



UE5C : Sciences Analytiques – Techniques spectrales

Spectrométrie de masse

université
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE
PHARMACIE

cours 6

Ali TFAYLI
ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr

Principe général

- Technique d'analyse par ionisation des molécules puis, séparation et détection des fragments ionisés suivant leur rapport masse/charge (m/z).
- Utilisée en tant que
 - Méthode de **dosage** (parmi les plus sensibles et spécifique)
 - Méthode **d'identification structurale**
 - Technique **couplée aux techniques séparatives** (chromatographie liquide, Ch. gazeuse, électrophorèse capillaire).

Aspect des spectres

- Le spectre renseigne sur la **masse moléculaire** (ion moléculaire) et la **structure** du composé (ions fragments).
- L'ion d'abondance relative 100% est appelé « pic de base »

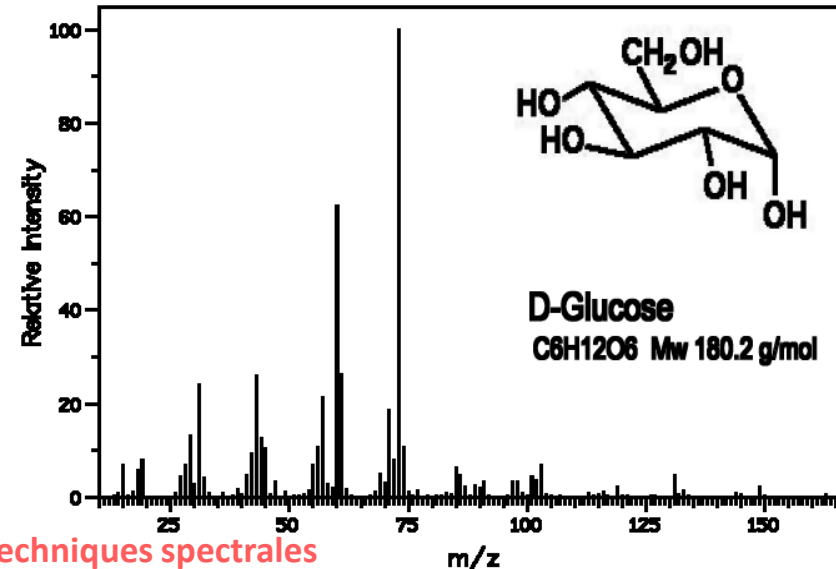
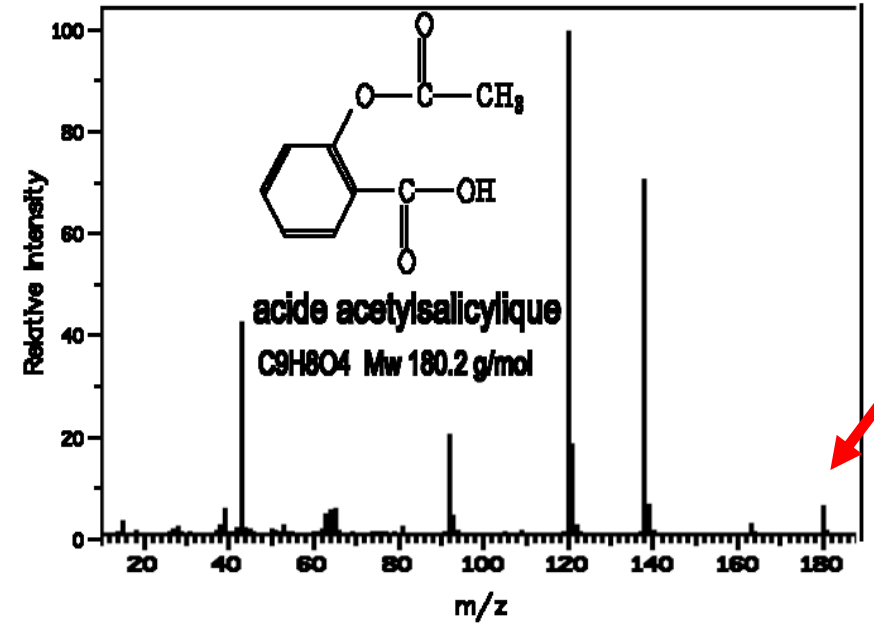
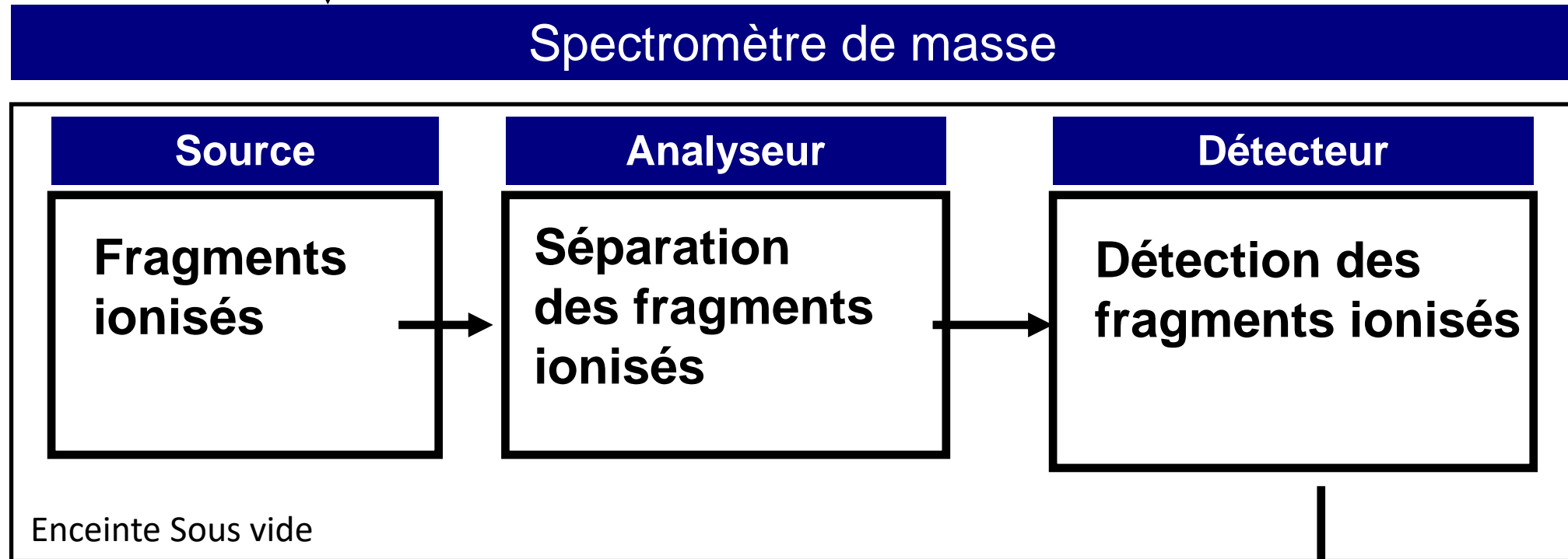


