



Licence STUE

UE Chimie Analytique

Spectrométrie de masse

SM

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 :

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

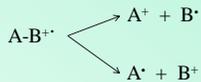
Ionisation et fragmentation

Ionisation :

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

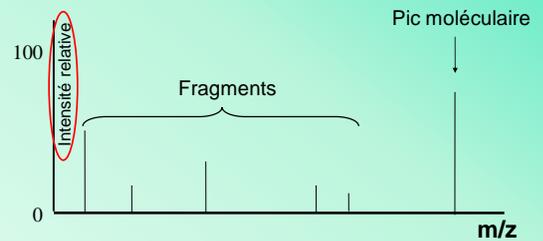
Fragmentation :

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



Quelles informations peut apporter la spectrométrie de masse ?

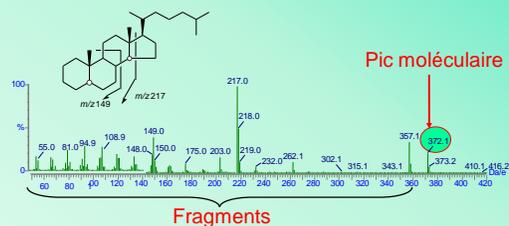
- 1- La **masse moléculaire** d'un composé
- 2- La masse de certains « morceaux » de ce composé appelés **fragments**
- 3- Une mesure de la **quantité**



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} , ...).

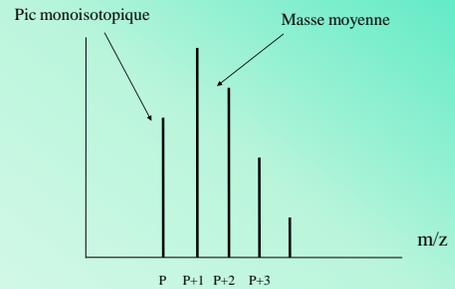
Masse chimique ou moyenne

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 ($C=12,011$).

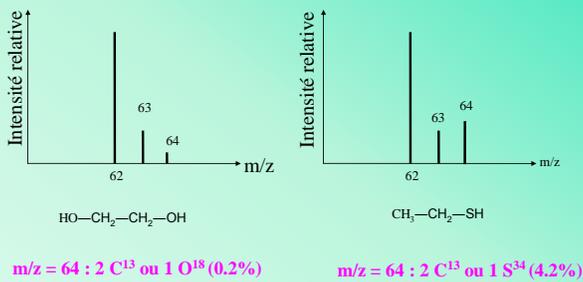
La masse s'exprime en Dalton (Da)

Elle dépend de la résolution du spectromètre de masse

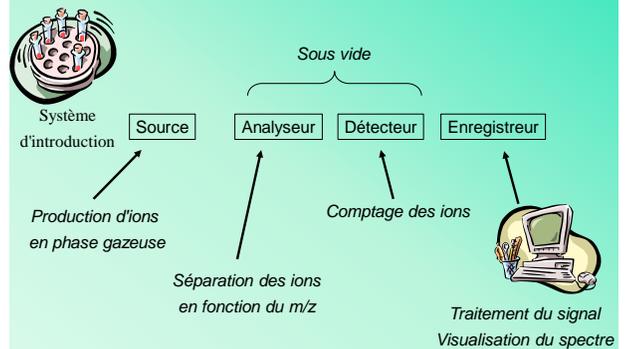
Le profil isotopique



Pourquoi chercher à obtenir un profil isotopique?



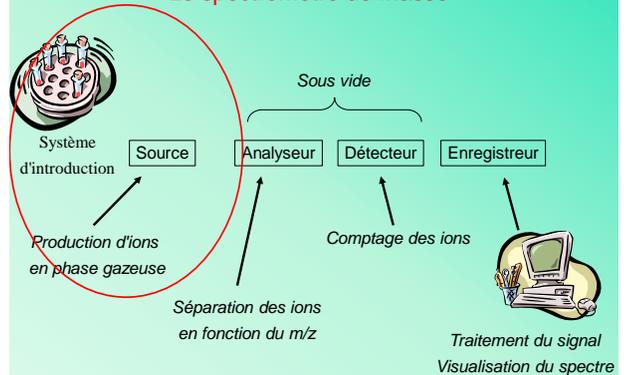
Le spectromètre de masse



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:

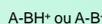
- la volatilité et la stabilité thermique du composé à analyser
- les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation
- la taille des molécules
- les quantités de produit disponibles
- le type d'introduction souhaitée (directe ou en couplage chromatographique)

Différentes méthodes d'ionisation

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



➤ Ionisation par protonation ou déprotonation



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



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.

