Spectrométrie de masse et techniques couplées

Guillaume Cazals – UAR PAC
Ingénieur en techniques d'analyses
guillaume.cazals@umontpellier.fr

Spectrométrie de masse et techniques couplées

UAR PAC Chimie Balard Montpellier

PLATEFORMES CHIMIE BALARD

PAC: Plateforme d'Analyse et de Caractérisation du Pôle chimie Balard

➔ **11 services** : RMN, MS, RX, IR/RAMAN, microscopies, magnétisme, …

➔ **Mutualisation des ressources et équipements analytiques (lourds et mi-lourds)** de services communs de recherche de l'UM et plateaux techniques des instituts du Pôle Balard

UM: site Triolet, site Pharmacie, ENSCM ➔ Bâtiment Recherche Chimie, Campus CNRS



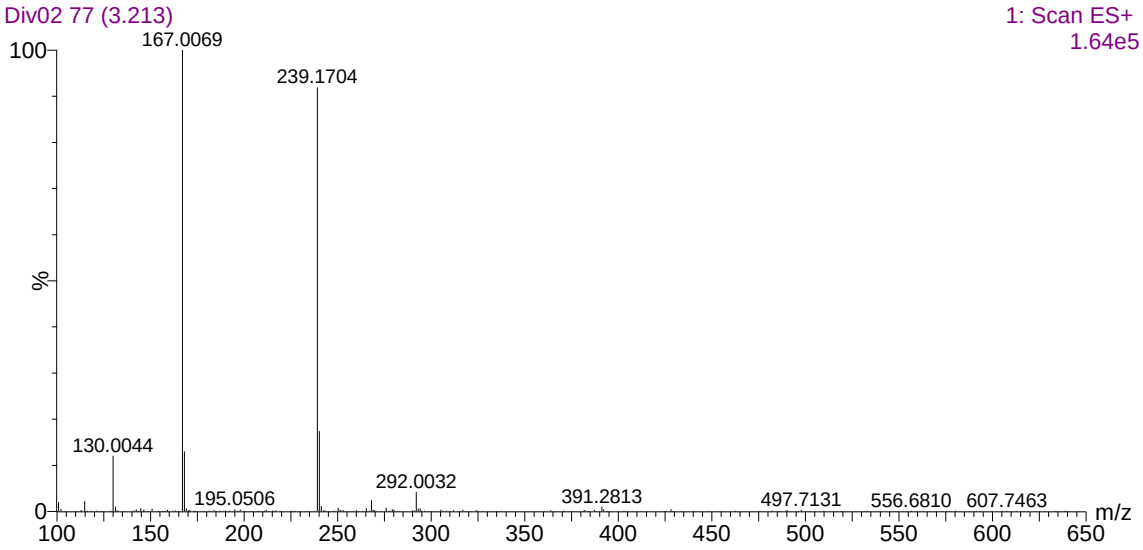


Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Objectifs :



Quelles infos ???

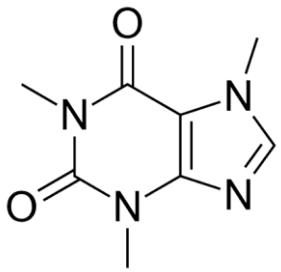


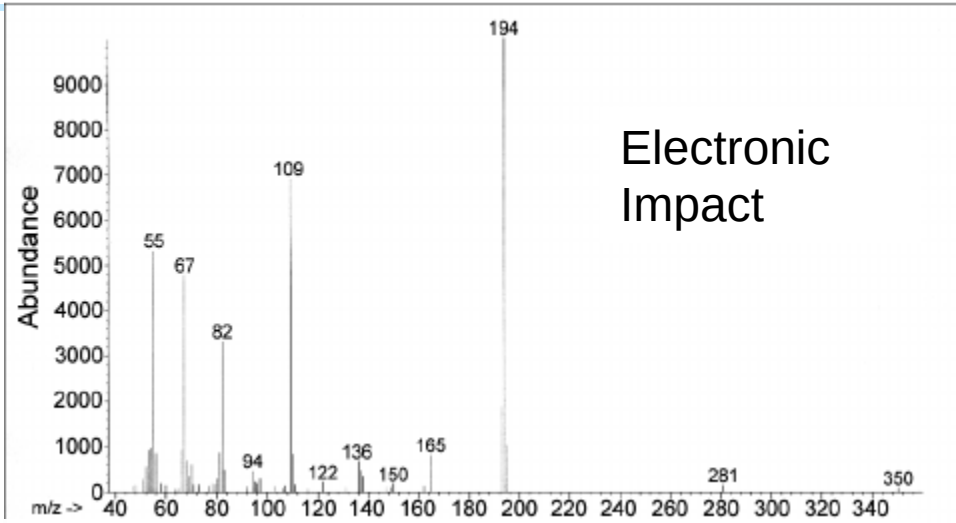


Quelles analyses ???

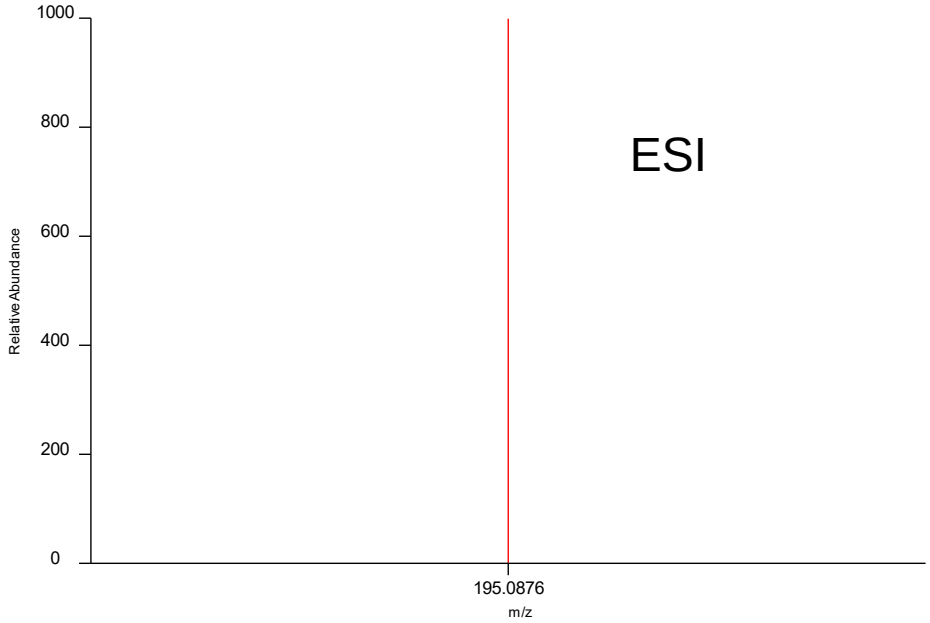
Spectrométrie de masse et techniques couplées

Une seule technique
Plusieurs technologies



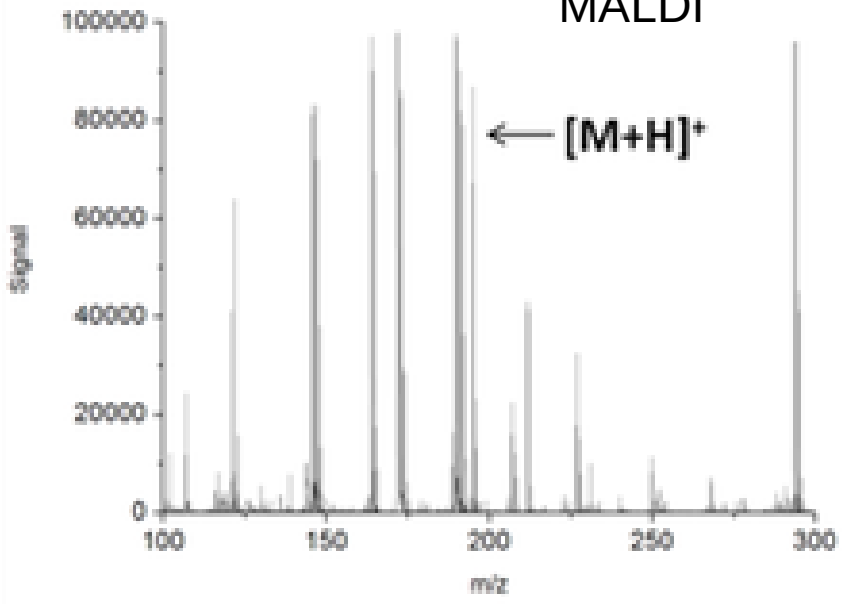


Electronic Impact



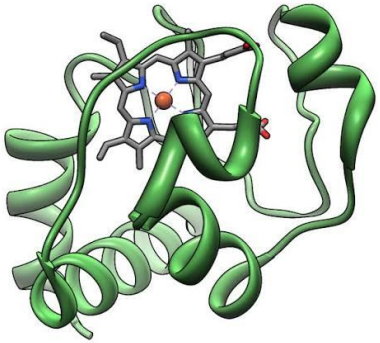
ESI

MALDI

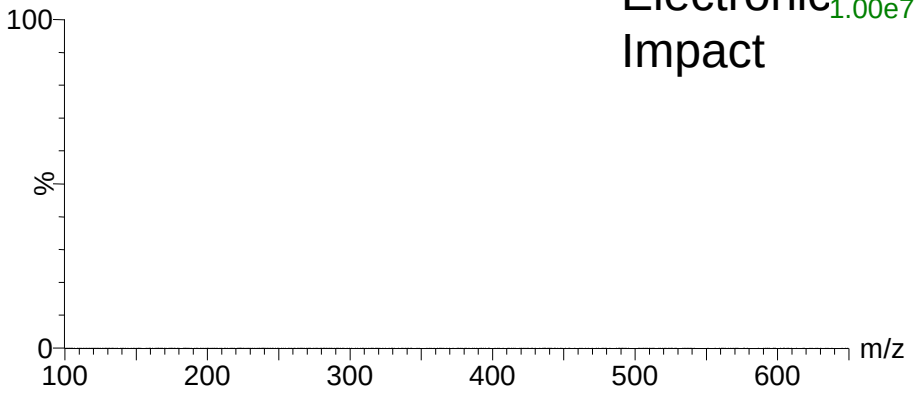


Spectrométrie de masse et techniques couplées

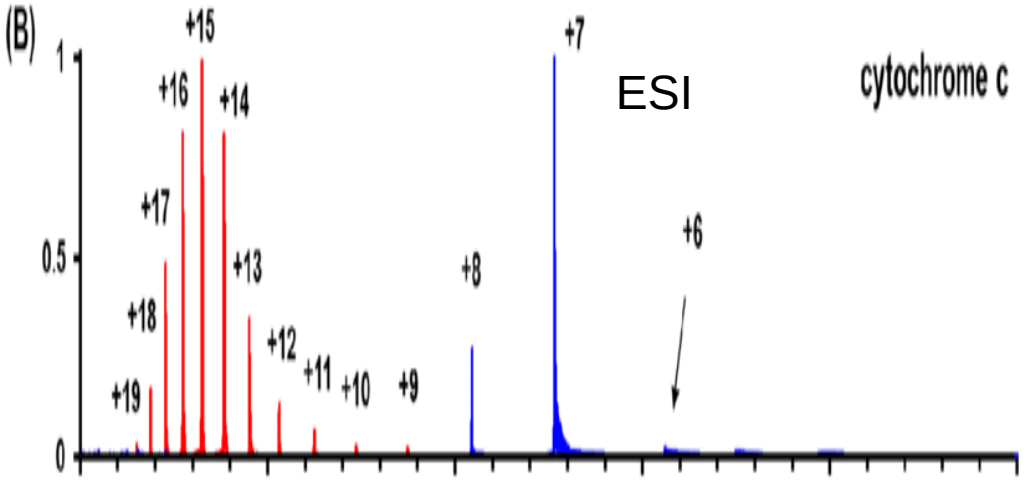
Une seule technique
Plusieurs technologies

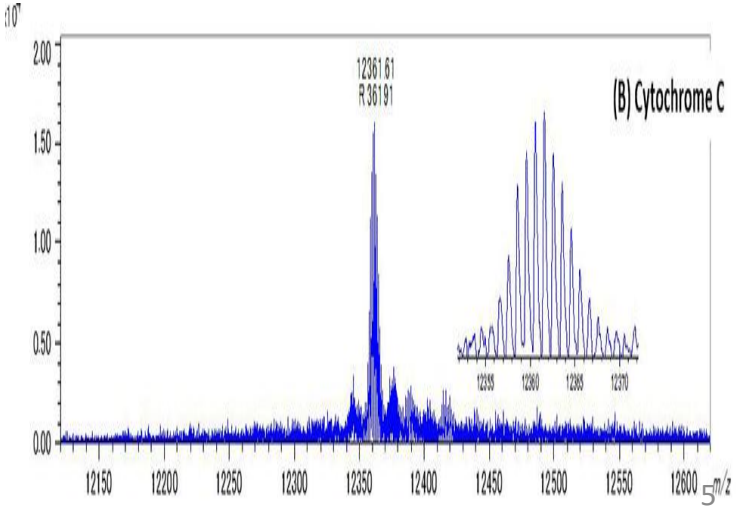


Electronic Impact



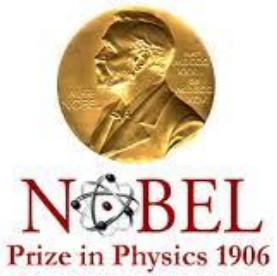
MALDI





Spectrométrie de masse et techniques couplées





- Une technique ancienne…

- **1897 Sir J.J. Thomson** (Laboratory of Cambridge) découvre l'électron et détermine son rapport m/z (Prix Nobel de physique)
- 1912 : spectres de masse de O2, N2, CO, CO2, COCl2 (JJ. Thomson)
- 1930 : Application de la MS à la chimie organique (R. Conrad)
- ….

- Mais très dynamique

Article citant « mass spectrometry »

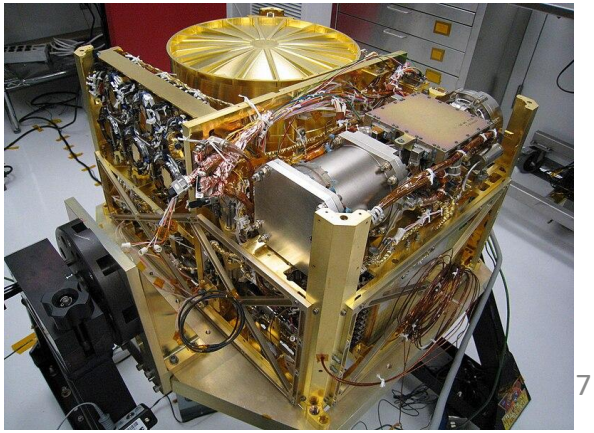
2001 : 6200 / 2011 : 16500 / 2021 : 28700

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Le saviez-vous ?

La spectrométrie de masse est aussi 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 (GCMS sur Mars)
- Détecter la présence de contaminants (pesticides/polluants) dans les aliments
- Etudier des mutations génétiques / Découvrir de nouveaux marqueurs pathologiques
- Analyser et dater des pièces archéologiques
- Suivre les processus de fermentation …



Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Les principes de la spectrométrie de masse
  - Masse moléculaire et isotopie
  - L'ionisation
  - La haute résolution et les analyseurs de masse
  - La fragmentation (MSMS)
  - Le couplage chromatographique
  - La quantification

Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Les principes de la spectrométrie de masse
  - Masse moléculaire et isotopie
  - L'ionisation
  - La haute résolution et les analyseurs de masse
  - La fragmentation (MSMS)
  - Le couplage chromatographique
  - La quantification

Principe 1 : Masse moléculaire et isotopie

Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Définition :

La spectrométrie de masse permet de mesurer le rapport masse sur charge d'un ion en phase en gazeuse (masse moléculaire)



- Comment passer du rapport m/z à la masse molaire voire à des infos structurales ?

Spectrométrie de masse et techniques couplées

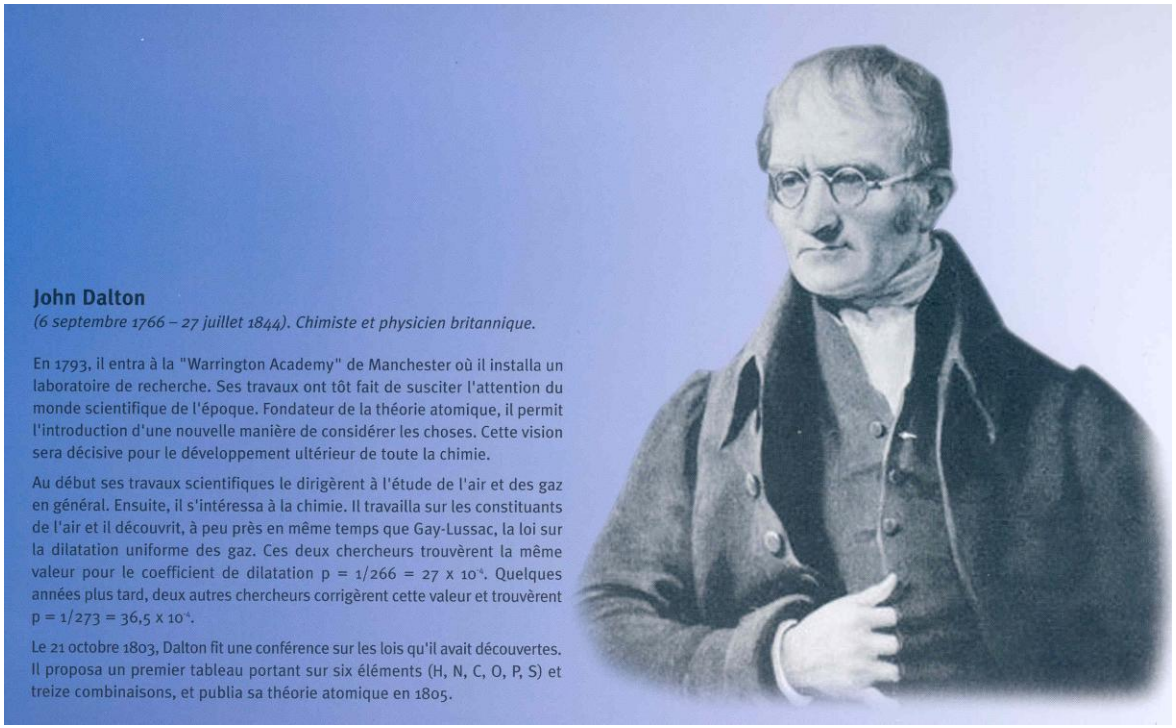
- Masse molaire vs masse moléculaire
  - Masse moléculaire : masse d'une molécule unique obtenue en faisant la somme des masses des éléments la composant (composition isotopique)
  - Masse molaire : masse d'une mole 6,022 140 76 × 10^{23} de molécules (moyenne des compositions isotopiques)

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Unité de mesure:

La masse moléculaire est exprimé en **unité de masse atomique unifiée** (uma ou amu) ou **Dalton** (Da) = 1/12 de la masse d'un atome de carbone 12

soit **<u>1,66 x 10^{-27} kg</u>**



John Dalton

(6 septembre 1766 – 27 juillet 1844). Chimiste et physicien britannique.

En 1793, il entra à la "Warrington Academy" de Manchester où il installa un laboratoire de recherche. Ses travaux ont tôt fait de susciter l'attention du monde scientifique de l'époque. Fondateur de la théorie atomique, il permit l'introduction d'une nouvelle manière de considérer les choses. Cette vision sera décisive pour le développement ultérieur de toute la chimie.

Au début ses travaux scientifiques le dirigèrent à l'étude de l'air et des gaz en général. Ensuite, il s'intéressa à la chimie. Il travailla sur les constituants de l'air et il découvrit, à peu près en même temps que Gay-Lussac, la loi sur la dilatation uniforme des gaz. Ces deux chercheurs trouvèrent la même valeur pour le coefficient de dilatation p = 1/266 = 27 x 10^{-4}. Quelques années plus tard, deux autres chercheurs corrigèrent cette valeur et trouvèrent p = 1/273 = 36,5 x 10^{-4}.

Le 21 octobre 1803, Dalton fit une conférence sur les lois qu'il avait découvertes. Il proposa un premier tableau portant sur six éléments (H, N, C, O, P, S) et treize combinaisons, et publia sa théorie atomique en 1805.

Spectrométrie de masse et techniques couplées

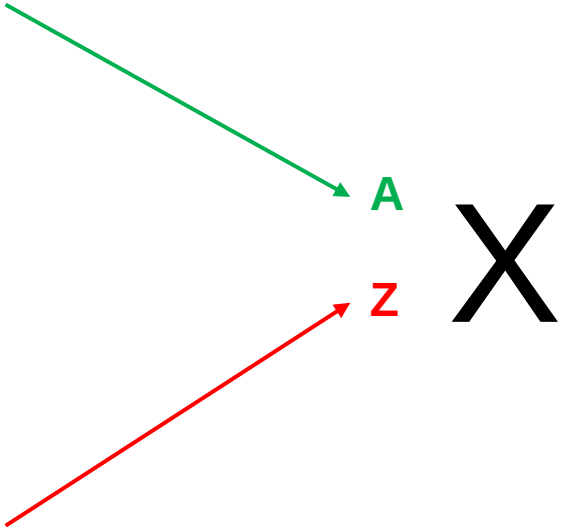
- Exemple H_2O
- Masse molaire : 18,01528 g/mol
- Masse d'une molécule $^{1}H_2{}^{16}O$: 18,01056 Da

- Et pour l'insuline ?
- Masse molaire : 5807.57 g/mol
- Masse moléculaire pour ^{1}H,^{16}O,^{12}C,^{14}N,^{32}S : 5803.63 Da

Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Back to basics

A : Nombre de masse, somme des protons et des neutrons



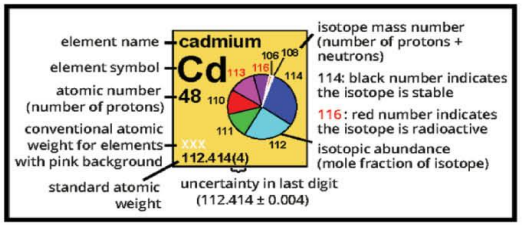
Z : Numéro atomique, nombre de proton dans le noyau : défini l'élément

IUPAC Periodic Table of the Elements and Isotopes

Element Background Color Key

Standard atomic weights are the best estimates by IUPAC of atomic weights that are found in normal materials, which are terrestrial materials that are reasonably possible sources for elements and their compounds in commerce, industry, or science. They are determined using all stable isotopes and selected radioactive isotopes (having relatively long half-lives and characteristic terrestrial isotopic compositions). Isotopes are considered stable (non-radioactive) if evidence for radioactive decay has not been detected experimentally.

- Element has two or more isotopes that are used to determine its standard atomic weight. The isotopic abundances and atomic weights vary in normal materials. These variations are well known, and the standard atomic weight is given as lower and upper bounds within square brackets, [ ]. Conventional atomic weight, such as for trade and commerce, is shown in white.
- Element has two or more isotopes that are used to determine its standard atomic weight. The isotopic abundances and atomic weights vary in normal materials, but upper and lower bounds of the standard atomic weight have not been assigned by IUPAC or the variations may be too small to affect the standard atomic weight value significantly. Thus, the standard atomic weight is given as a single value with an IUPAC assigned uncertainty that includes both measurement uncertainty and uncertainty due to isotopic abundance variations.
- Element has only one isotope that is used to determine its standard atomic weight. Thus, the standard atomic weight is invariant and is given as a single value with an IUPAC evaluated uncertainty.
- Element has no standard atomic weight because all of its isotopes are radioactive and, in normal materials, no isotope occurs with a characteristic isotopic abundance from which a standard atomic weight can be determined.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
hydrogen H 1 1.008 [1.007 84, 1.008 11]																	helium He 2 4.002 602(2)
lithium Li 3 6.94 [6.938, 6.997]	beryllium Be 4 9.012 1831(5)											boron B 5 10.81 [10.806, 10.821]	carbon C 6 12.011 [12.0096, 12.0116]	nitrogen N 7 14.007 [14.006 43, 14.007 28]	oxygen O 8 15.999 [15.999 03, 15.999 77]	fluorine F 9 18.998 403 163(6)	neon Ne 10 20.1797(6)
sodium Na 11 22.989 769 28(2)	magnesium Mg 12 24.306 [24.304, 24.307]											aluminium (aluminum) Al 13 26.981 5384(3)	silicon Si 14 28.085 [28.084, 28.086]	phosphorus P 15 30.973 761 998(5)	sulfur S 16 32.06 [32.059, 32.076]	chlorine Cl 17 35.45 [35.446, 35.457]	argon Ar 18 39.95 [39.792, 39.963]
potassium K 19 39.0983(1)	calcium Ca 20 40.078(4)	scandium Sc 21 44.955 908(5)	titanium Ti 22 47.867(1)	vanadium V 23 50.9415(1)	chromium Cr 24 51.9961(6)	manganese Mn 25 54.938 043(2)	iron Fe 26 55.845(2)	cobalt Co 27 58.933 194(3)	nickel Ni 28 58.6934(4)	copper Cu 29 63.546(3)	zinc Zn 30 65.38(2)	gallium Ga 31 69.723(1)	germanium Ge 32 72.630(8)	arsenic As 33 74.921 595(6)	selenium Se 34 78.971(8)	bromine Br 35 79.904 [79.901, 79.907]	krypton Kr 36 83.798(2)
rubidium Rb 37 85.4678(3)	strontium Sr 38 87.62(1)	yttrium Y 39 88.905 84(1)	zirconium Zr 40 91.224(2)	niobium Nb 41 92.906 37(1)	molybdenum Mo 42 95.95(1)	technetium Tc 43	ruthenium Ru 44 101.07(2)	rhodium Rh 45 102.905 49(2)	palladium Pd 46 106.42(1)	silver Ag 47 107.8682(2)	cadmium Cd 48 112.414(4)	indium In 49 114.818(1)	tin Sn 50 118.710(7)	antimony Sb 51 121.760(1)	tellurium Te 52 127.60(3)	iodine I 53 126.904 47(3)	xenon Xe 54 131.293(6)
caesium (cesium) Cs 55 132.905 451 96(6)	barium Ba 56 137.327(7)	57 - 71 * lanthanoids	hafnium Hf 72 178.49(2)	tantalum Ta 73 180.947 88(2)	tungsten W 74 183.84(1)	rhenium Re 75 186.207(1)	osmium Os 76 190.23(3)	iridium Ir 77 192.217(2)	platinum Pt 78 195.084(9)	gold Au 79 196.966 570(4)	mercury Hg 80 200.592(3)	thallium Tl 81 [204.382, 204.385]	lead Pb 82 207.2(1)	bismuth Bi 83 208.980 40(1)	polonium Po 84	astatine At 85	radon Rn 86
francium Fr 87	radium Ra 88	89 - 103 ‡ actinoids	rutherfordium Rf 104	dubnium Db 105	seaborgium Sg 106	bohrium Bh 107	hassium Hs 108	meitnerium Mt 109	darmstadtium Ds 110	roentgenium Rg 111	copernicium Cn 112	nihonium Nh 113	flerovium Fl 114	moscovium Mc 115	livermorium Lv 116	tennessine Ts 117	oganesson Og 118

*	lanthanum La 57 138.905 47(7)	cerium Ce 58 140.116(1)	praseodymium Pr 59 140.907 68(1)	neodymium Nd 60 144.242(3)	promethium Pm 61	samarium Sm 62 150.36(2)	europium Eu 63 151.964(1)	gadolinium Gd 64 157.25(3)	terbium Tb 65 158.925 354(8)	dysprosium Dy 66 162.500(1)	holmium Ho 67 164.930 328(7)	erbium Er 68 167.259(3)	thulium Tm 69 168.934 218(6)	ytterbium Yb 70 173.045(10)	lutetium Lu 71 174.9668(1)
‡	actinium Ac 89	thorium Th 90 232.0377(4)	protactinium Pa 91 231.035 88(1)	uranium U 92 238.028 91(3)	neptunium Np 93	plutonium Pu 94	americium Am 95	curium Cm 96	berkelium Bk 97	californium Cf 98	einsteinium Es 99	fermium Fm 100	mendelevium Md 101	nobelium No 102	lawrencium Lr 103

IUPAC

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

www.tableofisotopes.com

Values are the latest IUPAC values as of October 2018

The Periodic Table of the Elements and Isotopes: Copyright Sara Glidewell 2016-2018

Spectrométrie de masse et techniques couplées

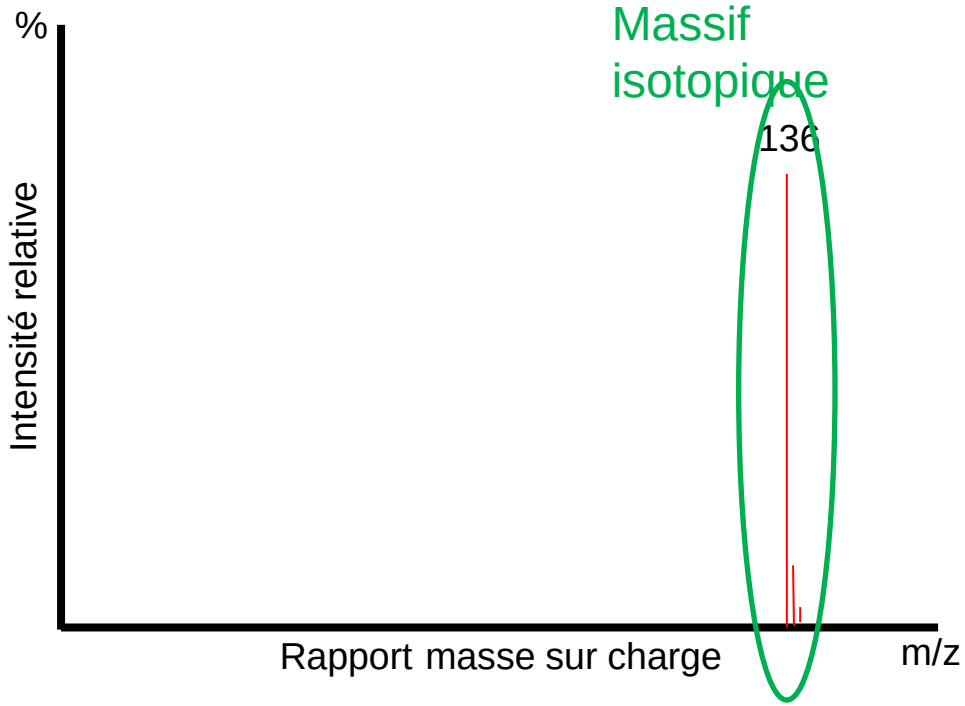
Isotopes : Un élément est souvent constitué de plusieurs isotopes présents dans diverses proportions nommées abondance.

