin d'illustrer cette étude, seul l'exemple de l'azoxystrobine est présenté.

Une gamme d'étalonnage en cinq points a été préparée et analysée par LC-MS/MS. Plusieurs régressions linéaires ont été établies :

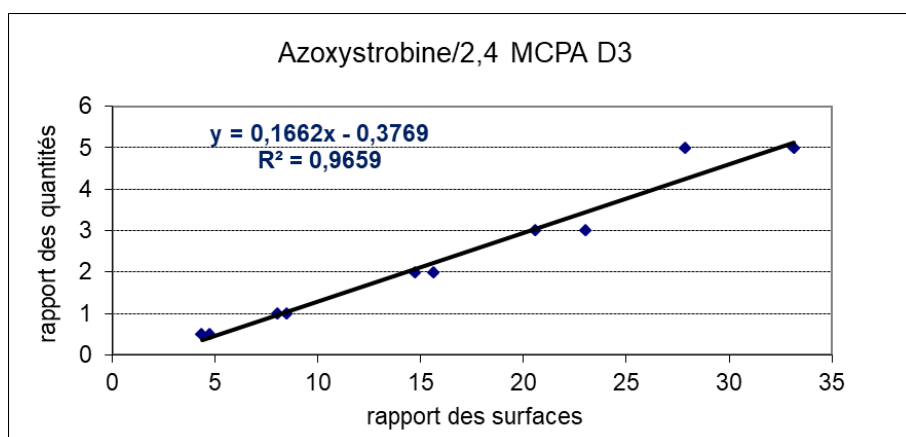
-en étalonnage externe (surface du pic de l'azoxystrobine mesurée en fonction de sa concentration),

-en étalonnage interne avec chacune des molécules marquées disponibles (rapport des surfaces du pic de l'azoxystrobine sur la surface de l'étalon de substitution en fonction du rapport des concentrations).

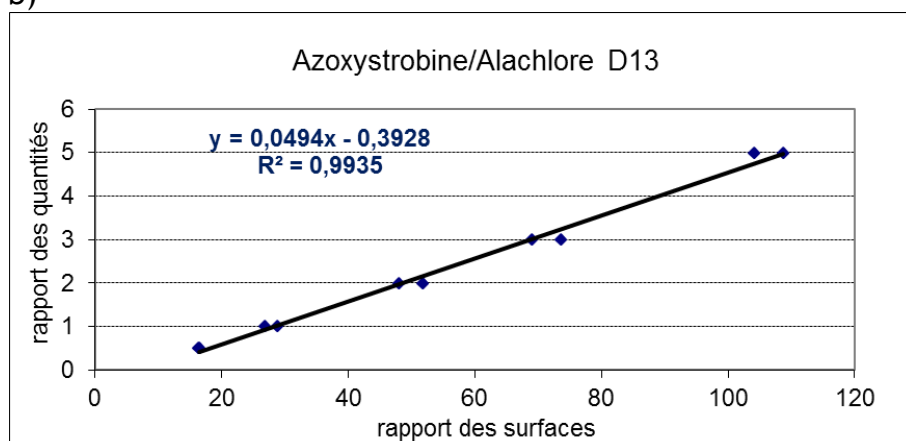
A titre d'exemple, seules les régressions linéaires tracées avec le 2,4 MCPA-D<sub>3</sub> et l'alachlore-D<sub>13</sub> sont présentées en figure 2.



a)



b)



c)

Figure 2 : Régression linéaire pour l'azoxystrobine a) en étalonnage externe, en étalonnage interne avec b) le 2,4 MCPA-D<sub>3</sub> et c) l'alachlore-D<sub>13</sub>

Le Erreur ! Source du renvoi introuvable. dresse un bilan du temps de rétention, du mode d'ionisation et du coefficient de corrélation des différentes régressions linéaires entre toutes les molécules marquées disponibles et l'azoxystrobine.

