

Cours de Spectrométrie de Masse

Enseignant : Y. FRANCOIS

Yannis FRANCOIS

Laboratoire de Dynamique et Structure
Moléculaires par Spectrométrie de Masse
Tour de Chimie, 12ème étage

e-mail: yfrancois@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 ...

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 :

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

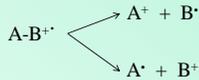
Ionisation et fragmentation

Ionisation :

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

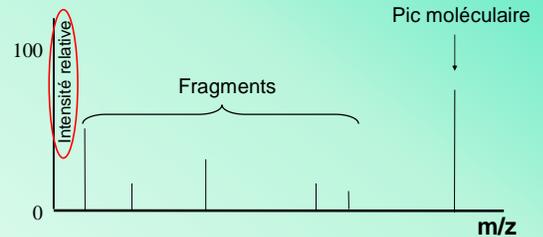
Fragmentation :

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



Quelles informations peut apporter la spectrométrie de masse ?

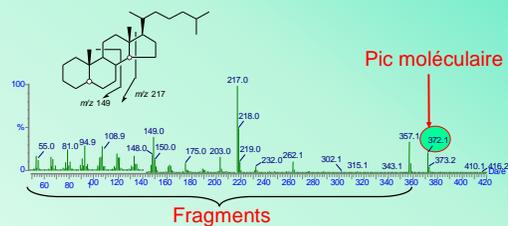
- 1- La **masse moléculaire** d'un composé
- 2- La masse de certains « morceaux » de ce composé appelés **fragments**
- 3- Une mesure de la **quantité**



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**

Cholestane



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%		1 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%	

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} , ...).

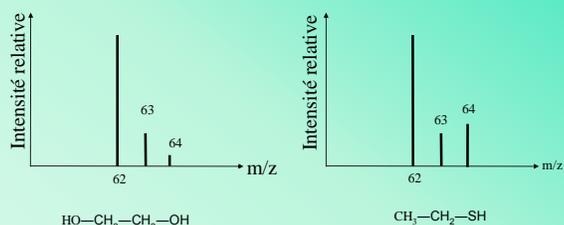
Masse chimique ou moyenne

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 ($C=12,011$).

La masse s'exprime en Dalton (Da)

Elle dépend de la résolution du spectromètre de masse

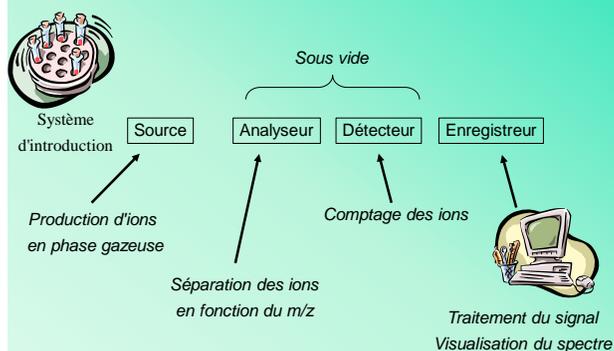
Pourquoi chercher à obtenir un profil isotopique ?



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

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

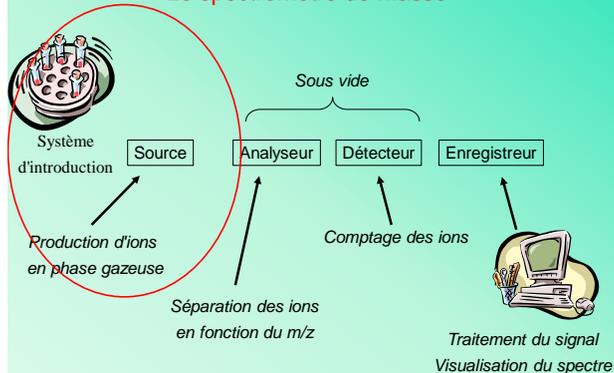
Le spectromètre de masse



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.