Elément	Masse atomique	Nucléide	Masse Exacte	Abondance relative %
H	1,00797	^{1}H D	1,00783 2,01410	99,985 0,0151
C	12,01115	^{12}C ^{13}C	12,00000 13,00336	98,90 1,10
N	14,0067	^{14}N ^{15}N	14,0031 15,0001	99,63 0,37
O	15,9994	^{16}O ^{17}O ^{18}O	15,9949 16,9991 17,9992	99,76 0,04 0,20
P	30,974	^{31}P	30,974	100

Une molécule => plusieurs isotopologues

Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Ce que l'on observe : massif isotopique

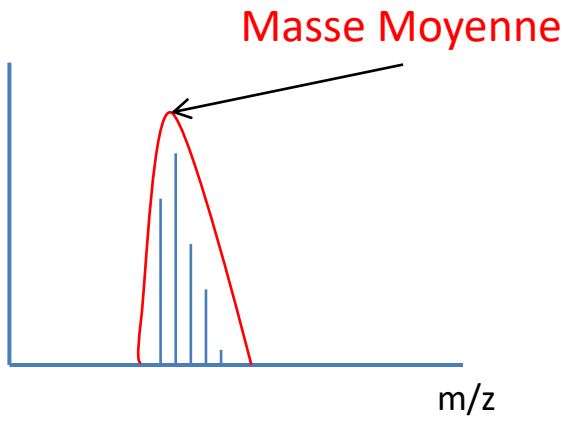


Spectrométrie de masse et techniques couplées

Quelle masse mesure-t-on?

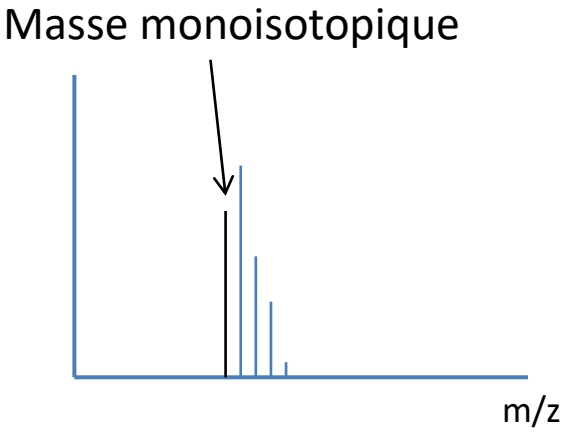
✓*Masse chimique ou moyenne:*

C'est le barycentre (centroïde) 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; …).



✓*Masse monoisotopique:*

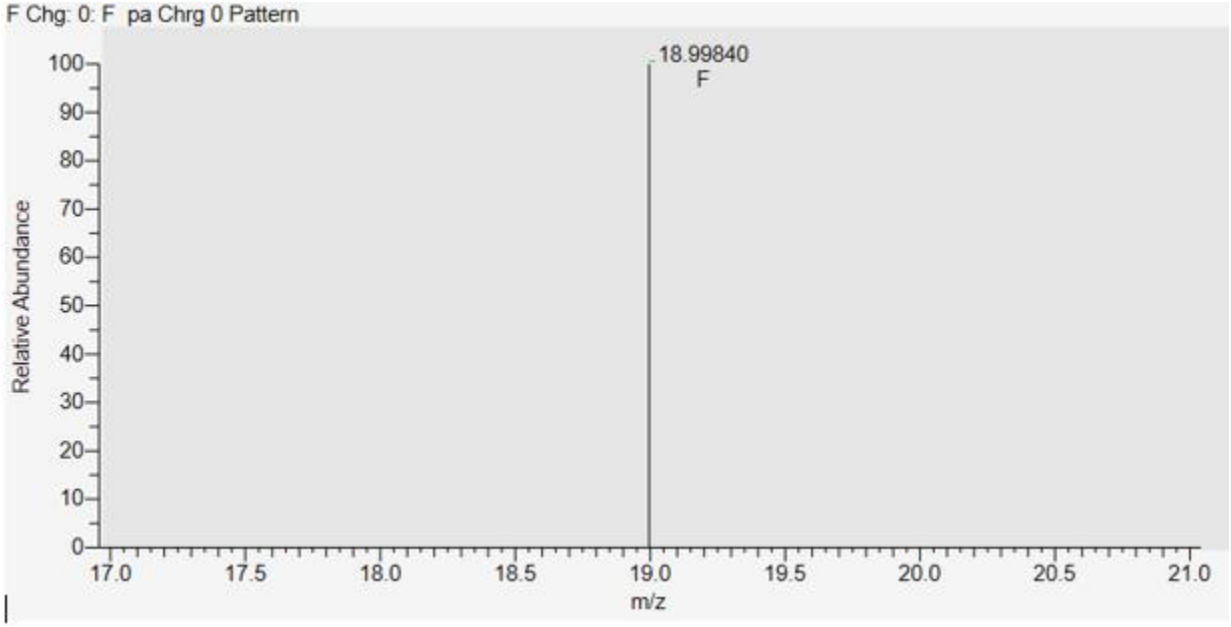
C'est la masse du premier pic du profil isotopique, c'est-à-dire celle qui ne prend en compte que les masses des isotopes les plus stables (H^1, C^{12}, O^{16}, S^{32}, N^{14}, …).



Le massif isotopique des éléments

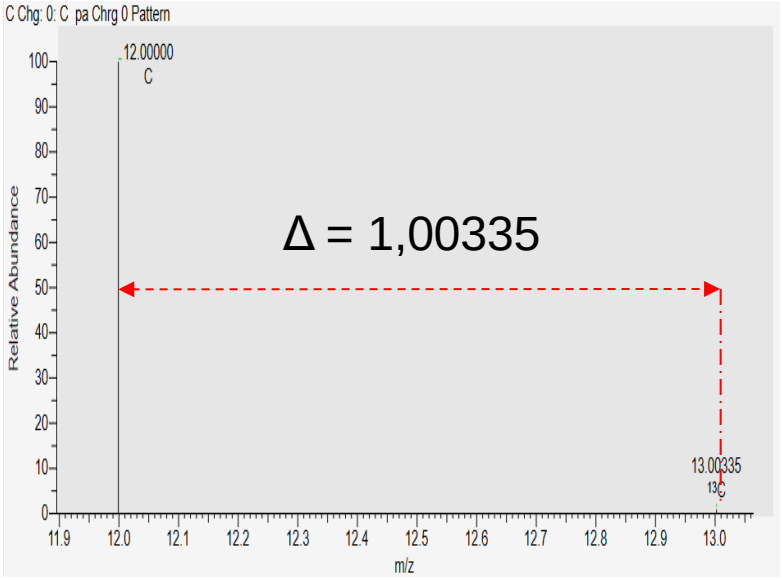
- Massif isotopique de type A (F, P, I, …)
- Massif isotopique de type A+1 (C, N, H, …)
- Massif isotopique de type A+2 (O, S, Cl, Br, …)
- Massif isotopique complexe A+n (Zn, Se, Pt, …)

Massif isotopique de type A

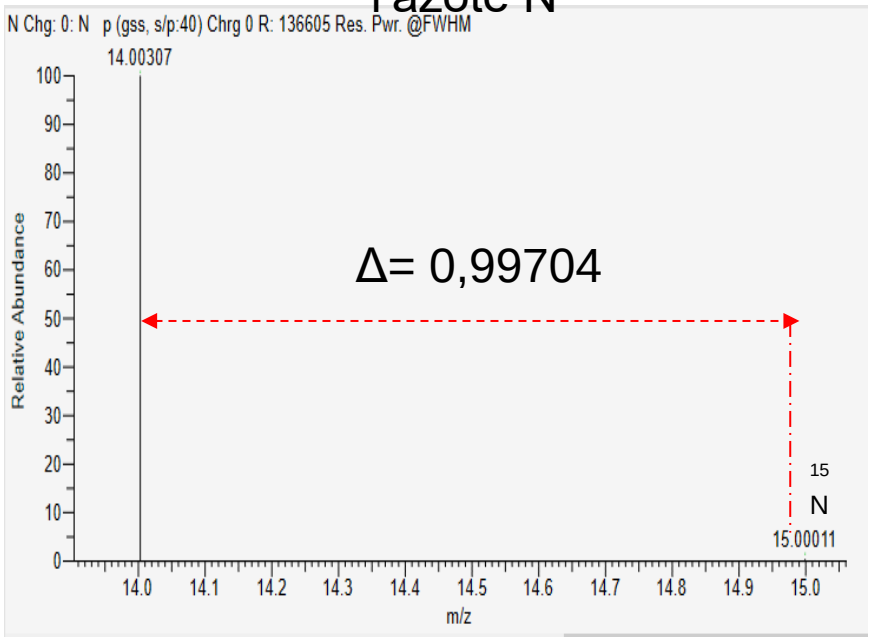


Massif isotopique de type A+1

- Cas du carbone C^+



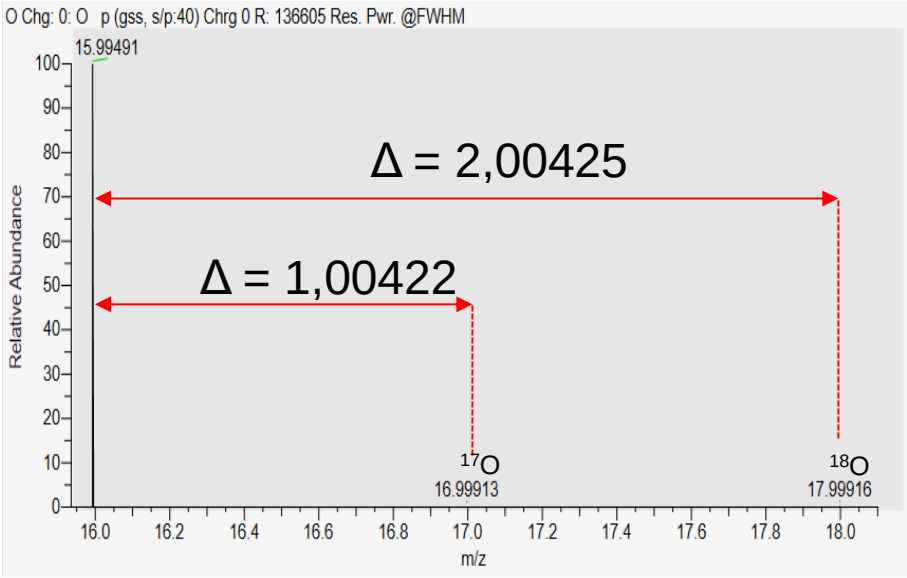
- Cas de l'azote N^+



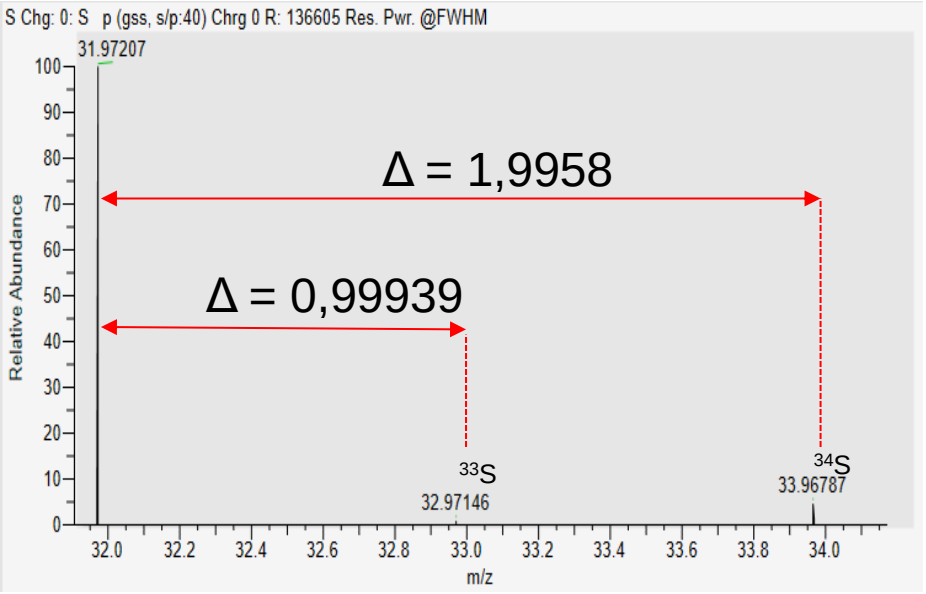
Spectrométrie de masse et techniques couplées

Massif isotopique de type A+2

Cas du carbone $O^{+\bullet}$



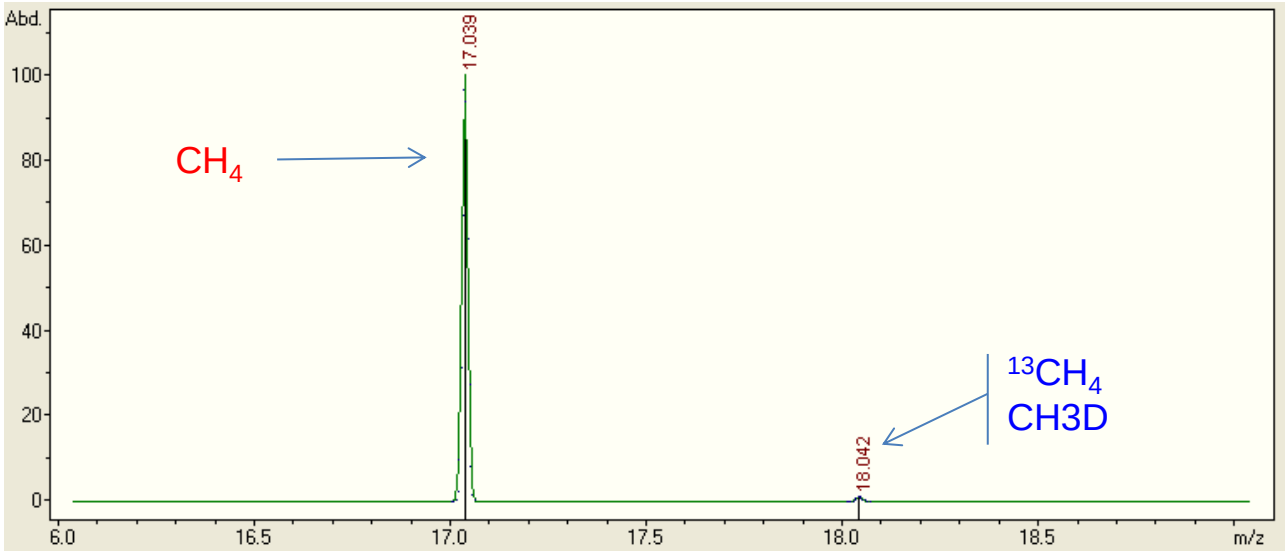
Cas du souffre $S^{+\bullet}$



Spectrométrie de masse et techniques couplées

Plusieurs éléments différents

CH_4	→	M/z = 17	100 %
$^{13}CH_4$	→	M/z = 18	1,1 %
CH_3D	→	M/z = 18	
$^{13}CH_3D$	→	M/z = 19	1,1% x 0,01%

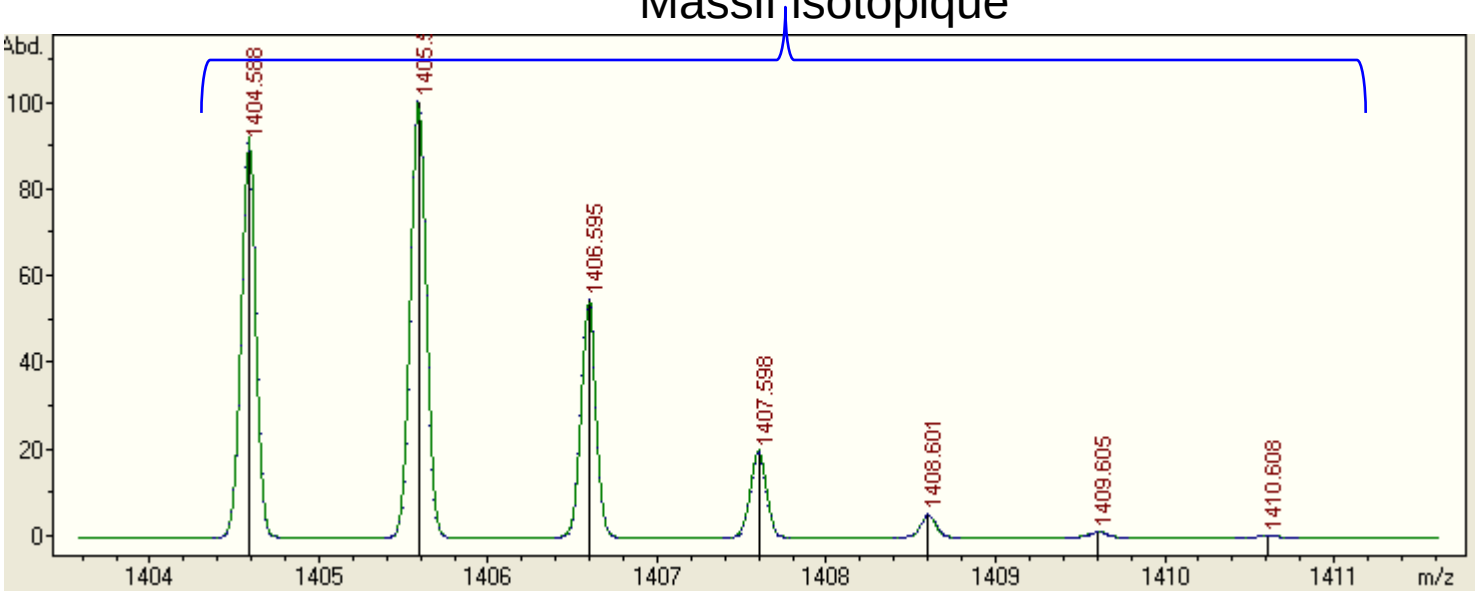


Spectrométrie de masse et techniques couplées

Cas des isotopes de faible abondance:

$C_{100}H_{202}$	→	m/z = 1404,5	90,5 %
$^{13}CC_{99}H_{202}$; $C_{100}H_{201}D$	→	m/z = 1405,5	**100 %**
$^{13}C_2C_{98}H_{202}$; $^{13}C_1C_{98}H_{201}D$; $C_{100}H_{200}D_2$	→	m/z = 1406,5	54,7 %
$^{13}C_3C_{97}H_{202}$; $^{13}C_2C_{98}H_{201}D$; $^{13}CC_{99}H_{200}D_2$; $C_{100}H_{200}D_3$	→	m/z = 1407,5	19,7 %

Massif isotopique

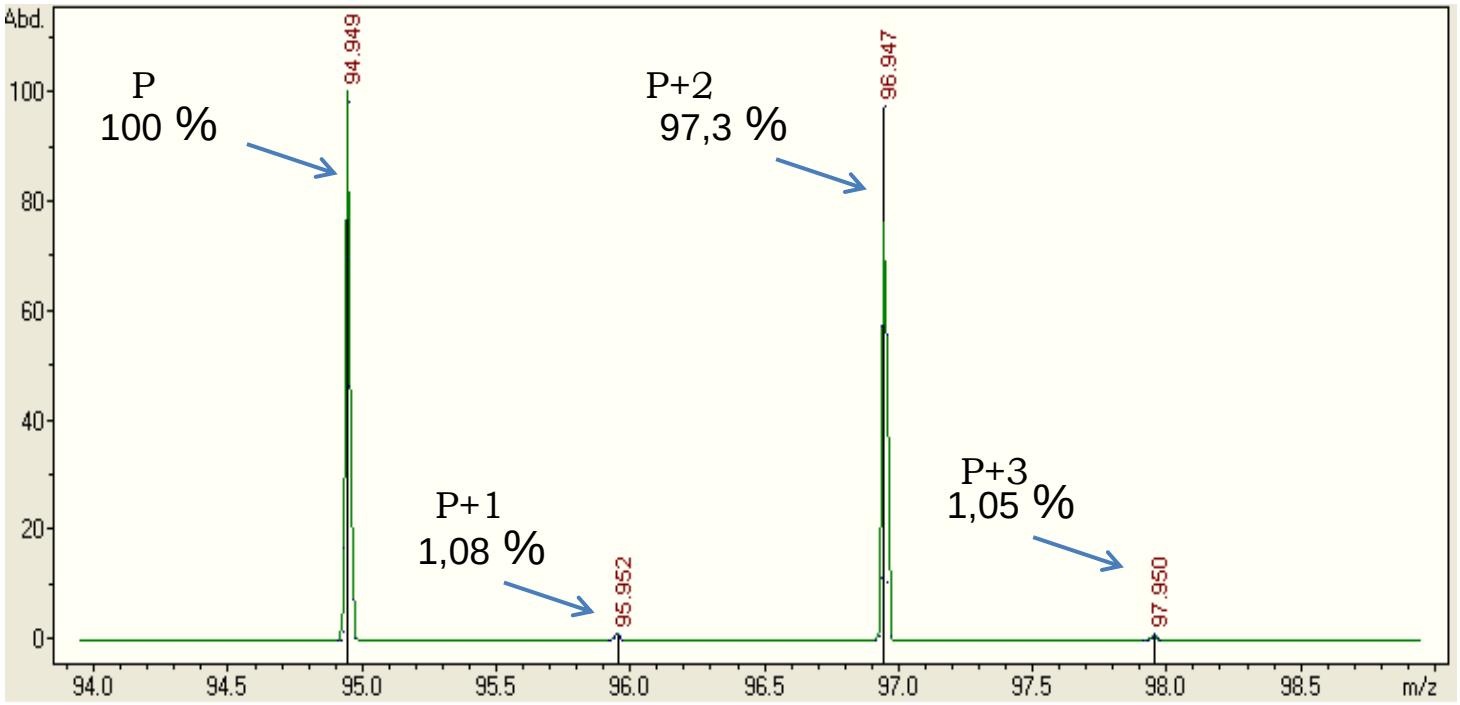


Spectrométrie de masse et techniques couplées

Cas des isotopes abondants (Cl et Br) : exemple 1

Brome a deux isotopes ^{79}Br (50,69 %) et ^{81}Br (49,31 %)

CH_3Br $M_{monoisotopique}$ = 93,9 g/mol $M_{moyenne}$ = 94,9 g/mol

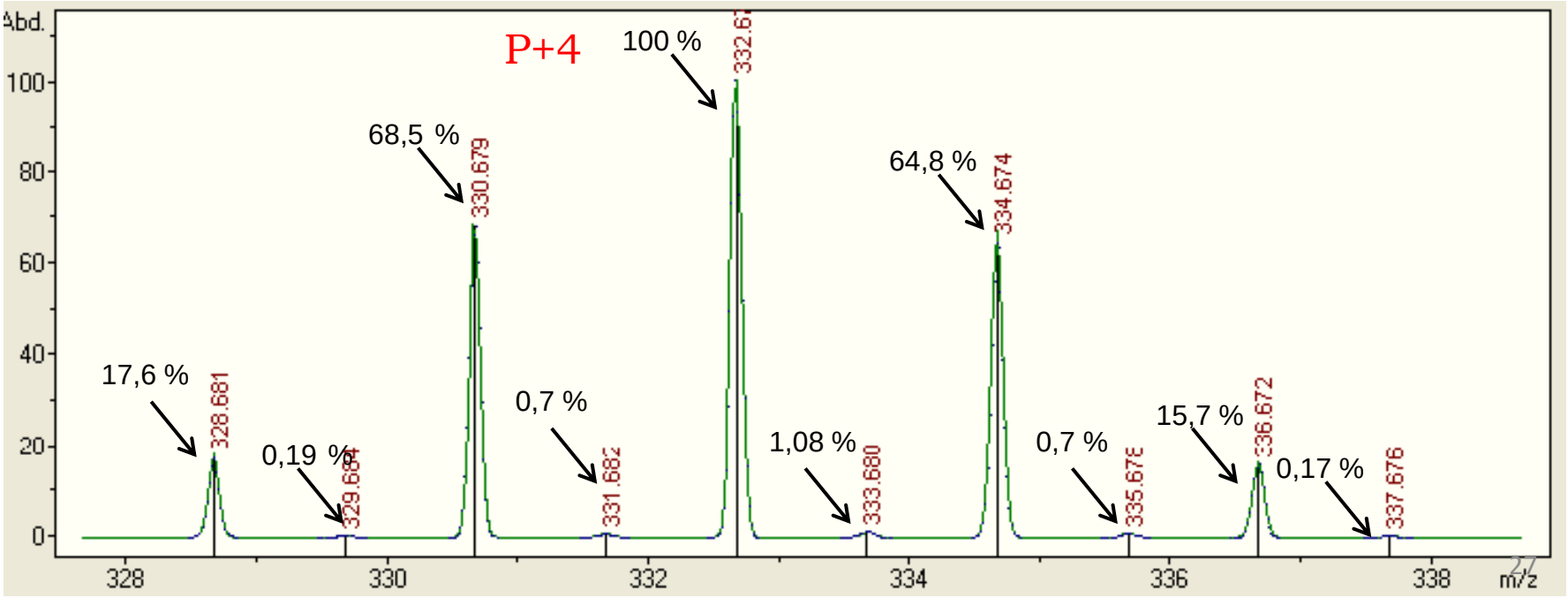


Spectrométrie de masse et techniques couplées

Cas des isotopes abondants: exemple 2

Brome a deux isotopes ^{79}Br (100 %) et ^{81}Br (97,3 %)

CBr_4 $M_{monoisotopique} = 327,7$ g/mol $M_{moyenne} = 331,6$ g/mol



Principe 2 : L'ionisation

Comment peser une molécule ?

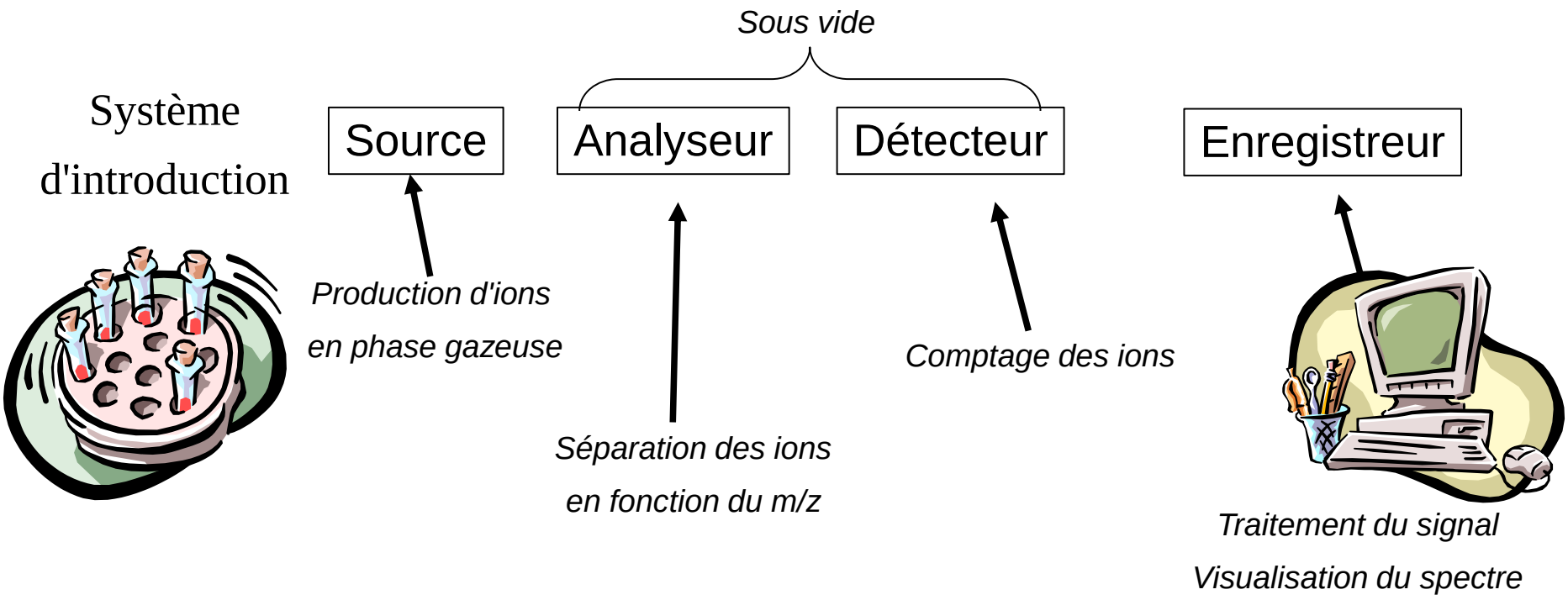
- Travailler en phase gazeuse où les molécules sont isolées
- Travailler avec des molécules chargées (ions)
- Utiliser les propriétés reliant :

Énergie / Trajectoire / Masse

- Travailler dans des champs électriques ou magnétiques

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Le spectrométre de masse doit **transformer des molécules dans leur état naturel (matière condensé) en ions à l'état gazeux** et d'obtenir leur mase moléculaire m en mesurant leur **rapport masse / charge, noté m/z**, où z est la charge de l'ion.



