



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Licence Chimie et Chimie Physique

UE Chimie Analytique

Spectrométrie de masse

SM

Enseignant : Y. FRANCOIS

Yannis FRANCOIS

Laboratoire de Spectrométrie de Masse des
Interactions et des Systèmes
Institut Lebel, 7^{ème} étage

e-mail: yfrancois@unistra.fr

Site internet: complex-matter.unistra.fr

Spectrométrie de masse:

1. Présentation générale

2. Instrumentation et principe de la mesure

- 2.1. les sources d'ions
- 2.2. les analyseurs
- 2.3. les détecteurs
- 2.4. Principe de la fragmentation

3. Le couplage LC – GC/MS

4. Applications

Le saviez-vous ?

La spectrométrie de masse est utilisée pour :

- Localiser un gisement en analysant les hydrocarbures dans les roches
- Détecter et identifier l'usage de stéroïdes chez les athlètes
- Etudier la composition de molécules trouvées dans l'espace
- Détecter la présence de dioxines dans des aliments contaminés
- Etudier des mutations génétiques
- Découvrir de nouveaux marqueurs pathologiques
- Analyser et dater des pièces archéologiques
- Suivre les processus de fermentation ...

Brève historique:

- 1897: J. Thomson découvre l'électron et détermine son rapport m/z (Prix Nobel de physique)
- 1912: Construction du 1^{er} spectromètre de masse

3 grandes périodes:

- 1912-1960: Analyse élémentaire et augmentation du pouvoir de résolution
- 1960-1980: Analyse de composés organiques, augmentation de la gamme de masse, intérêt de la mesure de la masse exacte pour la détermination de la formule brute des ions.
- 1980-: Analyse de macromolécules biologiques

Brève historique:

Aujourd'hui:

- Miniaturisation des spectromètres de masse (chars d'assaut, stations spatiales, salles d'opération,...)
- Vers des systèmes toujours plus résolutifs et donc précis en mesure de masse moléculaire

Qu'est-ce que la spectrométrie de masse ?

- Méthode analytique permettant de "peser" les molécules avec une très grande précision.
- On détermine sa **masse moléculaire**

Exemple d'application :

- ☒ Rechercher le signal d'un composé donné dans un mélange complexe (CO ds l'atmosphère de Titan ou un dopant ds les urines)
- ☒ Obtenir une 1ere donnée sur une molécule inconnue (molécule extraite d'une plante médicinale)

Principe de la spectrométrie de masse ?

- Méthode analytique permettant de mesurer la masse des molécules par rapports à leur nombre de charge
- Rapport masse sur charge :

$$\frac{m}{z}$$

Comment peser une molécule ?

- Travailler en **phase gazeuse** où les molécules sont isolées
- Travailler avec des molécules chargées
- Utiliser les propriétés reliant :

Énergie / Trajectoire / Masse

↳ Travailler dans des champs électriques ou magnétiques

Un spectromètre de masse mesure la masse de molécules isolées

Trois étapes :

1- Volatiliser

- Séparer les molécules les unes des autres
- Passer de l'état de matière condensée à un état gazeux

2- Ioniser

- Transformer les molécules en ions
- Utilisation d'un champs électriques

3- Analyser

- Calculer masse moléculaire à partir du rapport :

$$m / z = \text{masse} / \text{nb de charges}$$

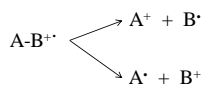
Ionisation et fragmentation

Ionisation :

1. Par protonation: $A-BH^+$
2. Par déprotonation : $A-B^-$
3. Par perte d'électron: $A-B^{+\bullet}$
4. Par cationisation: $A-B-Na^+$

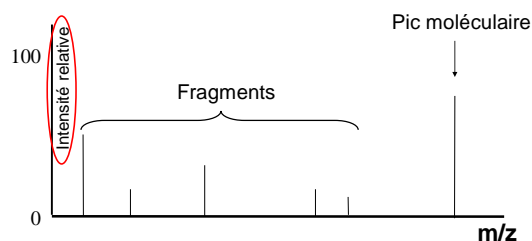
Fragmentation :

- Lorsque les ions possèdent un trop plein d'énergie interne



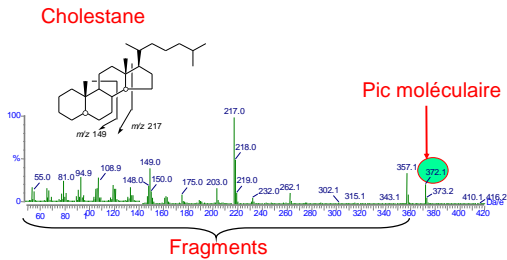
Quelles informations peut apporter la spectrométrie de masse ?

- 1- La **masse moléculaire** d'un composé
- 2- La masse de certains « morceaux » de ce composé appelés **fragments**
- 3- Une mesure de la **quantité**



Exemple du cholestane

- 1- La valeur m/z du pic moléculaire permet de calculer la **masse moléculaire**
- 2- Les pics de fragmentation permettent de reconstituer une partie de la **structure**
- 3- L'intensité des pics permet de faire de l'**analyse quantitative**



Exemple: spectre en ionisation par impact électronique du cholestane.

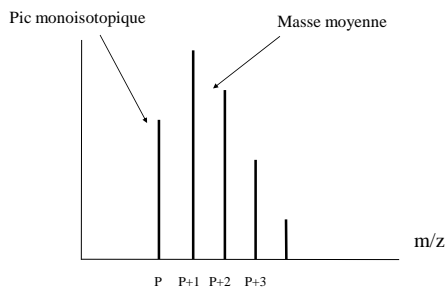
Comment calculer la masse moléculaire ?



Influence des isotopes

	M	M+1	M+2	
^{12}C	98,9%	^{13}C 1,1%		I isotope majoritaire
^{14}N	99,64%	^{15}N 0,36%		
^{16}O	99,8%	^{17}O ε	^{18}O 0,2%	
^{35}Cl	75,8%		^{37}Cl 24,2%	Distribution étendue
^{79}Br	49,8%		^{81}Br 50,2%	

Le profil isotopique



Quelle masse mesure-t-on ?

Masse monoisotopique

c'est la masse « exacte » du premier pic du profil isotopique c'est-à-dire celle qui ne prend en compte que les masses des isotopes les plus stables (C^{12} , H^1 , O^{16} , S^{32} , N^{14} , ...).

Masse chimique ou moyenne

c'est le barycentre des masses des pics constituant le profil isotopique c'est-à-dire la masse qui prend en compte la masse des éléments donnée par le tableau périodique ($\text{C}=12,011$).

La masse s'exprime en Dalton (Da)

Elle dépend de la résolution du spectromètre de masse

m en Dalton (Da) ou unité de masse atomique

$$1 \text{ Da} = 1/12 \cdot 12 \cdot 10^{-3} \text{ kgmole}^{-1} / N \quad (N = 6,022045 \cdot 10^{23})$$

Et donc:

$$1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$$

C^{12}	=	12,000000000	O^{16}	=	15,9949146
C^{13}	=	13,003354839	S^{32}	=	31,9720718
H^1	=	1,0078250	N^{14}	=	14,0030740
H^2	=	2,0141018	C^{35}	=	34,968852729

Le rapport m/z s'exprime en Thomson (Th)

Quelle masse mesure-t-on ?

Influence des isotopes

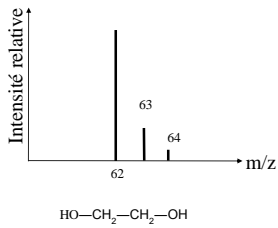
Exemple:

- masse moyenne du brome Br : 79.904 Da
2 isotopes de masse « exacte » : 78.918336 et 80.916289

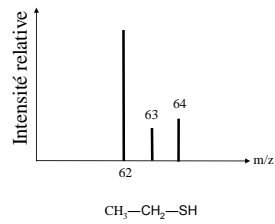
- Insuline : $\text{C}_{257}\text{H}_{383}\text{N}_{65}\text{O}_{77}\text{S}_6$

5801 (masse entière : 12 pour C; 14 pour N; 16 pour O;...)
5803.6375 (masse monoisotopique)
5807.6559 (masse moyenne)

Pourquoi chercher à obtenir un profil isotopique?



$m/z = 64 : 2 \text{ C}^{13} \text{ ou } 1 \text{ O}^{18} (0.2\%)$



$m/z = 64 : 2 \text{ C}^{13} \text{ ou } 1 \text{ S}^{34} (4.2\%)$

Pourquoi mesurer une masse isotopique ET/OU une masse moyenne ?

C'est une question de précision de mesure !!!!

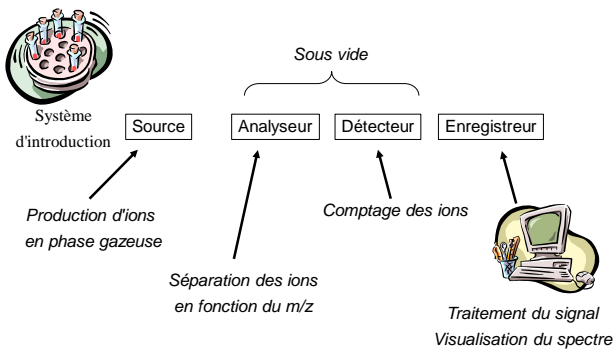
➤ On n'a pas toujours un signal sur l'ensemble des isotopes et donc le barycentre n'est pas complet

↳ mesure fautive

➤ L'instrument n'est pas assez résolutif

↳ Le composé est trop lourd pour détecter le 1^{er} isotope

Le spectromètre de masse



Spectrométrie de masse:

1. Présentation générale

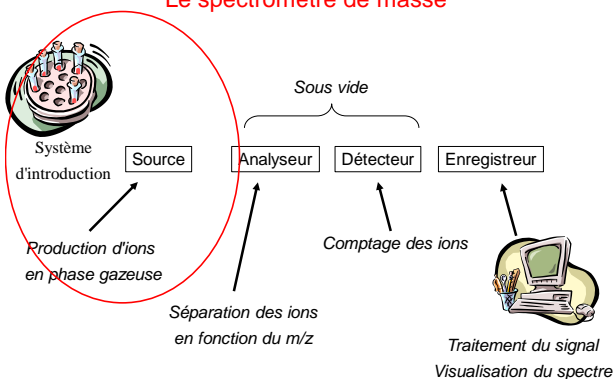
2. Instrumentation et principe de la mesure

- 2.1. les sources d'ions
- 2.2. les analyseurs
- 2.3. les détecteurs
- 2.4. Principe de la fragmentation

3. Le couplage LC – GC/MS

4. Applications

Le spectromètre de masse



La source d'ions : son rôle est de volatiliser et d'ioniser

Il existe de nombreux types de sources d'ions et chacun de ces types de sources repose sur un principe physique différent.