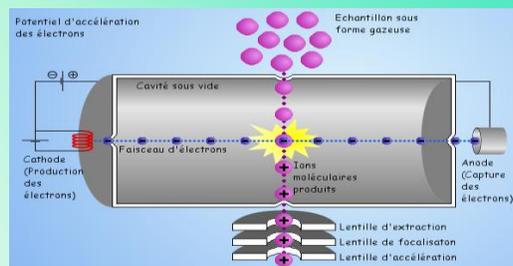
Sources d'ionisation

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

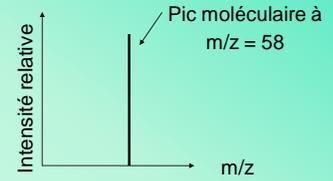
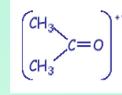
- $E > 70$ eV: le courant ionique atteint un seuil et beaucoup de fragmentations secondaires difficiles à interpréter

Malgré cela, dans les conditions classiques:

- faisceau d' e^- accéléré à 70 eV \rightarrow 1 ion sur 1000 molécules entrantes

L'impact électronique (EI)

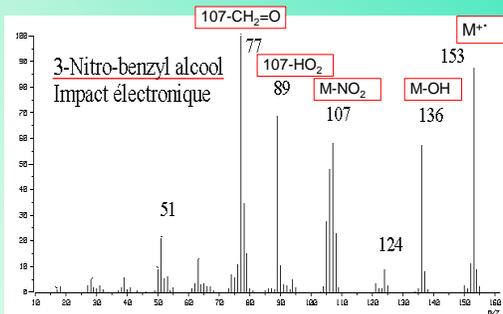
Exemple de l'acétone



La notation M^{+} 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

Exemple spectre EI:



La source par ionisation chimique (CI)

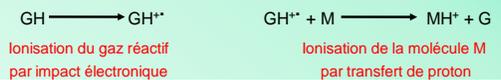
Complémentaire de l'impact électronique car produit des ions avec un faible excès d'énergie

\rightarrow peu de fragmentation

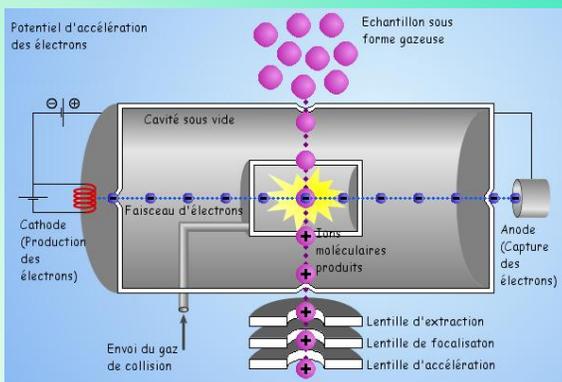
l'ion moléculaire est facilement reconnaissable !

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)

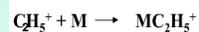
1. Le gaz réactif: exemple du méthane

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

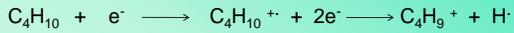


L'ion MH^+ est un ion ($M+1$) de faible énergie interne qui se fragmente peu

La source par ionisation chimique (CI)

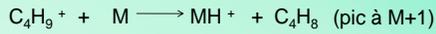
1. Le gaz réactif: exemple de l'isobutane

1. Formation des espèces ionisantes par EI

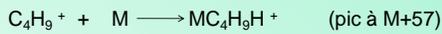


2. Collision entre les espèces ionisantes et la molécule à analyser

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

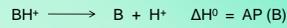


Mais on observe aussi:

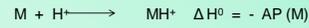
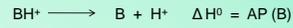


Il faut choisir le gaz réactif en fonction de la molécule à analyser

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



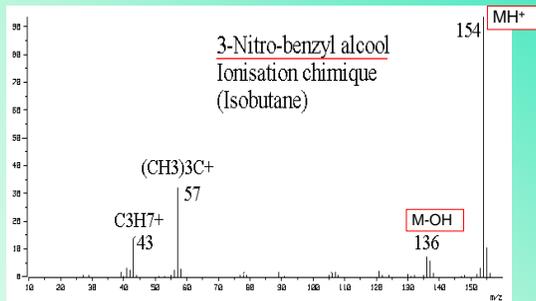
L'ionisation chimique d'une molécule M peut être considérée comme la somme:



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

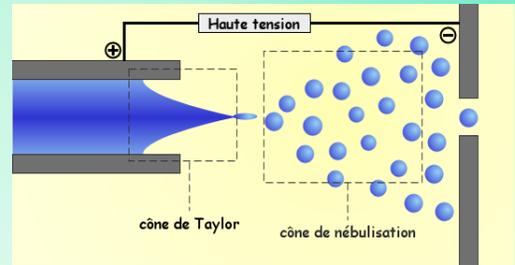
Réactif B	CH_4	H_2O	NH_3	n- C_4H_{10}
Ion BH^+	CH_5^+	H_3O^+	NH_4^+	$\text{C}_4\text{H}_{11}^+$
AP(B) kJ/mol	540	742	858	723