Les sources d'ionisations

Deux parties essentielles :

La source d'ion : pour volatiliser et ioniser

Ces opérations peuvent se faire simultanément ou successivement selon le type de source d'ions. Leur mécanisme précis est souvent mal connu.

L'analyseur : pour mesurer m/z

Il mesure les valeurs du rappor m/z

C'est une partie de l'appareil où règne un vide suffisant pour que le libre parcours moyen des ions soit supérieur à la distance à parcourir dans l'appareil pour atteindre le détecteur.

Spectrométrie de masse et techniques couplées

- 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
  - sa labilité chimique
  - 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)

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Deux grandes familles : sources « dures » et sources « douces »

- Les « ionisations dures » génèrent souvent des ions moléculaires 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 qui sont relativement stables et qui ont des durées de vie suffisantes pour traverser l'analyseur, arriver jusqu'au détecteur, et donc être mesurés

Spectrométrie de masse et techniques couplées

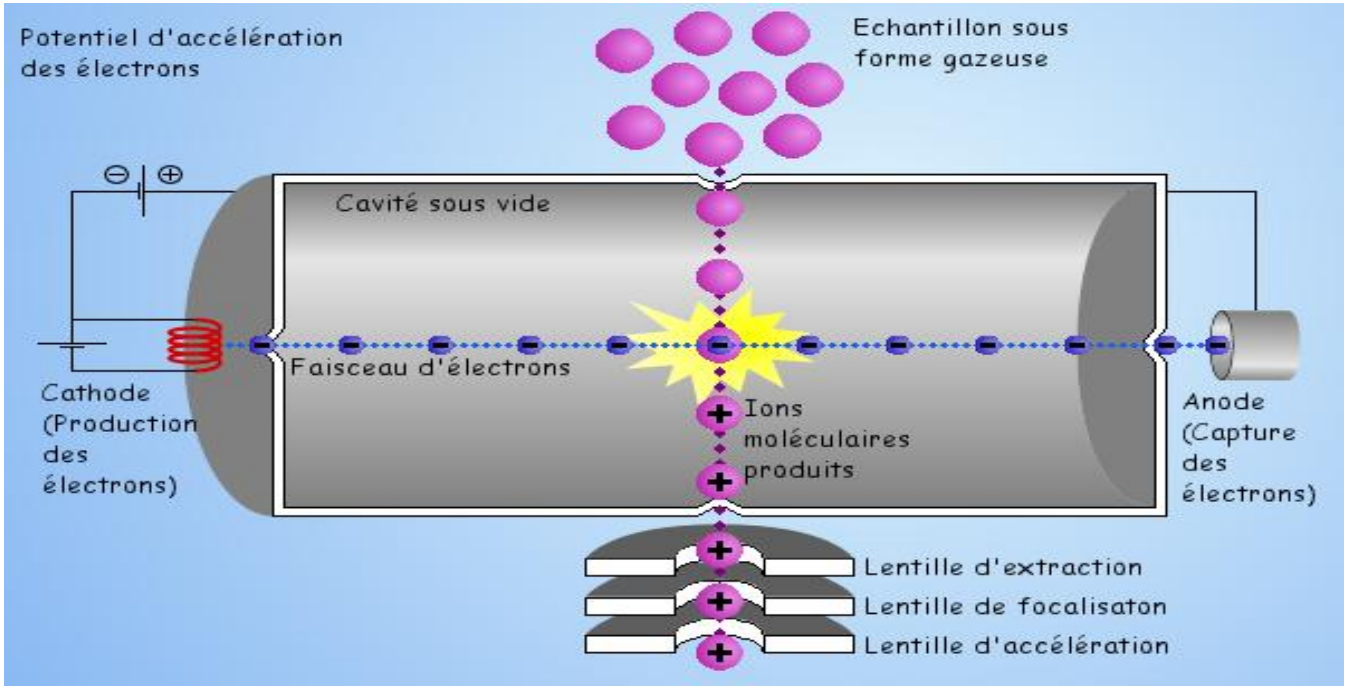
- Liste (non exhaustive) :
  - ESI : ElectroSpray Ionization
  - EI : Electronic Impact
  - CI : Chemical Ionization

« Dures »

  - APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
  - MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation
  - DESI : Desorption ElectroSpray Ionization
  - ASAP : Atmospheric Solid Analysis Probe
  - …

Spectrométrie de masse et techniques couplées

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

Spectrométrie de masse et techniques couplées

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

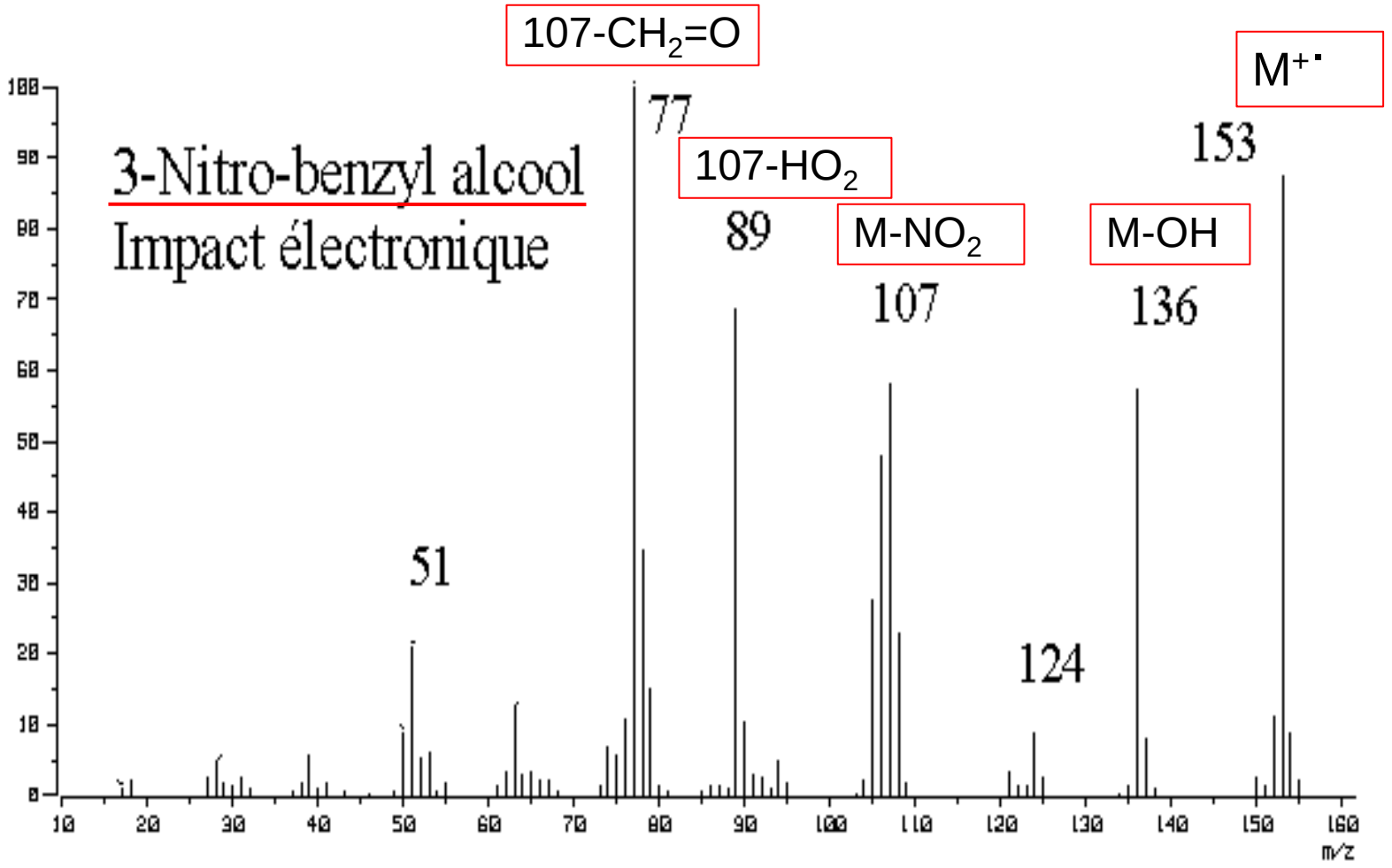
- E>70 eV: le courant ionique atteint un seuil et beaucoup de fragmentations secondaires difficiles à interpréter

Malgré cela, dans les conditions classiques :

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

Spectrométrie de masse et techniques couplées

L'impact électronique (EI)



Spectrométrie de masse et techniques couplées

L'impact électronique (EI)

Avantages :

- Fragmentation reproductible
- Accès à des bases de données (NIST contient environ 347 000 composés)
- Couplage avec la chromatographie gaz (GCMS)

Applications

- Composés volatiles (parfums, cosmétiques, pétrole, produits naturels, huiles essentielles…)
- Molécules de faible poids moléculaires (<1000Da)

Spectrométrie de masse et techniques couplées
L'impact électronique (EI)

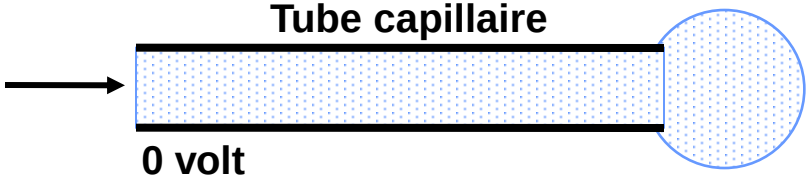
En résumé

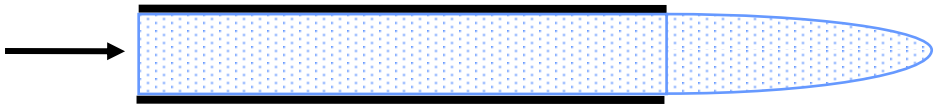
- Composé de faible masse et volatile
- Radicalaire $M^{+\circ}$
- Très énergétique
- Nombreux fragments
- Ions moléculaires parfois absents
- Accès à des bases de données

Spectrométrie de masse et techniques couplées

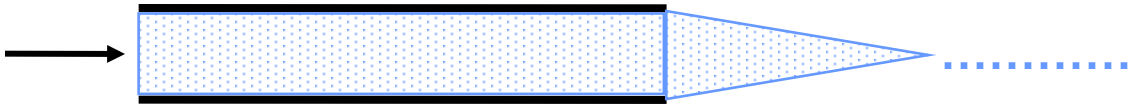
L'electrospray (ESI)

Débit imposé par une pompe à p atm

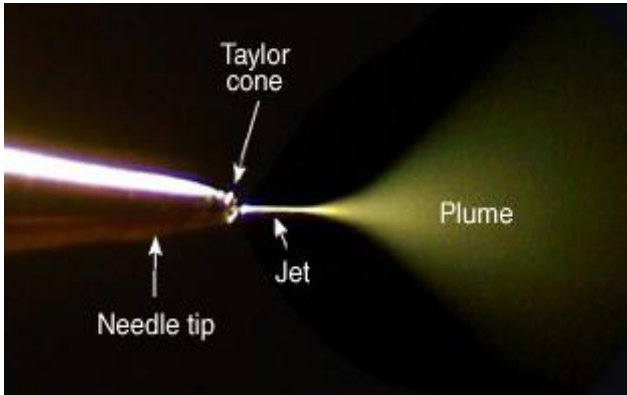




Effet de pointe qui entraîne la déformation du liquide en gouttelettes chargées



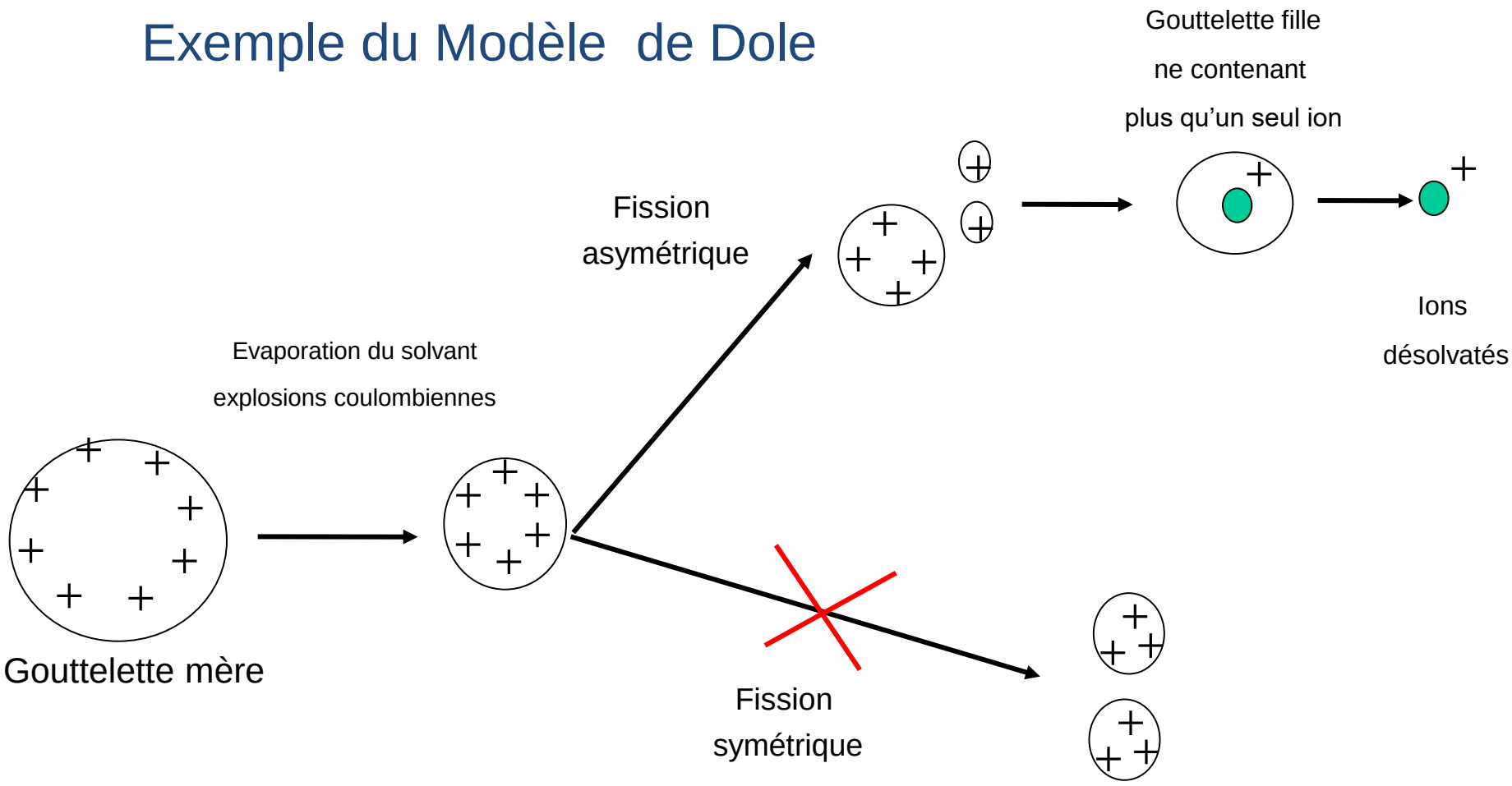
Emission d'un spray visible à la loupe. Ces gouttelettes expulsées sèchent, entament des fissions, et génèrent des ions désolvatés



Spectrométrie de masse et techniques couplées

L'electrospray (ESI)

Exemple du Modèle de Dole



Spectrométrie de masse et techniques couplées

- La molécule a été ionisée grâce à la perte ou au gain d'un proton. On observe l'ion $[M + H]^+$ en positif ou $[M - H]^-$ en négatif.

- La masse moléculaire est déduite du rapport m/z du pic moléculaire.

Si l'ion observé, en mode, positif a une masse de m/z = 327g/mol, la masse moléculaire du produit sera :

$[M + H]^+ = 327$ → $M = 327 - H = 327 -1 = 326$ g/mol

- Formations possible d'adduits $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+HCOO]^-$

- Formations possible d'ions multichargés $[M+nH]^{n+}$ ou $[M-nH]^{n-}$

Spectrométrie de masse et techniques couplées

L'electrospray (ESI)

Avantages :

- Fonctionne à basse T°C, à pression atmosphérique, peu de dégradation, peu de fragmentation
- Formation d'ion pseudo-moléculaires [M+H]+ ou [M-H]-
- Sensibles
- Formation d'ions multichargées
- Couplage Chromatographie liquide
- Large gamme de masse analysable

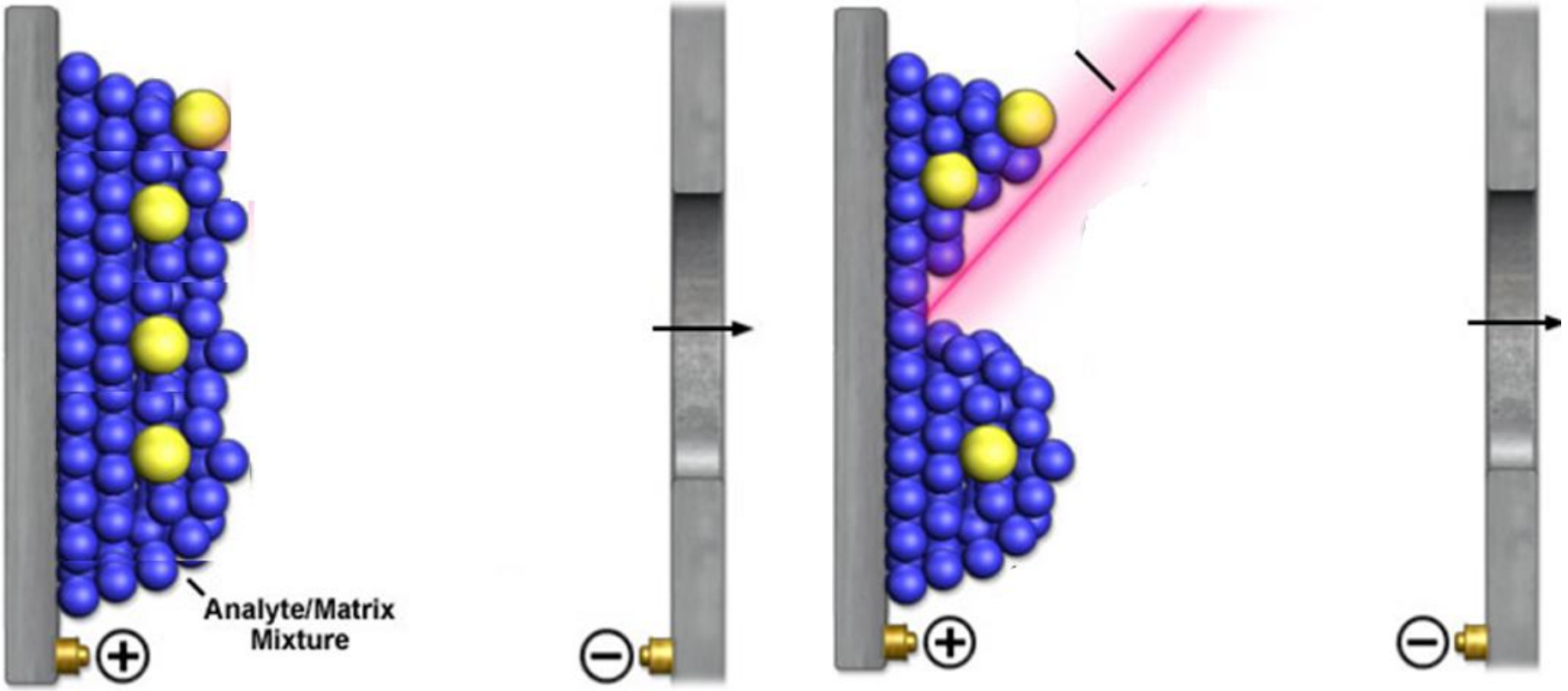
Applications

- Molécules polaires
- Biomolécules
- Polymères
- Solvants compatibles : Eau, Alcools, Acetonitrile

Spectrométrie de masse et techniques couplées

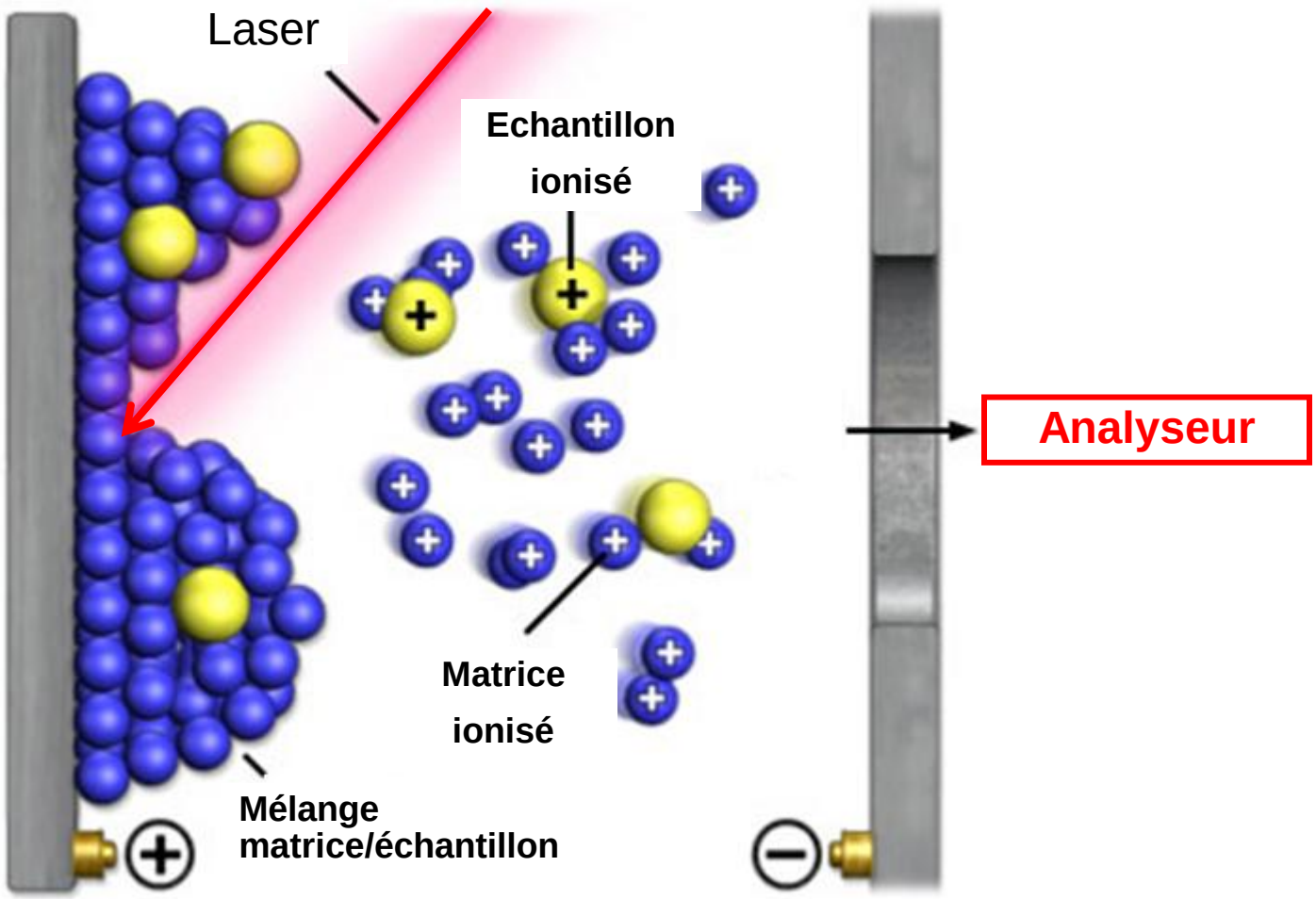
MALDI

- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization



Spectrométrie de masse et techniques couplées

MALDI



Spectrométrie de masse et techniques couplées

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

$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$

$[M-H]^-$

Spectrométrie de masse et techniques couplées

MALDI

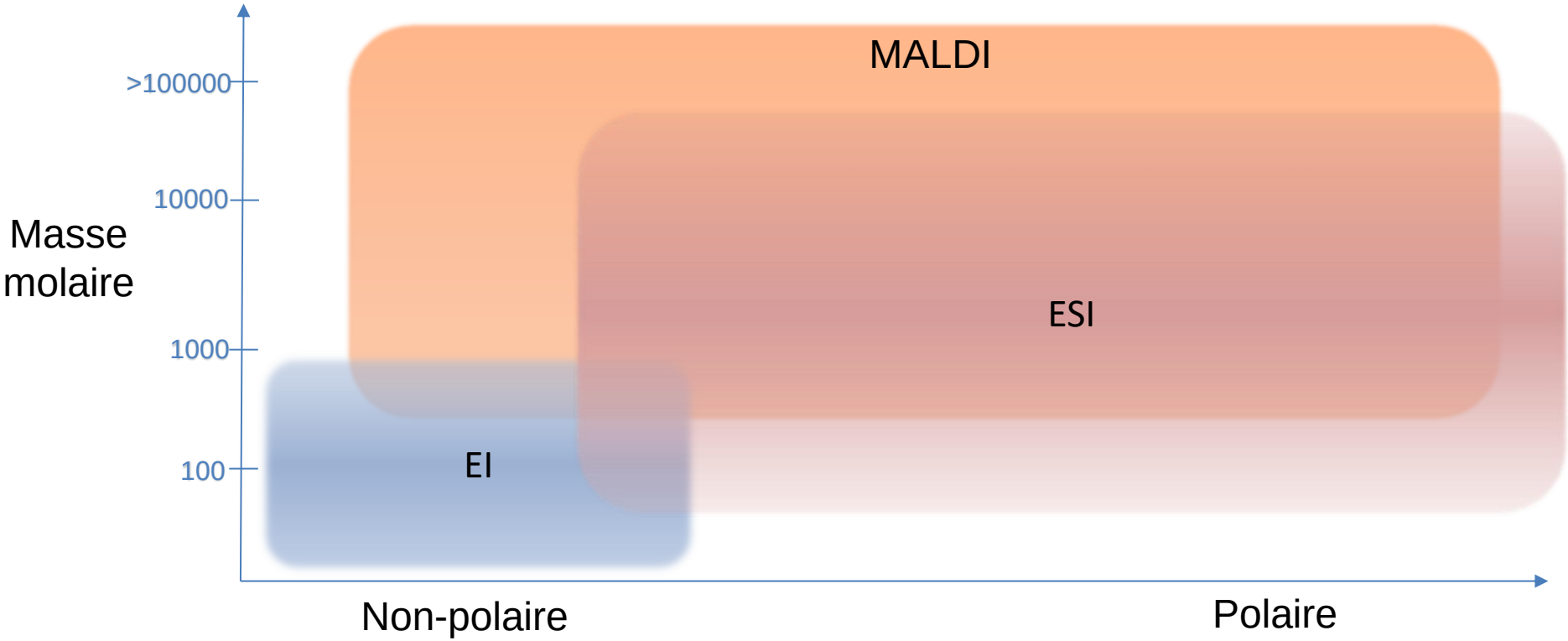


Dépôt d'un échantillon

(1 µl)

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Les sources



Spectrométrie de masse et techniques couplées

	EI	ESI	MALDI
Energie	++++	+	++
Masse molaire max	1000	500 000	1 000 000
Polarité	Positif	Pos/neg	Pos/neg
Type d'ions	$M^{+\circ}$	$[M+H]^+$ $[M+X]^+$ $[M-H]^-$	$[M+H]^+$ $[M+X]^+$ $[M-H]^-$
Ions multichargées	Non	Oui $[M+xH]^{x+}$ $[M-xH]^{x-}$	Non
Pression	Vide	PA	Vide
Fragments	Oui	Non	Non
Solvants usuels	Hexane CHCl3 MeOH	Eau MeOH Acetonitrile	CHCl3 Eau MeOH Acetonitrile

Principe 3 : La haute résolution et les analyseurs de masse

Spectrométrie de masse et techniques couplées

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)

OT : Piège à ion orbitalaire (Orbitrap)

TOF : Mesure d'un temps de vol (Time Of Flight)

FT-ICR : Résonnance Cyclotronique d'Ions à Transformée de Fourrier

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).