Schéma de principe

Échantillon

Systeme d'introduction: direct ou couplage



Systeme d'enregistrement

Plan

1. Ionisation en phase vapeur

Analyse de petites molécules ($m/z < 1000$ u.m.a.)

1. Appareillage (Système à impact électronique et analyseur quadripolaire).
2. Principe de la fragmentation en impact électronique
3. Ionisation chimique.
4. Couplage aux techniques séparatives
5. Applications

2 Ionisation en solution

Electrospray

3 Ionisation par désorption

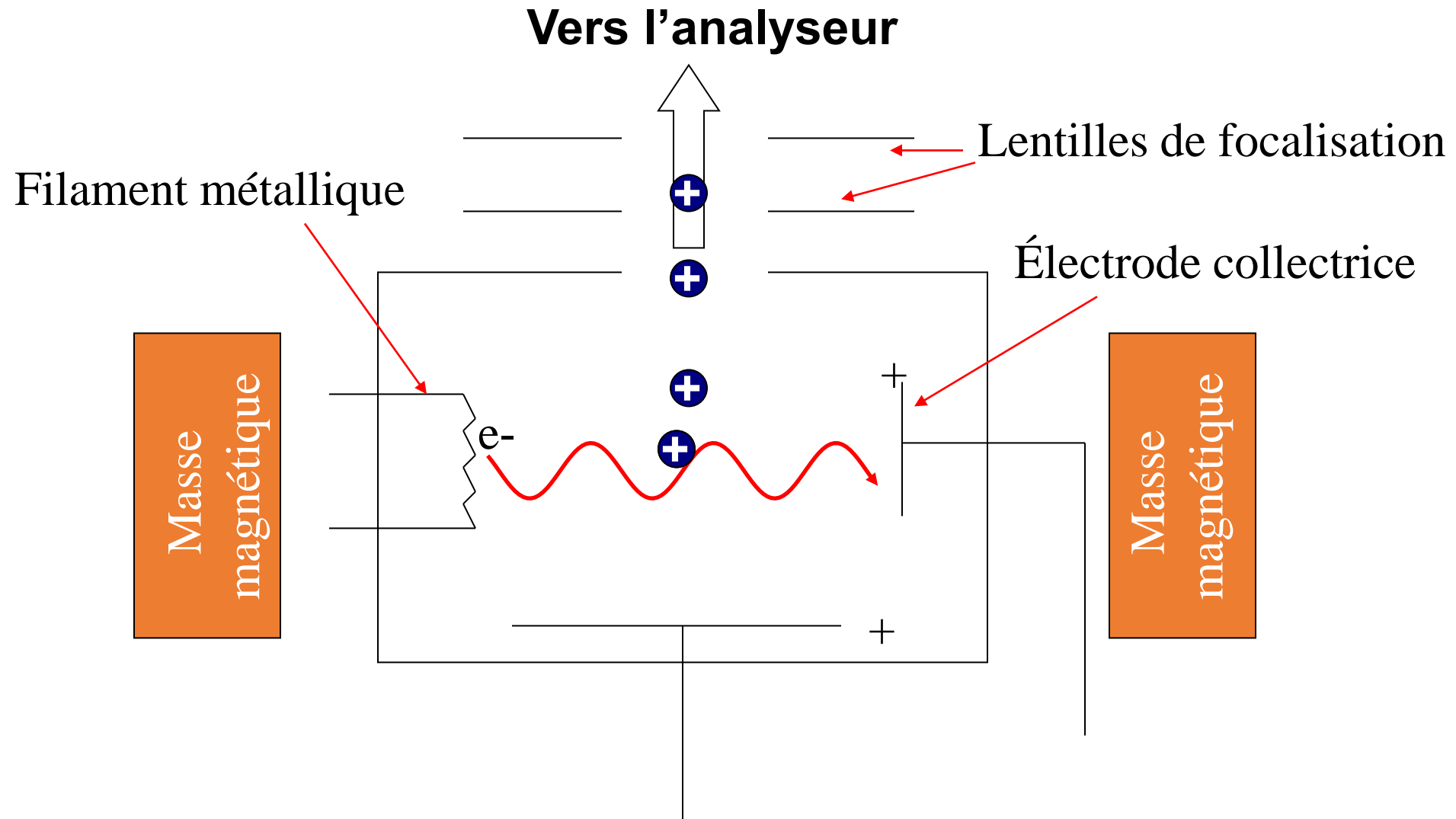
Molécules de taille importante

MALDI et analyseur à temps de vol.