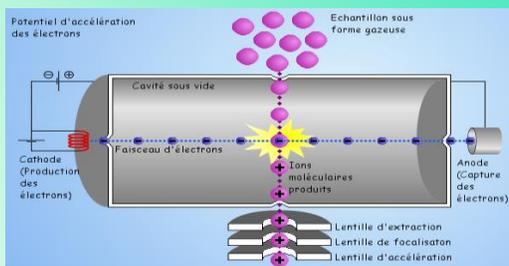
Sources d'ionisation

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)

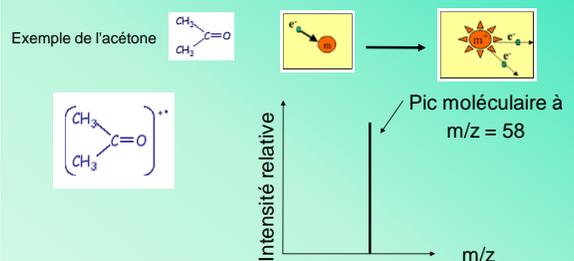


- un filament porté à haute T°C par passage d'un courant émet des e⁻ qui peuvent être accélérés par une certaine ΔV.

- 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

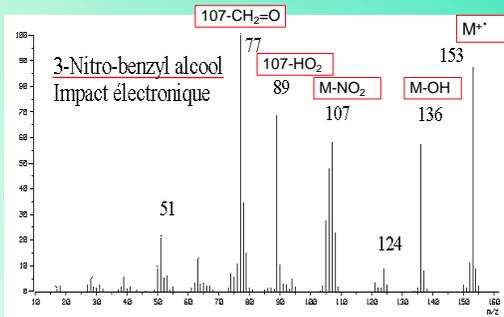
L'impact électronique (EI)



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

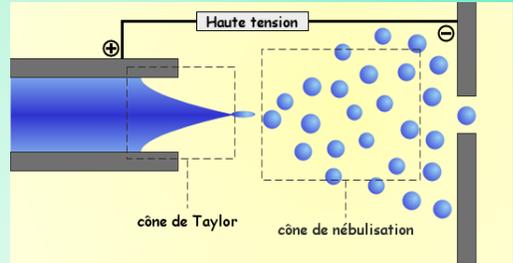
Il s'agit de l'ion moléculaire

Exemple spectre EI:

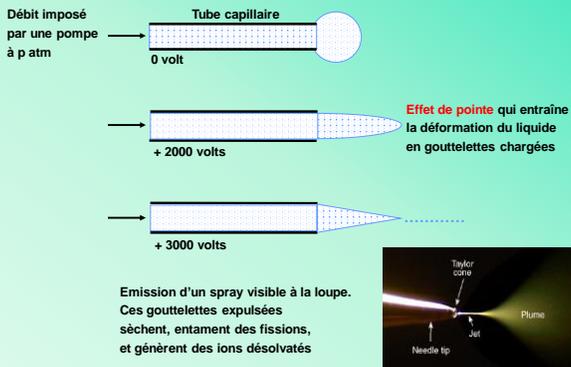


L'ionisation par électronébulisation (Electrospray)

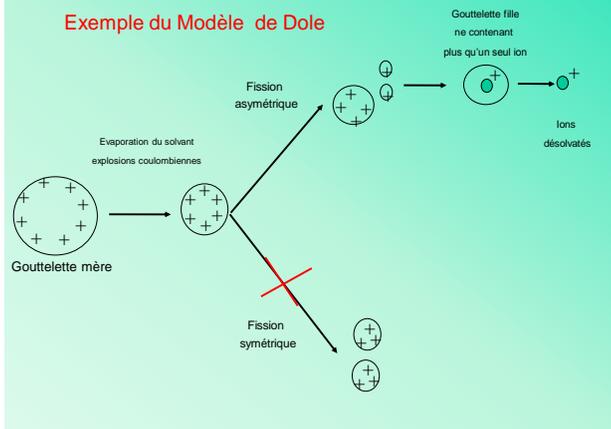
basée sur la formation à pression atmosphérique de molécules chargées issue d'un spray créé dans un champs électrique