Composé	Mode d'ionisation	Temps de rétention en min	R <sup>2</sup>
Aldicarbe-D <sub>3</sub>	+	14,10	0,9641
Carbofuran-D <sub>3</sub>	+	17,16	0,9921
Amidosulfuron-D <sub>6</sub>	+	20,79	0,9942
<b>Azoxystrobine</b>	<b>+</b>	<b>25,84</b>	<b>0,9753</b>
2,4 MCPA-D <sub>3</sub>	-	25,88	0,9659
Mécoprop-D <sub>3</sub>	-	26,60	0,9688
2,4D- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	-	27,83	0,9758
Dichlorprop-D <sub>6</sub>	-	27,92	0,9661
Malathion-D <sub>6</sub>	+	28,16	0,9803
Alachlore-D <sub>13</sub>	+	28,16	0,9935
Chlorfenvinphos-D <sub>10</sub>	+	29,24	0,9875
Bentazone-D <sub>6</sub>	-	30,16	0,9668
Fluazifop-D <sub>9</sub>	+	36,40	0,9772

Tableau 5 : temps de rétention, mode d'ionisation et coefficient de corrélation des différentes régressions linéaires entre toutes les molécules marquées achetées et de l'azoxystrobine

En jaune apparaissent les molécules marquées présentant les temps de rétention les plus proches de l'analyte. Il s'agit du 2,4 MCPA-D<sub>3</sub>, du mécoprop-D<sub>3</sub> et du 2,4D-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>. Elles ne s'ionisent pas dans le même mode et ne permettent pas d'obtenir des coefficients de corrélation les plus proches de 1.

En bleu apparaissent les molécules marquées avec lesquelles les coefficients de corrélation obtenues sur les régressions linéaires sont les plus proches de 1. Ceci traduit un comportement analytique de la molécule marquée proche de celui de l'analyte (variations du signal identiques pour les deux composés). Il s'agit de l'amidosulfuron-D<sub>6</sub>, l'alachlore-D<sub>13</sub>, le carbofuran-D<sub>3</sub>. Elles s'ionisent dans le même mode mais leurs temps de rétention ne sont pas très proches.

Cette analyse a démontré qu'aucune molécule marquée de l'étude ne présentait à la fois un temps de rétention proche, un comportement analytique proche et le même mode d'ionisation que l'analyte.

Le critère qui semblait finalement le plus déterminant, était le coefficient de corrélation des régressions obtenues. En effet, plus celui-ci était proche de 1 et plus les variations du signal de l'azoxystrobine étaient compensées par celles de l'amidosulfuron-D<sub>6</sub>, l'alachlore-D<sub>13</sub>, ou du carbofuran-D<sub>3</sub>. Analytiquement, ces trois molécules pouvaient convenir pour la quantification de l'azoxystrobine.

Des comportements analytiques proches ne sont pas le seul critère de sélection de la molécule marquée de substitution. En effet, il est également nécessaire de vérifier que ces molécules sélectionnées se comportent de la même façon lors de l'étape de préparation, en particulier durant la phase d'extraction SPE dans le cas présent (même rendement d'extraction).

Le **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** présente les rendements lors de la préparation (comportant une étape d'extraction SPE et une d'évaporation) des molécules marquées sélectionnées et de l'azoxystrobine.

	Rendement (en %)
Azoxystrobine	72
Amidosulfuron-D <sub>6</sub>	121
Alachlore-D <sub>13</sub>	73
Carbofuran-D <sub>3</sub>	118

Tableau 6 : Rendement de préparation de l'azoxystrobine, l'amidosulfuron-D<sub>6</sub>, l'alachlore-D<sub>13</sub> et du carbofuran-D<sub>3</sub>

Le rendement de l'alachlore-D<sub>13</sub> était du même ordre de grandeur que celui de l'azoxystrobine.

L'alachlore-D<sub>13</sub> avait donc été retenu comme étalon de substitution pour l'azoxystrobine car il avait été vérifié qu'il présentait un comportement analytique proche et un comportement similaire lors de la préparation de celui de l'analyte.