Le principe physique qui permet de volatiliser et d'ioniser un type de composé est choisi par l'opérateur en fonction des caractéristiques de la molécule à analyser. Les étapes de volatilisation et d'ionisation se font successivement ou simultanément selon le type de source.

Les critères de choix principaux sont:

- la volatilité et la stabilité thermique du composé à analyser
- les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation
- la taille des molécules
- les quantités de produit disponibles
- le type d'introduction souhaitée (directe ou en couplage chromatographique)

Différentes méthodes d'ionisation

➤ Ionisation d'une molécule neutre par éjection ou capture d'un électron

A-B^{•+}

➤ Ionisation par protonation ou déprotonation

A-BH⁺ ou A-B⁻

➤ Ionisation par formation d'adduits (réaction ion-molécule)

A-B-Na⁺

Les sources d'ions se classent en sources « dures » et en sources « douces »

• De très nombreuses méthodes d'ionisation ont été inventées pour ioniser et volatiliser des molécules de plus en plus fragiles, grandes et polaires.

• Les « ionisations dures » génèrent souvent des ions moléculaires, à nombre impair d'électrons, qui se fragmentent beaucoup et parfois même totalement avant d'avoir eu le temps de sortir de la source. Leurs fragments peuvent être analysés et donnent des informations de structures.

• Les « ionisations douces » génèrent des ions moléculaires à nombre pair d'électrons, qui sont relativement stables et qui ont des durées de vie suffisantes pour traverser l'analyseur, arriver jusqu'au détecteur, et donc être mesurés.

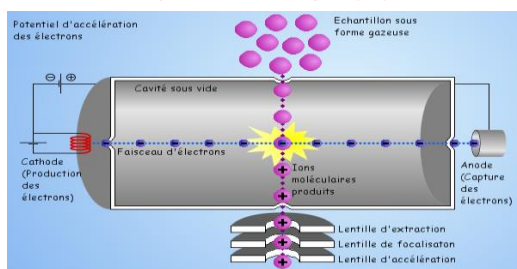
Sources d'ionisation

Ionisation EI (Electronical Impact)	dure
Ionisation CI (Chemical Ionisation)	assez douce
Ionisation FAB (Fast Atom Bombardment)	} assez douce
Ionisation LD (Laser Desorption)	
Ionisation ES (electrospray)	} douce
Ionisation APPI, APCI	
Ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)	

Sources d'ionisation

Ionisation EI (Electronical Impact)	} Petites molécules volatiles et non thermosensibles
Ionisation CI (Chemical Ionisation)	
Ionisation FAB (Fast Atom Bombardment)	} molécules < 6000 Da
Ionisation LD (Laser Desorption)	
Ionisation ES (electrospray)	} Couplage LC-ES sur petites molécules non volatiles
Ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)	
	} Biomolécules (1 300 kDa) et complexes non-covalents

L'impact électronique (EI)



- un filament porté à haute T°C par passage d'un courant émet des e⁻ qui peuvent être accélérés par une certaine ΔV.

- E_{cin} des e⁻ influe sur le rendement d'ionisation et sur l'énergie d'excitation des ions formés

rendement optimal : faisceau d'e⁻ accéléré à 70eV

L'impact électronique (EI)

L'énergie des ions ionisants (70 eV) correspond à un compromis:

- E<70 eV, peu de molécules ionisées et les molécules ayant moins d'énergie interne se fragmentent peu: peu de sensibilité et peu d'informations structurales

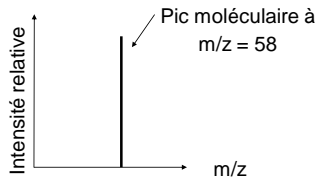
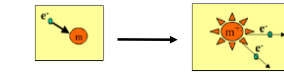
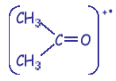
-E>70 eV: le courant ionique atteint un seuil et beaucoup de fragmentations secondaires difficiles à interpréter

Malgré cela, dans les conditions classiques:

-faisceau d'e⁻ accéléré à 70eV → 1 ion sur 1000 molécules entrantes

L'impact électronique (EI)

Exemple de l'acétone



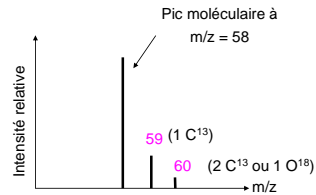
La notation $M^{+\bullet}$ signifie qu'il s'agit de la molécule entière après perte d'un électron. Elle est chargée positivement et comporte un électron libre non apparié.

Il s'agit de l'ion moléculaire

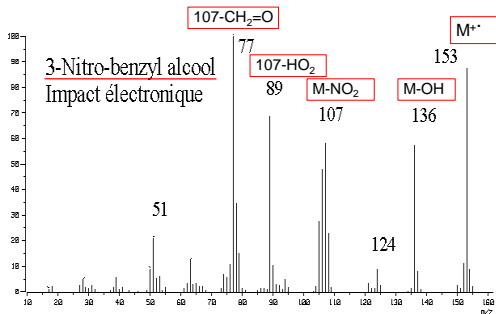
On peut avoir sur le spectre des pics ayant une masse supérieure à celle de l'ion moléculaire

lié à la présence des isotopes

Ainsi pour l'acétone:



Exemple spectre EI:



La source par ionisation chimique (CI)

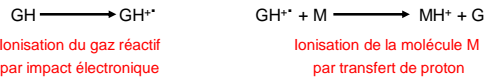
Complémentaire de l'impact électronique car produit des ions avec un faible excès d'énergie

→ peu de fragmentation

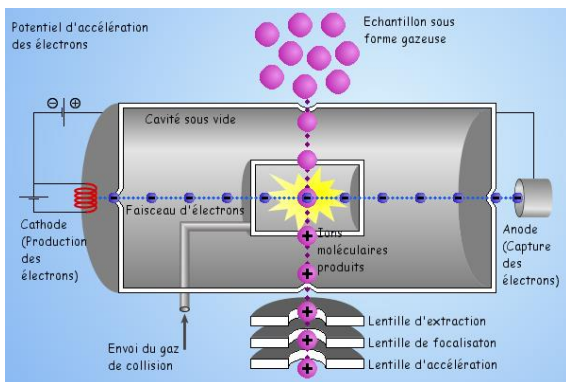
l'ion moléculaire est facilement reconnaissable !

l'ionisation se fait par collision entre les molécules gazeuses de l'échantillon et des ions primaires d'un gaz réactif présent dans la source:

l'ionisation se fait donc par collisions ion - molécule



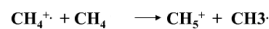
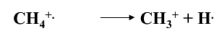
La source par ionisation chimique (CI)



La source par ionisation chimique (CI)

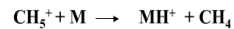
1. Le gaz réactif: exemple du méthane

1. Formation des espèces ionisantes par EI

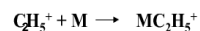


2. Collision entre les espèces ionisantes et la molécule à analyser

L'entité majoritaire du plasma gazeux est CH_5^+ est un acide très fort (électrophile), capable de protoner la plupart des molécules organiques



L'ion MH^+ est un ion

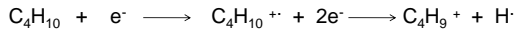


($M+1$) de faible énergie interne qui se fragmente peu

La source par ionisation chimique (CI)

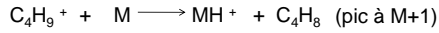
1. Le gaz réactif: exemple de l'isobutane

1. Formation des espèces ionisantes par EI

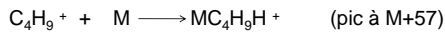


2. Collision entre les espèces ionisantes et la molécule à analyser

L'entité réactive est l'ion tertibutyl C_4H_9^+

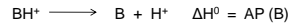


Mais on observe aussi:

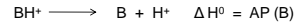


Il faut choisir le gaz réactif en fonction de la molécule à analyser

L'affinité protonique d'un produit B est définie comme l'enthalpie de la réaction:



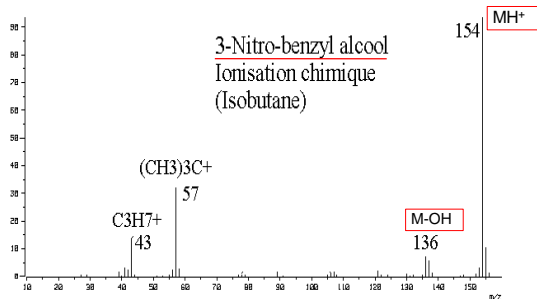
L'ionisation chimique d'une molécule M peut être considérée comme la somme:



La réaction a lieu si elle est exothermique cad si $\text{AP}(\text{M}) > \text{AP}(\text{B})$

Réactif B	CH_4	H_2O	NH_3	n- C_4H_{10}
Ion BH^+	CH_5^+	H_3O^+	NH_4^+	$\text{C}_4\text{H}_{11}^+$
AP(B) kJ/mol	540	742	858	723

Exemple spectre CI:



La source par bombardement d'atomes rapides (FAB: Fast Atom Bombardment)

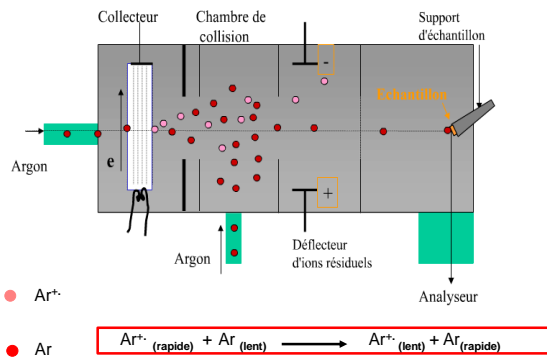
> Permet l'analyse des molécules non vaporisables sous vide

> Ionisation faite par **expulsion en phase vapeur des ions** contenus dans un échantillon liquide suite à un bombardement d'atomes rapides (Ar):

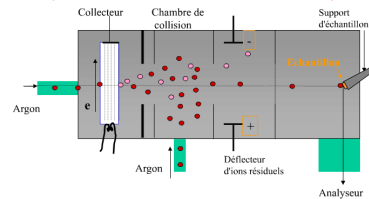
→ peu de fragmentation

Ion moléculaire est facilement reconnaissable !