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

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"

Spectrométrie de masse et techniques couplées

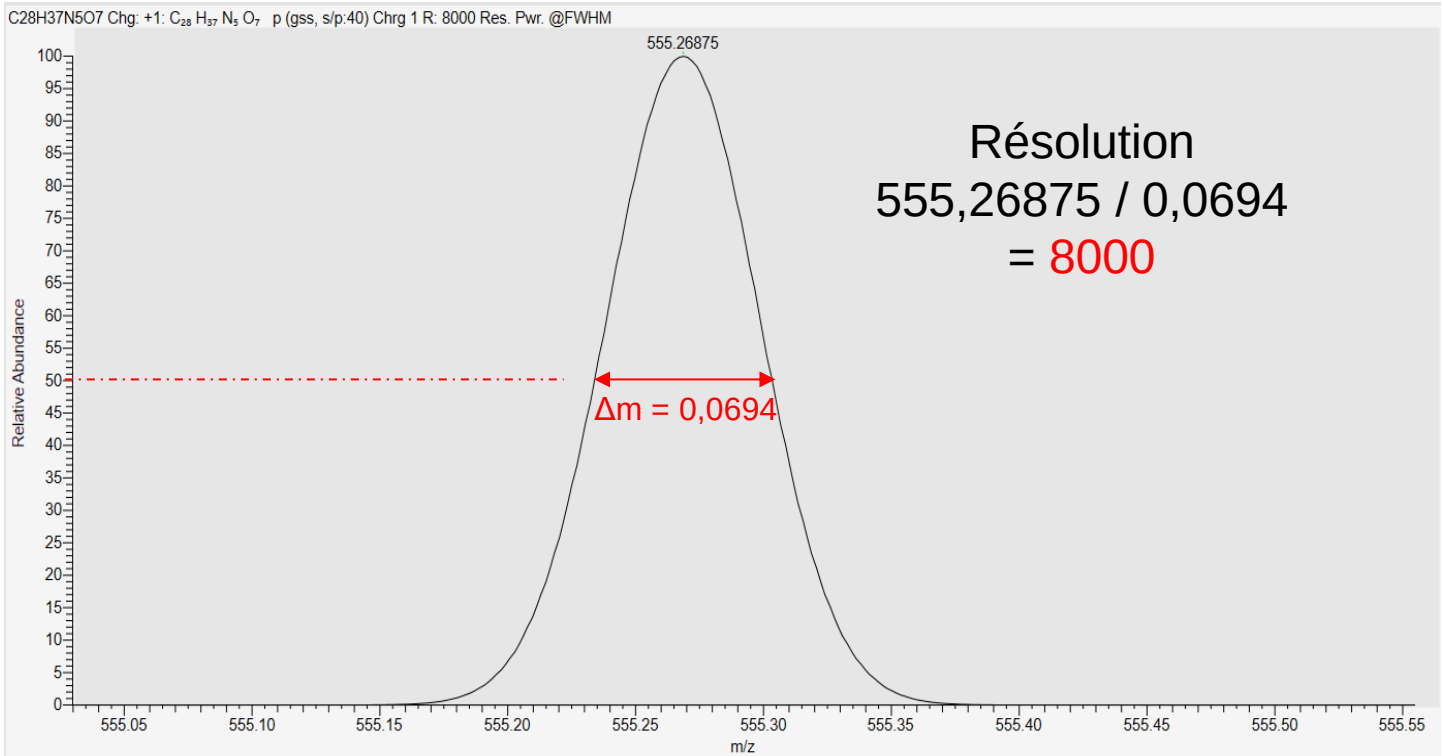
La résolution

Un paramètre important : la résolution des analyseurs

- Définition IUPAC $R = \frac{M}{\Delta m}$

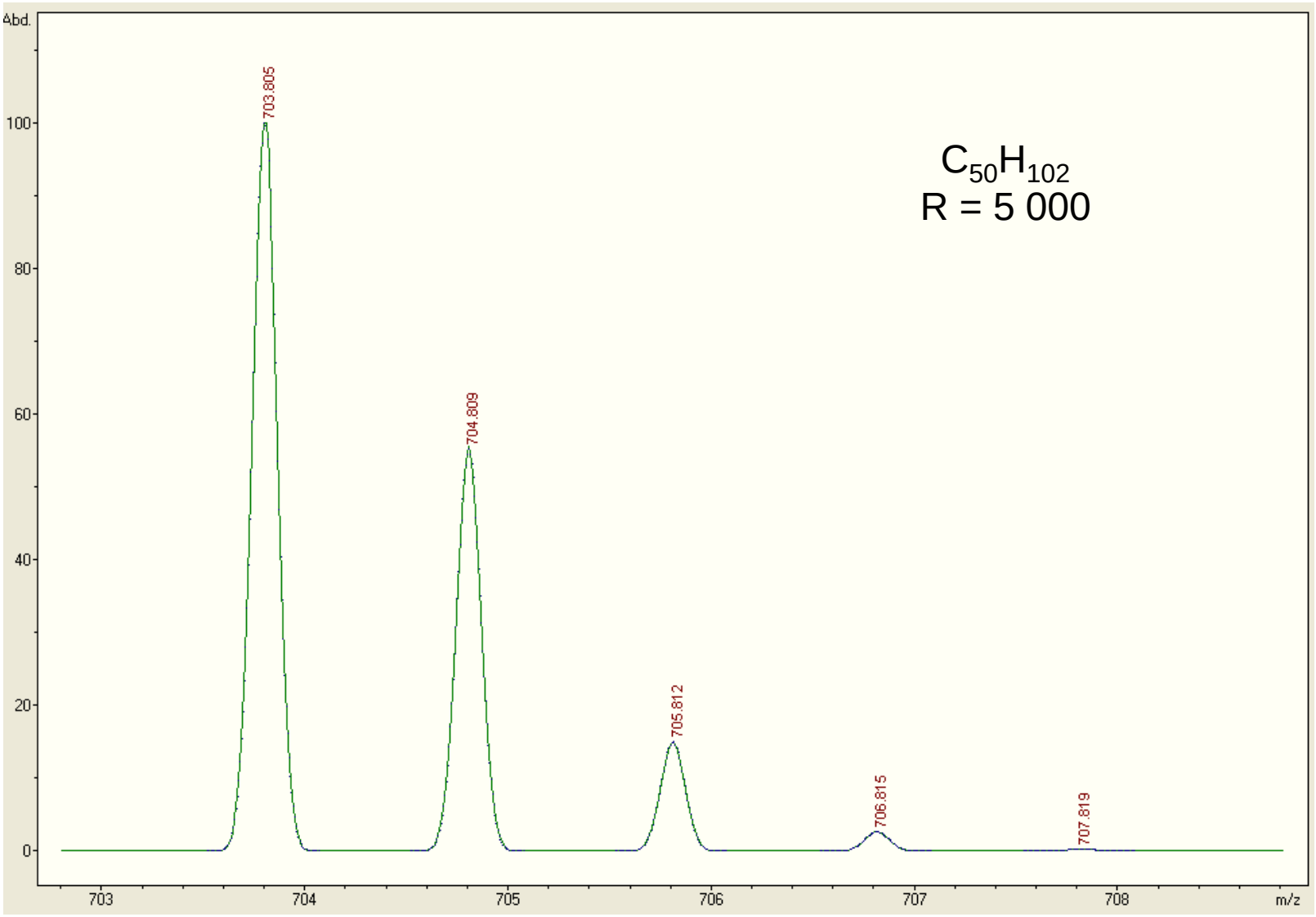
M = masse de l'ion observé

Δm= largeur du signal à mis hauteur



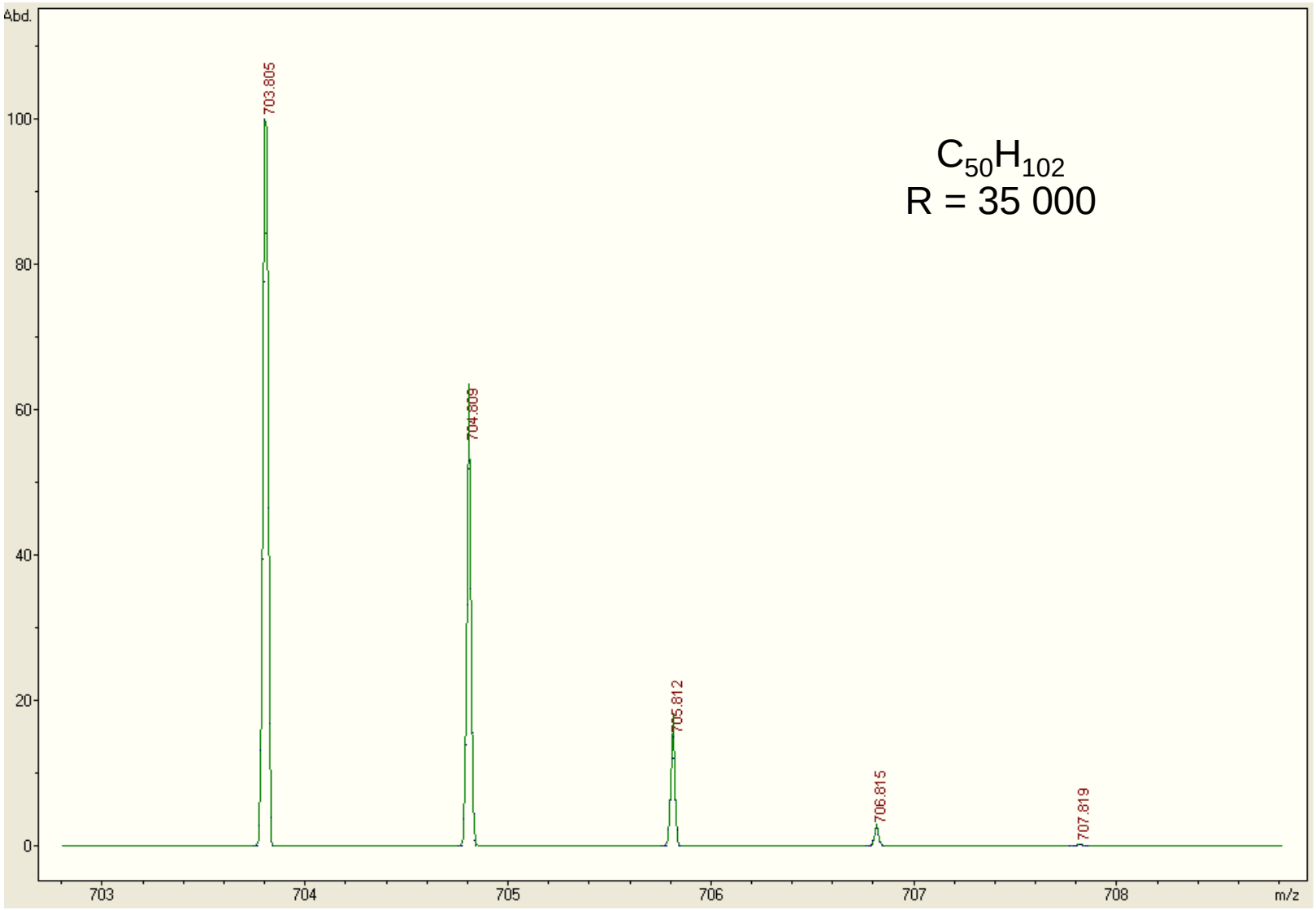
Spectrométrie de masse et techniques couplées

La résolution



Spectrométrie de masse et techniques couplées

La résolution



Spectrométrie de masse et techniques couplées

La résolution

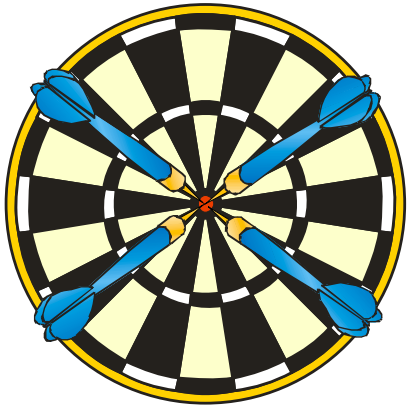
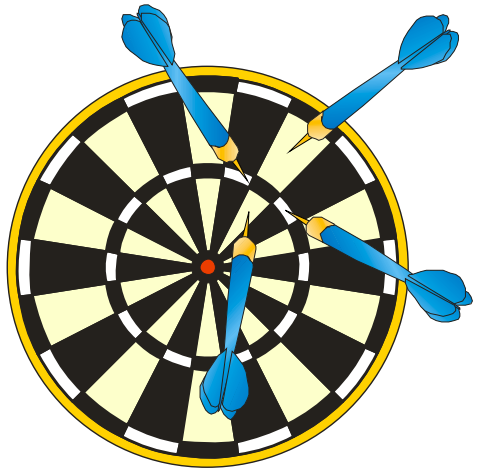
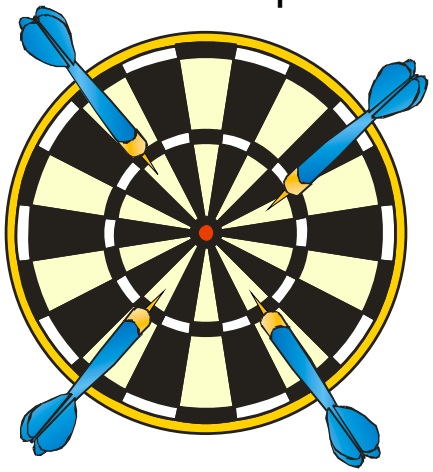
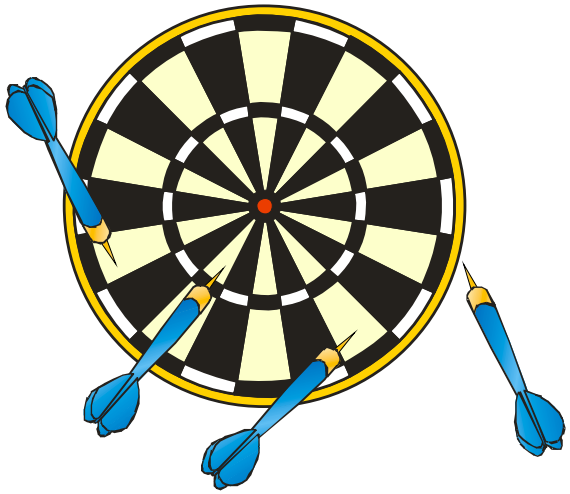
Une mesure dite « Haute Résolution » est surtout effectuée pour obtenir une valeur de masse exacte.

Attention : La résolution permet d'obtenir des mesures précises, mais pas nécessairement des mesures exactes.

L'exactitude dépend de la calibration de l'appareil

Spectrométrie de masse et techniques couplées

La résolution

	Calibré	Non -Calibré
Haute résolution	 Exactitude & precision	 Precision, Pas d'exactitude
Basse résolution	 Exactitude, Pas de precision	 Pas de precision, Pas d'exactitude

Calcul de la précision de mesure

✓ mDa: $M_{théorique} - M_{experimental}$

✓ ppm: $\frac{(M_{théorique} - M_{experimental})}{M_{théorique}}$ x 10^6

- Attention au ppm:
  - 1 ppm pour une masse de 200, correspond à 0,2 mDa
  - 1 ppm pour une masse de 2000, correspond à 2 mDa

De la précision de mesure à la formule brute

Grace à la précision de la mesure, nous pouvons simuler l'analyse élémentaire de la molécule, c'est-à-dire déterminer la nature et le nombre d'atomes qui constituent la molécule étudiée.

C'est un traitement mathématique (algorithme de calcul), qui peut être renforcé par la comparaison des massifs isotopiques (théorique et expérimental)

Spectrométrie de masse et techniques couplées
La résolution

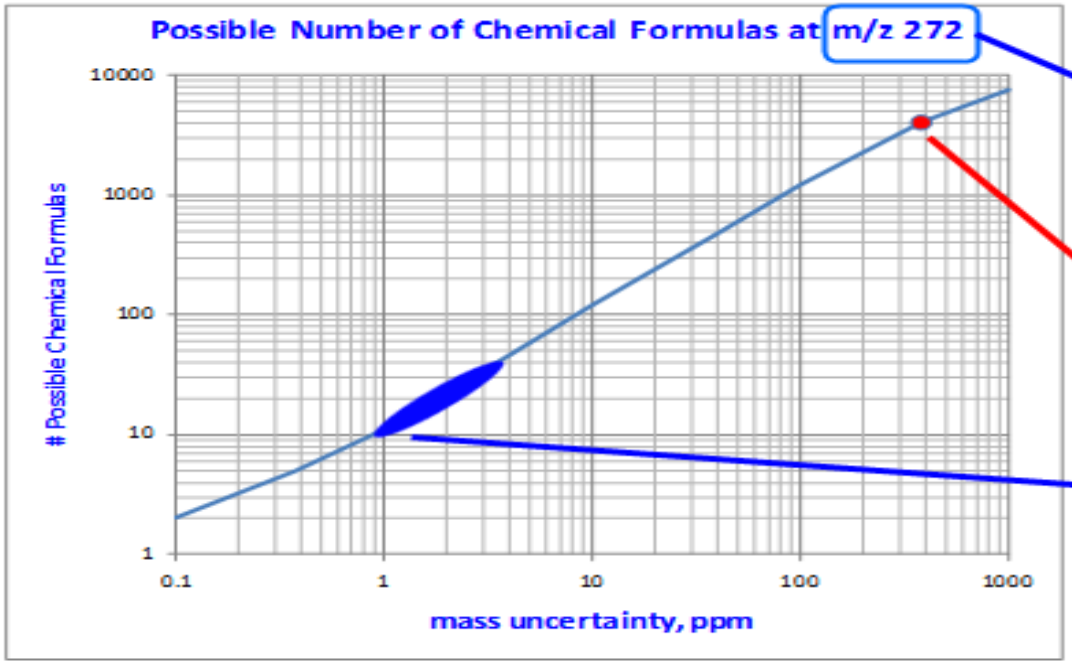
Limitations de la mesure de masse exacte **:**

Pour une composition élémentaire $C_{0-100}H_{3-74}N_{0-4}O_{0-4}$

- **Masse nominale de 118 Da : le plus proche voisin est à 34 ppm (soit à 0,004 g/mol)**
- **Masse nominale de 500 Da : 5 composés pour une erreur de 3 ppm (soit 0,0025 g/mol)**
- **Masse nominale de 750,4 Da : 626 composés pour une erreur de 3 ppm (soit 0,0375 g/mol). Pour avoir une seule masse, il faut une erreur de 0,018 ppm.**

L'apport de la haute résolution

Une masse précise réduit le nombre de formules chimiques possibles



Octafluoronaphthalene (CAS 313-72-4)

$C_{10}F_8$ = 271.98667

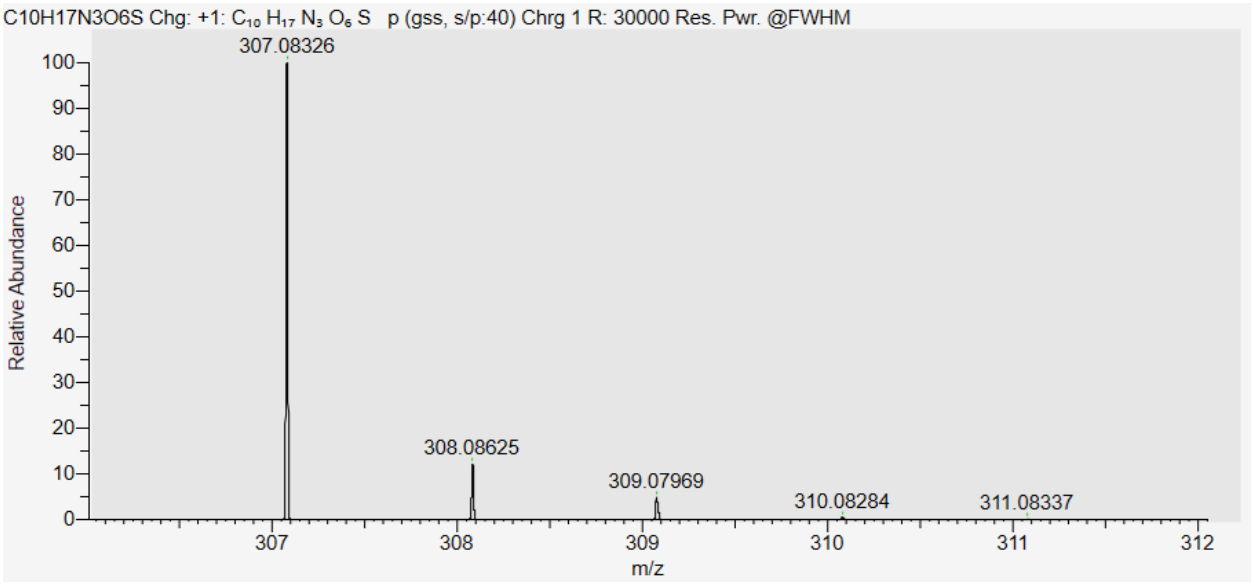
incertitude		# possible de formules
ppm	amu	
1000	0.3	7657
368	0.1	4050
100	0.03	1223
37	0.01	466
10	0.003	120
4	0.001	43
1	0.0003	11
0.4	0.0001	5
0.1	0.00003	2

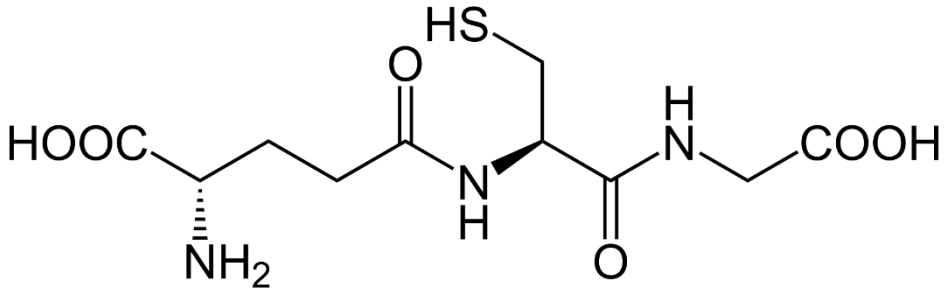
Formules contenant:
C,H,N,O,F, & Cl

Une masse précise réduit le risque de perdre du temps sur la mauvaise molécule

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Exemple sur le spectre du glutathion

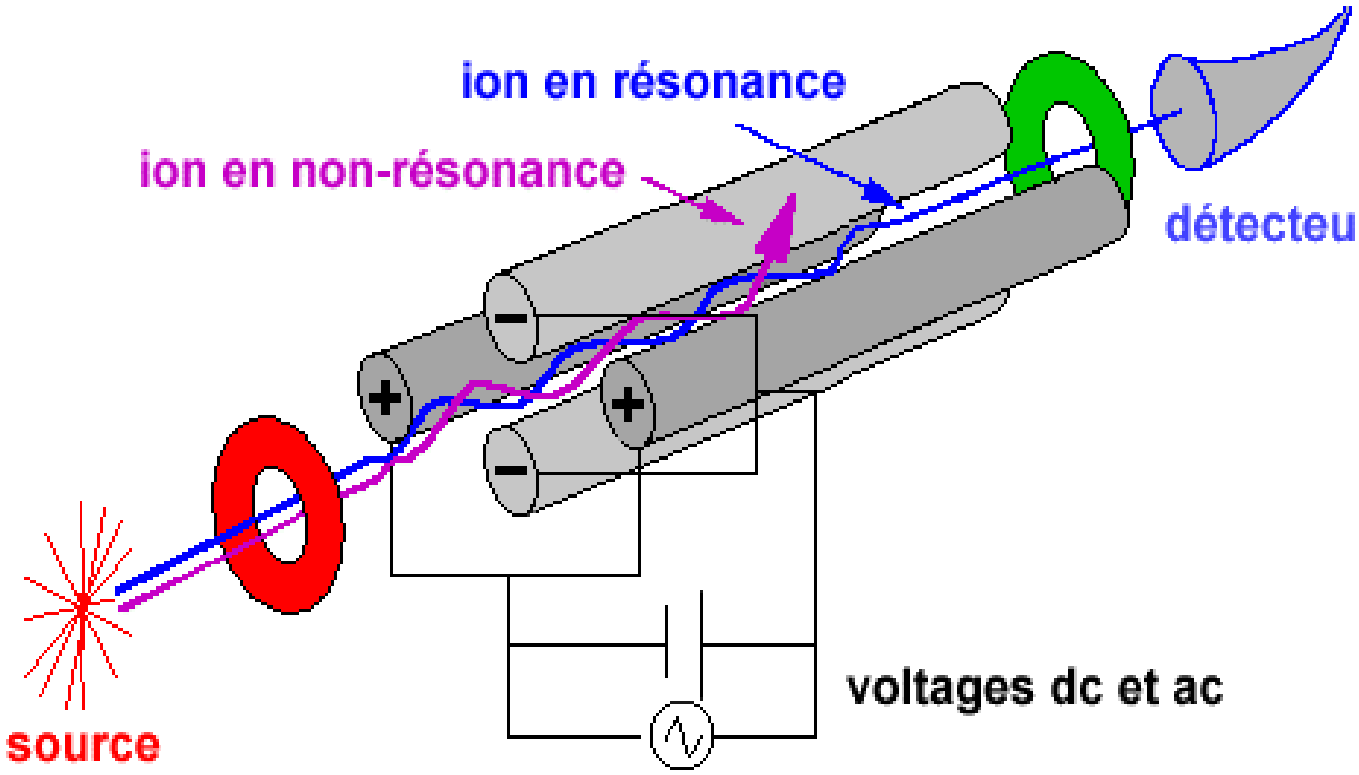




Spectrométrie de masse et techniques couplées

Le quadripôle

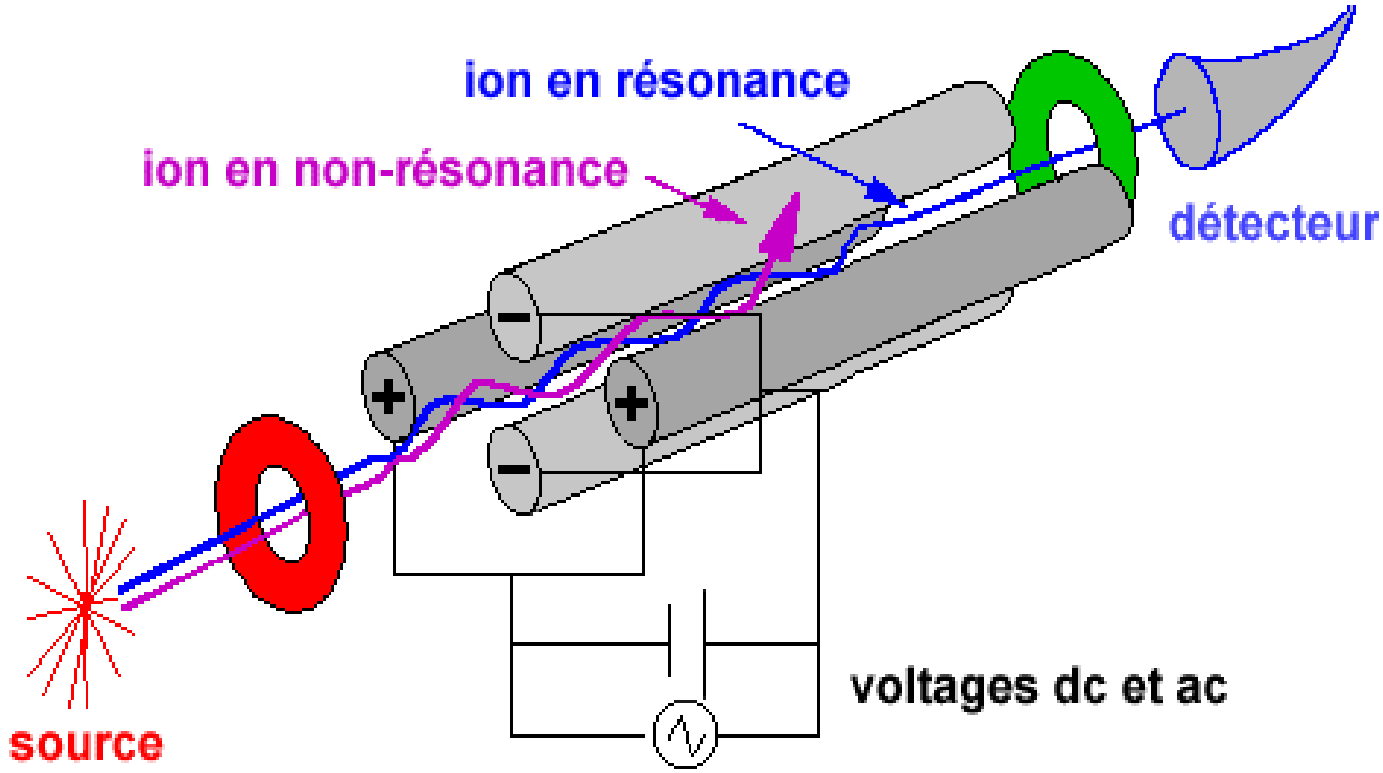
Formé de quatre barres de métal parallèles entre lesquelles les ions sont injectés avec une énergie cinétique de quelques électron volts.