### 4.3 PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

- Stabilité des molécules deutérées

Sous certaines conditions analytiques, les molécules marquées au deutérium peuvent présenter des problèmes de stabilité qui ne peuvent être mis en évidence que lors de leur utilisation.

Au cours d'une étude réalisée au LNE sur le dosage d'hormones dans les eaux, des phénomènes d'échanges d'atomes de deutérium de la molécule marquée avec de l'hydrogène de la matrice ont été observés lors d'une étape de dansylation réalisée dans des conditions d'acidité et de température élevées : c'est une réaction de tautomérisation [Hall-2009].

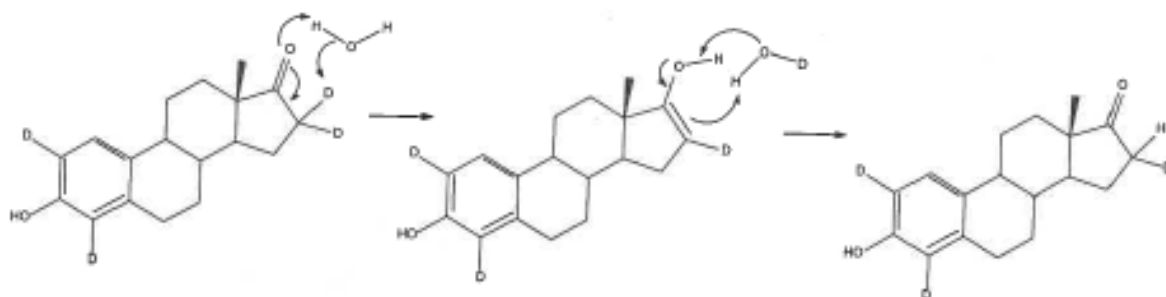
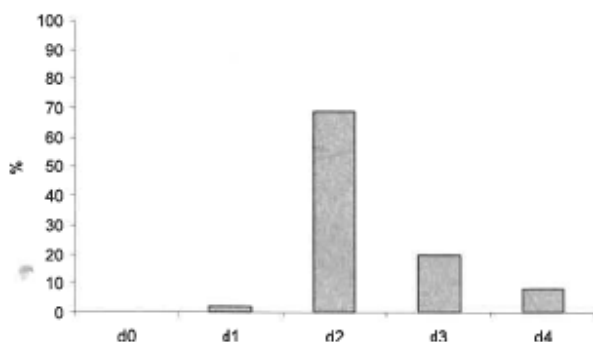


Figure 3: Réaction de tautomérisation de l'estrone-D<sub>4</sub>

Lors de cette réaction, la molécule d'estrone marquée en D<sub>4</sub> s'est dégradée principalement en D<sub>2</sub>, comme le montre la Figure 3. La réaction n'étant pas répétable, le signal de l'estrone D<sub>4</sub> est rendu variable tout comme les rapports des signaux de l'estrone natif et l'estrone D<sub>4</sub>, et la quantification avec cette molécule marquée par D1 devient impossible (figure 4).

Graph 10: Isotopic pattern for d<sub>2</sub>-dansyl estrone



Graph 11: Isotopic pattern for d<sub>4</sub>-estrone

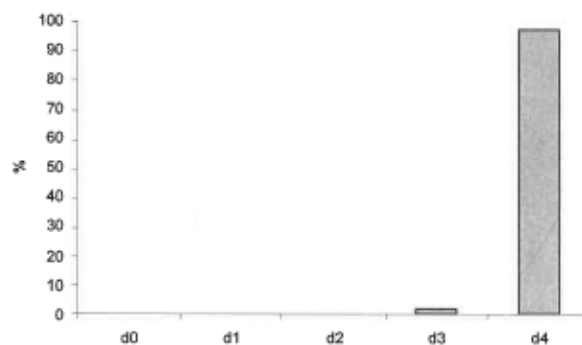


Figure 4 : Abondance relative des différentes combinaisons d'atomes de l'estrone marquée après et avant dansylation

L'estrone-<sup>13</sup>C, plus stable, a été finalement utilisée afin de palier à ce problème.