Exemple spectre CI:

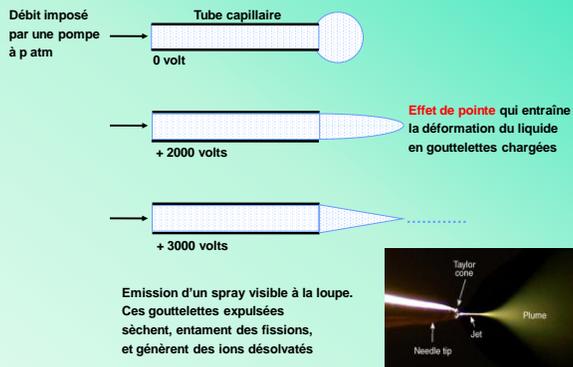


L'ionisation par électronébulisation (Electrospray)

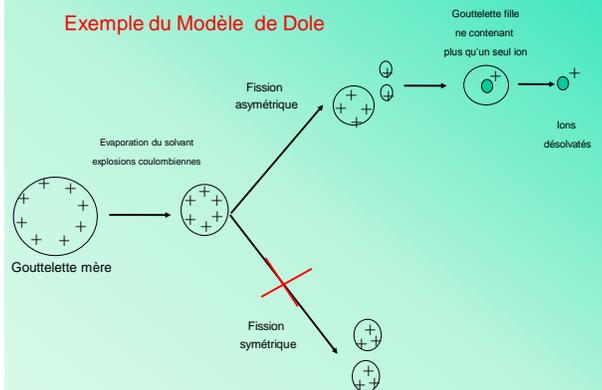
basée sur la formation à pression atmosphérique de molécules chargées issue d'un spray créé dans un champs électrique



L'ionisation électrospray : principe de la production du spray

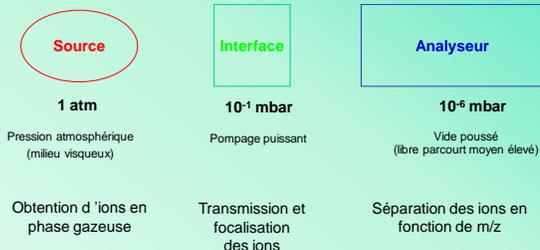


Exemple du Modèle de Dole



L'ionisation par électrospray (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**.



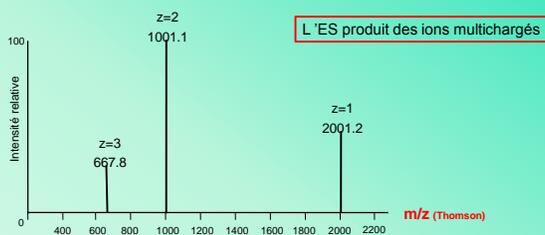
Avantage de l'électrospray

- 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
 - ↳ dessalage impératif

Interprétation d'un spectre electro spray



L'ES produit des ions multichargés

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

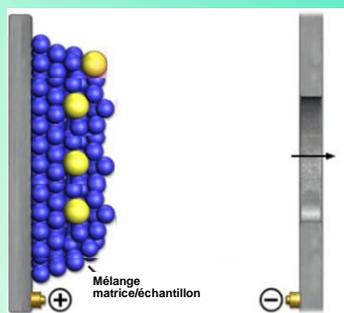
L'ionisation laser assistée par matrice

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)

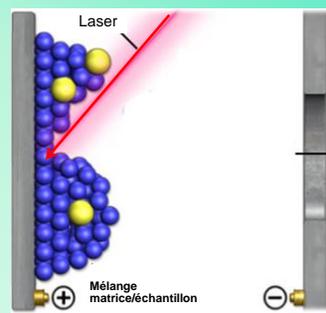
- Le MALDI est basé sur l'utilisation d'un composé (la matrice) qui absorbe à 337 nanomètres
- L'énergie va être transféré à l'échantillon par la matrice
- L'échantillon ionisé va être transféré dans l'analyseur

Génère des ions à une seule charge

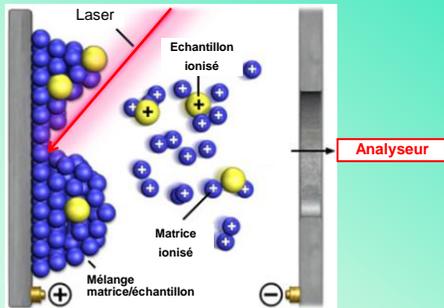
Principe MALDI-MS



Principe MALDI-MS



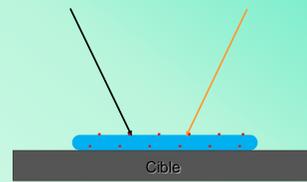
Principe MALDI-MS



Préparation de l'échantillon en MALDI-MS

solution d'échantillon
eau 0,1 % TFA/acétonitrile (50/50)

solution de matrice :
acide a-cyano-4-hydroxycinnamique
dans eau 0,1 % TFA/acétonitrile (50/50)