L'ionisation électrospray : principe de la production du spray

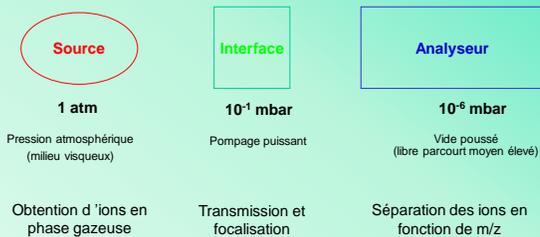


Exemple du Modèle de Dole



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**



Avantage de l'électrospray

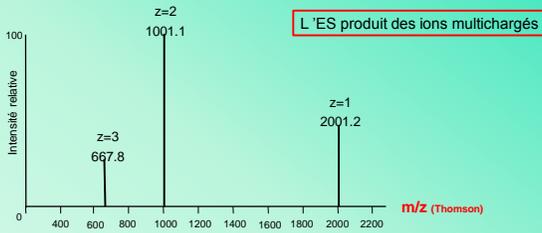
- Fonctionne à basse T°C, à pression atmosphérique, pas de dégradation, pas de fragmentation
- Génère de ions multichargés
- Mesure précise de la masse moléculaire (0.1%) soit ± 1 Da sur M = 10000 Da
- Extraction des ions de large masse moléculaire (polymère, biomolécule)
- Sensible (C - μM)
- Extraction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

Interprétation d'un spectre electrospray



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

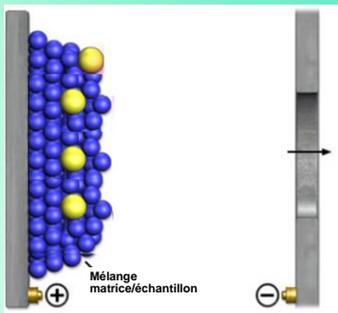
↳ Masse de notre composé : 2000,2 Da

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

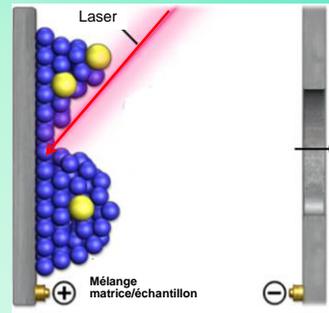
- Le MALDI est basé sur l'utilisation d'un composé (la matrice) qui absorbe à 337 nanomètres
- L'énergie va être transféré à l'échantillon par la matrice
- L'échantillon ionisé va être transféré dans l'analyseur

Génère des ions à une seule charge

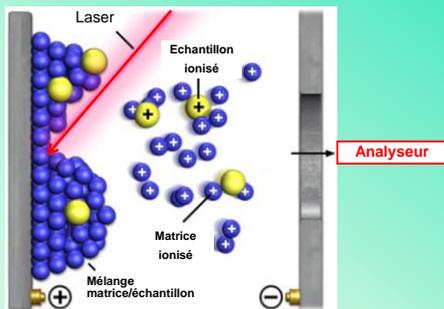
Principe MALDI-MS



Principe MALDI-MS



Principe MALDI-MS



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)

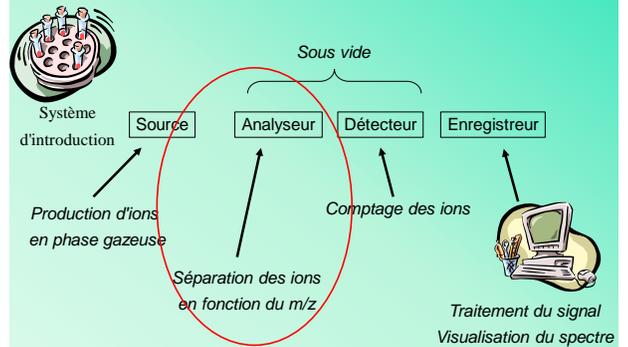
Rôle :

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

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:

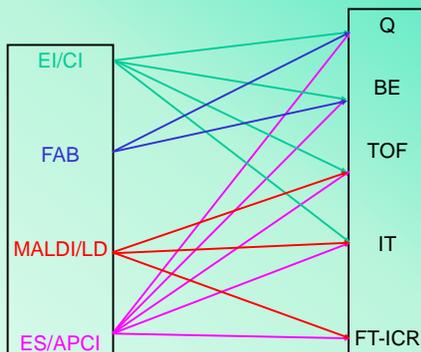
$$L = kT / \sqrt{2}p\sigma$$

- 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)

$$L = 0,66 / p$$

Spectromètres de masse commerciaux:

De nombreux accouplements source /analyseur sont possibles



Les caractéristiques principales d'un analyseur sont :

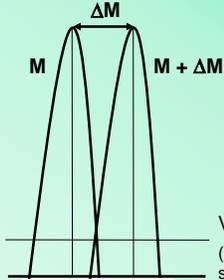
- La résolution R
- La gamme m/z qu'il peut analyser
- La rapidité de balayage en m/z
- La sensibilité
- La vitesse avec laquelle les ions le traversent