Lorsque l'abondance de la molécule marquée varie au cours du processus analytique, il faudra vérifier que des réactions ayant un impact sur sa stabilité ou provoquant sa transformation n'aient pas lieu. Il conviendra, par conséquent, de tester les molécules marquées à chaque étape du processus analytique.

- Pureté du composé marqué

Bien que le choix de l'analyste doit se porter préférentiellement sur l'achat d'un étalon marqué de pureté isotopique élevée, la valeur annoncée dans le certificat d'analyse peut parfois ne pas être « vraie ». En effet, la synthèse de molécule marquée à partir de la molécule native peut être mal réalisée, pouvant avoir comme conséquence une présence importante de molécules natives résiduelles. Il est par conséquent important de vérifier la présence de molécules non marquées résiduelles, notamment d'un lot à l'autre. Cette présence peut générer un biais dans la quantification lorsque des lots d'étalons marqués différents sont utilisés dans les échantillons et dans les étalons. Aussi il est recommandé lors d'une même série d'analyses, d'utiliser le même lot d'étalon marqué pour la préparation des étalons et des échantillons ou de corriger les résultats en tenant compte de la proportion de non marqué apporté par le marqué.

Le cas a été notamment rencontré au LNE lors du développement d'une méthode d'analyse de glycérol dans du sérum. La pureté des étalons internes marqués différaient fortement d'un lot à l'autre pour une même référence. Malgré ces différences de pureté, cette référence a finalement dû être utilisée car aucune autre n'était disponible. Mais le protocole mis en œuvre au laboratoire pour ce type d'analyse impose l'utilisation d'un même lot d'étalon marqué pour chaque nouvelle campagne de mesures.

- Compatibilité du composé marqué avec la méthode d'analyse

Il appartient également à l'analyste de s'assurer que la molécule marquée choisie est adaptée à sa méthode d'analyse.

En effet, dans une publication de Leeuwen (Leeuwen, 2009), sur le dosage des plusieurs composés perfluorés dans l'eau, l'étalon interne marqué choisi (le D<sub>3</sub>-N-MeFOSA) pour quantifier le sulfonamide de perfluorooctane (PFOSA) s'est avéré non adapté. En effet, au cours de la préparation des échantillons d'eau, les laboratoires ont constaté une perte de 40% de la quantité initiale d'étalon interne marqué ajouté à l'échantillon au bout de 12h qui était la durée d'équilibration. Cette perte a été attribuée à une faible solubilité du D<sub>3</sub>-N-MeFOSA dans l'eau, qui s'est adsorbé sur les parois du contenant de l'échantillon, rendant la quantification impossible pour ce composé avec cet étalon marqué. Aussi un autre étalon marqué a été sélectionné (<sup>13</sup>C-PFOS).

#### 4.4 AVANTAGES DE LA DI

La mise en œuvre de la dilution isotopique peut être le seul moyen de permettre la quantification fiable de certaines molécules, lorsque le processus analytique

conduit à des pertes éventuelles des analytes, par exemple lors d'étapes d'évaporation/reconcentration, ou lors d'un dépassement du volume de fin de fixation en SPE.

En effet, dans la publication de Capdeville (Capdeville, 2011) portant sur l'analyse de composés organiques en ultra traces dans les eaux de consommation et les eaux souterraines, des pertes d'analytes très volatiles (dont notamment la ciprofloxacine et la ciprofloxacine-<sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N) ont été observées lors des étapes d'évaporation/reconcentration lorsque celles-ci étaient trop longues ou trop brutales (rapide, température élevée, à sec). Ces pertes peuvent être compensées par l'addition des homologues marqués de ces analytes très volatiles car ils ont un comportement similaire.