- > 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)

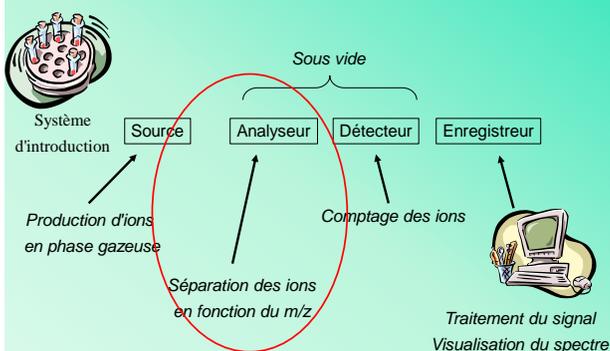
Rôle :

- > Protéger l'analyte de la destruction par un faisceau laser directe
- > 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:

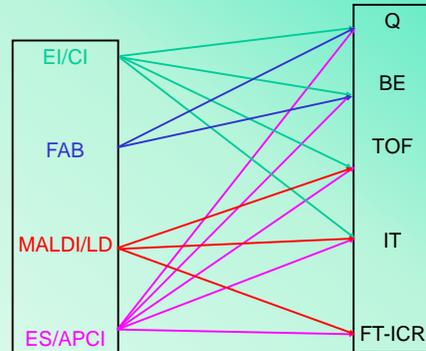
$$L = kT / \sqrt{2}p\sigma$$

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 :

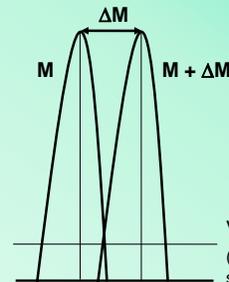
- La résolution R
- La gamme m/z qu'il peut analyser
- La rapidité de balayage en m/z
- La sensibilité
- La vitesse avec laquelle les ions le traversent

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 $M + \Delta M$)



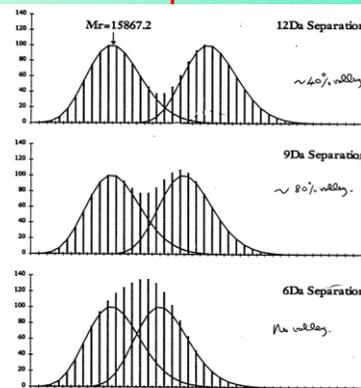
Vallée à 10 %
 (les 2 pics se recouvrent sur 10% de leurs hauteurs)

Résolution R

Postulat :

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

Le pouvoir résolutif (TOF)



Détection de 2 produits
 Bonne précision de la mesure de masse

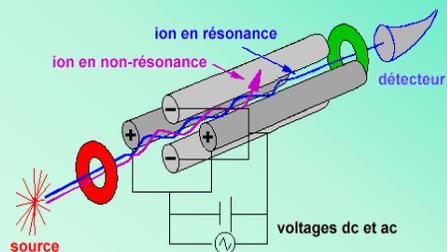
Perte de l'info: 2 produits
 Mesure de masse erronée

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

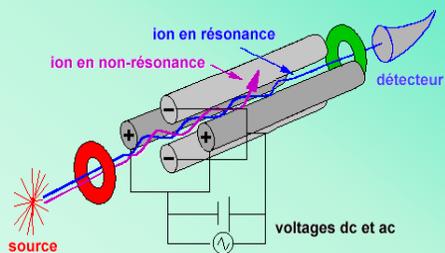
L'analyseur quadripolaire

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

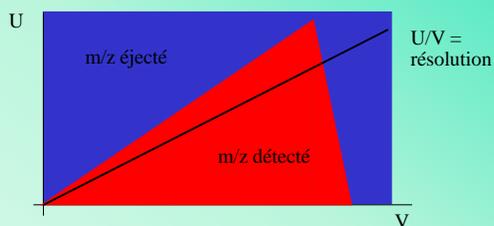
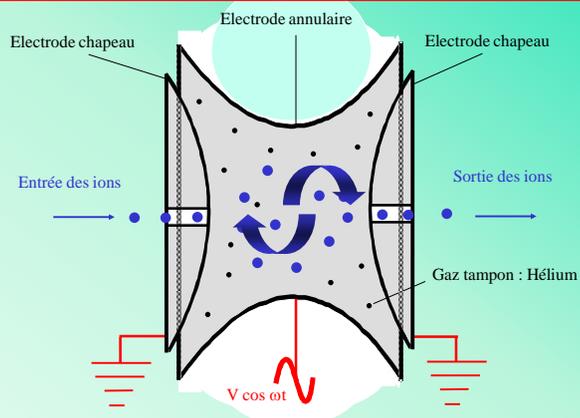