La source par bombardement d'atomes rapides (FAB: Fast Atom Bombardment)



La source par bombardement d'atomes rapides (FAB: Fast Atom Bombardment)



Echantillon: en solution, mélangé à une « matrice » liquide non volatile (glycérol, thioglycérine, alcool m-nitrobenzylique)

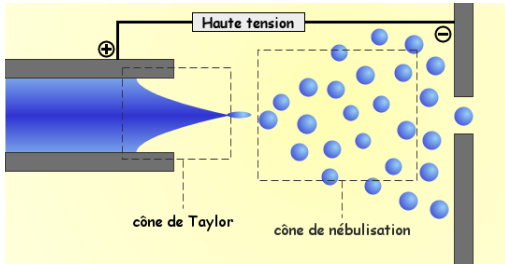
Faisceau d'atomes neutres à 5 keV

Expulsion en phase gazeuse des ions préexistants en solution

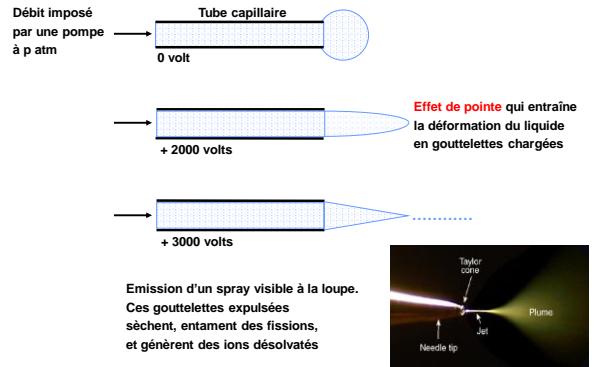
Accélération des ions ainsi générés vers l'analyseur

L'ionisation par électronébulisation (Electrospray)

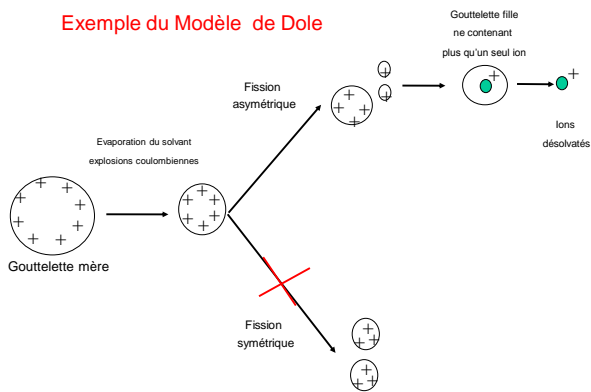
basée sur la formation à pression atmosphérique de molécules chargées issue d'un spray créé dans un champ électrique



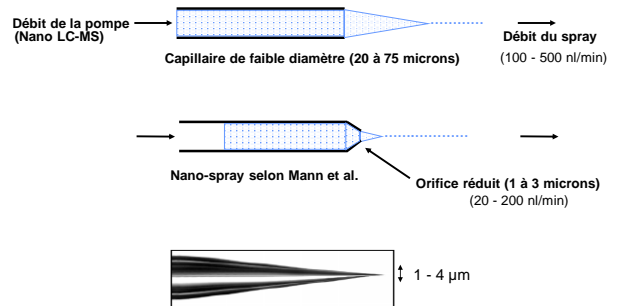
L'ionisation électrospray : principe de la production du spray



Exemple du Modèle de Dole

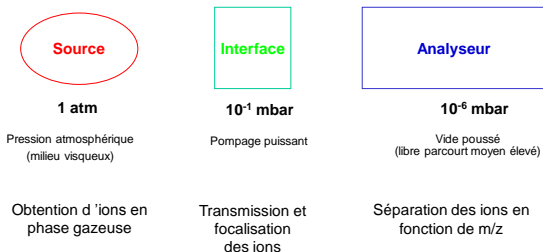


L'ionisation électrospray convient aussi aux débits faibles

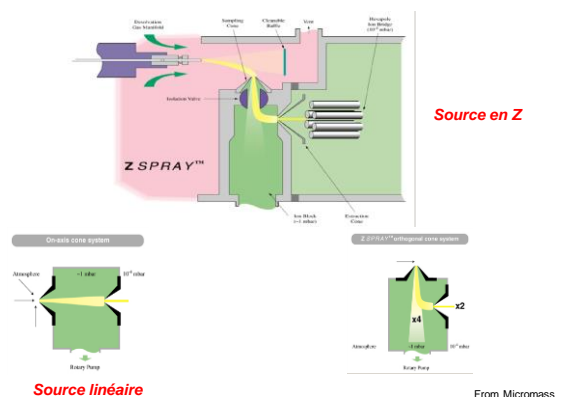


L'ionisation par électronébulisation (electrospray) se fait à pression atmosphérique.

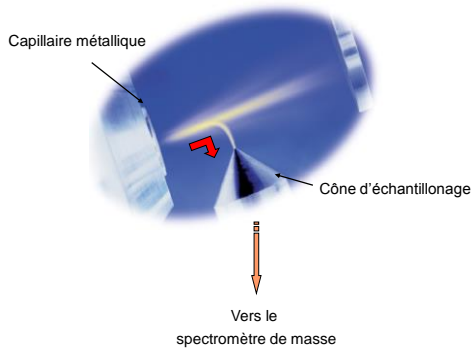
Pour faire passer les ions formés à pression atmosphérique dans l'enceinte sous vide de l'analyseur du spectromètre de masse, il faut un dispositif appelé **INTERFACE**



Interface entre la source ESI et l'analyseur



Extraction des ions dans une source Z-spray



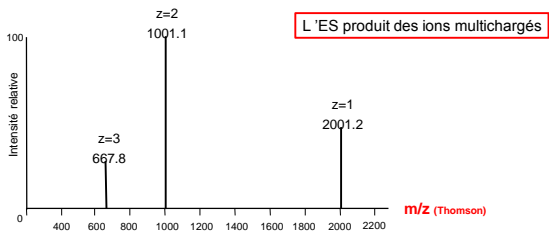
Avantage de l'électrospray

- Fonctionne à basse T°C, à pression atmosphérique,
 - ↳ pas de dégradation, pas de fragmentation
- Génère de ions multichargés
- Mesure précise de la masse moléculaire (0.1%) soit ± 1 Da sur $M = 10000$ Da
- Extraction des ions de large masse moléculaire (polymère, biomolécule)
- Sensible (C ~ μ M)
- Extraction des molécules polaires

Inconvénient de l'électrospray

- Peu d'information structurale, sauf si on effectue de la MS/MS
- Très sensible à la présence de sels ou additifs
 - ↳ suppression du signal
 - ↳ dessalage impératif

Interprétation d'un spectre electropray



Etat de charge	m/z	masse calculée
1	$2001.2 = (M + m_H) / 1$	2000.2 Da
2	$1001.1 = (M + 2m_H) / 2$	2000.2 Da
3	$667.8 = (M + 3m_H) / 3$	2000.4 Da

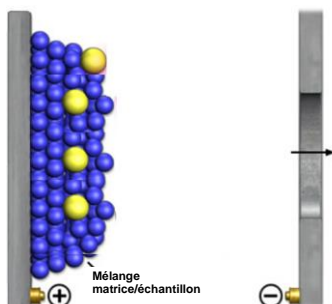
↳ Masse de notre composé : 2000,2 Da

L'ionisation laser assistée par matrice Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)

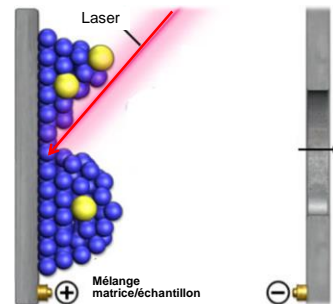
- Le MALDI est basé sur l'utilisation d'un composé (la matrice) qui absorbe à 337 nanomètres
- L'énergie va être transféré à l'échantillon par la matrice
- L'échantillon ionisé va être transféré dans l'analyseur

Génère des ions à une seule charge

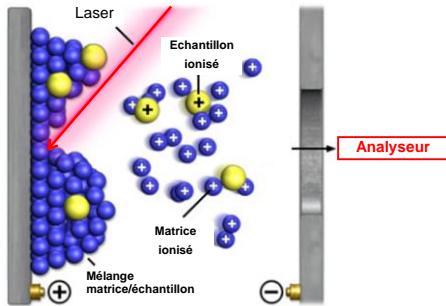
Principe MALDI-MS



Principe MALDI-MS



Principe MALDI-MS

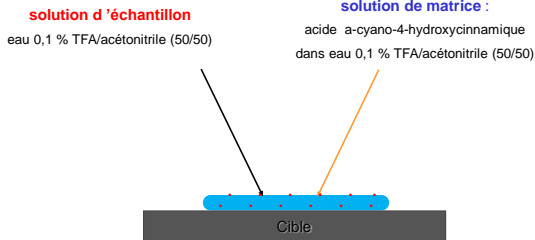


La cible MALDI



Dépôt d'un échantillon (1 µl)

Préparation de l'échantillon en MALDI-MS



- > L'analyte est dilué environ 10 000 fois dans cette matrice
- > Evaporation lente et totale des solvants
- > Formation de gros cristaux de matrice
- > Pas de couplage avec la chromatographie possible

Caractéristiques de la matrice:

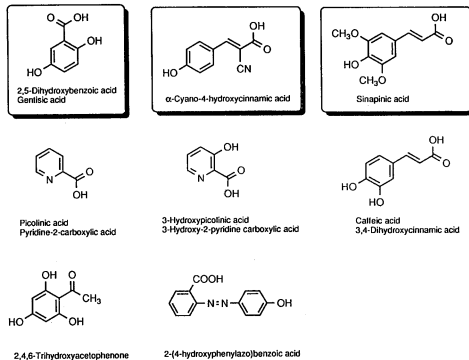
1. De faible masse moléculaire (faciliter la vaporisation)
2. Acide (agissant comme source de protons)
3. Forte absorption dans l'UV (absorbe l'irradiation laser)
4. Fonctionnalisée avec des groupes polaires (travail en solution aqueuse)

Rôle :

- > Protéger l'analyte de la destruction par un faisceau laser direct
- > Faciliter sa vaporisation et son ionisation.