Spectrométrie de masse et techniques couplées

Le quadripôle

Les ions oscillent entre les barres 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

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Le quadripôle

Il s'agit d'un analyseur à balayage, chaque m/z va être scanné au cours d'un cycle d'acquisition

Technologie la moins coûteuse et la plus répandue

Caractéristiques principales :

Résolution : 2000

Précision de mesure : +/- 0,2Da

Vitesse d'acquisition : 10000 Da/s (10Hz pour un scan de 10 à 1000Da)

Gamme de linéarité : 5 ordres de magnitude

Gamme de masse : jusqu'à 3000 Da en routine

Bascule positif/négatif : 20ms

- Mode d'acquisition
  - Full Scan : balayage complet entre deux masses
  - SIM : mode « filtre » le quad est fixé sur une seule masse -> augmente la sensibilité

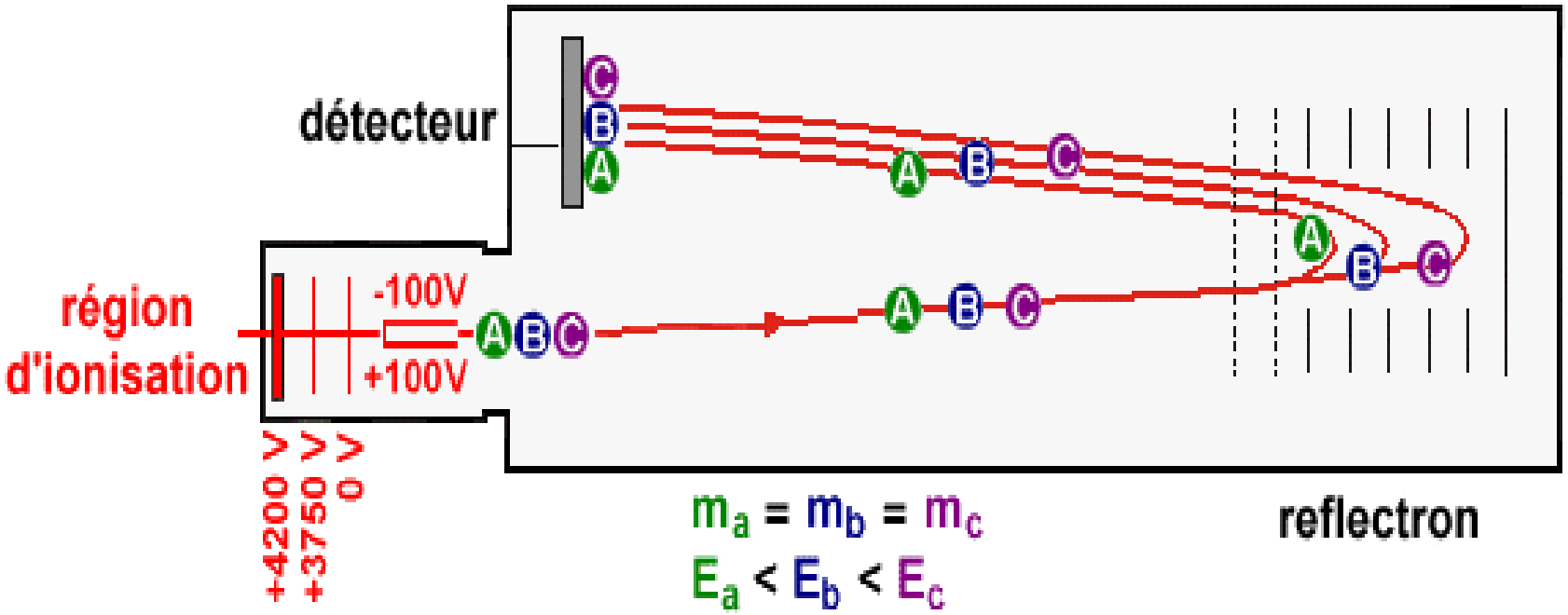
Spectrométrie de masse et techniques couplées
Ion Trap

- Mode d'acquisition
  - Full Scan : balayage complet entre deux masses
  - SIM : Un seul ion est accumulé dans la trappe -> gain de sensibilité
  - MS^n: MSMS itérative -> étude structurale

Spectrométrie de masse et techniques couplées

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)

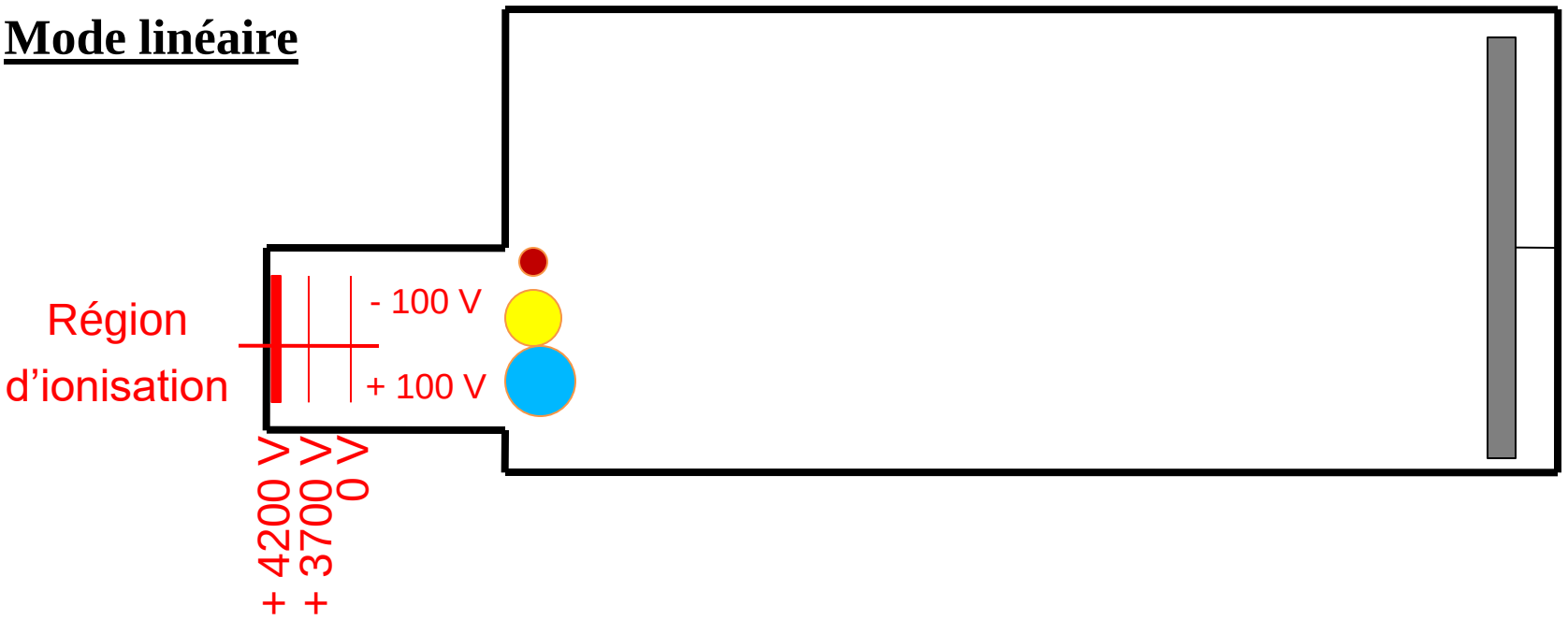


Les ions arrivent avec leur Ec ($mv^2/2$) dans une zone libre de champs

- **Les plus légers sont plus rapides → 1er détectés**
- **Les plus lourds sont plus lents → derniers détectés**

Spectrométrie de masse et techniques couplées
Temps de vol (TOF)

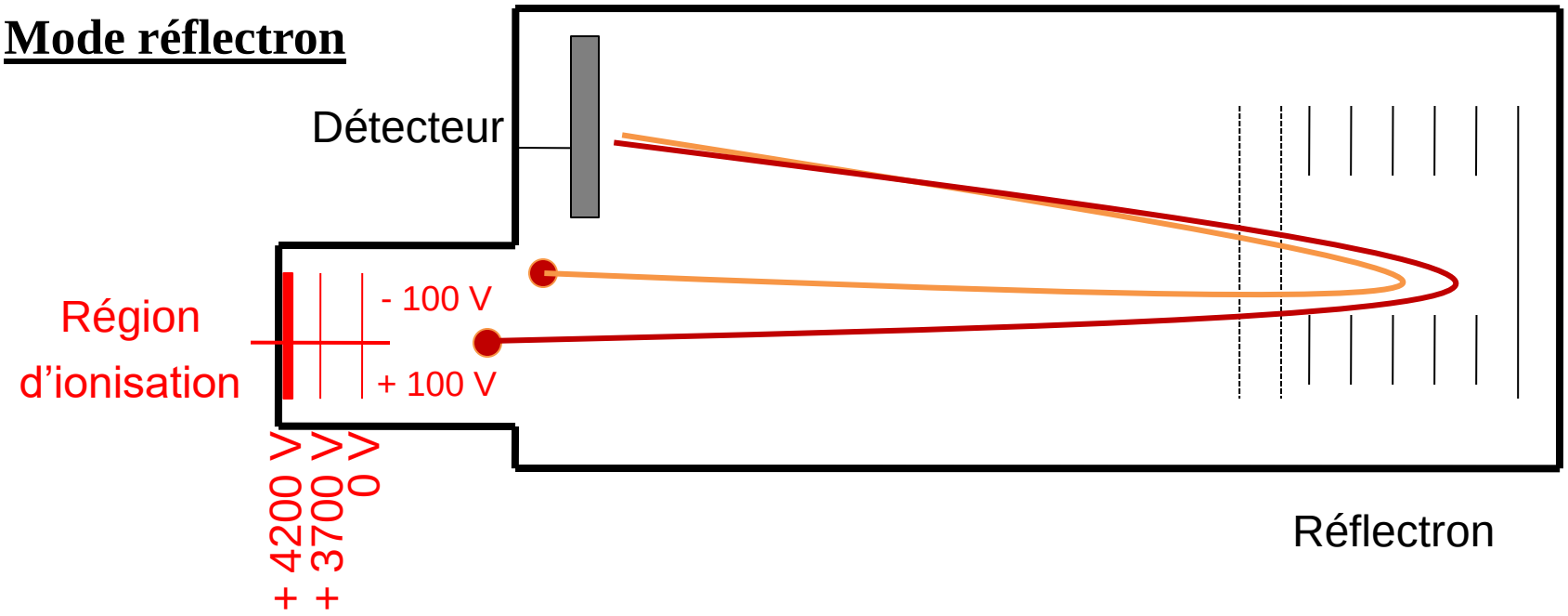
Mode linéaire



- **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**
- **Inconvénient : Effet dispersif de l'Ec, baisse de la résolution (5000)**

Spectrométrie de masse et techniques couplées
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**

Spectrométrie de masse et techniques couplées
Temps de vol (TOF)

Il s'agit d'un analyseur continu, tous les m/z vont être analysé à chaque scan

Donne accès à des analyses haute résolution

Caractéristiques principales :

Résolution : jusqu'à 80000 (indépendant de la vitesse d'acquisition)

Précision de mesure : 1-3ppm

Vitesse d'acquisition : 50Hz (indépendant de la gamme de masse)

Gamme de linéarité : 3-4 ordres de magnitude

Gamme de masse : 1 000 000 Da

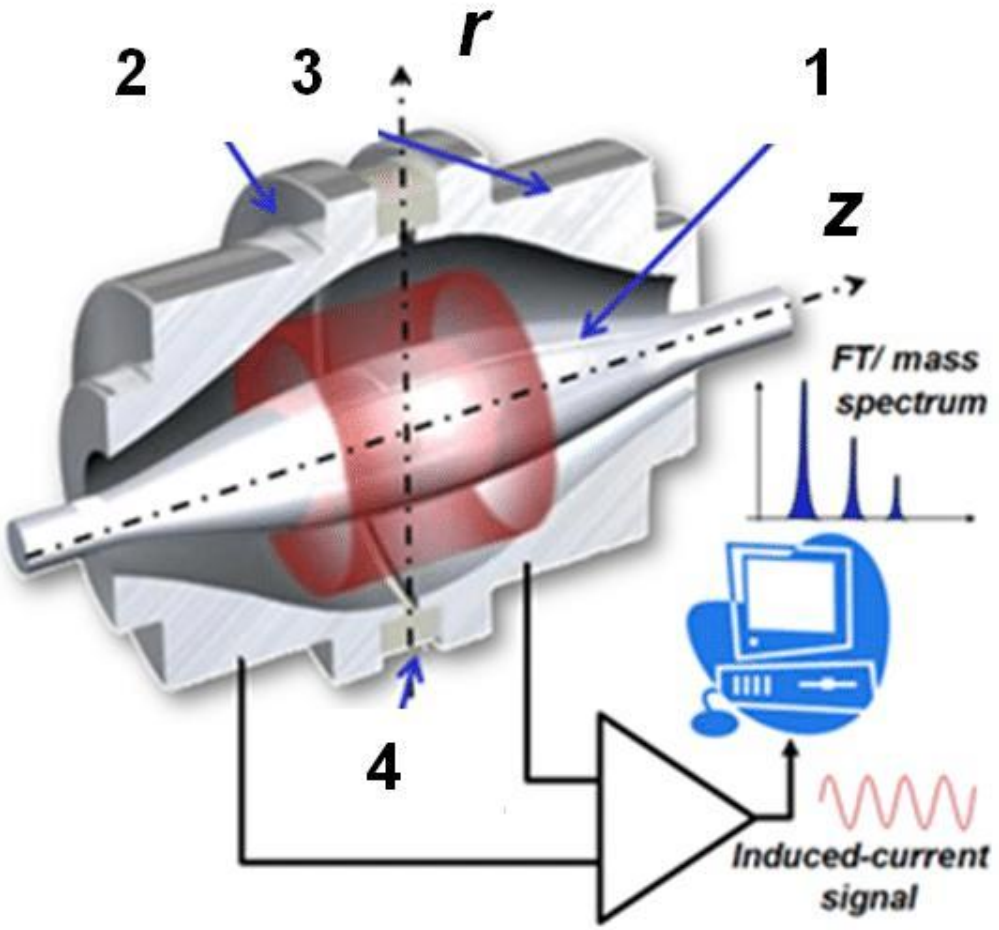
Bascule positif/négatif : 30s

Spectrométrie de masse et techniques couplées
Temps de vol (TOF)

- Mode d'acquisition
  - Full Scan : balayage complet entre deux masses
  - Linéaire ou réflectron (compromis gamme de masse/résolution)

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Orbitrap



Piégeage des ions par un champ électrostatique. Ces ions possèdent une fréquence d'oscillation axiale variable en fonction de leur ratio masse sur charge, ce qui permet de les séparer. L'Orbitrap est composée d'une électrode centrale ainsi qu'une électrode externe en forme de cylindre. L'électrode centrale coaxiale à l'axe interne piège les ions dans un mouvement orbitale. Un spectre de masse peut être généré à partir du détecteur qui convertit l'image du courant induit des ions piégés en spectre de fréquence en utilisant la transformée de Fourier.

Spectrométrie de masse et techniques couplées

Orbitrap

Il s'agit d'un analyseur à balayage, chaque m/z va être scanné au cours d'un cycle d'acquisition

Technologie exclusive à Thermo Scientific (1ere commercialisation 2005), dénommé « ultra haute résolution »

Caractéristiques principales :

Résolution : 500 000

Précision de mesure : 0.5-1ppm

Vitesse d'acquisition : 20Hz

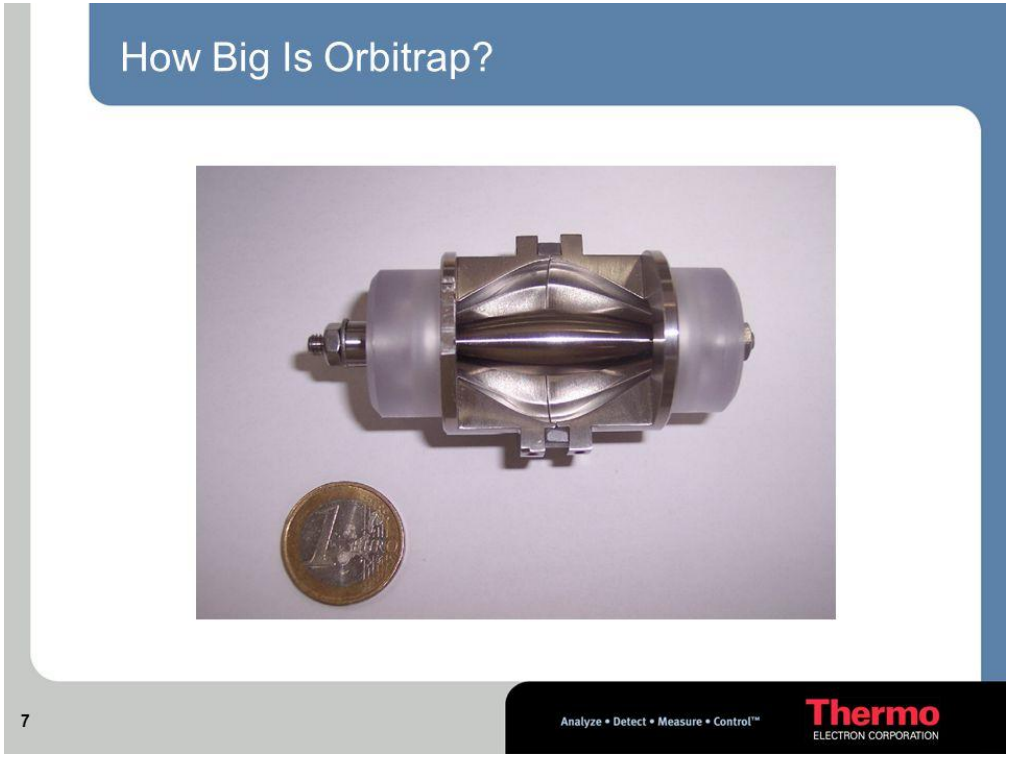
Gamme de linéarité : non spécifié

Gamme de masse : jusqu'à 6000 Da

Bascule positif/négatif : 1s

Orbitrap

- Mode d'acquisition
  - Full Scan : balayage complet entre deux masses



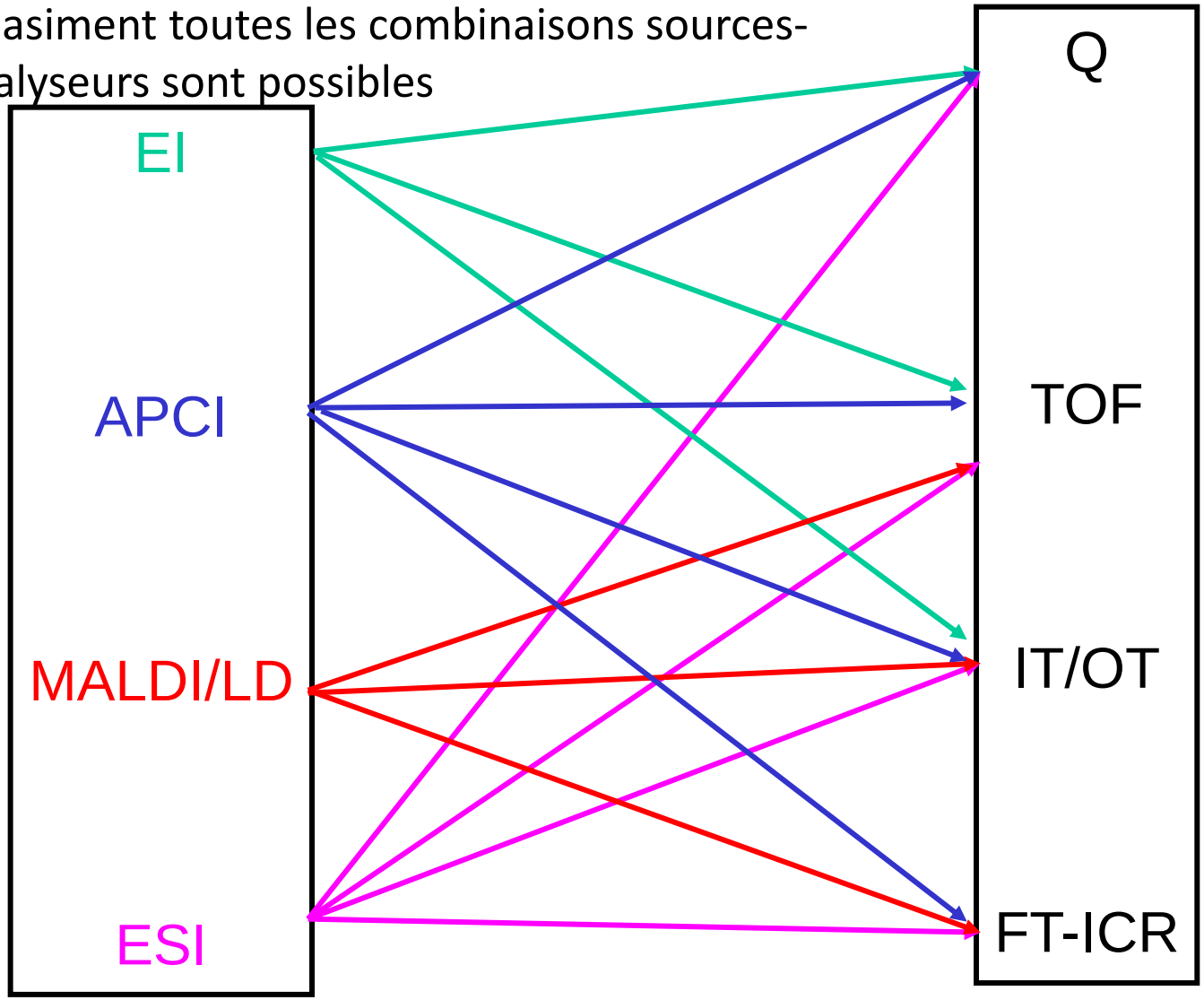
Spectrométrie de masse et techniques couplées

Résumé analyseur

	Quad	IT	TOF	Orbitrap	FT-ICR
Résolution	2 000	5 000	80 000	500 000	10 000 000
Précision de mesure (m/z=400)	0,2Da (500ppm)	0,15Da (375ppm)	3ppm	1ppm	0,25ppm
Vitesse d'acquisition (0-1000)	10Hz	50Hz	50Hz	20Hz	4Hz
Limite m/z	3 000 Da	3 000 Da	1 000 000 Da (20 000 en réflectron)	6 000 Da	10 000 Da
Pos/neg	Oui	Oui	Non	Limité	Oui
Linéarité (ordre de grandeur)	5	4 à 5	3 à 4	nc	nc
Prix	€	€	€€€	€€€€	€€€€€€€

Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Quasiment toutes les combinaisons sources-analyseurs sont possibles



Principe 4 : La spectrométrie de masse à plusieurs dimensions

MSMS

MS^n

Spectrométrie de masse et techniques couplées

MSMS

A quoi sert la MSMS?

Technique d'activation ciblé d'une molécule afin de la fragmenter en plus petites 'briques'
Utile avec les techniques d'ionisations douces

- ❑ Comparaison avec des bases de données
- ❑ Etude structurale (découverte de molécules inconnus)
- ❑ Confirmation de structure
- ❑ Quantification



Spectrométrie de masse et techniques couplées

MSMS

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

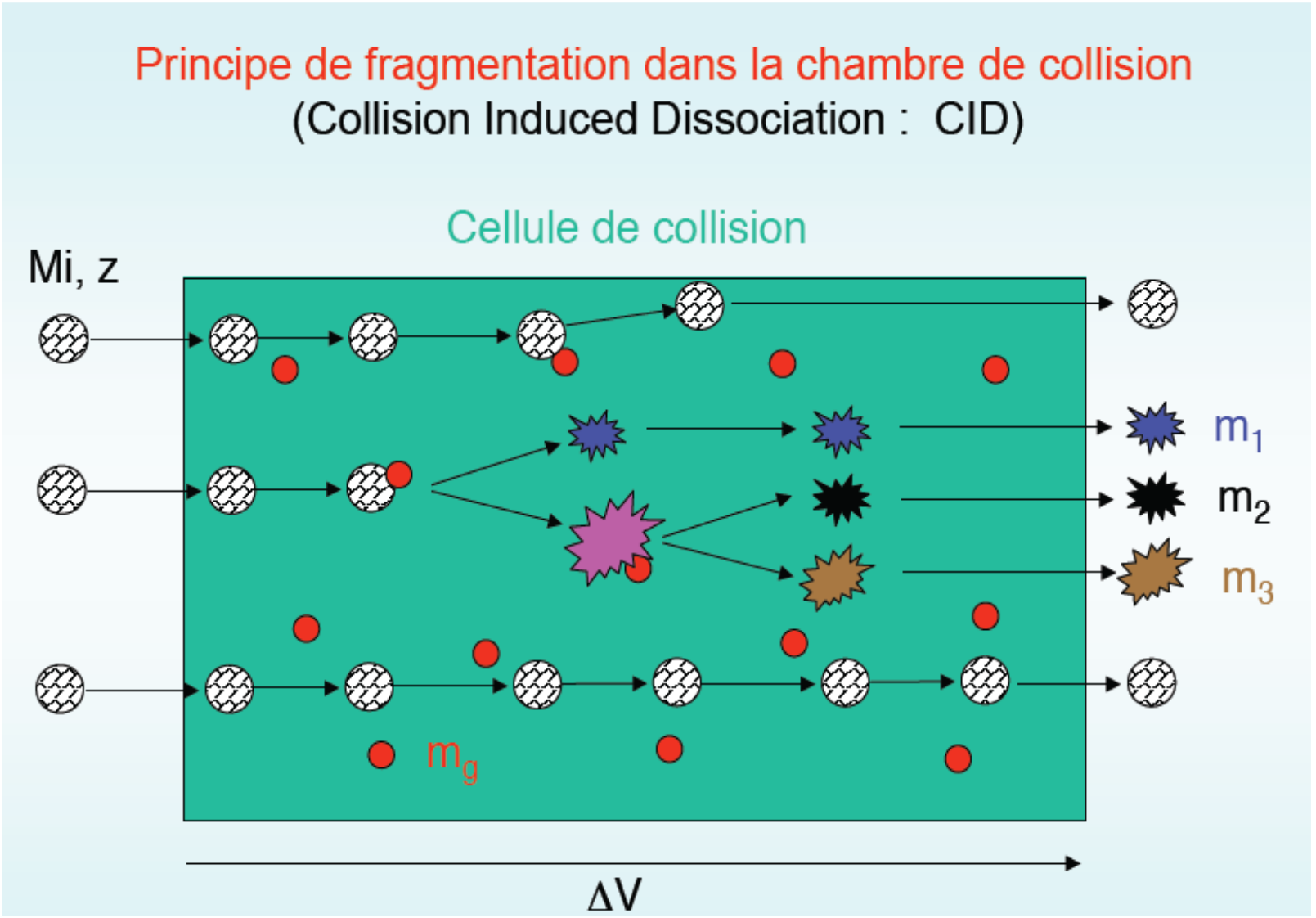
Rôle du deuxième analyseur : mesure les m/z des fragments