Diagramme de stabilité → Trajectoires stables ou Trajectoires instables

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

La trappe ionique



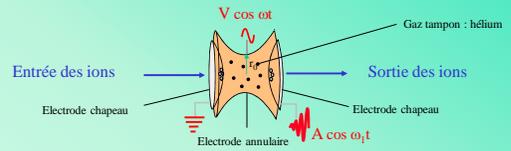
La trappe ionique

Equations du mouvement des ions identiques à celles pour le quadrupole

Les quatre barres parallèles du filtre quadrupolaires 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



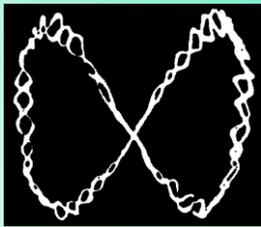
Potentiel dans la trappe : $\Phi_{r,z}$

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

Mouvement des ions dans la trappe : Equations de Mathieu

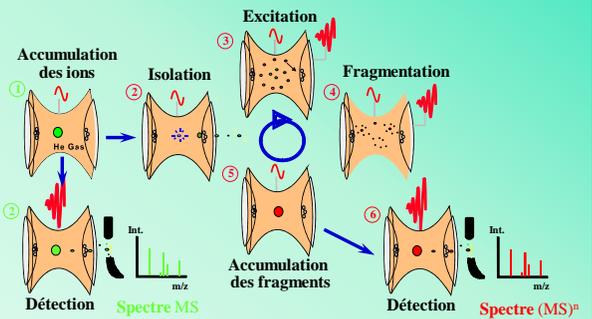
Trajectoire des ions dans la trappe : Diagramme de stabilité

Trajectoire des ions



Courbe de Lissajous

Analyse MS et $(MS)^n$ dans une trappe ionique

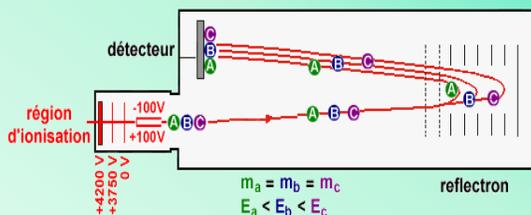


L'analyseur à temps de vol (TOF)

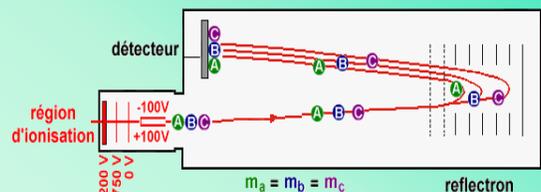
Séparation des ions en fonction de leur vitesse lorsqu'ils se déplacent dans une zone libre de champs (tube de vol)

Deux types de mode d'utilisation :

Mode linéaire et mode réflectron



L'analyseur à temps de vol (TOF)

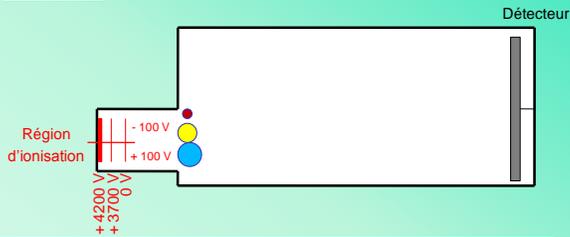


Les ions arrivent avec leur E_c ($mv^2/2$) dans une zone libre de champs

- > 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

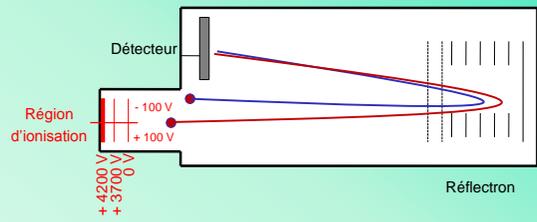


➤ Calcul du rapport m/z en fonction du temps que met l'ion à parcourir le tube de vol

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

L'analyseur à temps de vol (TOF)

Mode réflectron



➤ Correction de l'effet dispersif de l'Ec (mode linéaire)

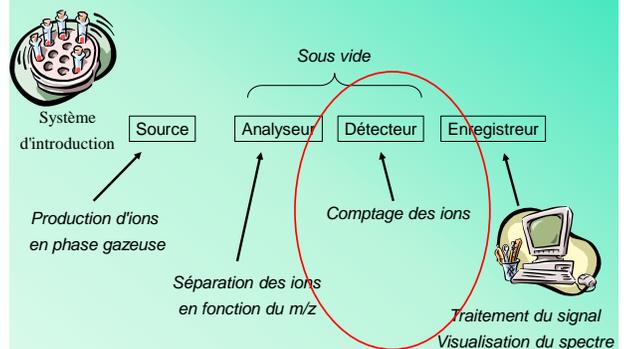
↳ Focalisation temporelle au niveau du détecteur

- 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
- Multiplicateur 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