Matrices couramment utilisées en MALDI-MS

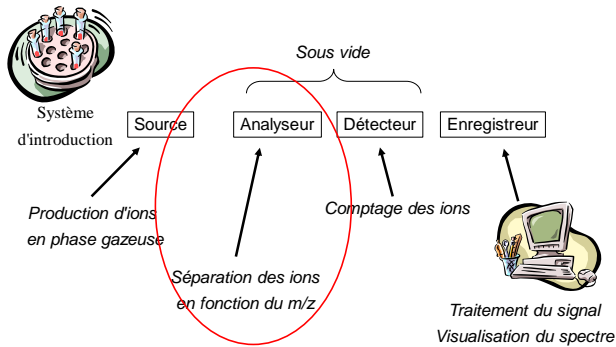
Elles absorbent à 337 nm et cristallisent facilement



Spectrométrie de masse:

1. Présentation générale
2. Instrumentation et principe de la mesure
 - 2.1. les sources d'ions
 - 2.2. les analyseurs
 - 2.3. les détecteurs
 - 2.4. Principe de la fragmentation
3. Le couplage LC – GC/MS
4. Applications

Le spectromètre de masse



L'analyseur : pour mesurer m/z

Il existe différents types d'analyseurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais tous les analyseurs mesurent des valeurs m/z. C'est une partie de l'appareil sous vide ($10^{-5} - 10^{-7}$ Torr)

- BE: Déflexion par un champ magnétique (c'est l'analyseur le plus ancien)
- Q: Déflexion par un champ quadrupolaire
- IT: Confinement dans un piège à ion (Ion Trap)
- TOF: Mesure d'un temps de vol (Time Of Flight)
- FT-ICR: Résonance Cyclotronique d'Ions à Transformée de Fourier

Les ions formés dans la source sont dirigés (extraction et focalisation) vers l'analyseur par des champs électrostatiques qui peuvent être de quelques volts (Q, IT, FT-ICR) ou de plusieurs dizaines de kilovolts (TOF, B).

Notion de libre parcours moyen

Le spectromètre de masse doit être sous un vide poussé car il faut limiter les collisions entre les ions à analyser et les molécules de gaz résiduelles:

- déviation de l'ion de sa trajectoire
- réactions non désirées (fragmentation de l'ion)

Libre parcours moyen: distance minimale entre 2 chocs à une pression donnée

D'après la théorie cinétique des gaz:

$$L = kT / \sqrt{2}p\sigma$$

L : libre parcours moyen (en m)
 k: constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K)
 T: température (300 K)
 p: pression (en Pa)
 σ : section de collision ($45 \cdot 10^{-20}$ m²)

$$L = 0,66 / p$$

Les unités de mesures des pressions sont nombreuses.

L'unité officielle est le pascal (Pa): 1 pascal = 1 N/m²

On utilise également:

L'atmosphère	1 atm = 101 325 Pa (soit 1 013,25 hecto Pa) et 1 atm = 1,013 bar
Le bar	1 bar = 10 ⁵ Pa
Le millibar	1 millibar = 10 ⁻³ bar = 10 ² Pa
Le Torr	1 Torr = 1 mm Hg
Le Psi	1 Psi = 1 pound / square inch = 0,07 atm et 14 PSI = 1 atm

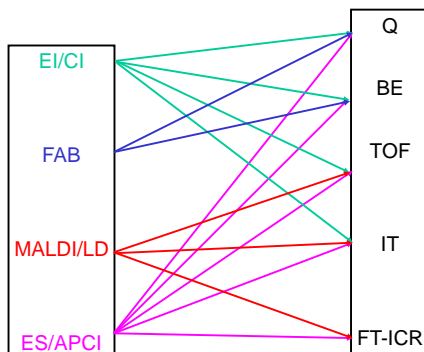
Pour la plupart des spectromètres de masse, le vide est indiqué en millibar.

Les valeurs du vide dans l'analyseur sont en général:

- 10⁻⁶ mbar : pour un analyseur trappe ionique (orbite circulaire)
- 10⁻⁶ mbar : pour un analyseur quadrupolaire (1 mètre de long).
- 10⁻⁷ mbar : pour un analyseur magnétique (2 à 3 mètres de long).
- 10⁻⁷ mbar : pour un analyseur à temps de vol (2 à 3 mètres de long).
- 10⁻⁹ mbar : pour un analyseur ICR (orbite circulaire).

Spectromètres de masse commerciaux:

De nombreux accouplements source / analyseur sont possibles



Les caractéristiques principales d'un analyseur sont :

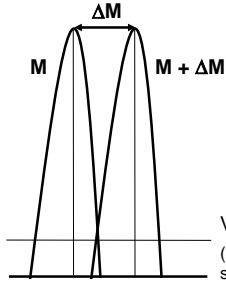
- La résolution R
- La gamme m/z qu'il peut analyser
- La rapidité de balayage en m/z
- La sensibilité
- La vitesse avec laquelle les ions le traversent

Souvent, avec un même analyseur, on peut augmenter l'une de ces caractéristiques aux dépens des autres, mais seulement dans certaines limites.

Chaque type d'analyseur a son "point fort"

Résolution R

R mesure l'aptitude d'un analyseur à distinguer des ions séparés par ΔM Dalton (l'ion M de l'ion $M+\Delta M$)



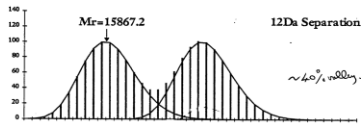
$$R = M/\Delta M$$

Résolution R

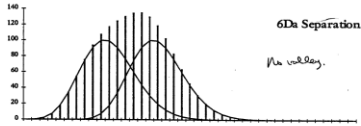
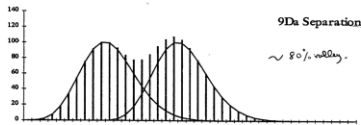
Postulat :

- Pour analyseur FTICR
 - ↳ Pics résolus pour vallée < 10%
- Pour analyseurs TOF, Q et IT
 - ↳ Pics résolus pour vallée < 50%

Le pouvoir résolusif (TOF)



Détection de 2 produits
Bonne précision de la mesure de masse



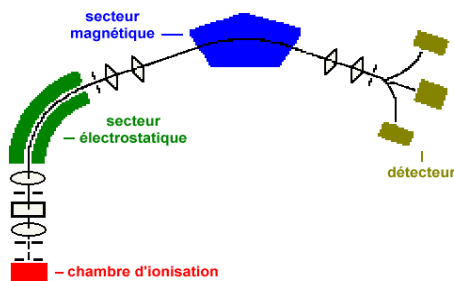
Perte de l'info: 2 produits
Mesure de masse erronée

Caractéristiques des analyseurs

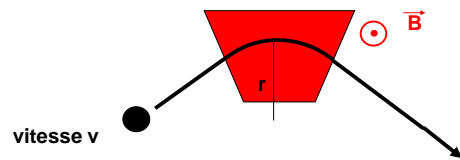
Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadrupôle (Q)	2 000	8 000
Magnétique (EB)	20 000	20 000
Temps de vol (TOF)	20 000	500 000
Trappe ionique	5 000	6 000
Cyclotron à résonance des ions (FT-ICR)	1 000 000	4 000

Principe de l'analyseur électrostatique/magnétique

Il est équipé des deux secteurs: un magnétique et un électrostatique. Le secteur magnétique et le secteur électrostatique ont un rayon r fixe (tube de vol). Les ions doivent suivre une trajectoire circulaire pour ne pas être détruits.



Principe de l'analyseur électrostatique/magnétique



$$r = \frac{\sqrt{2mEc}}{zeB}$$

$$Ec = ze\Delta V$$

Energie conférée par l'accélération en sortie de source

Principe de l'analyseur magnétique

La trajectoire d'un ion suivra exactement la forme circulaire (de rayon r) du tube de vol si:

- la force centrifuge (mv^2/r ou mv^2/r)
 - la force de déflexion magnétique ($Bzev$)
- se compensent exactement.

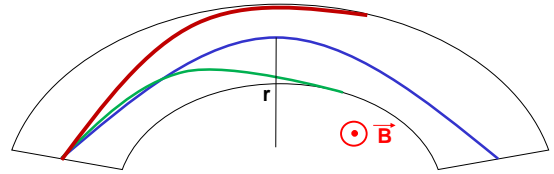
Or $E_c = \frac{1}{2} mv^2 = zeV$

Donc, s'il y a équilibre des forces $mv^2/r = Bzev$

D'où $m/z = B^2 r^2 e / 2V$

On voit qu'un ion ayant un m/z donné pourra passer la déflexion magnétique sans être détruit pour une certaine valeur de B (que l'on fait varier lors de la prise du spectre).
 r , e et V sont des constantes.

L'analyseur magnétique



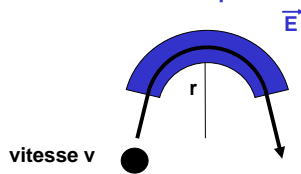
$m/z < B^2 r^2 e / 2V$

$m/z > B^2 r^2 e / 2V$

$m/z = B^2 r^2 e / 2V$

L'analyseur électrostatique

Secteur électrostatique avec rayon r fixe



$$r = \frac{2E_c}{zeE} \quad E_c = ze\Delta V$$

Il est utilisé pour améliorer la résolution des spectromètres à analyseur magnétique en fournissant un faisceau homocinétique

Principe de l'analyseur électrostatique

La trajectoire d'un ion suivra exactement la forme circulaire (de rayon r) du tube de vol si:

- la force centrifuge (mv^2/r ou mv^2/r)
 - la force de déflexion électrostatique (zeE)
- se compensent exactement.

Or $E_c = \frac{1}{2} mv^2 = zeV$

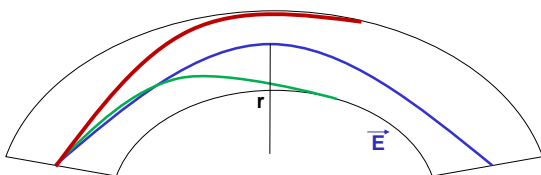
Donc, s'il y a équilibre des forces $mv^2/r = zeE$

D'où $mv^2 = zeEr$ et mv^2 doit être constant

On voit qu'un ion ayant une énergie cinétique donnée pourra passer la déflexion électrostatique sans être détruit

le secteur électrostatique est un filtre en énergie cinétique.

L'analyseur magnétique



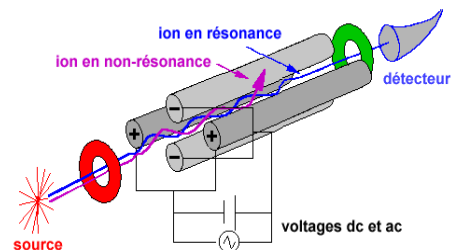
$mv^2 < zeEr$

$mv^2 > zeEr$

$mv^2 = zeEr$

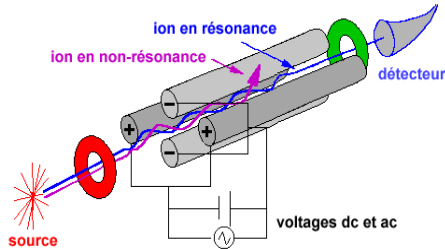
L'analyseur quadripolaire

Formé de quatre barres de métal parallèles entre lesquelles les ions sont injectés avec une énergie cinétique de quelques électron volts.



L'analyseur quadripolaire

Les ions oscillent entre les barres (slalom) grâce à des tensions électriques oscillantes appliquées sur les barres.