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

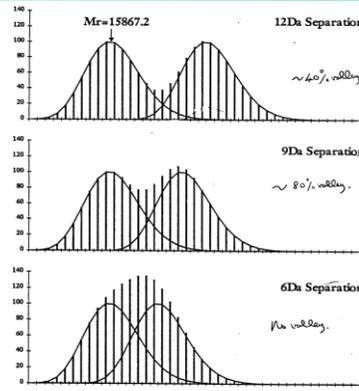
R mesure l'aptitude d'un analyseur à distinguer des ions séparés par ΔM Dalton (l'ion M de l'ion $M+\Delta M$)



$$R = M/\Delta M$$

Vallée à 10 %
(les 2 pics se recouvrent sur 10% de leurs hauteurs)

Le pouvoir résolutif (TOF)



Détection de 2 produits
Bonne précision de la mesure de masse

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

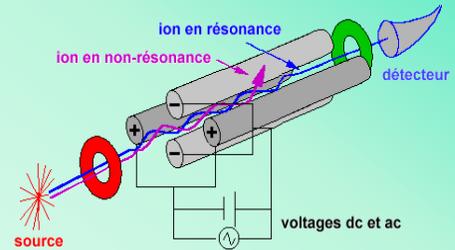
Caractéristiques des analyseurs

Analyseurs	Résolution	Gamme m/z
Quadripôle (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

2 heures

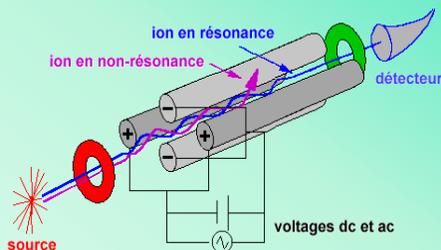
L'analyseur quadripolaire

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



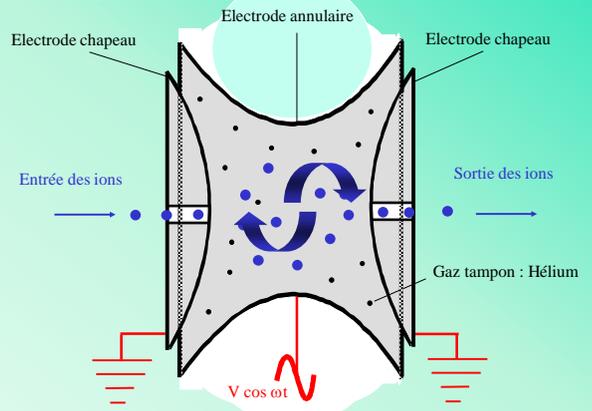
L'analyseur quadripolaire

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

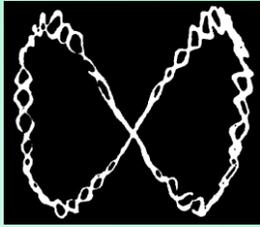


Les ions d'une seule valeur m/z arrivent à traverser le système sans heurter les barres

La trappe ionique

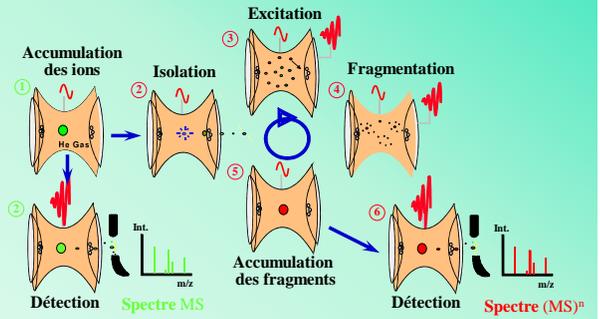


Trajectoire des ions



Courbe de Lissajous

Analyse MS et (MS)ⁿ dans une trappe ionique

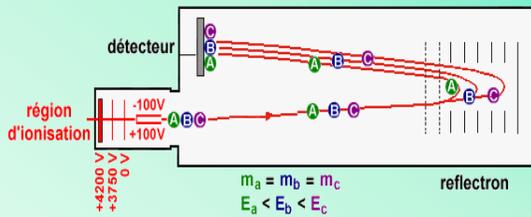


L'analyseur à temps de vol (TOF)