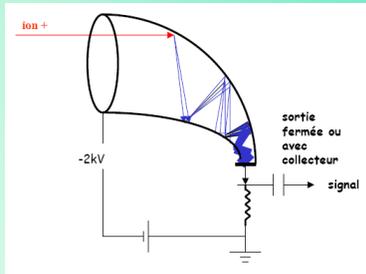
Avantage : précis

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 verre dopés au plomb (dynode)



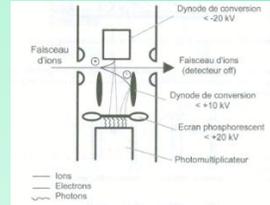
Avantage : bonne sensibilité et balayage rapide

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 sont 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

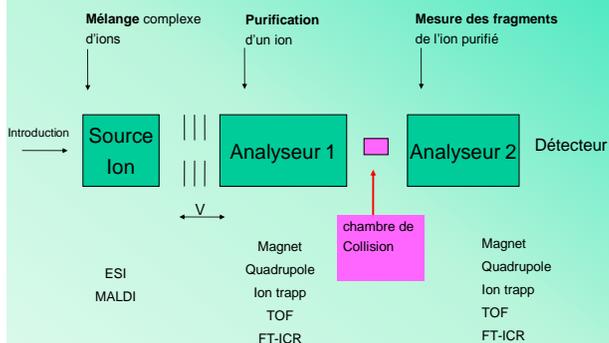
Principe : consiste à « casser » une molécule à l'intérieur d'un spectromètre de masse, afin de déterminer ses propriétés structurales

Moyens : coupler plusieurs analyseurs et agir de façon séquentielle

↳ Spectrométrie de masse à plusieurs dimension MS^n

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

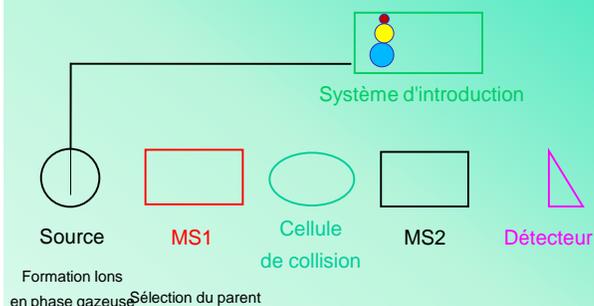
Rôle de la chambre de collision : cellule dans laquelle l'ion parent va être fragmenté pour donner les ions fils

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

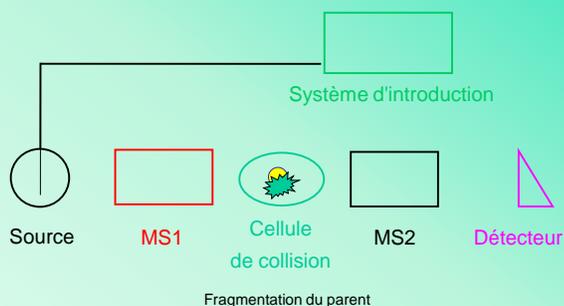
Rôle du deuxième analyseur : mesure les m/z des fragments

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

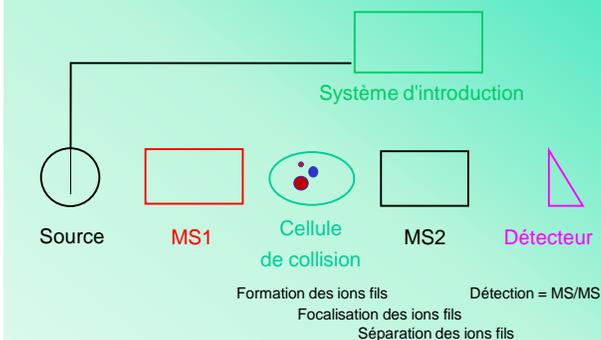
La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS



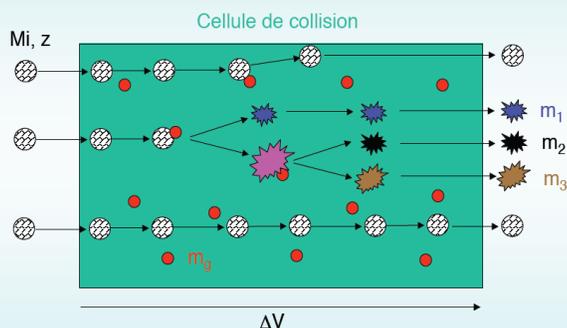
La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions couplée à la HPLC: LC-MS-MS



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

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

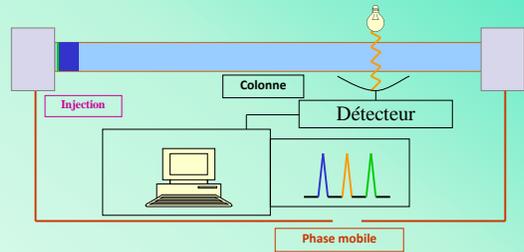
« Simplifier » les mélanges complexes
Permettre leur passage en MS de façon optimal