Les ions d'une seule valeur m/z arrivent à traverser le système sans heurter les barres

L'analyseur quadripolaire:

Les fonctions qui représentent les tensions appliquées sur les barres permettent de calculer les équations de mouvement des ions

$$+(U-V\cos \omega t) \text{ et } -(U-V\cos \omega t)$$

Équations de mouvement

Diagramme de stabilité :
Trajectoires stables
Trajectoires instables

L'analyseur quadripolaire:

Existence d'un diagramme de stabilité

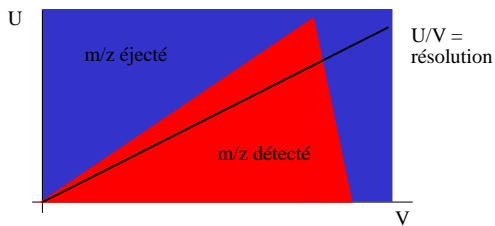
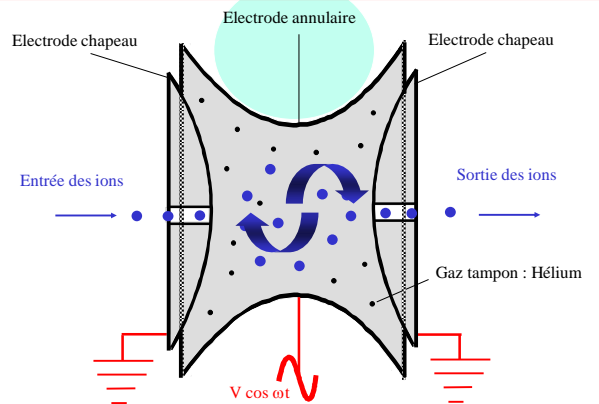


Diagramme de stabilité → Trajectoires stables ou Trajectoires instables

Détermination de la masse du composé en fonction de U et V

La trappe ionique



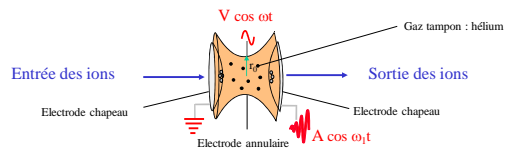
La trappe ionique

Equations du mouvement des ions identiques à celles pour le quadripole

Les quatre barres parallèles du filtre quadripolaires sont remplacées par un "anneau torique" dont l'intérieur est hyperbolique.

Les fonctions qui représentent les tensions appliquées sur l'anneau permettent de calculer les équations de mouvement des ions.

Trajectoire des ions



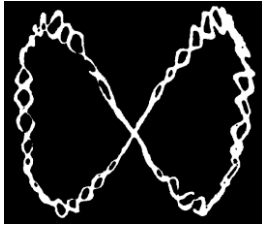
Potentiel dans la trappe : $\Phi_{E,z}$

Champ électrique dans la trappe : $E_{r,z}$

Mouvement des ions dans la trappe : Equations de Mathieu

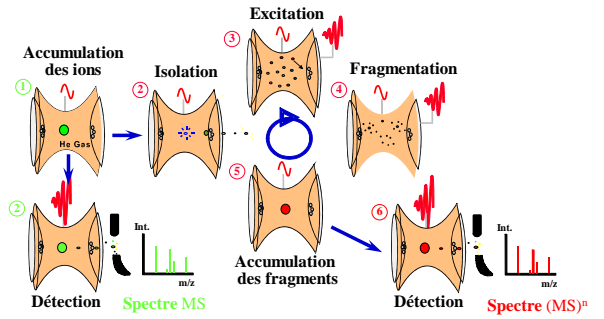
Trajectoire des ions dans la trappe : Diagramme de stabilité

Trajectoire des ions



Courbe de Lissajous

Analyse MS et (MS)ⁿ dans une trappe ionique

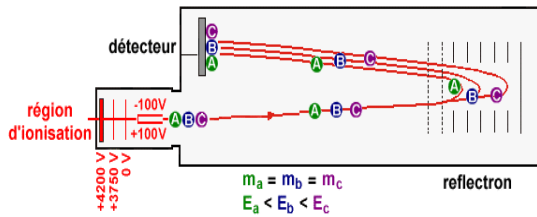


L'analyseur à temps de vol (TOF)

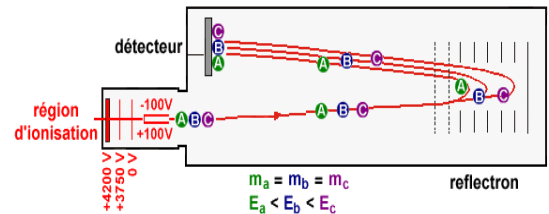
Séparation des ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans une zone libre de champs (tube de vol)

Deux types de mode d'utilisation :

Mode linéaire et mode réflectron



L'analyseur à temps de vol (TOF)

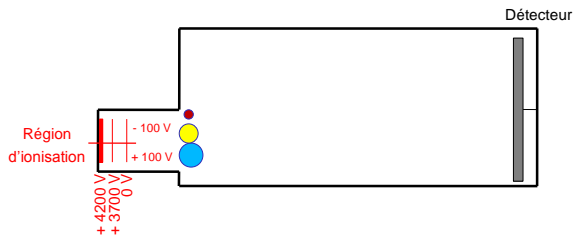


Les ions arrivent avec leur E_c ($mv^2/2$) dans une zone libre de champs

- > Les plus légers sont plus rapides → 1^{er} détectés
- > Les plus lourds sont plus lents → derniers détectés

L'analyseur à temps de vol (TOF)

Mode linéaire

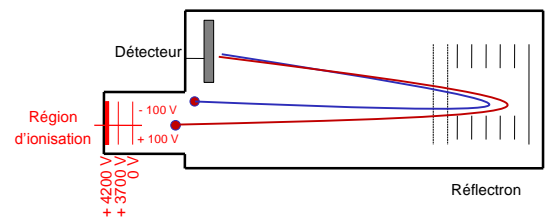


> Calcul du rapport m/z en fonction du temps que met l'ion à parcourir le tube de vol

- > Vitesse d'analyse extrêmement rapide
- > Limite de masse > 1 000 000, mais résolution 5000
- > Inconvénient : Effet dispersif de l' E_c , baisse de la résolution

L'analyseur à temps de vol (TOF)

Mode réflectron



> Correction de l'effet dispersif de l' E_c (mode linéaire)

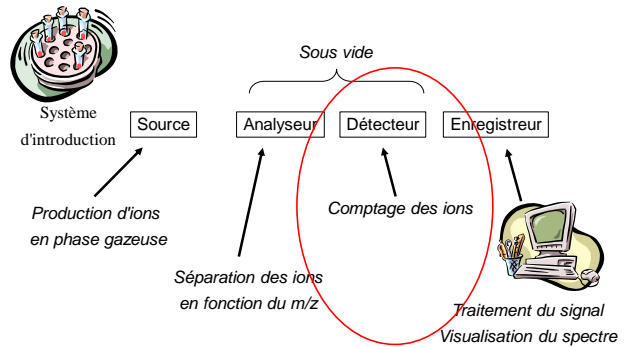
↳ Focalisation temporelle au niveau du détecteur

- > Vitesse d'analyse extrêmement rapide
- > Limite de masse : 10 000, avec résolution 20 000

Spectrométrie de masse:

1. Présentation générale
2. Instrumentation et principe de la mesure
 - 2.1. les sources d'ions
 - 2.2. les analyseurs
 - 2.3. les détecteurs
 - 2.4. Principe de la fragmentation
3. Le couplage LC – GC/MS
4. Applications

Le spectromètre de masse



Le détecteur : pour compter les ions

Comme les analyseurs et les sources, il existe différents types de détecteurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais leur rôle reste le même, compter les ions.
C'est une partie de l'appareil sous vide ($10^{-5} - 10^{-7}$ Torr)

- Plaques photographiques
- Cylindre de Faraday
- Multiplicateur d'électrons
- Mutiplicateur de photons

Le détecteur : pour compter les ions

Plaques photographiques (détecteur historique) :

Principe : le noircissement de la plaque donne une valeur relative de l'intensité du flux (quantité d'ion)

Inconvénient : très peu sensible

Cylindre de Faraday :

Principe : transfert de charge de l'ion détecté sur une surface conductrice, puis amplification du signal

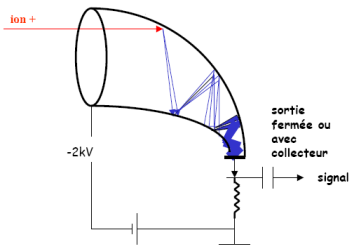
Avantage : précis

Inconvénient : peu sensible, gros bruit de fond, lent dans la mesure

Le détecteur : pour compter les ions

Multiplicateur d'électron (détecteur le plus courant) :

Principe : dopage du signal par la formation d'électron secondaire à l'aide de tubes en verres dopés au plomb (dynode)



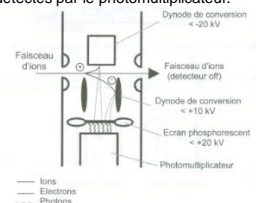
Avantage : bonne sensibilité et balayage rapide

Inconvénient : moins précis que le cylindre de Faraday, durée de vie limitée

Le détecteur : pour compter les ions

Multiplicateur de photon :

Principe : dopage du signal par la formation d'électron secondaire (dynode). Ceux-ci sont accélérés vers l'écran phosphorescent où ils ont convertis en photons. Ces photons sont ensuite détectés par le photomultiplicateur.