Le dépassement du volume de fin de fixation lors d'une analyse par extraction sur phase solide (SPE) peut également être source de perte d'analyte. Le cas est également décrit dans cette publication. Lors d'une analyse de résidus de molécules pharmaceutiques par SPE, les rendements d'extraction de certaines molécules natives et marquées ont été étudiés. La Figure 5 montre que les rendements d'extraction de l'aténolol-D<sub>7</sub> et du paracétamol-D<sub>4</sub> diminuent fortement avec l'augmentation du volume d'eau percolée, tandis que ceux du propranolol-D<sub>7</sub> et le diazépam-D<sub>5</sub> restent pratiquement inchangés. Ce phénomène est une conséquence du dépassement du volume maximum qui peut être reconcentré en SPE sans affecter le rendement d'extraction, le volume de fin de fixation en SPE. Ces effets peuvent être compensés par l'addition d'étalons internes correspondants exactement à l'analyte, c'est-à-dire généralement son homologue. Par exemple, le rendement d'extraction de l'aténolol évalué avec l'aténolol-D<sub>7</sub> était toujours proches de 100% quel que soit le volume d'eau percolée, tandis que son rendement diminuait fortement lorsqu'il est évalué par étalonnage externe. C'est le également cas lorsque la quantification d'une molécule se fait avec un étalon marqué autre que son homologue, mais non approprié comme par exemple pour le paracétamol avec le diazépam-d5 et paracétamol avec le paracétamol-D4 (figure 5).

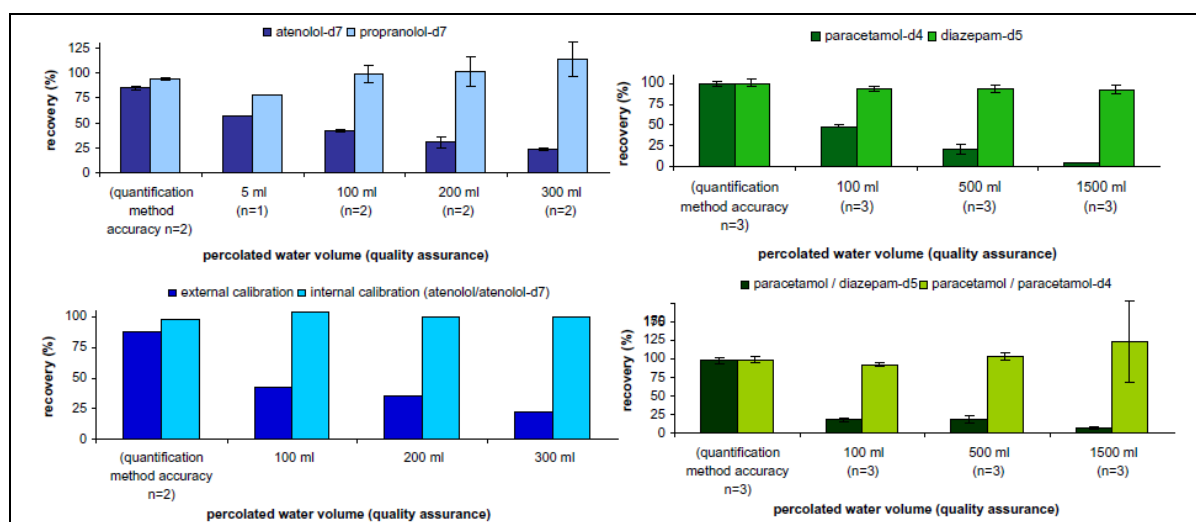


Figure 5 : Impact du volume d'eau percolée sur les rendements d'extraction par SPE :  
-Exemple de l'aténolol/aténolol-D<sub>7</sub> (à gauche) : calcul du rendement par étalonnage externe et par ajout son homologue marqué et

-Exemple du paracétamol (à droite) : calcul du rendement par ajout d'étalon interne marqué inapproprié et par ajout de son homologue marqué

La mise en œuvre de la dilution isotopique est le seul moyen de compenser ces effets. Mais il est toutefois indispensable d'optimiser la méthode afin que ses performances attendues (LOQ, rendement d'extraction suffisant, linéarité) soient atteintes.