Intérêt du couplage LC-GC/MS

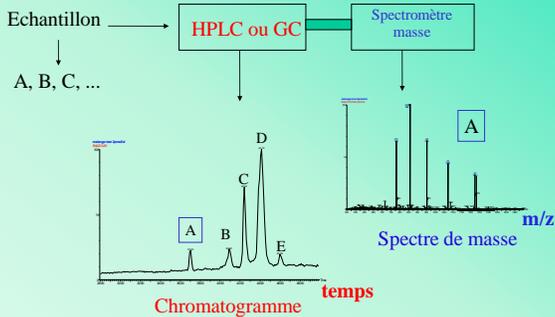
- Séparation d'un mélange afin d'obtenir une identification de tous les constituants
- Avoir la sensibilité la plus élevée possible
- Etre universel, c'est-à-dire détecter toutes les substances éluées
- Fournir le plus d'info structurales possible
- Etre sélectif (identification d'un constituant ciblé)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

La chromatographie

Principe



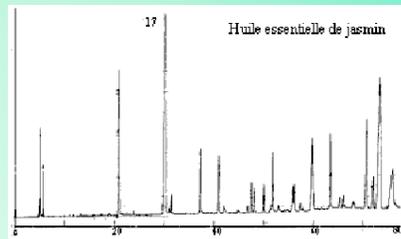
Le couplage LC-GC/MS



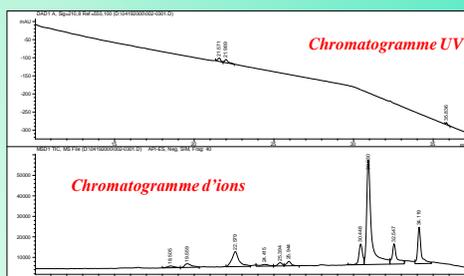
Le couplage LC-GC/MS

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



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



Le couplage LC-GC/MS

Mode d'acquisition (spectre de masse):

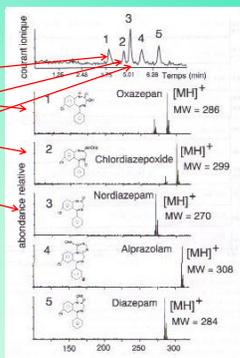
- A l'aide du chromatogramme d'ion, on détermine le spectre de masse de chaque constituant présent dans les pics
- Intégration de chaque pic correspond au spectre des composés présent dans le pic

Le couplage LC-GC/MS

Mode d'acquisition (spectre de masse):

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

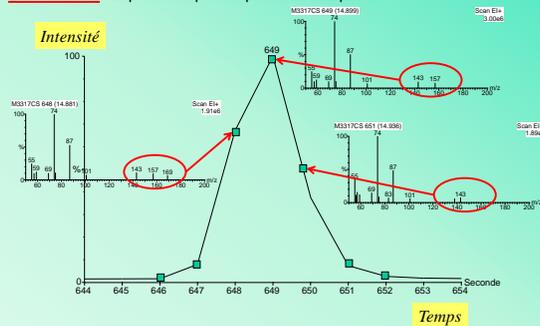
- Pic 1 : Oxazepam
- Pic 2 : Chlordiazepoxide
- Pic 3 : Nordiazepam
- etc...



Le couplage LC-GC/MS

Mode d'acquisition (spectre de masse):

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



Le couplage GC/MS

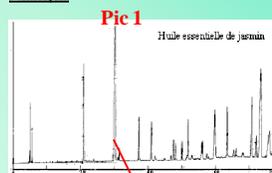
Le Couplage GC/MS

- 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

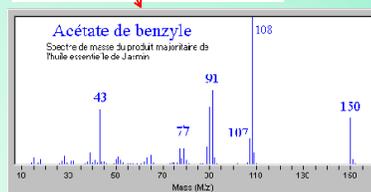
Assez simple à mettre en place car les ions arrivent dans la source à l'état gazeux

Le couplage GC/MS

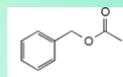
Exemple



Chromatogramme d'ion de l'huile essentielle de jasmin



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



Le couplage 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 :

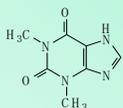
Problèmes de compatibilité des éluants HPLC avec la MS

- 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

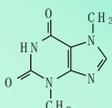
Le couplage LC-GC/MS

Choix de la phase mobile :

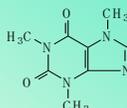
comparons une analyse avec éluant non volatil et éluant volatil