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

Spectrométrie de masse et techniques couplées

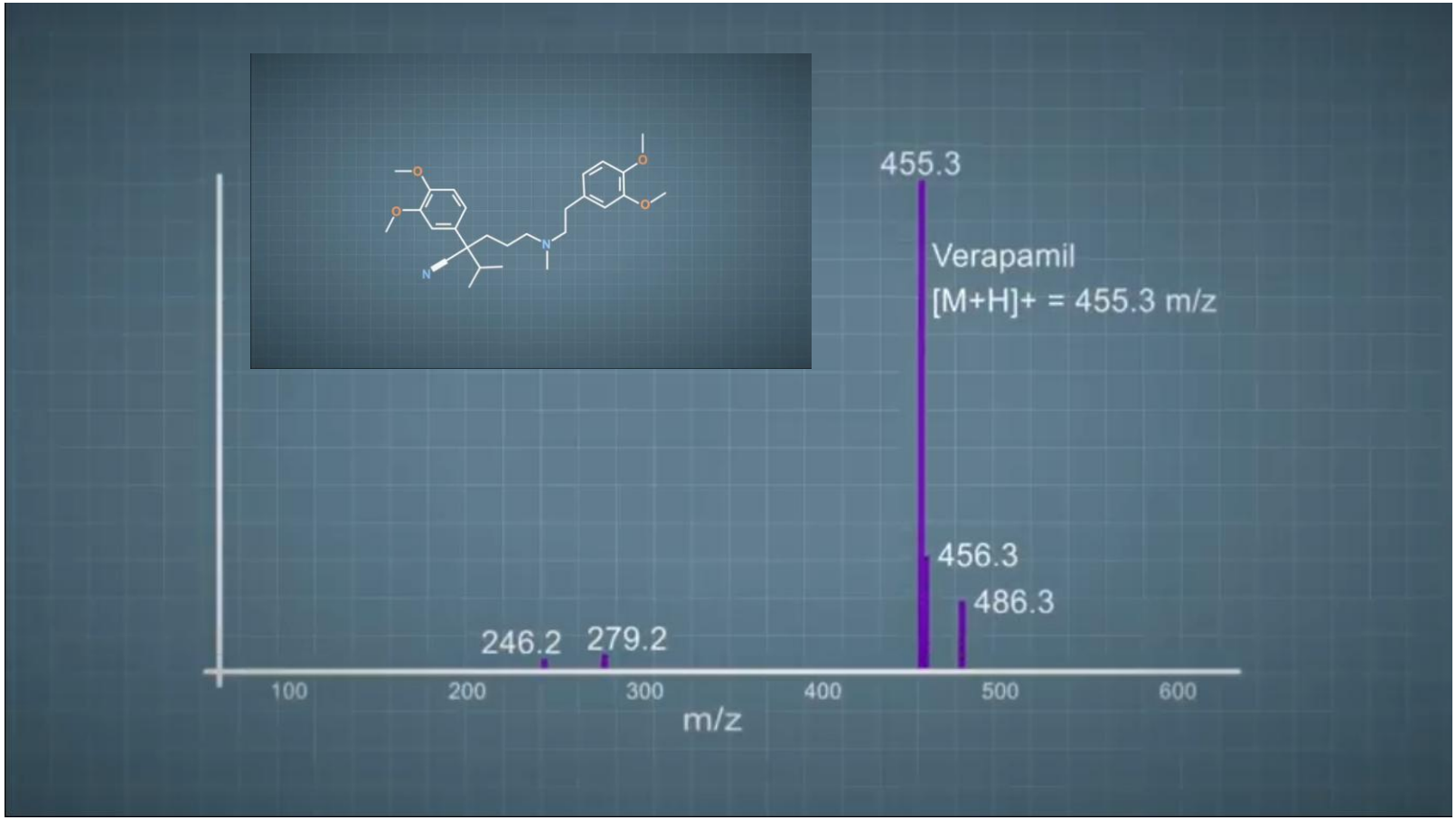
- La cellule de collision
  - Permet l'activation des ions pour induire la rupture de liaison covalente au sein de l'ion sélectionné
  - Nombreuses techniques disponibles :
    - CID : Collision Induced Dissociation
    - HCD : Higher-energy collisional dissociation
    - ETD : Electron-transfer dissociation
    - ECD : Electron-capture dissociation
    - IRMPD : InfraRed Multiphoton dissociation
    - …

Spectrométrie de masse et techniques couplées



Spectrométrie de masse et techniques couplées MSMS

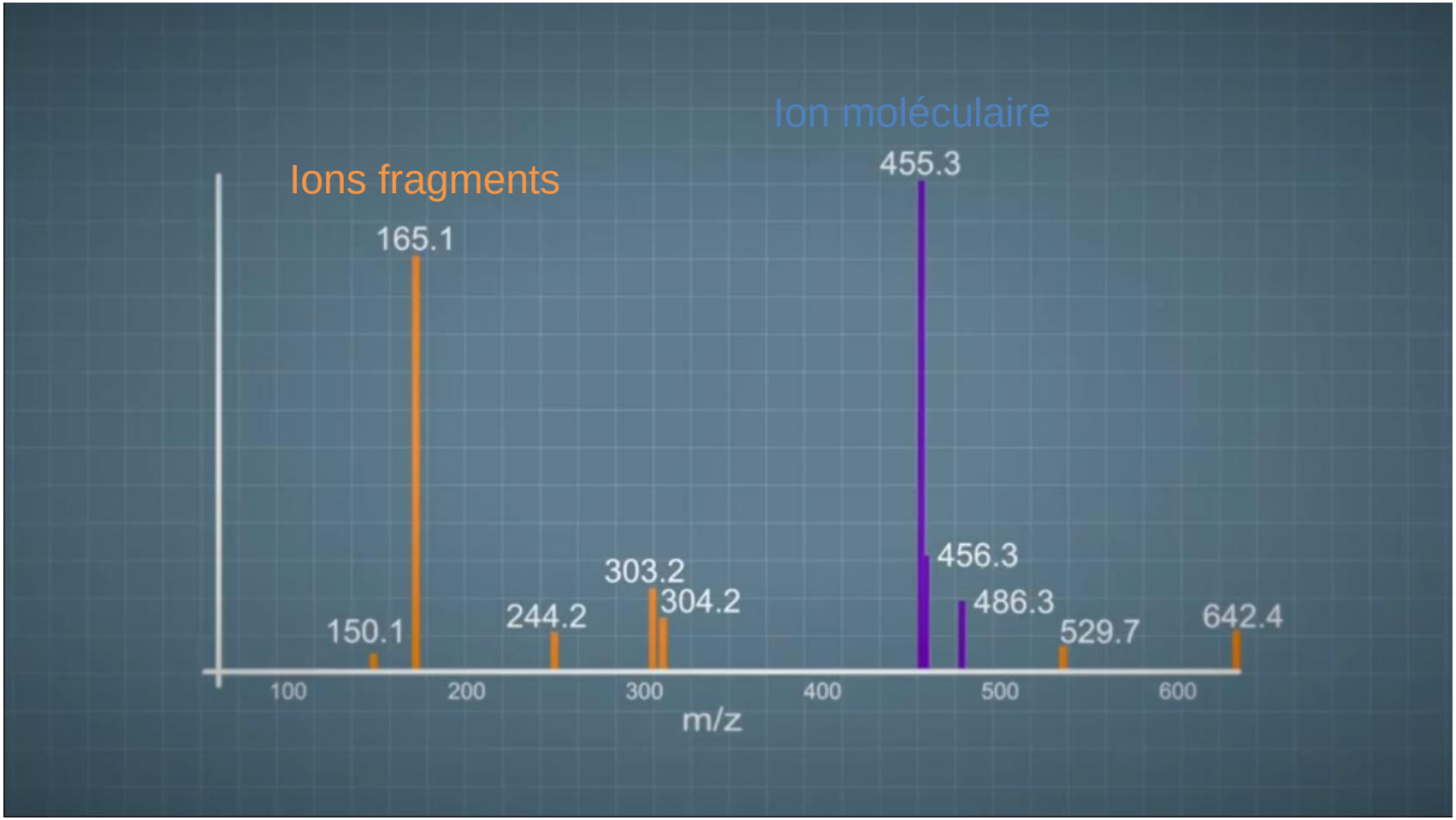
Exemple : Spectre MS du vérapamil (médicament antiarythmique)



Spectrométrie de masse et techniques couplées

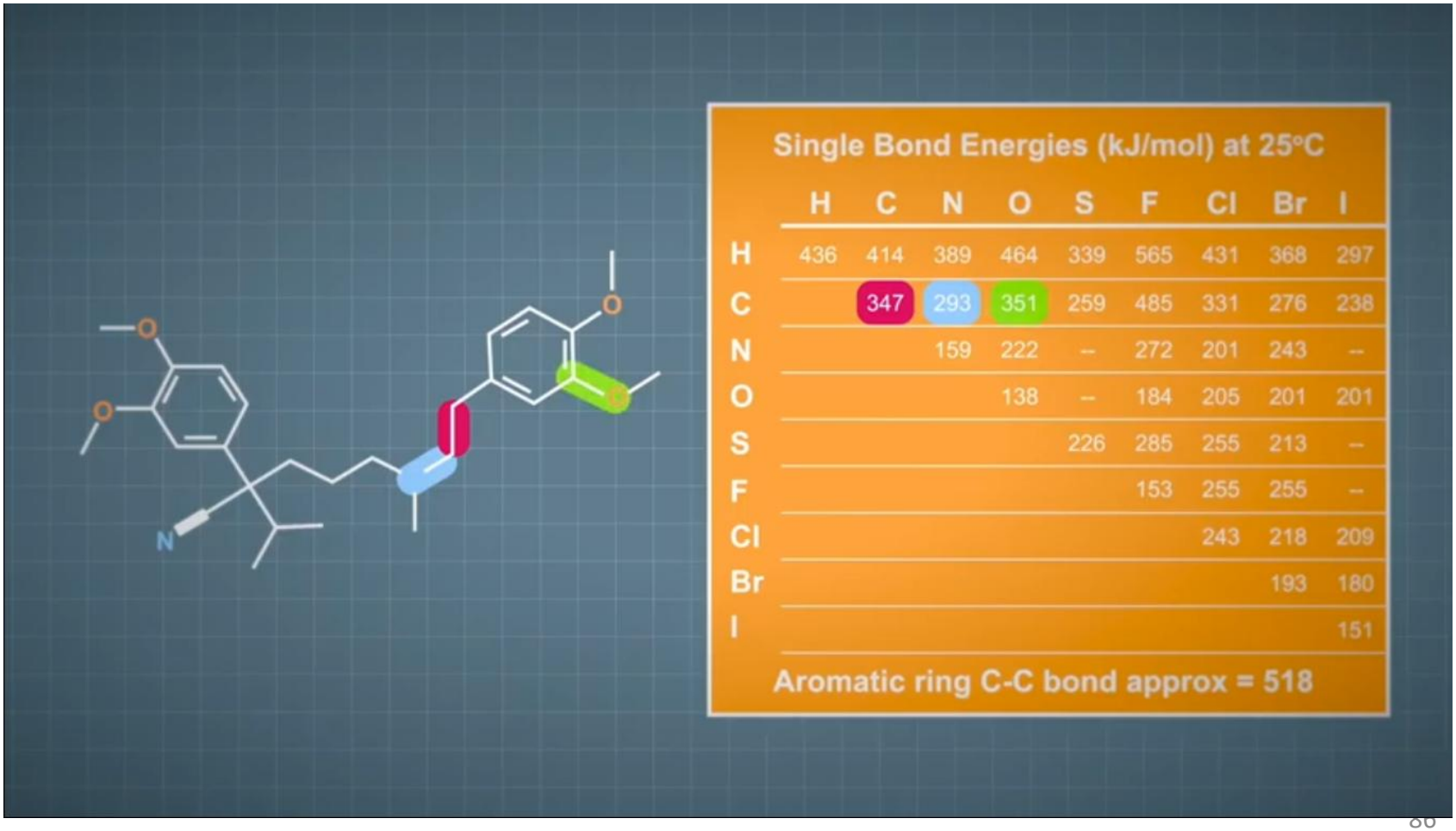
MSMS

Spectre MSMS



Spectrométrie de masse et techniques couplées MSMS

Energie théorique des liaisons atomiques



Single Bond Energies (kJ/mol) at 25°C

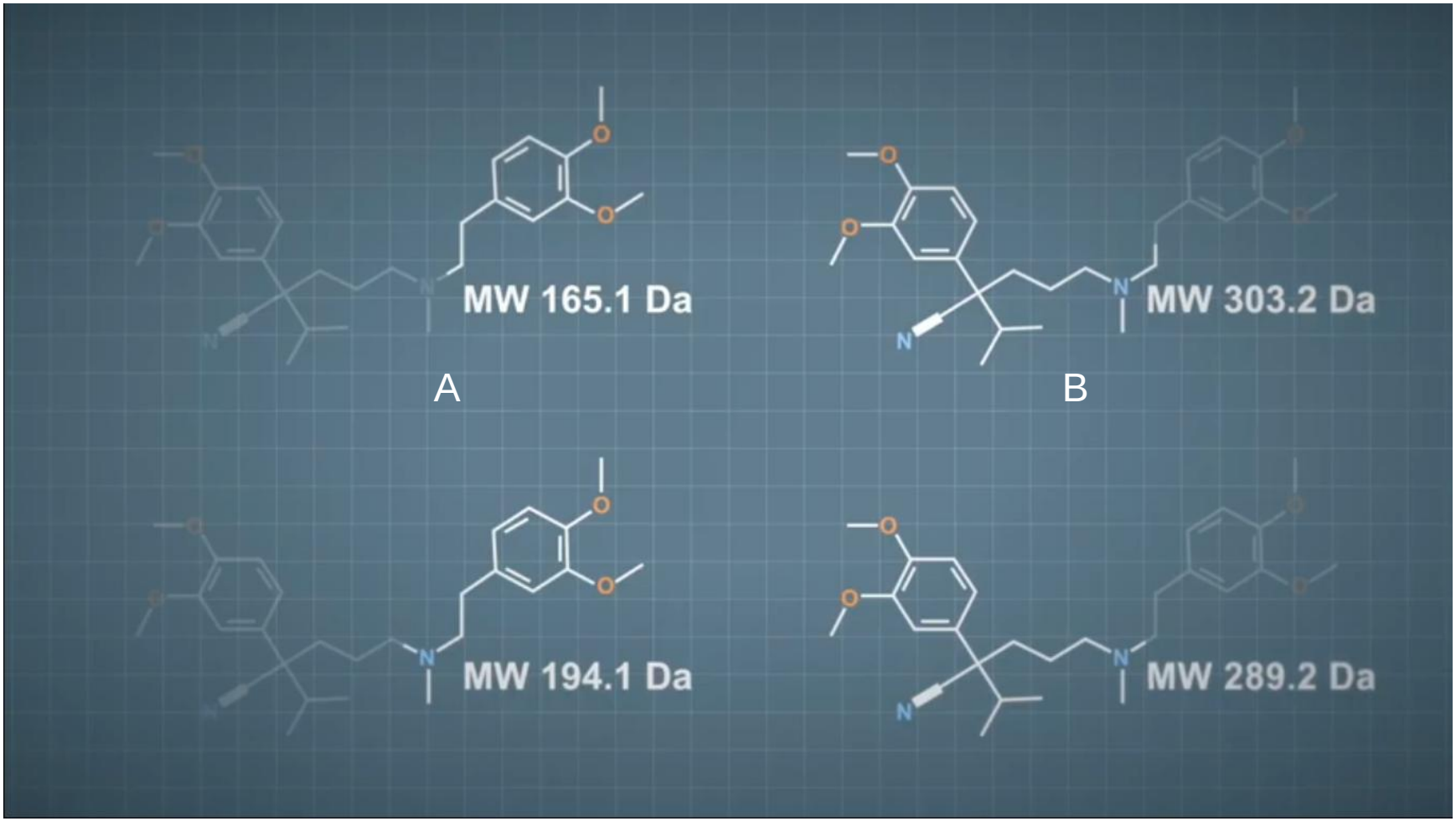
	H	C	N	O	S	F	Cl	Br	I
H	436	414	389	464	339	565	431	368	297
C		347	293	351	259	485	331	276	238
N			159	222	--	272	201	243	--
O				138	--	184	205	201	201
S					226	285	255	213	--
F						153	255	255	--
Cl							243	218	209
Br								193	180
I									151

Aromatic ring C-C bond approx = 518

Spectrométrie de masse et techniques couplées

MSMS

Fragments théoriques obtenus pour le vérapamil



Spectrométrie de masse et techniques couplées

MSMS



Principe 5 : Le couplage MS avec la chromatographie

Spectrométrie de masse et techniques couplées

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 Chromato/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

Spectrométrie de masse et techniques couplées

- Les couplages « traditionnels »
  - LC-MS
  - GC-MS

- Les « nouveaux » couplages :
  - TLC-MALDI
  - TLC-ESI

La LCMS

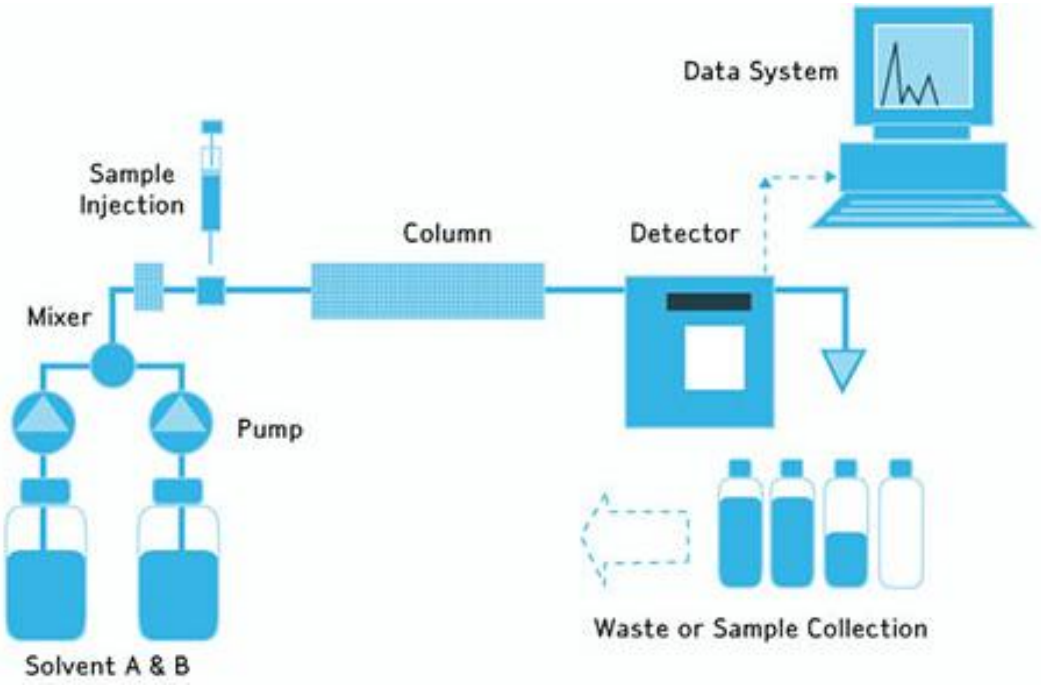
(LC / HPLC / UPLC / UHPLC)

Spectrométrie de masse et techniques couplées

RP-LC : une histoire d'affinité

Phase stationnaire : silice greffée qui va retenir les composés
Phase mobile : solvant(s) qui entraine les composés à travers la phase stationnaire

Objectif : chaque composé est son propre temps de rétention (RT min)



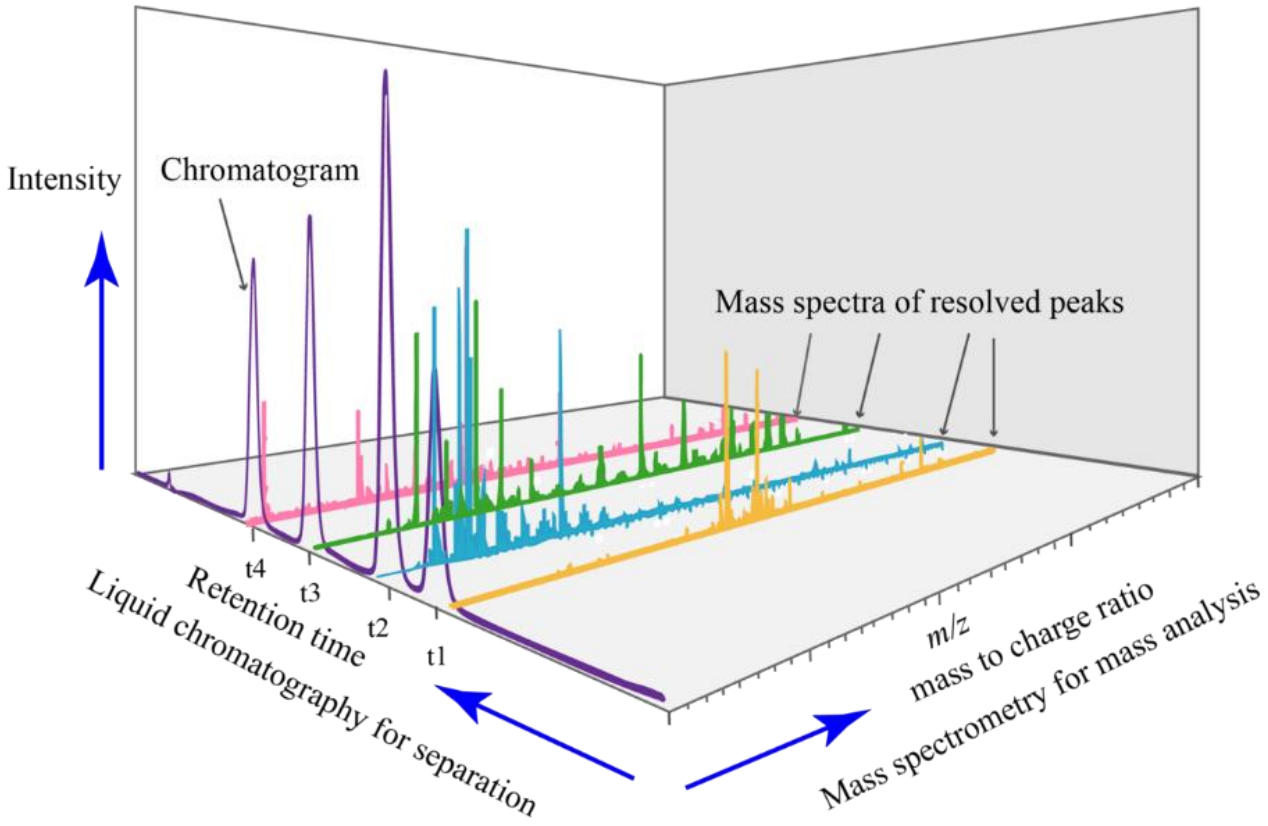
Spectrométrie de masse et techniques couplées



Avantages

- Séparation des différents composés d'un mélange avant leur détection/analyse
- Compatible avec de nombreux détecteurs : UV / CAD / RI / ELSD….
- 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

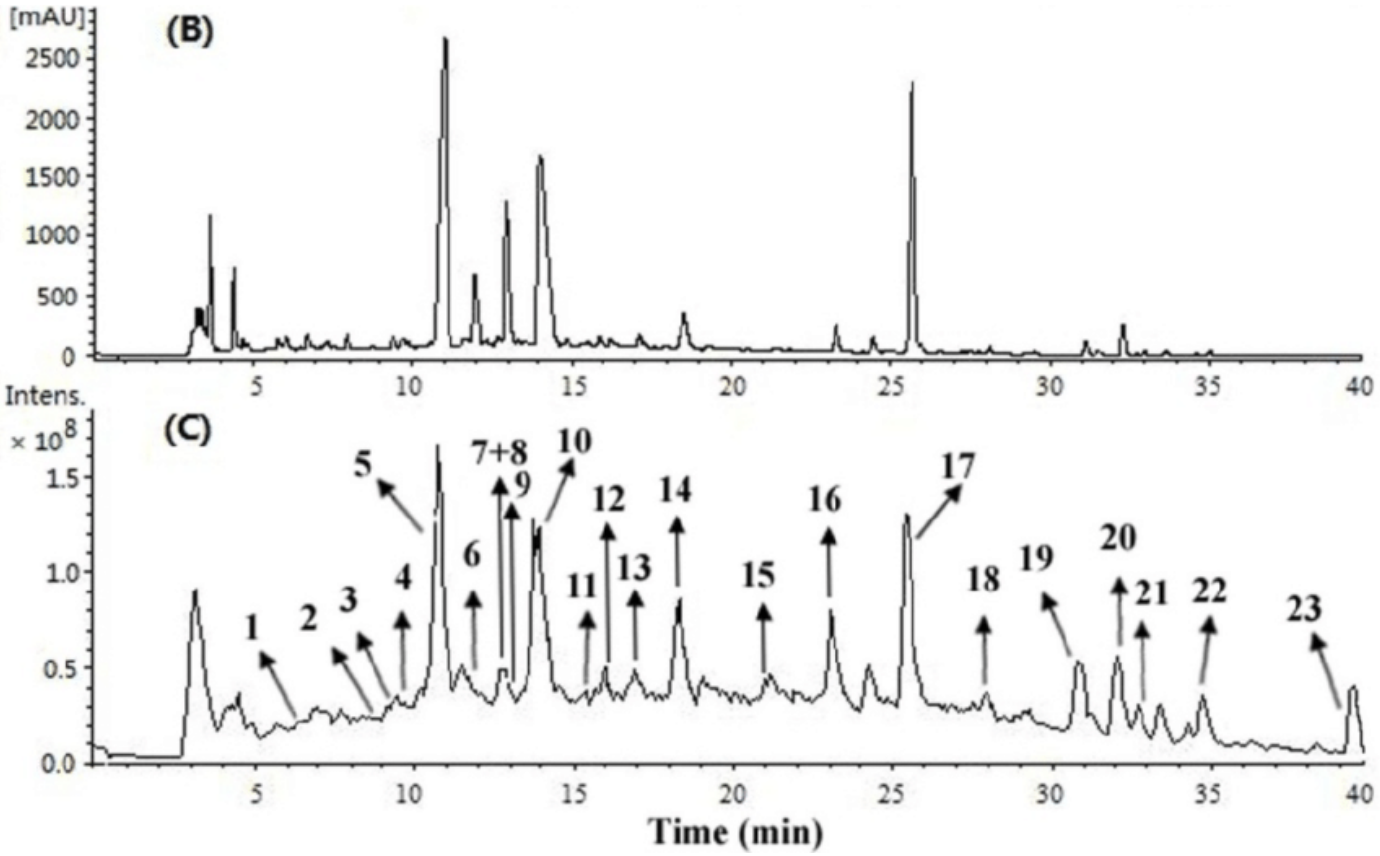
Spectrométrie de masse et techniques couplées