Lors du développement de méthode d'analyses multi-résidus, il est parfois difficile d'optimiser au mieux chaque paramètre (rendement d'extraction, LOQ) pour chaque analyte. Des compromis analytiques doivent donc être trouvés et le recours à des molécules marquées pour quantifier de manière fiable certains analytes peut être une solution pour compenser des performances non optimales sur certaines molécules.

## **5. CONCLUSION**

Lors d'analyses multi résidus en spectrométrie de masse, la dilution isotopique reste la meilleure approche pour compenser au mieux tous les effets potentiels liés à l'analyse et à la préparation des échantillons et assurer ainsi une quantification fiable.

Un large choix de molécules marquées au carbone 13 et au deutérium, est disponible dans le commerce couvrant ainsi de nombreuses familles de molécules. Aussi, si un analyste souhaite mettre en œuvre la dilution isotopique ou bien un étalonnage interne en utilisant un composé marqué d'un composé natif ayant un comportement proche avéré pour ses analyses multi-résidus, aux vues du large choix de molécules proposées, il lui sera généralement toujours possible de disposer d'étalons internes adaptés à ses besoins (coût de l'étude) et à ses exigences analytiques (performance de la méthode), moyennant parfois certains compromis.

Ce guide propose quelques recommandations pour choisir l'étalon interne marqué adapté à son étude. Il est préférable de privilégier :

- les molécules marquées au  $^{13}\text{C}$  du fait de leur stabilité par rapport aux molécules marquées au deutérium,
- avec un enrichissement maximal pour augmenter l'abondance de la molécule marquée et minimiser l'abondance de la molécule native (sans marquage),
- un taux de marquage important pour augmenter sa sélectivité (contribution spectrale) et la robustesse en SM.

Lorsqu'il aura fait son choix, l'analyste devra vérifier expérimentalement que celui-ci convient à ses besoins. En effet, certaines molécules marquées peuvent présenter des problèmes de stabilité ou des comportements chimiques différents qui ne peuvent hélas être mis en évidence que lors de leur mise en œuvre.

Mais le choix final revient toujours à l'analyste qui tiendra compte principalement de ses exigences analytiques (performance de la méthode) et de ses besoins (coût de l'étude). La mise en œuvre de la dilution isotopique reste,

quoi qu'il arrive, la meilleure approche pour la quantification des analyses multi-résidus.

Dans le cas où la DI ou l'étalonnage interne utilisant des molécules marquées ne permettent pas de compenser certains effets, des développements de méthode spécifiques ou la mise en œuvre de la méthode des ajouts dosés seront nécessaires.



## Bibliographie

Norme XP T90-214 - Qualité de l'eau - Caractérisation d'une méthode - Critères pour l'évaluation d'une méthode d'analyse pour la détermination de composés organiques multi-classes par spectrométrie de masse- Juin 2018

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.

Norme ISO 17858 - Qualité de l'eau - Dosage des biphényles polychlorés de type dioxine - Méthode par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse- Février 2007

Publication du CNAM sur la dilution isotopique - 1996

Site Web de Cambridge Isotope Laboratories :

[https://www.isotope.com/corporate-overview/newsletters.cfm?nid=The+Standard+%E2%80%93+April+2011&aid=Understanding+Isotopic+Enrichment#.XErdX-8W\\_Ok.email](https://www.isotope.com/corporate-overview/newsletters.cfm?nid=The+Standard+%E2%80%93+April+2011&aid=Understanding+Isotopic+Enrichment#.XErdX-8W_Ok.email)

Zoe Hall- Improving the measurement of clinical environmental toxins- Method development and validation for determination of low level estrogens in synthetic effluent by exact matching isotope dilution mass spectrometry - LGC- January 2009

S.P.J. van Leeuwen, C.P. Swart, I. van der Veen, J. de Boer - Significant improvements in the analysis of perfluorinated compounds in water and fish: Results from an interlaboratory method evaluation study -J. Chromatogr. A 1216 (2009) 401-409

M.J. Capdeville, H. Budzinski - Trace-level analysis of organic contaminants in drinking waters and groundwaters- Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 4, 2011