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



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

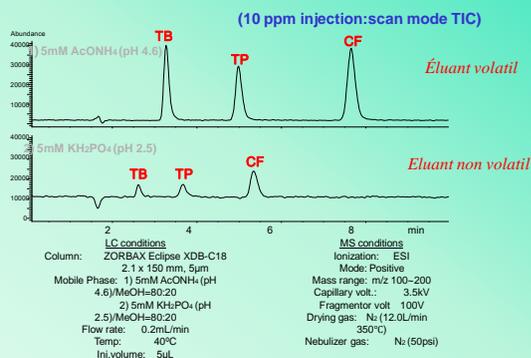


Caffeine (CF)
M.W=194.19
pKa = 14

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

- 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

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

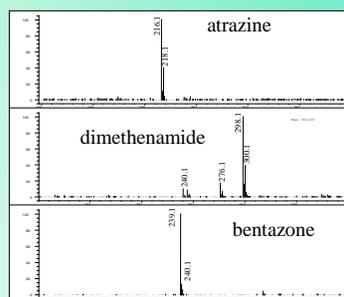
Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

pesticide	ion	M/z	TR min
Carbendazine	M+H	192	12.2
DIA	M+H	174	12.7
Imidaclopride	M+H	256	16.4
Terbufosmeton	M+H	226	21.6
Bentazone	M+H	239	22.4
Oxadibyl	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
Dinoterbe	M+H	239	34
orizalin	M+H	345	32.4
sulcotrioxone	M+H	327	22.7
prosulfuron	M+H	418	29.4

Le couplage LC-GC/MS

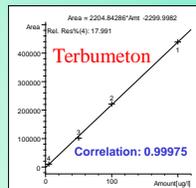
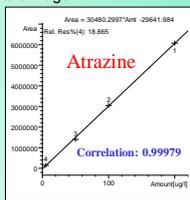
Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS

Spectre de masse des standards



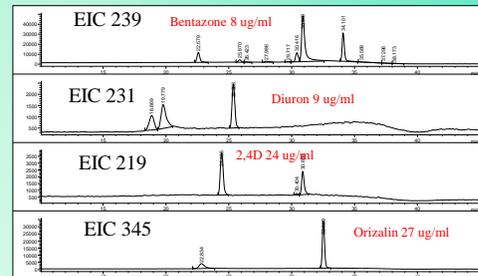
Le couplage LC-GC/MS

Exemple : Criblage de pesticide par HPLC/MS
 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



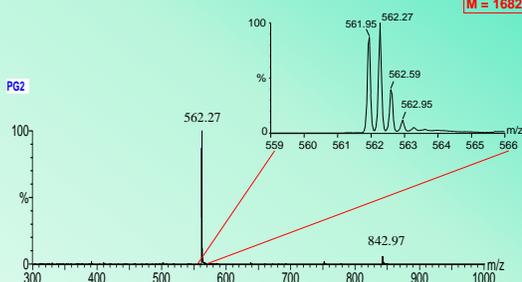
La différence de masse apportée par la présence d'1 isotope est de 1 Da donc le rapport m/z varie de $1/z$

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

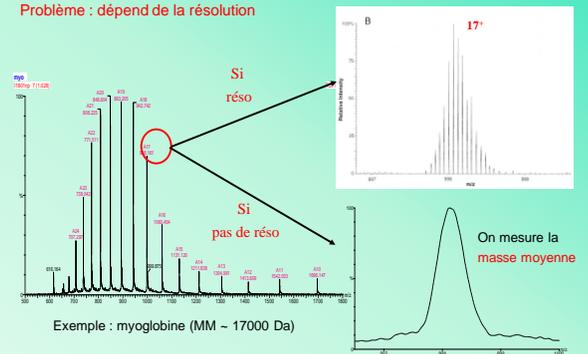
$\Delta m/z = 0.32$
 $z = 3$
 $M = 1682.85 \text{ Da}$



Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

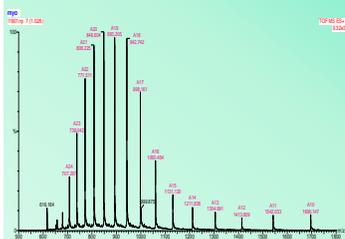
Problème : dépend de la résolution



Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Cas de mauvaise résolution



Exemple : myoglobine (MM - 17000 Da)

Deux pics consécutifs permettent de déterminer M et z_1

X_1 X_2

m/z

$$X_1 = \frac{M + z_1 m_H}{z_1} \quad X_2 = \frac{M + z_2 m_H}{z_2}$$

$$z_2 = z_1 - 1$$

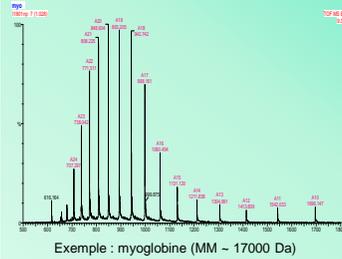
Système de 2 équations à 2 inconnues

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

Application 1

Détermination de l'état de charge d'un composé

Cas de mauvaise résolution



Exemple : myoglobine (MM - 17000 Da)

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.

Série d'ions multichargés.

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

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