Accès à une dimension supplémentaire

Spectrométrie de masse et techniques couplées

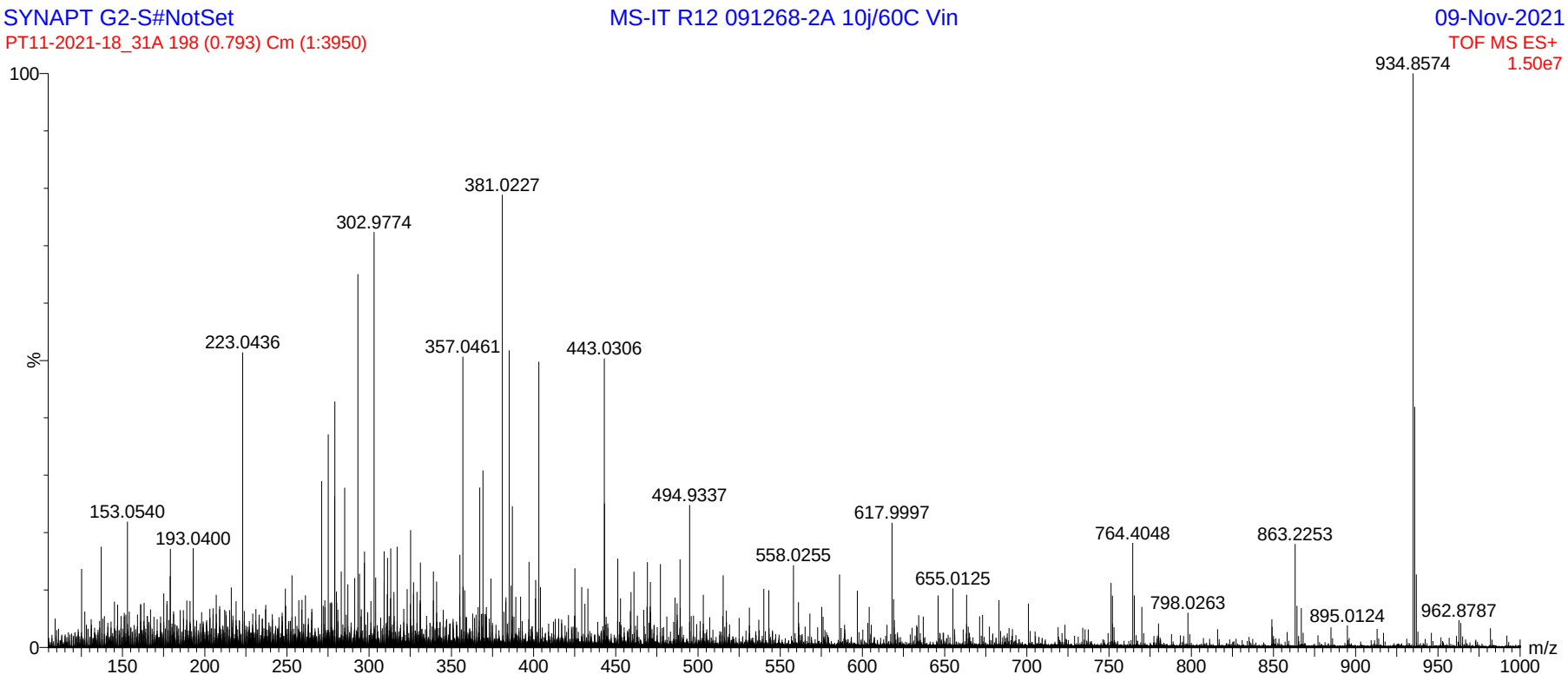
Une analyse : plusieurs chromatogrammes



Chromatogramme UV

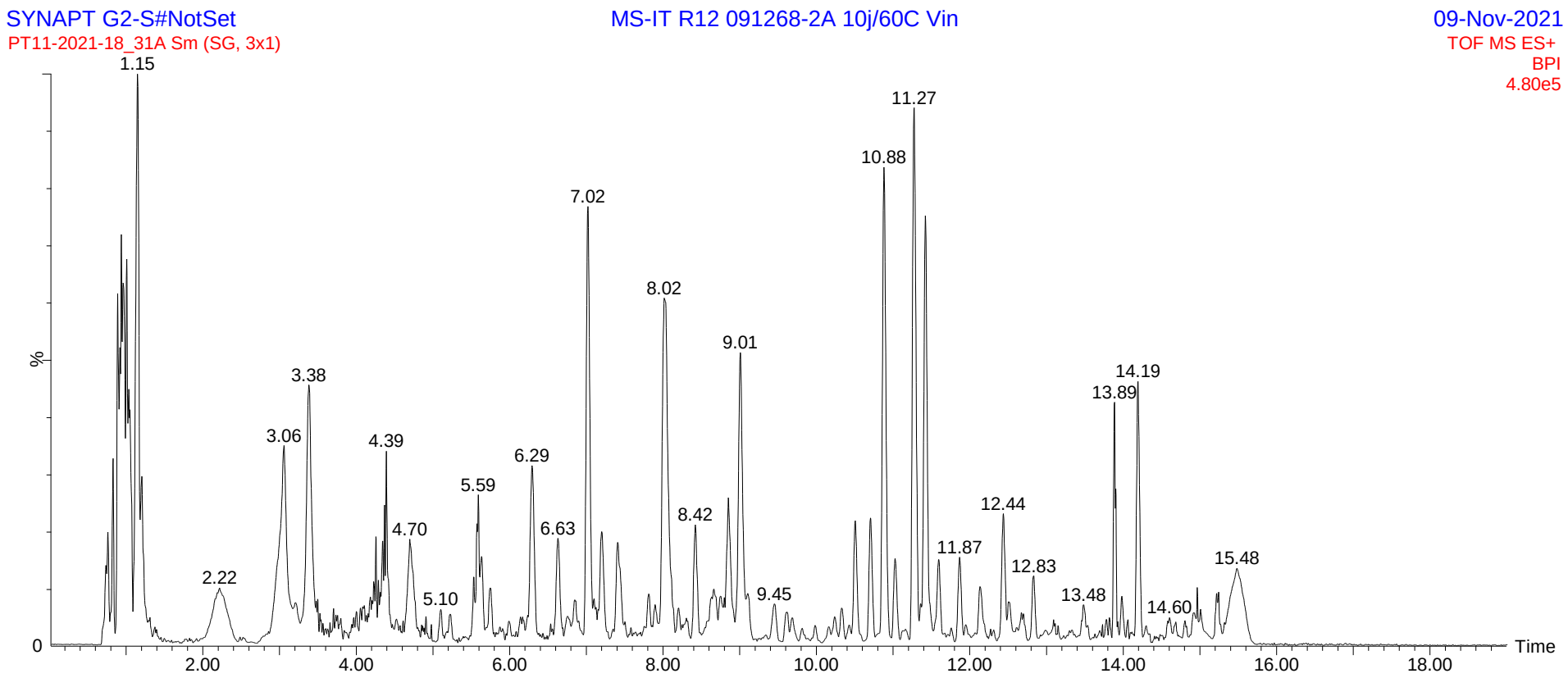
TIC MS

Spectrométrie de masse et techniques couplées



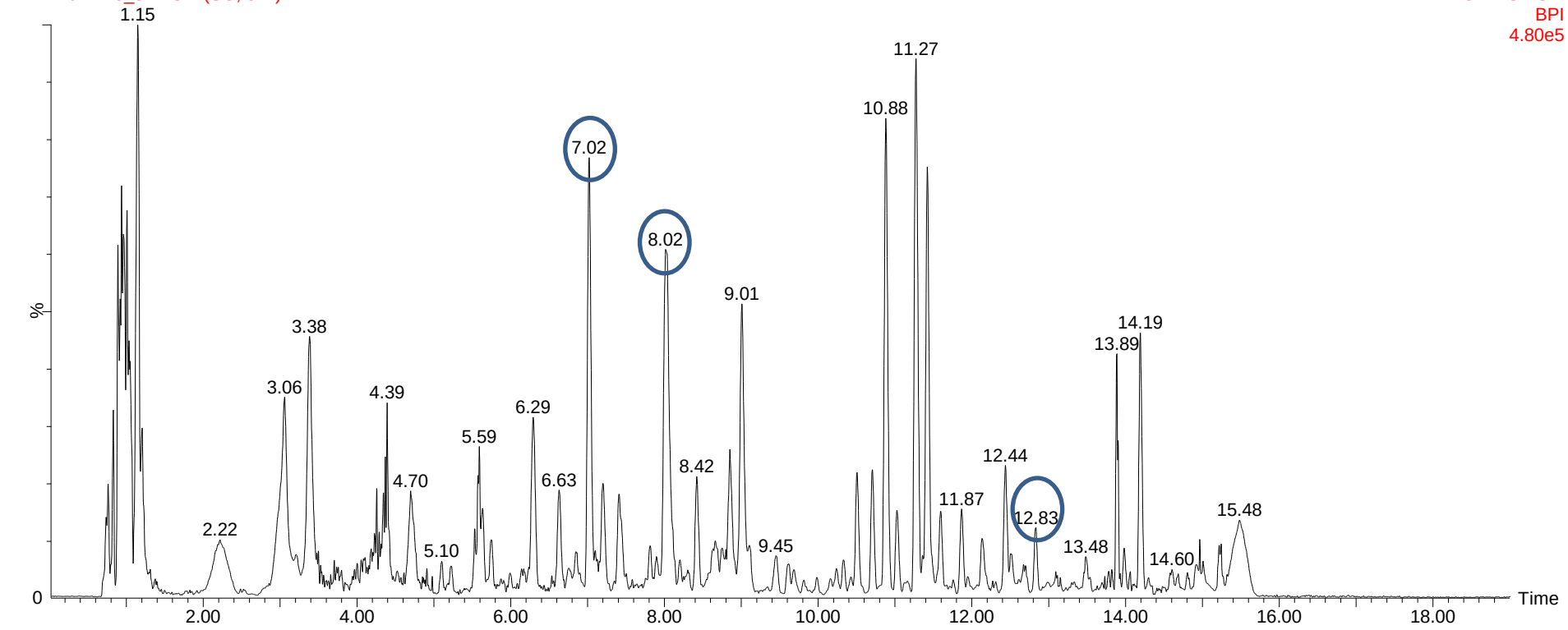
Spectre de masse d'un échantillon complexe : du Champagne

Spectrométrie de masse et techniques couplées



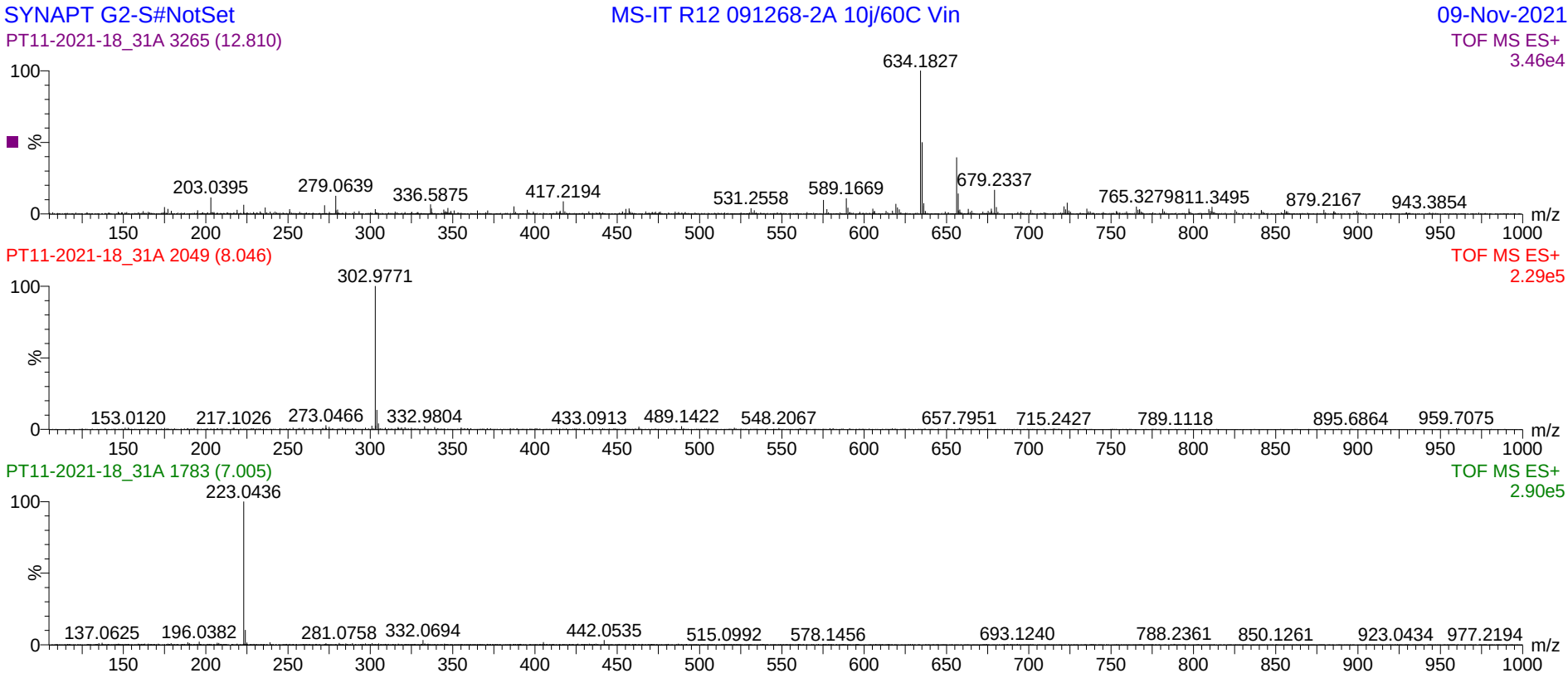
Le même échantillon analysé en LCMS
Chromatogramme MS (1ere dimension de séparation)

Spectrométrie de masse et techniques couplées



On peut « extraire » le spectre de masse de chacun des pics chromatographiques

Spectrométrie de masse et techniques couplées



Spectre MS à différents RT (2eme dimension de séparation)

Choix de la phase mobile :

Problèmes de compatibilité des éluants HPLC avec la MS (source ESI)

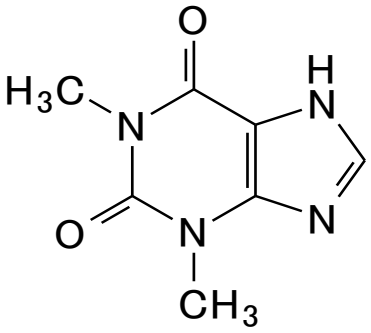
- Besoin d ’adapter les méthodes de LC pour la LC-MS
- Les phases éluantes doivent être relativement volatiles et exemptes de sels ou d ’électrolytes en proportions trop importantes

Il est important d’adapter les conditions d’ionisations/volatilisation à la phase mobile (débit/composition) :

- Température, débit et pression de gaz

Choix de la phase mobile :

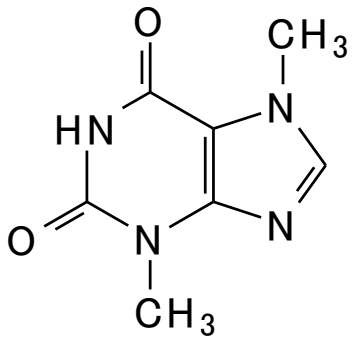
Comparons une analyse avec éluant non volatil et éluant volatil



Theophylline (TP)

M.W=180.17

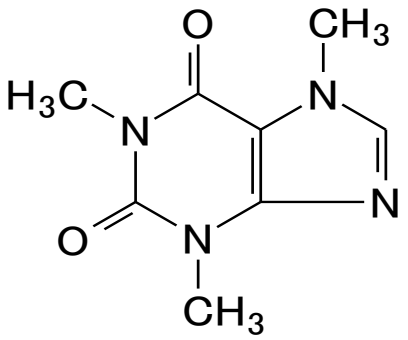
pKa <1, 8.6



Theobromine (TB)

M.W=180.17

pKa <1, 10.0



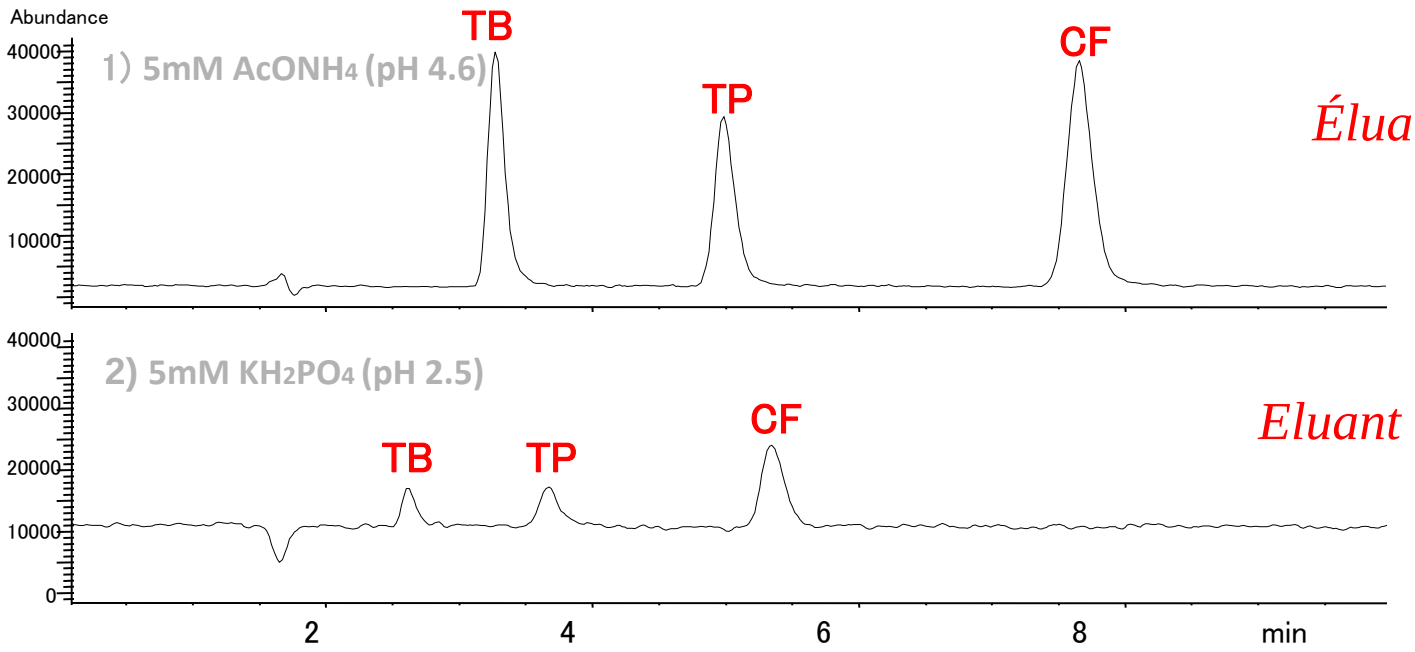
Caffeine (CF)

M.W=194.19

pKa = 14

Spectrométrie de masse et techniques couplées

(10 ppm injection:scan mode TIC)



Éluant volatil

Eluant non volatil

LC conditions

Column: ZORBAX Eclipse XDB-C18 2.1 x 150 mm, 5µm

Mobile Phase: 1) 5mM $AcONH_4$ (pH 4.6)/MeOH=80:20

2) 5mM KH_2PO_4 (pH 2.5)/MeOH=80:20

Flow rate: 0.2mL/min

Temp: 40ºC

Inj.volume: 5µL

MS conditions

Ionization: ESI

Mode: Positive

Mass range: m/z 100~200

Capillary volt.: 3.5kV

Fragmentor volt : 100V

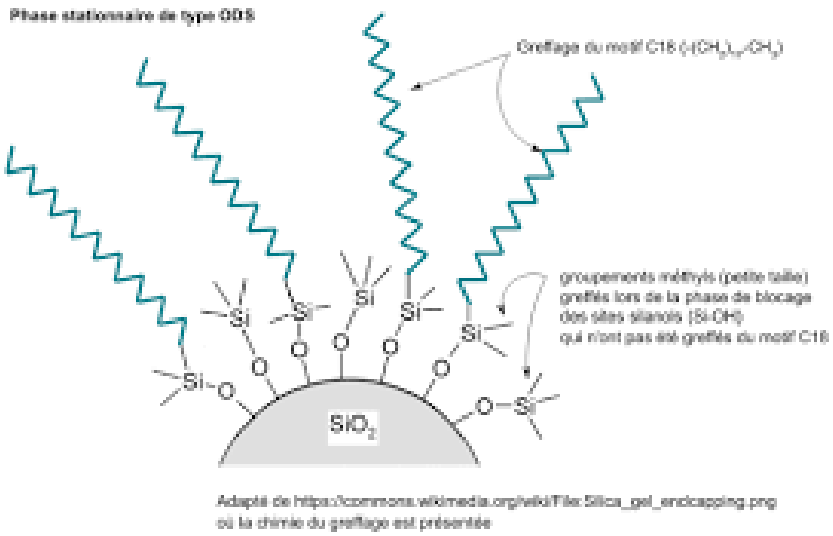
Drying gas: N_2 (12.0L/min, 350℃)

Nebulizer gas: N_2 (50psi)

Choix de la phase stationnaire

Chromatographie de phase inverse : phase stationnaire apolaire

C18 : la plus répandue -> interaction hydrophobe



En mode gradient on démarre avec une phase mobile polaire puis on augmente l'apolarité de cette phase mobile.

Les composés les plus polaires auront des RT plus courts

Choix de la phase stationnaire

En cas de mauvaises séparations : deux leviers

Phase mobile : beaucoup de possibilités mais contrainte de la MS, chronophage

Phase stationnaire : Screening de chimie différente

C8, C4

NH2

HILIC

Biphényl, Phenyl-Hexyl

Perfluorophényl PFP

…

La GCMS

Spectrométrie de masse et techniques couplées

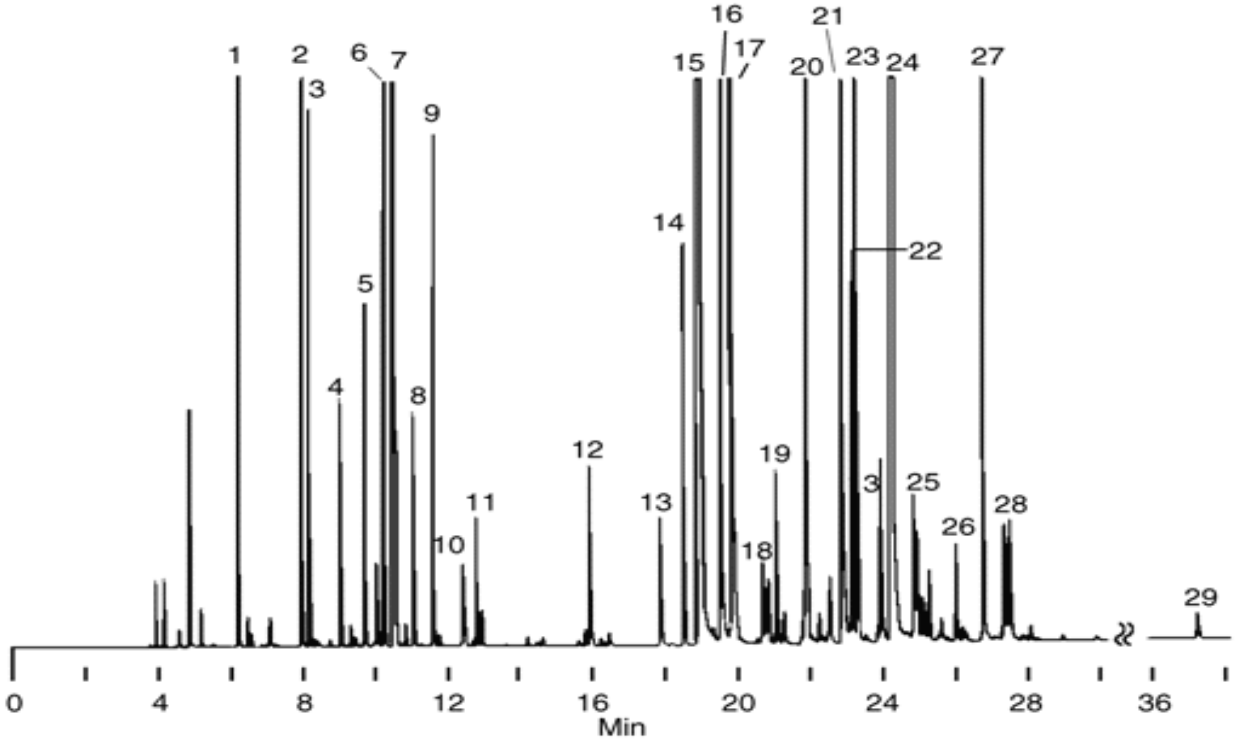
Le Couplage GC/MS

- 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, azote, hydrogène

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

Spectrométrie de masse et techniques couplées

1. α-Pinene
2. β-Pinene
3. Sabinene
4. Myrcene
5. α-Terpinene
6. L-Limonene
7. 1,8-Cineole
9. γ-Terpinene
10. para-Cymene
11. Terpinolene
12. 3-Octanol
13. 1-Octen-3-ol
14. trans-Sabinenehydrate
15. L-Menthone
16. Menthofuran
17. D-Isomenthone
18. Beta-Bourbonene
19. Linalool
20. Methyl acetate
21. Neo-menthol
22. Terpinene-4-ol
23. β-Caryophyllene
24. L-Menthol
25. Pulegone
26. α-Terpineol
27. Gemacrene-D
28. Piperitone
29. Viridiflorol



Mr. William Faas of A.M. Todd Company provided the sample and assisted with peak identification.

Chromatogramme GCMS de l'huile essentielle de menthe

Le spectre MS de chaque pic chromatographique est comparé à une base donnée

Identification des composants du mélange

Spectrométrie de masse et techniques couplées

La séparation en GCMS

- La phase mobile est défini par l'appareillage – modification fastidieuse

- Optimisation du gradient de séparation : gradient de température

- Choix de la phase stationnaire : moins de choix qu'en LC

Type 5, Type 1, WAX : modification de la polarité de la colonne

- Important : utiliser des colonnes avec la mention MS : bruit de fond moins important (ex DB-5ms)

Principe 6 : La quantification par MS

La quantification par MS

Spectrométrie de masse et techniques couplées

La quantification par MS

- Utiliser la sensibilité et la spécificité de la LC/GC-MS pour doser des composés présents dans des mélanges complexes, exemples :
  - Recherche de biomarqueurs dans des échantillons biologiques
  - Pharmacocinétique de composés actifs
  - Recherche de produits illégaux/toxiques
  - Pesticides dans les produits agroalimentaires
  - Qualité de l'eau/des sols

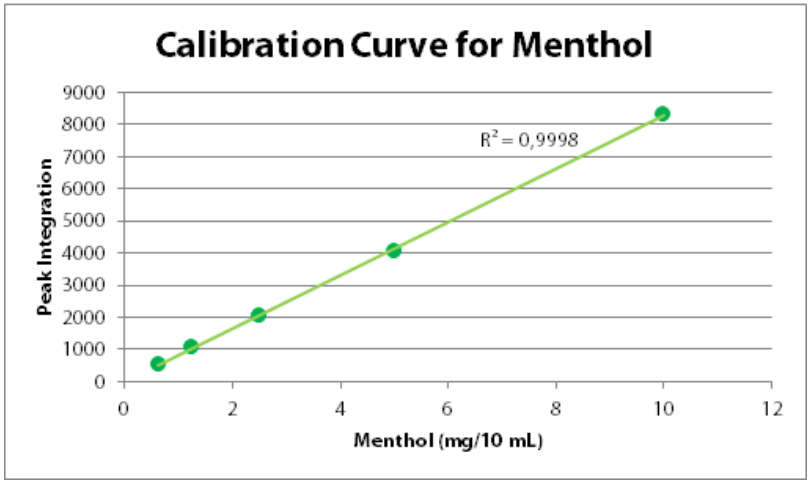
- Analyse ciblé : on sait ce que l'on cherche

- Contraintes : rendement d'ionisation composé-dépendant
  - Calibration systématiques

Spectrométrie de masse et techniques couplées

La quantification par MS

- Détermination de la réponse d'un composé à l'analyse MS à plusieurs concentrations -> droite de calibration
- Nécessite de posséder le standard analytique correspondant

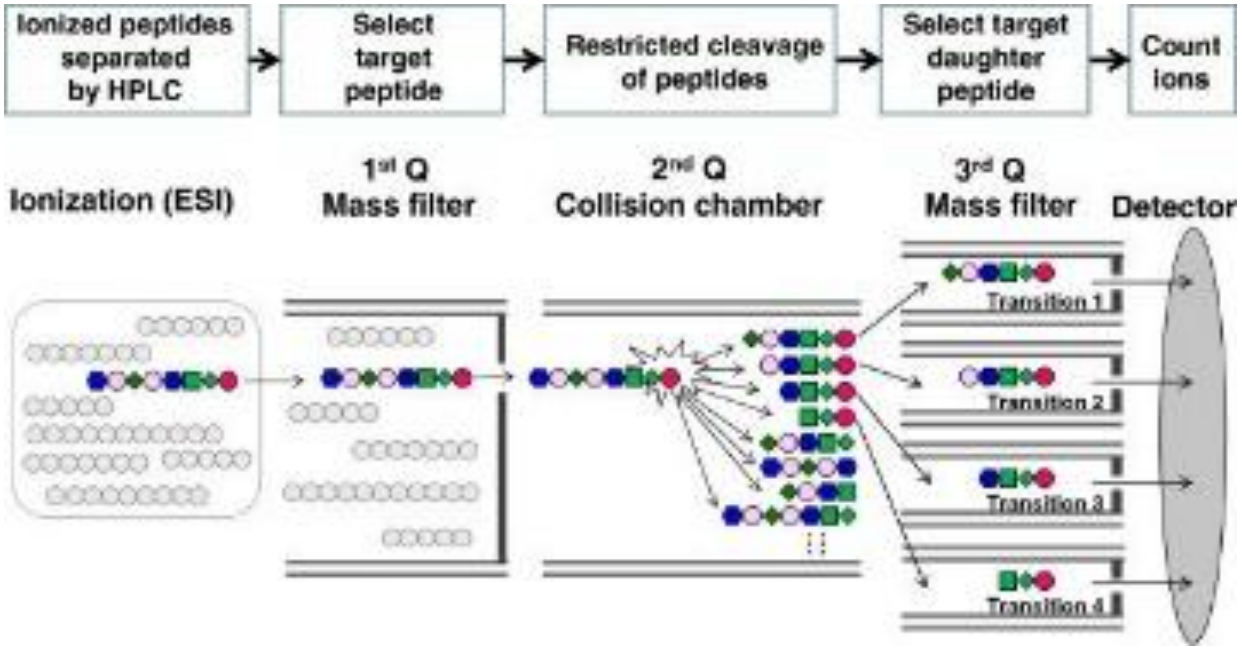


- Analyse des inconnus dans les mêmes conditions

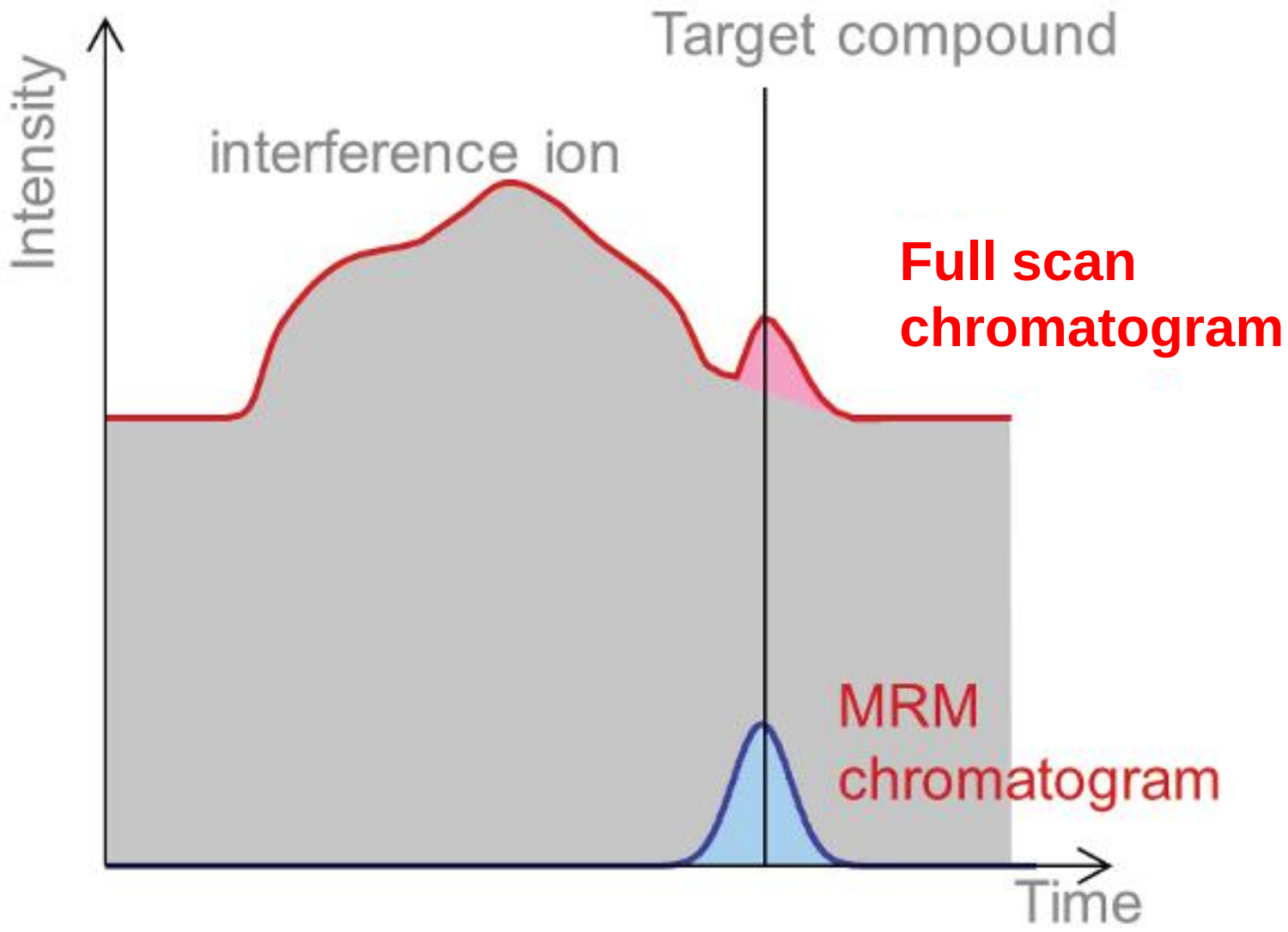
Spectrométrie de masse et techniques couplées