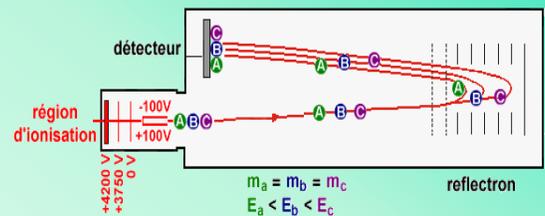
Séparation des ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans une zone libre de champs (tube de vol)

Deux types de mode d'utilisation :

Mode linéaire et mode réflectron



L'analyseur à temps de vol (TOF)

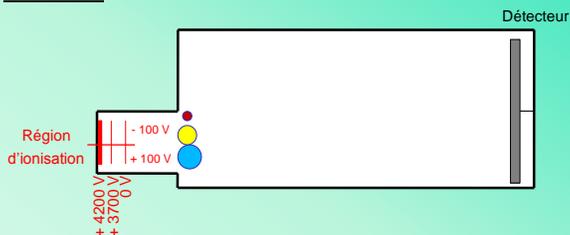


Les ions arrivent avec leur E_c ($mv^2/2$) dans une zone libre de champs

- 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

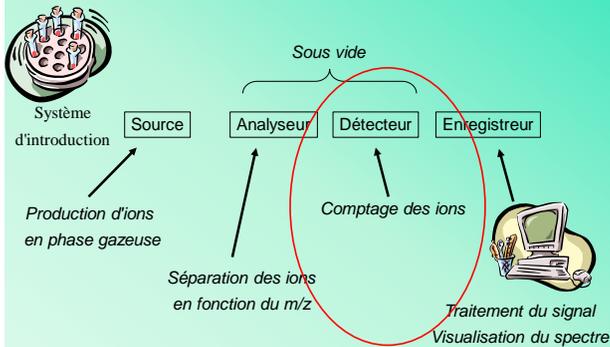
➤ Vitesse d'analyse extrêmement rapide

➤ Limite de masse > 1 000 000, mais résolution 5000

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

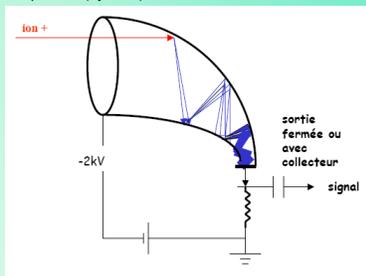
Comme les analyseurs et les sources, il existe différents types de détecteurs. Ils sont tous basés sur des principes physiques différents, mais leur rôle reste le même, compter les ions. C'est une partie de l'appareil sous vide ($10^{-5} - 10^{-7}$ Torr)

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

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

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

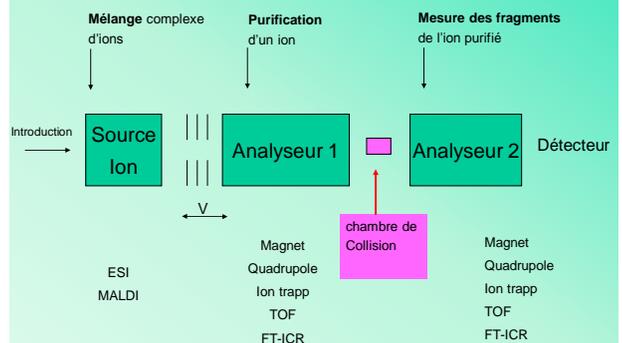
Principe : consiste à « casser » une molécule à l'intérieur d'un spectromètre de masse, afin de déterminer ses propriétés structurales

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

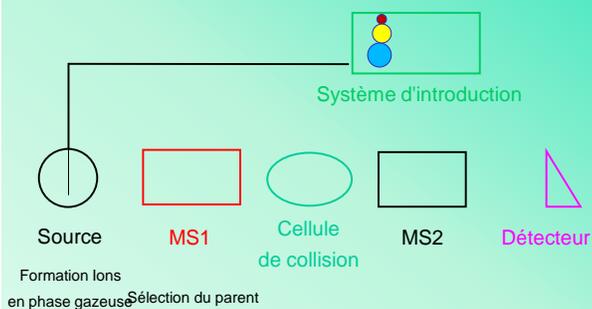
Rôle de la chambre de collision : cellule dans laquelle l'ion parent va être fragmenté pour donner les ions fils