Avantage : bonne sensibilité, gain d'amplification très forte

Inconvénient : balayage moins rapide qu'un multiplicateur d'électron

Spectrométrie de masse:

1. Présentation générale
2. Instrumentation et principe de la mesure
 - 2.1. les sources d'ions
 - 2.2. les analyseurs
 - 2.3. les détecteurs
 - 2.4. Principe de la fragmentation
3. Le couplage LC – GC/MS
4. Applications

La fragmentation

Principe : consiste à « casser » une molécule à l'intérieur d'un spectromètre de masse, afin de déterminer ses propriétés structurales

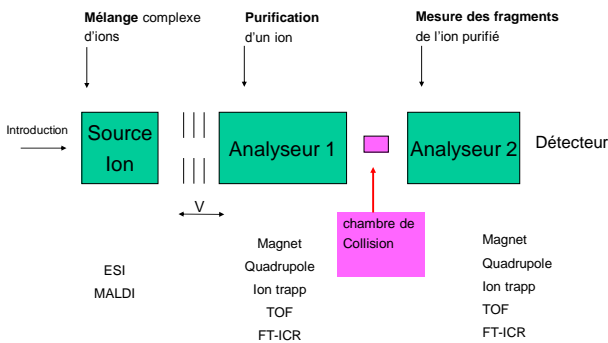
Moyens : coupler plusieurs analyseurs et agir de façon séquentielle



Spectrométrie de masse à plusieurs dimension MSⁿ

La MS-MS est un puissant outil de détermination de structure

La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions MS-MS



La fragmentation

Rôle du premier analyseur : sélectionne les ions avec un certain m/z (ion parent)

Purification d'un ion présent dans un mélange complexe

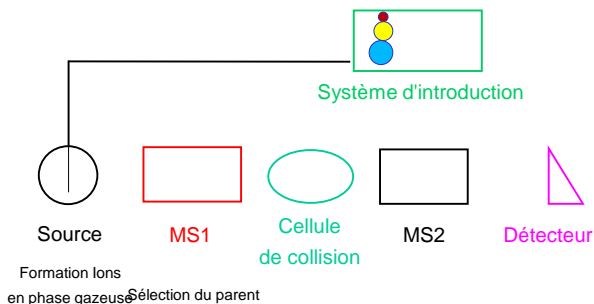
Rôle de la chambre de collision : cellule dans laquelle l'ion parent va être fragmenté pour donner les ions fils

Exemple : Présence d'un gaz qui va induire par collision des fragmentations

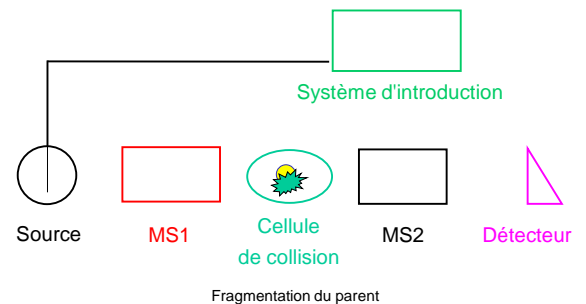
Rôle du deuxième analyseur : mesure les m/z des fragments

Répétition de l'opération : MS-MS-MS ou MS³ etc....

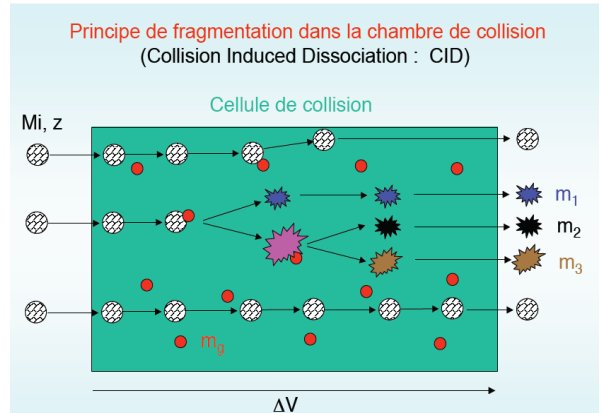
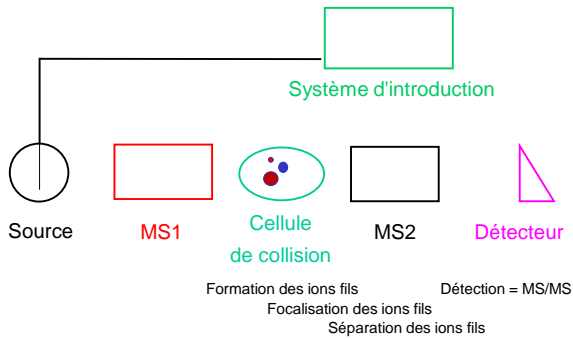
La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS



La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS



La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS



Les énergies de la collision en MS/MS dépendent du type d'analyseur utilisé. On peut obtenir des schémas de fragmentation différents selon les énergies utilisées

Collision haute énergie	Collision basse énergie
en keV	en eV
EB/EB ou BEB	QQ
EB/Q	Q-TOF
EB/TOF	IT
TOF/TOF	FT-ICR
TOF (PSD)	

Spectrométrie de masse:

1. Présentation générale
2. Instrumentation et principe de la mesure
 - 2.1. les sources d'ions
 - 2.2. les analyseurs
 - 2.3. les détecteurs
 - 2.4. Principe de la fragmentation
3. Le couplage LC – GC/MS
4. Applications

Pourquoi un couplage LC-GC/MS ?

Malgré la puissance analytique de la MS, cette technique présente de fortes limitations dans l'étude de mélange très complexe (produits naturels, matrices complexes...)

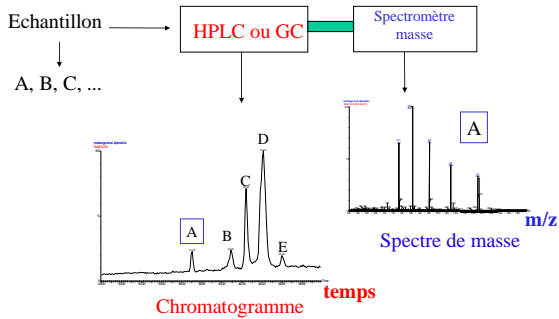
- Perte de signal due au trop grand nombre de composés à analyser
- Perte de sensibilité
- Perte de résolution

« Simplifier » les mélanges complexes
Permettre leur passage en MS de façon optimal

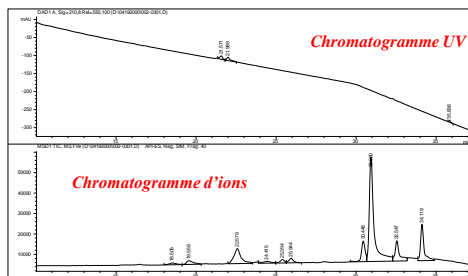
Intérêt du couplage LC-GC/MS

- Séparation d'un mélange afin d'obtenir une identification de tous les constituants
- Avoir la sensibilité la plus élevée possible
- Etre universel, c'est-à-dire détecter toutes les substances éluées
- Fournir le plus d'info structurales possible
- Etre sélectif (identification d'un constituant ciblé)
- Permettre des analyses quantitatives

Le couplage LC-GC/MS



Là où le détecteur UV s'arrête, le spectromètre de masse est à son aise...



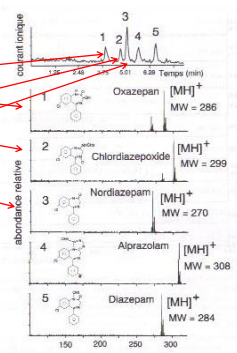
Agilent Technologies
Innovating with you

Le couplage LC-GC/MS

Mode d'acquisition (spectre de masse):

> **Cas idéal** : un pic correspond à un composé

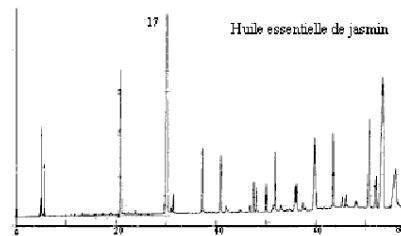
- > Pic 1 : Oxazepam
- > Pic 2 : Chlordiazepoxide
- > Pic 3 : Nordiazepam
- > etc...



Le couplage LC-GC/MS

Mode d'acquisition (chromatogramme) :

- > Tracé d'un chromatogramme d'ion à l'aide du spectromètre de masse
- > Représente l'intensité d'un ion de rapport m/z déterminé en fonction du temps



Le couplage LC-GC/MS

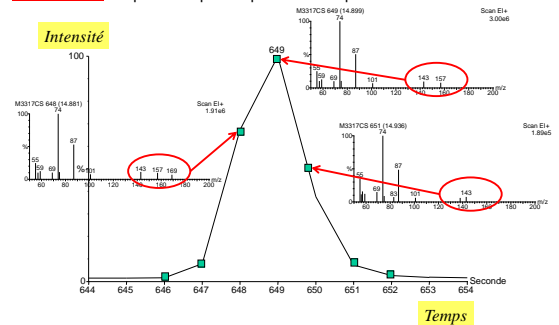
Mode d'acquisition (spectre de masse):

- > A l'aide du chromatogramme d'ion, on détermine le spectre de masse de chaque constituant présent dans les pics
- > Intégration de chaque pic correspond au spectre des composés présent dans le pic

Le couplage LC-GC/MS

Mode d'acquisition (spectre de masse):

> **Cas naturel** : un pic correspond à plusieurs composés



Le couplage GC/MS

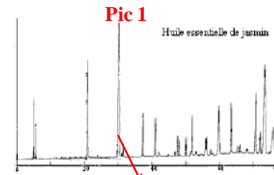
Le Couplage GC/MS

- Etude de composés volatiles (molécules de petite taille)
- Compatibilité avec les sources EI et CI (débit 1 à 2 mL/min)
- Compatible uniquement avec des colonnes capillaires (compatible avec le débit)
- gaz vecteur utilisé : hélium

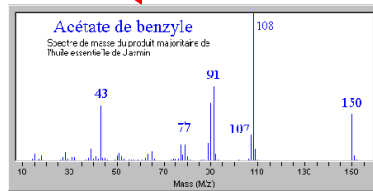
Assez simple à mettre en place car les ions arrivent dans la source à l'état gazeux

Le couplage GC/MS

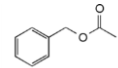
Exemple



Chromatogramme d'ion de l'huile essentielle de jasmin

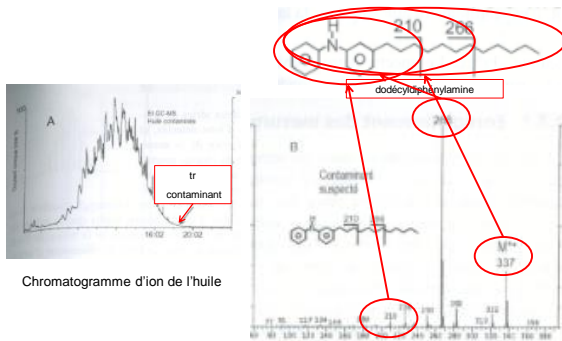


Spectre de masse du produit majoritaire (pic 1)
m/z 150 Th



Le couplage GC/MS

Exemple : Recherche d'un contaminant dans un huile en EI/GC-MS/MS



Le couplage LC-GC/MS

Le Couplage LC/MS

- Etude de composés non-volatiles
- Compatibilité avec les sources ESI et APCI
- Choix primordial de la nature de phase mobile (compatibilité avec l'analyseur)
- Elimination des solvants, compatibilité avec les débits

Plus compliquée à mettre en place, mais extrêmement puissante

Le couplage LC-GC/MS

Choix de la phase mobile :

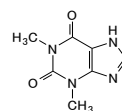
Problèmes de compatibilité des éluants HPLC avec la MS

- besoin d'adapter les méthodes de LC pour la LC-MS
- Les phases éluantes doivent être relativement volatiles et exemptes de sels ou d'électrolytes en proportions trop importantes

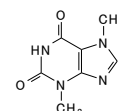
Le couplage LC-GC/MS

Choix de la phase mobile :