La quantification par MS

- L'outil de choix : le triple quad (couplage LC ou GC)
- Le mode d'acquisition : MRM Multiple Reaction Monitoring
- Transition : un ion parent donne un ion fils



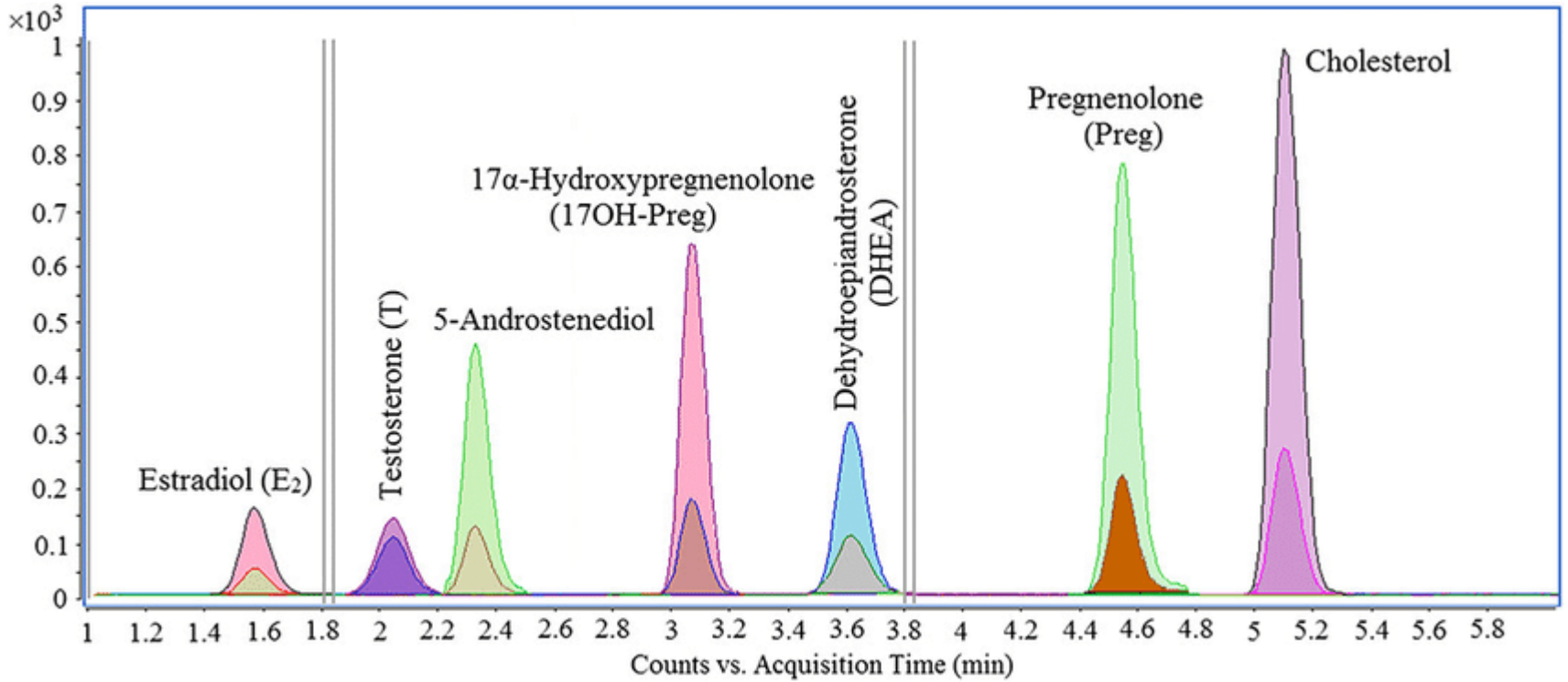
Spectrométrie de masse et techniques couplées



Spectrométrie de masse et techniques couplées

La quantification par MS

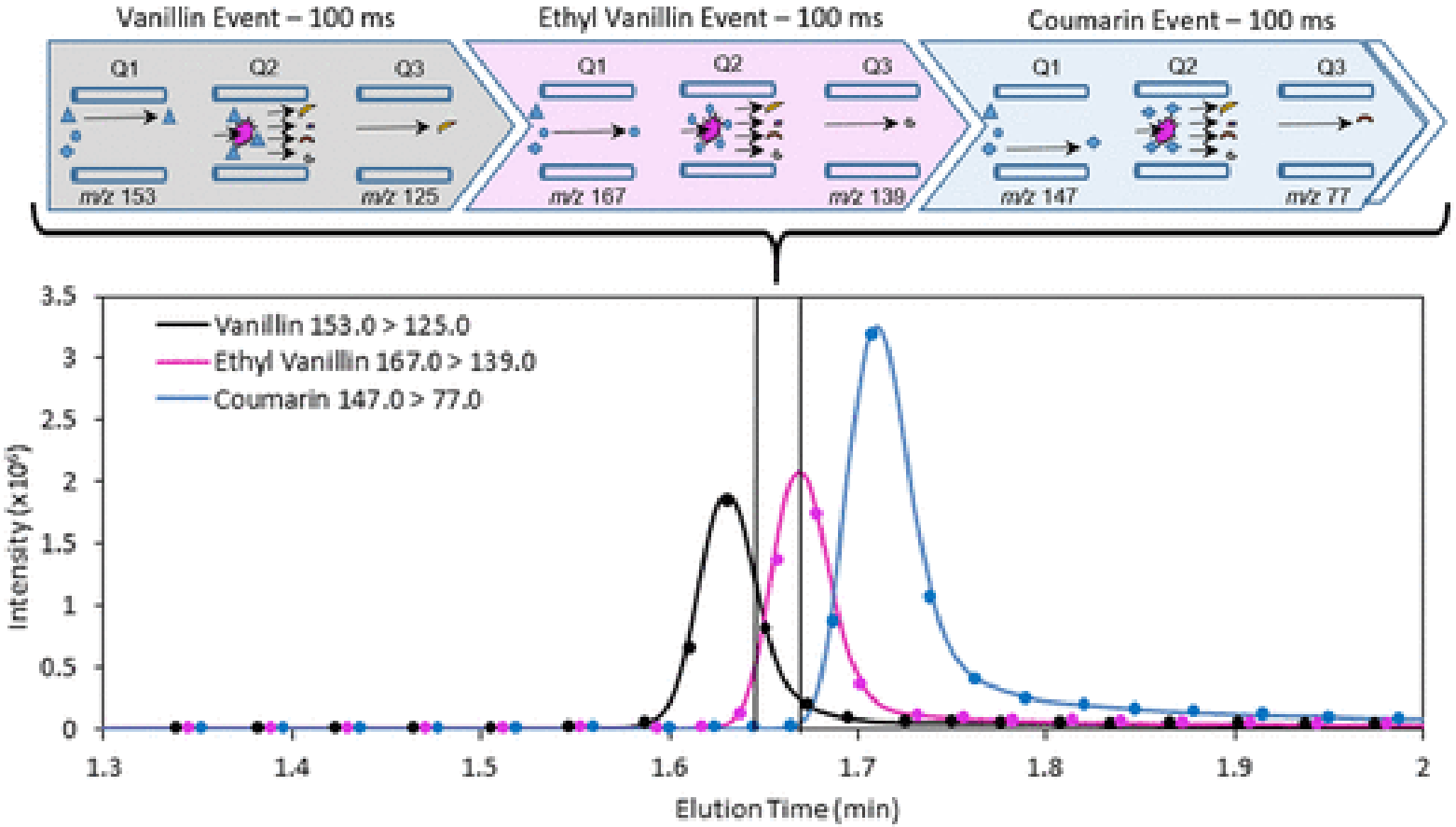
➢La MRM va permettre une spécificité maximum, chaque composé étant défini par plusieurs paramètres : RT, m/z de l'ion parent, m/z des ions fils, ratio entre les ions fils



Spectrométrie de masse et techniques couplées

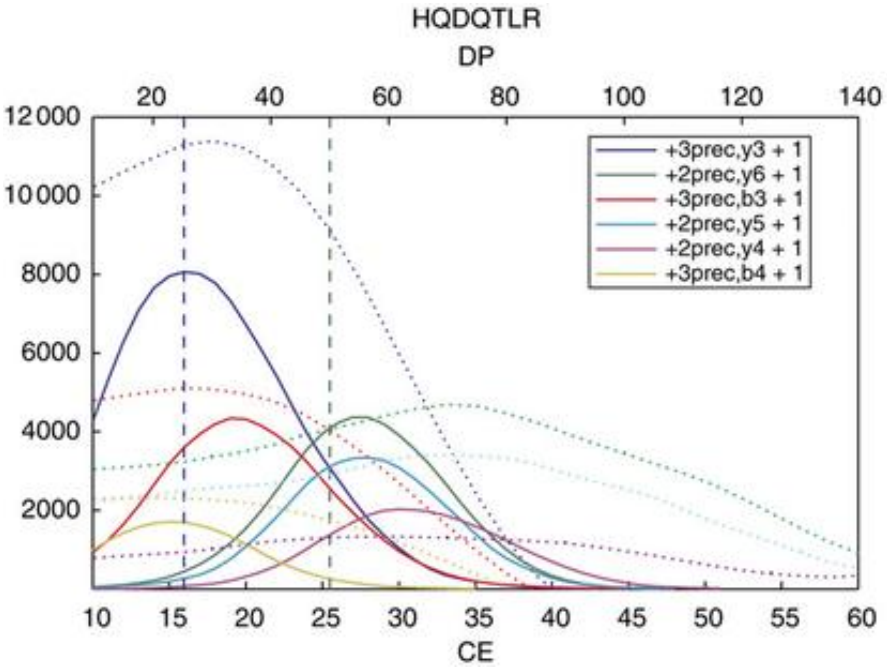
La vitesse d'acquisition

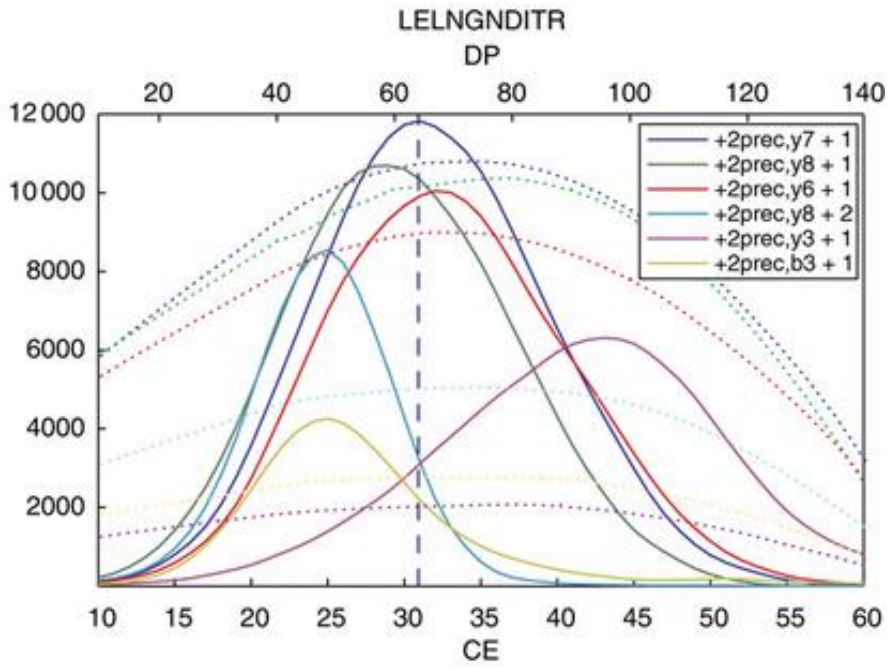
➢Lors du dosage de plusieurs composés, l'appareil réalise un cycle entre les différentes transitions (event)



L'énergie de collision

➢Pour chaque transition observe il est important d'optimiser l'énergie de collision (CE) pour obtenir l'intensité de signal maximum





La quantification par MS

➢Une fois tous ces paramètres optimisés, il faut déterminer pour chaque composé :

- ➢ Limite de détection
- ➢ Limite de quantification
- ➢ Gamme de linéarité

La limite de détection LOD

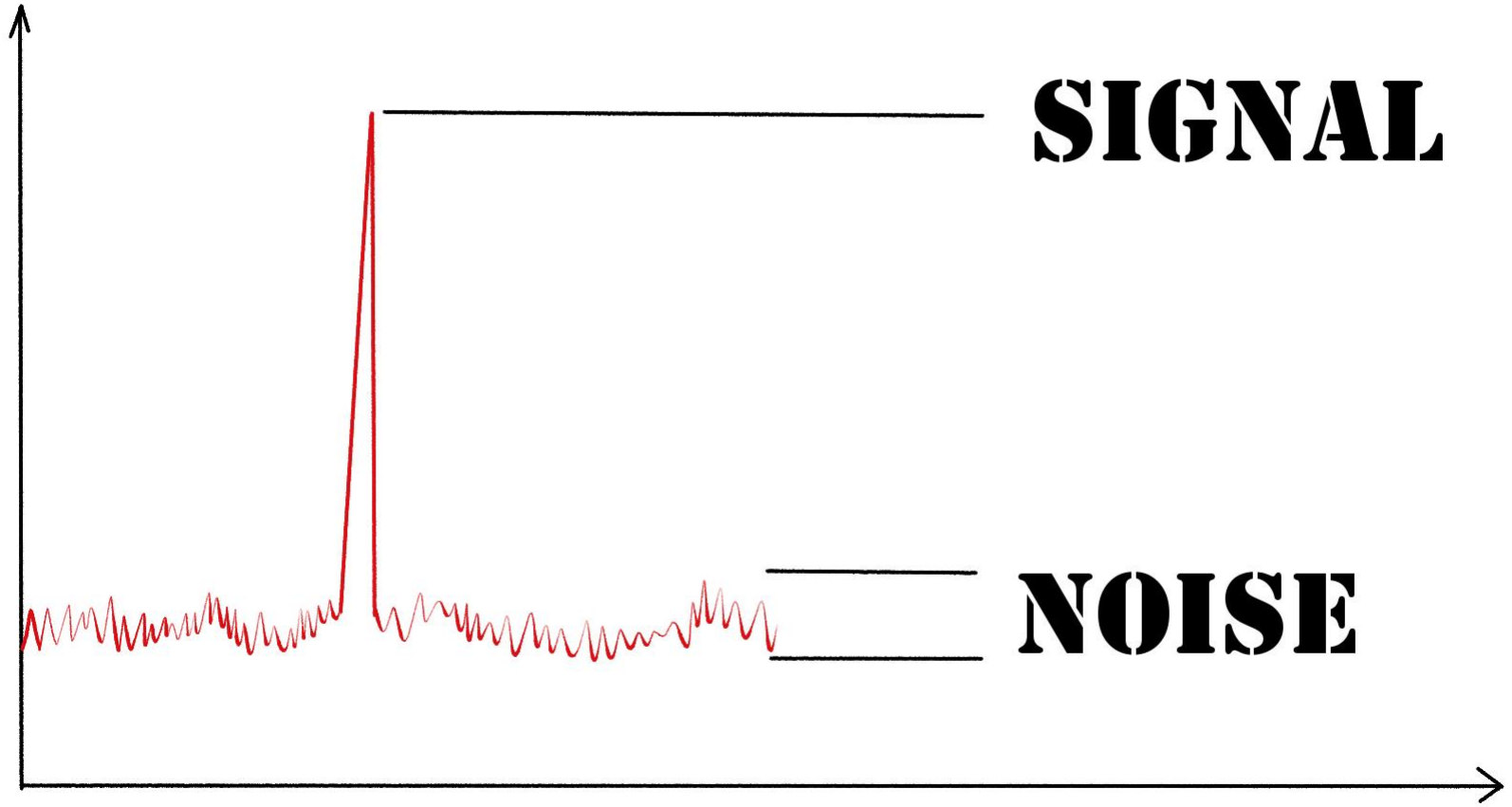
- IUPAC : La **limite de détection** d'une méthode est la plus basse concentration pour un composé, analysé dans une matrice réelle, qui produit un signal détectable avec une incertitude acceptable.

- Pour la déterminer, plusieurs approches selon la norme utilisé (FDA, IUPAC, Eurachem, NordVal…)

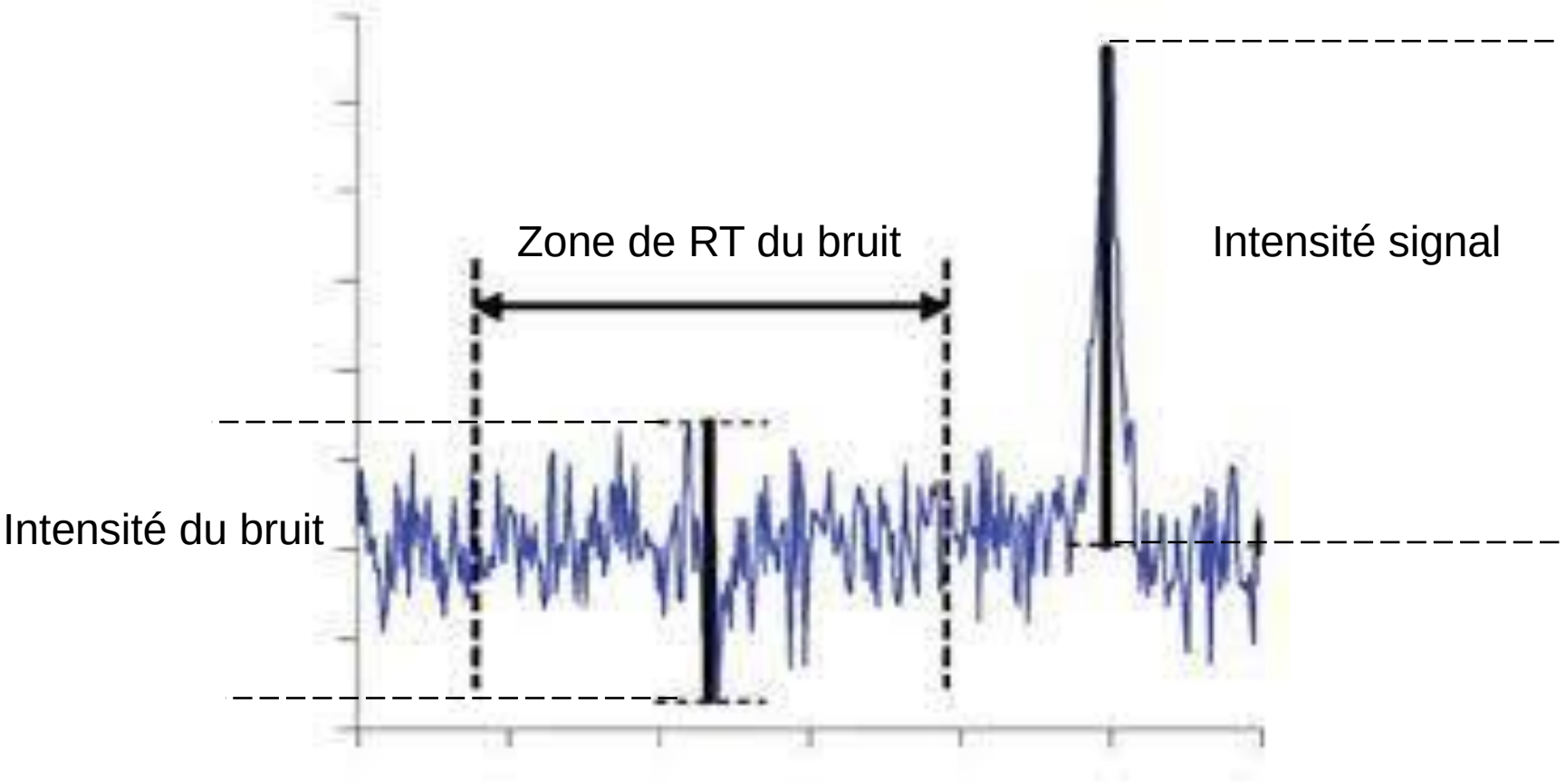
- Méthode la plus simple : approche graphique

$$S/N > 3$$

Le rapport signal sur bruit



Le rapport signal sur bruit



La limite de quantification LOQ

➢ La **limite de quantification** d'un composé est la concentration la plus basse mesuré avec une répétabilité acceptable.

➢Approche graphique : plus rapide mais moins précise

$$S/N > 10$$

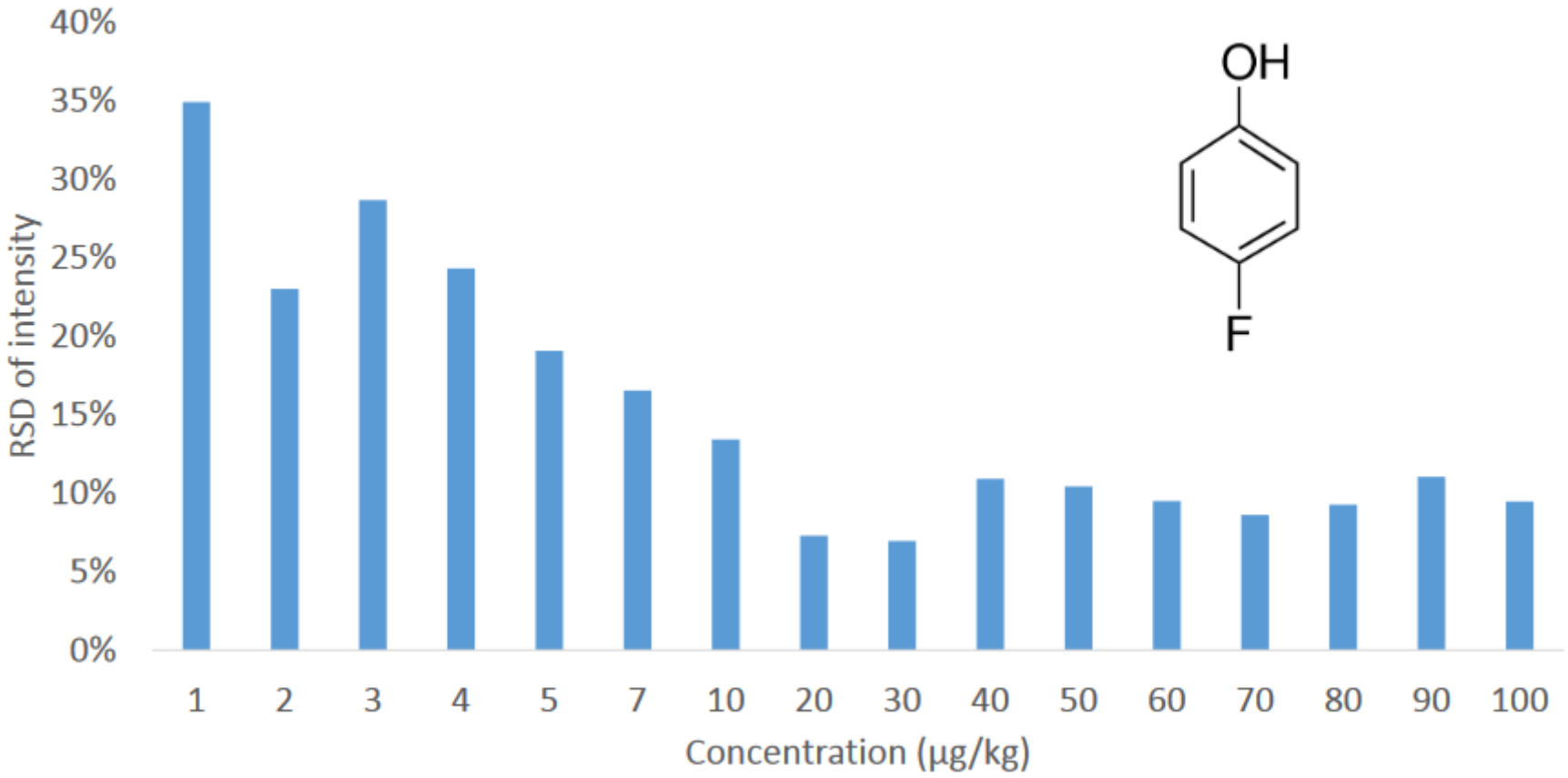
➢ Mesure du coefficient de variation (CV%, RSD)

$$CV = \frac{\sigma}{\mu}$$

CV (coefficient de variation) = l'écart-type sur la moyenne

Coefficient de variation

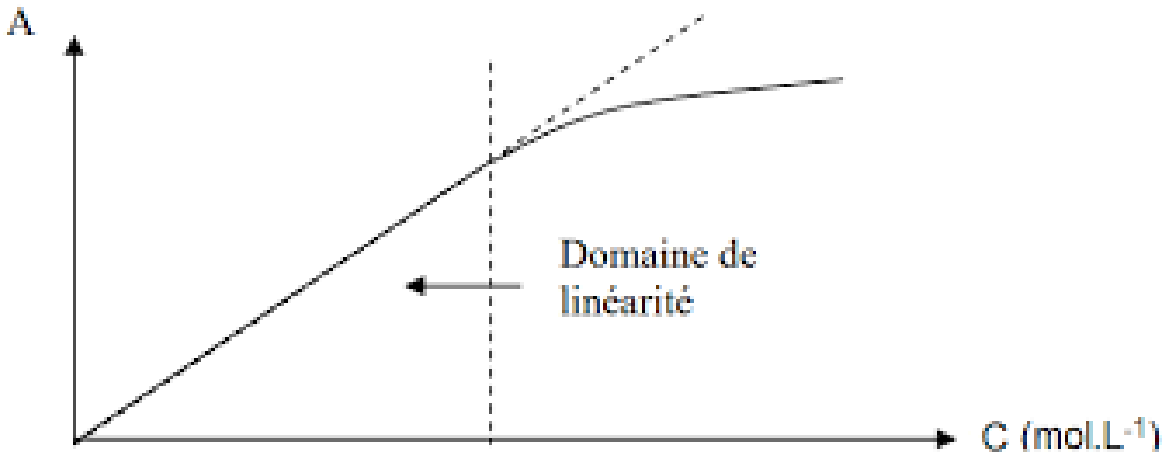
Inférieur à 15 ou 20% selon les normes



La gamme de linéarité

➢ La gamme de concentration pour laquelle on peut déterminer une realtion linéaire entre l'aire et la concentration

$$R^2 > 0,99..$$



LOD, LOQ et linéarité