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

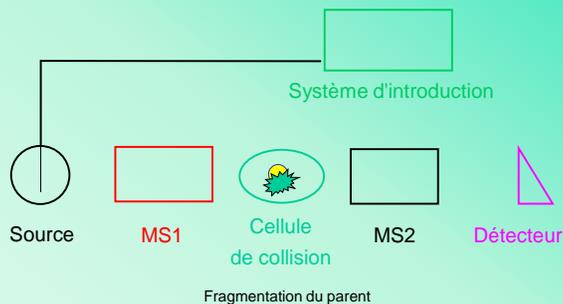
Rôle du deuxième analyseur : mesure les m/z des fragments

Répétition de l'opération : MS-MS-MS ou MS^3 etc....

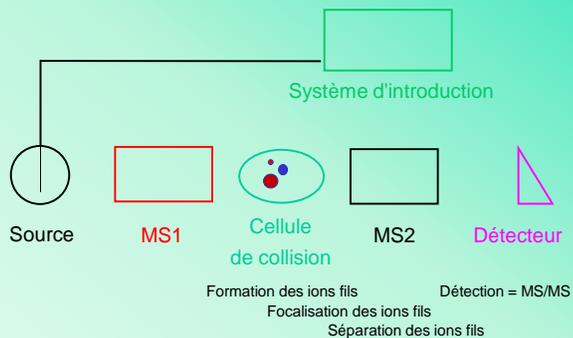
La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS



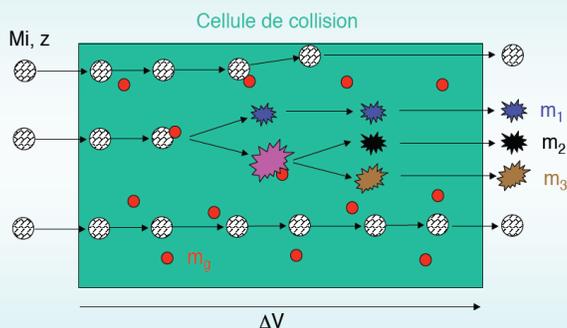
La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS



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



Principe de fragmentation dans la chambre de collision (Collision Induced Dissociation : CID)



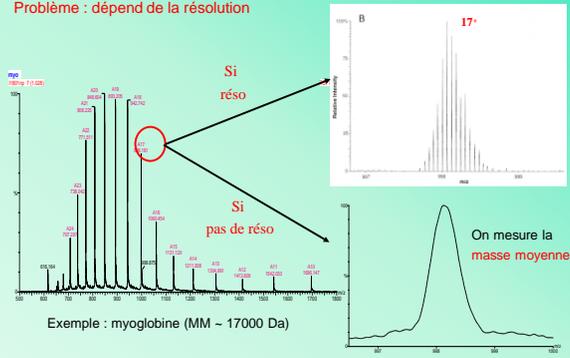
Spectrométrie de masse:

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

Problème : dépend de la résolution

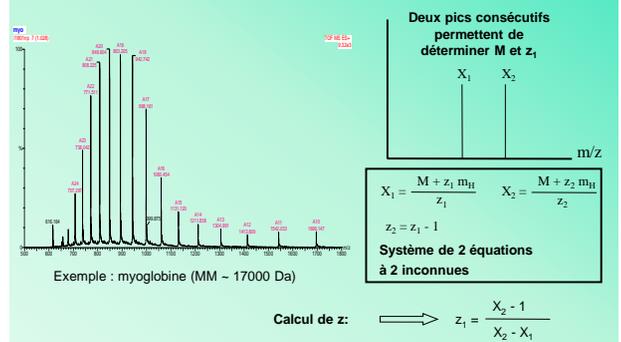


Exemple : myoglobine (MM ~ 17000 Da)

Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Cas de mauvaise résolution

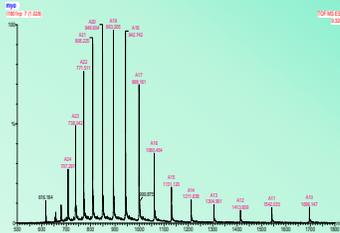


Exemple : myoglobine (MM ~ 17000 Da)

Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Cas de mauvaise résolution



Exemple : myoglobine (MM ~ 17000 Da)

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