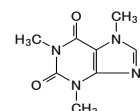
comparons une analyse avec éluant non volatil et éluant volatil



Theophylline (TP)
M.W=180.17
pKa <1, 8.6



Theobromine (TB)
M.W=180.17
pKa <1, 10.0

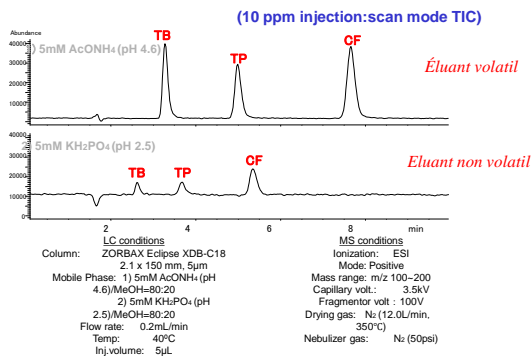


Caffeine (CF)
M.W=194.19
pKa = 14

Le couplage LC-GC/MS

Choix de la phase mobile :

comparons une analyse avec éluant non volatil et éluant volatil



Le couplage LC-GC/MS

Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

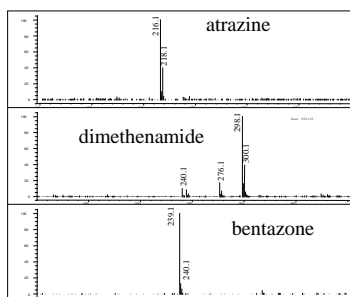
Démarche scientifique :

- Analyse sur des **solutions standards**
Intégration des pics et calcul du rapport S/N pour chaque pesticide
- Détermination de la limite de détection (LOD) sur colonne pour un rapport S/N de 3
- Courbe de calibration avec des solutions standard dans une gamme dynamique de 4 ordres de grandeur (0,1 à 1000 pg/µl)
- Les critères de linéarité sont :
 - Coefficient de corrélation > 0,99
 - Déviatoin standard < 15%
- Dosage des pesticides

Le couplage LC-GC/MS

Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

Spectre de masse des standards



Le couplage LC-GC/MS

Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

- Réglementation UE: forte demande en méthodes analytiques adaptées à **différentes matrices**
- Les difficultés d'analyse:
 - Nombreuses molécules de pesticides avec des paramètres de détection spécifiques
 - Complexité de la matrice
 - Limites de détection basses et homogènes pour l'ensemble des pesticides
 - Besoin de détection spécifique (MS-MS)

Le couplage LC-GC/MS

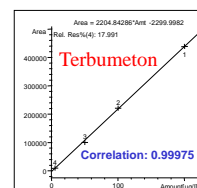
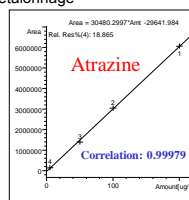
Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

pesticide	ion	M/z	TR min
Carbendazine	M+H	192	12.2
DIA	M+H	174	12.7
Imidaclopride	M+H	256	16.4
Terbutometon	M+H	226	21.6
Bentazone	M+H	239	22.4
Oxadixyl	M+Na	301	21.2
Carbofuran	M+Na	244	23.1
Chlorotoluron	M+H	211	23.8
Atrazine	M+H	216	23.85
Diuron	M+H	231	25.3
2,4D	M+H	219	24.3
Trichlopyr	?	196	25.9
Dimethenamid	M+Na	298	29.4
Dimetorbe	M+H	239	34
orizalin	M+H	345	32.4
sulcotrione	M+H	327	22.7
prosafluron	M+H	418	29.4

Le couplage LC-GC/MS

Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

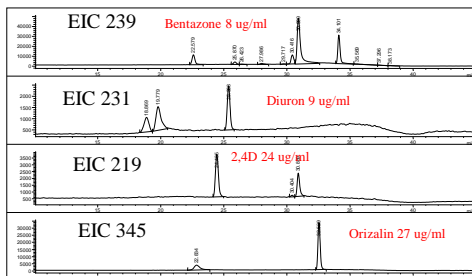
Courbe d'étalonnage



Le couplage LC-GC/MS

Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

Détection sélective de certains composés cibles dans un échantillon d'eau



On recherche dans le chromatogramme la présence d'ions caractéristiques de rapport m/z = 239; 231; 219; 345

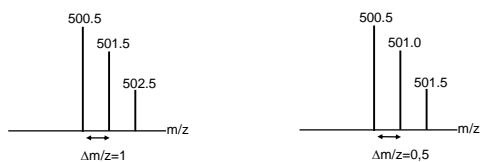
Spectrométrie de masse:

1. Présentation générale
2. Instrumentation et principe de la mesure
 - 2.1. les sources d'ions
 - 2.2. les analyseurs
 - 2.3. les détecteurs
 - 2.4. Principe de la fragmentation
3. Le couplage LC – GC/MS
4. Applications

Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

On se sert des profils isotopiques

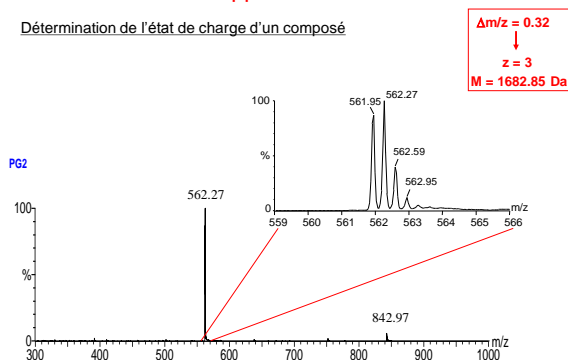


La différence de masse apportée par la présence d'1 isotope est de 1 Da donc le rapport m/z varie de 1/z

Si $z=1$ $\Delta m/z=1$
 $z=2$ $\Delta m/z=0.5$
 $z=3$ $\Delta m/z=0.33$
 etc

Application 1

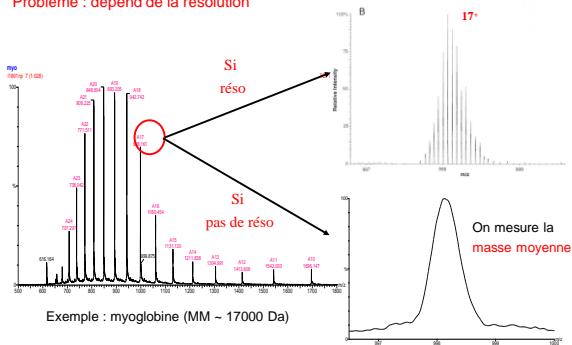
Détermination de l'état de charge d'un composé



Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Problème : dépend de la résolution

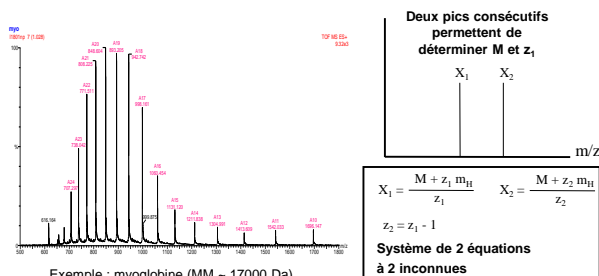


On mesure la masse moyenne

Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Cas de mauvaise résolution

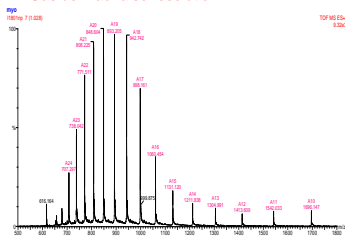


Calcul de z:
$$z_1 = \frac{X_2 - 1}{X_2 - X_1}$$

Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Cas de mauvaise résolution



Série d'ions multichargés.

Tous ces pics correspondent à la même molécule, mais avec un nombre de protons différents.

La masse M et z sont d'abord calculées à partir de 2 pics.

Ensuite, M est calculée à partir de chacun des pics de la série d'ions multichargés.

Dans cet exemple on observe 16 états de charges différents (10 à 25 charges).

La masse mesurée sera donc le résultat de la moyenne de ces 16 mesures, d'où la grande précision obtenue.

Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Cas de mauvaise résolution

m/z	z	Masse
679,12	25	16953,00
707,31	24	16951,44
737,99	23	16950,77
721,5	22	15851,00
808,28	21	16952,88
848,53	20	16950,60
893,24	19	16952,56
942,67	18	16950,06
998,18	17	16952,06
1060,41	16	16950,56
1130,95	15	16949,25
1211,81	14	16951,34
Moyenne :		16951,65 +/- 0,17 Da

La moyenne des valeurs trouvées pour la masse moléculaire est calculée avec une déviation standard.

Plus il y a d'ions multichargés, plus la masse pourra être mesurée avec précision

Les masses calculées sont des masses chimiques et non pas des masses monoisotopiques car la résolution n'est pas suffisante pour séparer les pics isotopiques

Application 2

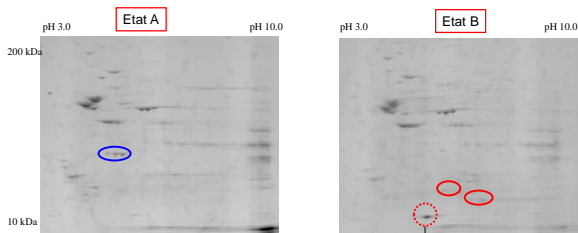
Application de la SM dans le domaine de la santé

découverte de nouvelles cibles diagnostiques ou thérapeutiques

validation de nouveaux médicaments

Application 2

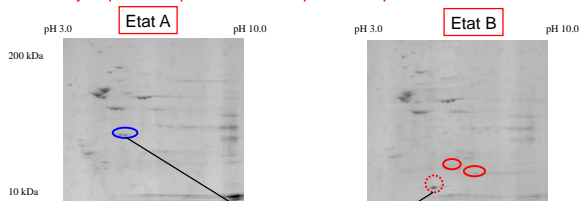
Analyse protéomique différentielle par électrophorèse bidimensionnelle



Molecular and Cellular Proteomics, 2, 494-505, (2003).

Application 2

Analyse protéomique différentielle par électrophorèse bidimensionnelle



Excision du spot d'intérêt

Identification de la protéine Par spectrométrie de masse

Application 2

Analyse protéomique différentielle par électrophorèse bidimensionnelle

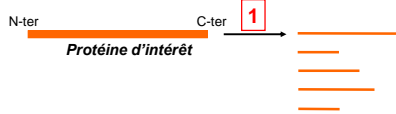


La précision de mesure de masse permet d'identifier une protéine d'intérêt:

Une MM → un enchaînement en AA → une protéine !

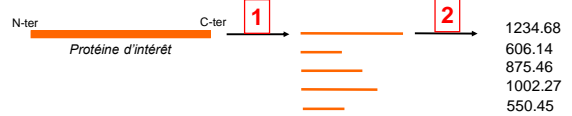
Problème : Limitation par la gamme de masse

La précision de mesure de masse : Une nécessité en protéomique !



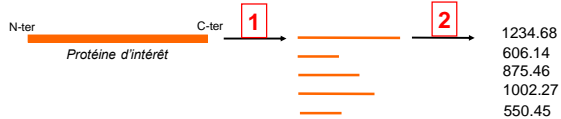
1. Génération de peptides par action d'une enzyme spécifique (trypsine)

La précision de mesure de masse : Une nécessité en protéomique !



1. Génération de peptides par action d'une enzyme spécifique (trypsine)
2. Mesure de la masse moléculaire de chaque peptide avec une précision de quelques ppm !

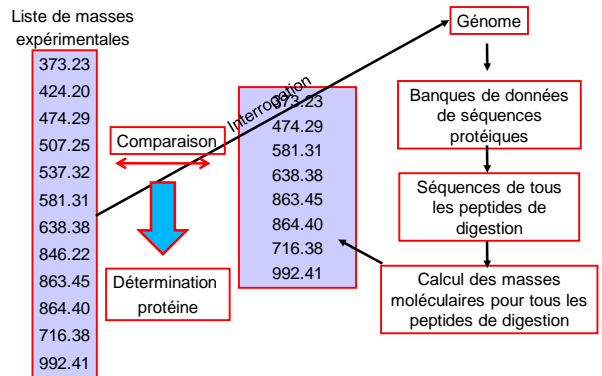
La précision de mesure de masse : Une nécessité en protéomique !



1. Génération de peptides par action d'une enzyme spécifique (trypsine)
2. Mesure de la masse de chaque peptide
3. Existe-t-il dans les banques de données une protéine dont certains peptides tryptiques ont la même masse (à +/- 0,xx Da) que certains des pics mesurés?

Application 2

Analyse protéomique différentielle par électrophorèse bidimensionnelle



Exemple de recherche sur MS-Fit (mesures ESI)

MS-Fit donne la liste des peptides reconnus par leur masse moléculaire et la séquence correspondante

m/z submitted	MW matched	Delta ppm	start	end	Peptide Sequence (Click for Fragmentions)	Modifications
373.23	391.2300	56.4837	1	3	(-)M(L)E(V)	
424.20	529.3030	229.3466	7	16	(K)E(L)O(R)(F)	
474.29	545.3704	545.3047	119	145	(K)E(R)I(N)Q	
507.25	545.3700	545.3047	119	145	(K)E(R)I(N)Q	
537.32	778.4200	778.4099	12	33	(R)E(N)F(L)A(G)E(K)(D)	
581.31	1010.3900	1010.5199	128	241	(K)E(F)I(T)P(E)(N)	
638.38	1153.5800	1153.5642	13	233	(R)E(N)F(L)A(G)E(K)(F)	
864.22	1229.5400	1229.6741	109	193	(R)O(O)G(V)Y(L)S(K)(E)	
863.45	1229.5400	122.0522	173	182	(R)Y(L)P(E)R(E)R(E)Q(Q)	
864.40	1229.5400	122.0522	173	182	(R)Y(L)P(E)R(E)R(E)Q(Q)	
716.38	1229.5400	122.0522	173	182	(R)Y(L)P(E)R(E)R(E)Q(Q)	
992.41	1229.5400	122.0522	173	182	(R)Y(L)P(E)R(E)R(E)Q(Q)	
	77	42.4012	349	360	(R)E(N)F(L)A(G)E(K)D(N)Y(T)(Q)	
	37	56.0431	387	398	(E)E(Y)F(Y)D(A)Q(P)Q(E)(E)	
	38	83.1661	296	307	(K)K(O)E(E)P(L)Y(Q)(Y)	
	33	49.8392	234	246	(K)E(F)E(I)P(E)K(P)O(L)R(D)	
	42	72.7959	16	30	(E)E(N)S(F)O(L)P(E)M(O)N(G)R(I)	
	72	-88.5925	365	380	(R)Y(O)R(L)A(F)P(S)A(D)Y(Y)E(L)	
	103	169.3072	104	120	(E)D(A)C(T)T(L)Y(L)V(H)D(H)O(H)E(I)	
	193	-68.0876	173	193	(R)Y(L)P(E)R(E)R(E)O(Q)G(V)Y(L)S(K)(E)	

Résultats d'une recherche .

Application 3 La spectrométrie de masse supramoléculaire

MS-Fit Search Results

Press stop on your browser if you wish to abort this MS-Fit search prematurely

Sample ID (comment): **Magic Bullet digest**
 Database searched: **NCBI nr 03.07.1999**
 Molecular weight search: **(1000 - 100000 Da)** selects **342273** entries
 Full pI range: **359484** entries
 Combined molecular weight and pI searches select **342273** entries
 MS-Fit search selects **18278** entries (results displayed for top 5 matches).

Considered modifications: **Peptide N-terminal Gln to pyrroGln | Oxidation of M | Protein N-terminus Acetylated |**

Min. # Peptides to Match	Peptide Masses	Digest Used	Max. # Missed Cleavages	Cysteines Modified by	Peptide N-terminus	Peptide C-terminus	Input # Peptide Masses
4	200-1000 ppm	monoisotopic Trypsin	1	unmodified	Hydrogen (H)	Free Acid (O H)	36

Result Summary

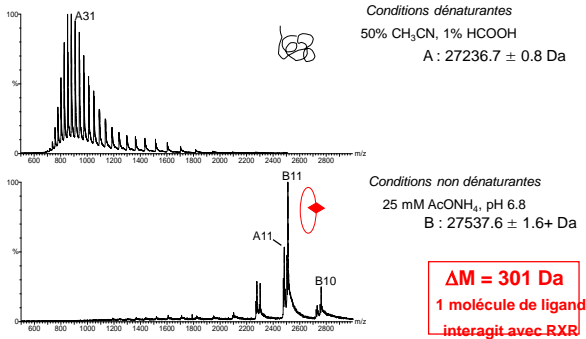
Rank	MOWSE Score	# (%) Masses Matched	Protein MW (Da)/pI	Species	NCBI nr 03.07.1999 Accession #	Protein Name
1	3.11e+007	1636 (44%)	48107.1 / 5.66	GLYCINE MAX	2605512	(AB208679) beta subunit of beta conglycinin
2	3.2e+006	1436 (38%)	50552.2 / 5.88	GLYCINE MAX	121282	(84493) C34 beta-conglycinin
3	3.85e+005	1436 (38%)	63296.3 / 4.92	GLYCINE MAX	2605510	(AB208678) alpha subunit of beta conglycinin
4	3.68e+005	1436 (38%)	70293.4 / 5.07	GLYCINE MAX	121281	(X17699) propro-polyprotein (AA-22 to 58)
5	3.68e+005	1436 (38%)	70306.5 / 5.13	UNREADABLE	99889	>g99889 gus20007 beta-conglycinin alpha chain precursor - soybean

Définition: c'est la spectrométrie de masse des complexes non covalents

- La volatilisation / ionisation se fait en préservant en phase gazeuse les interactions spécifiques qui existaient en solution entre des molécules.
- La spectrométrie de masse supramoléculaire étudie des complexes spécifiques
- Le spectromètre de masse est souvent réglé de façon différente que pour faire de la spectrométrie de masse moléculaire où le but est de détruire toutes les interactions entre molécules (spécifiques et non spécifiques)

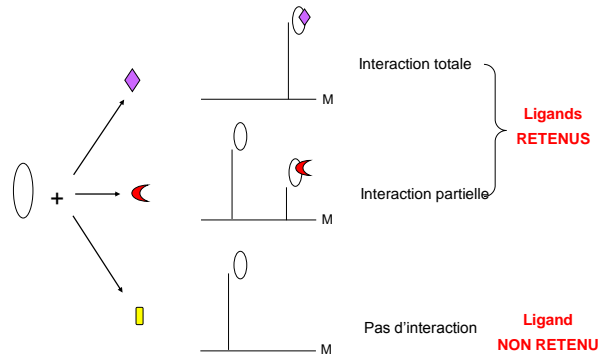
Application 3 Interaction protéine/ligand

Comparaison des spectres obtenus en conditions **dénaturantes** (les interactions non covalentes entre molécules sont détruites) et en conditions **non dénaturantes**



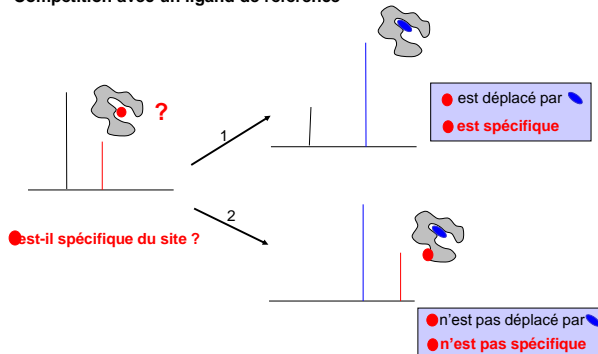
La SM peut-elle s'intégrer aux stratégies de criblage de ligand ?

→ sélection de ligands « liants » versus « non liants »

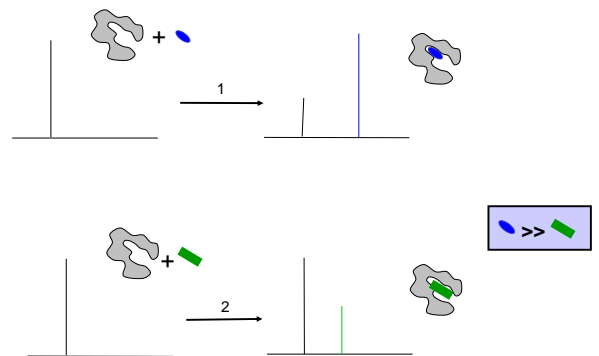


Validation implique spécificité !

Compétition avec un ligand de référence

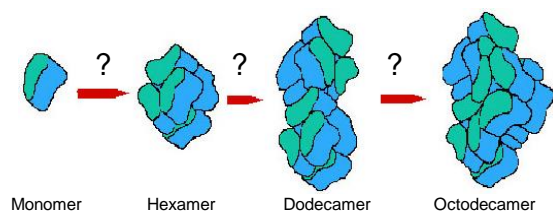


La SM peut elle informer sur la stabilité en solution ?



Vers des complexes de plus en plus lourds...
Analyse d'hémocyanine de crabe

1. Pour vérifier la composition exacte des différents oligomères
2. Relier cette composition au biotope



Monomer

Hexamer

Dodecamer

Octodecamer

Native hemocyanin from the deep-sea crab *Bithograea thermydron*

- masses mesurées jusqu'à 2 341 kDa pour le 30-mer