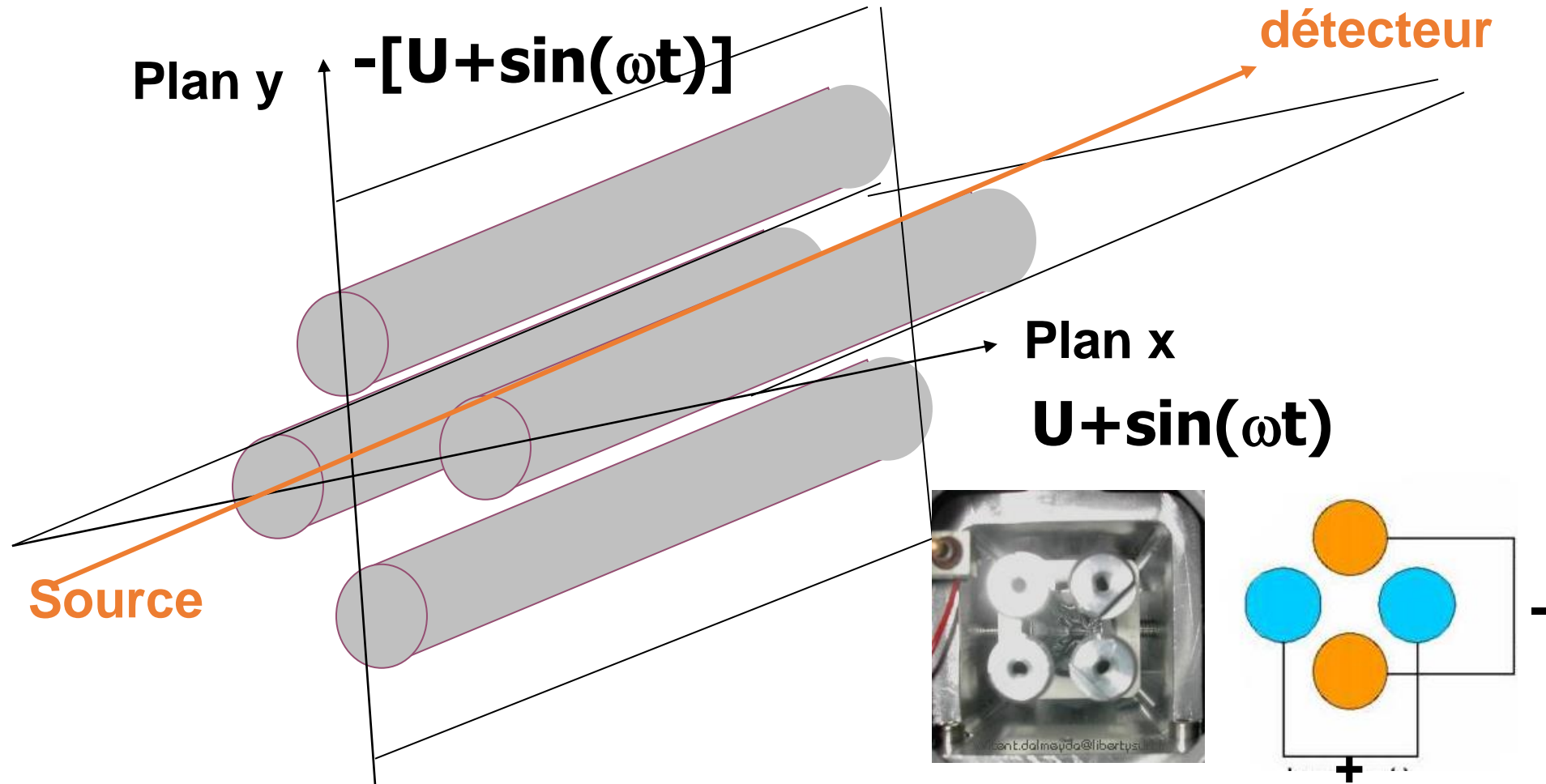
Ionisation en phase vapeur

impact électronique

Source d'impact électronique



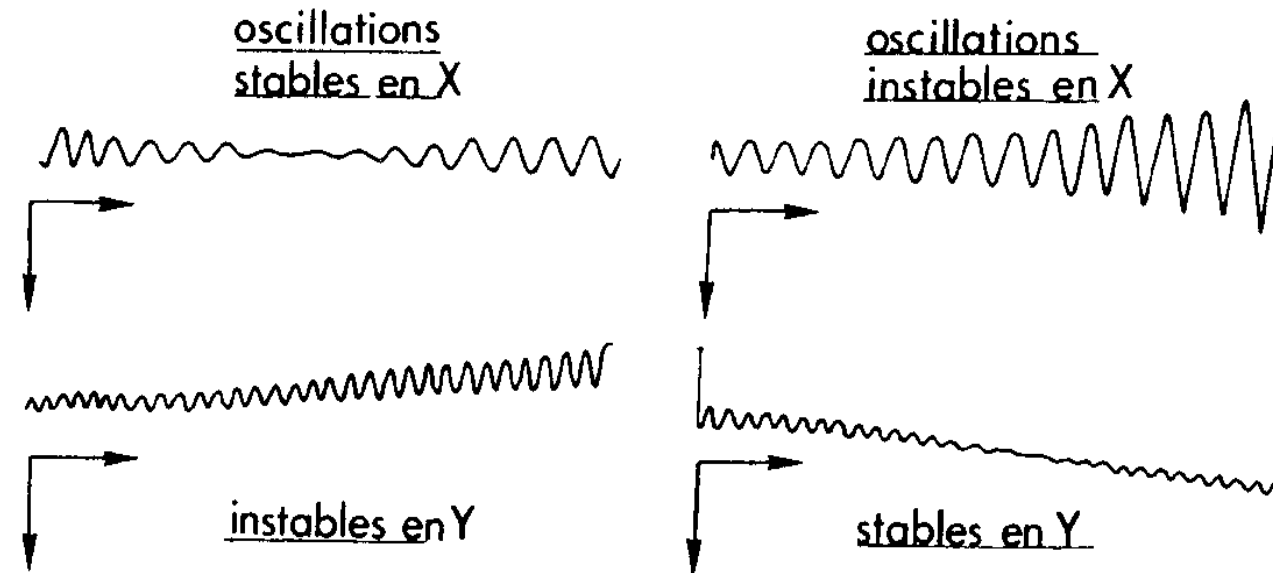
Analyseur quadripolaire



Analyseur quadripolaire

À l'instant « t » un ion de rapport m/z donné aura

- soit une trajectoire stable en X et en Y, qui lui permet de sortir du quadripole,
- soit une trajectoire instable (oscillations dont l'amplitude augmente exponentiellement).



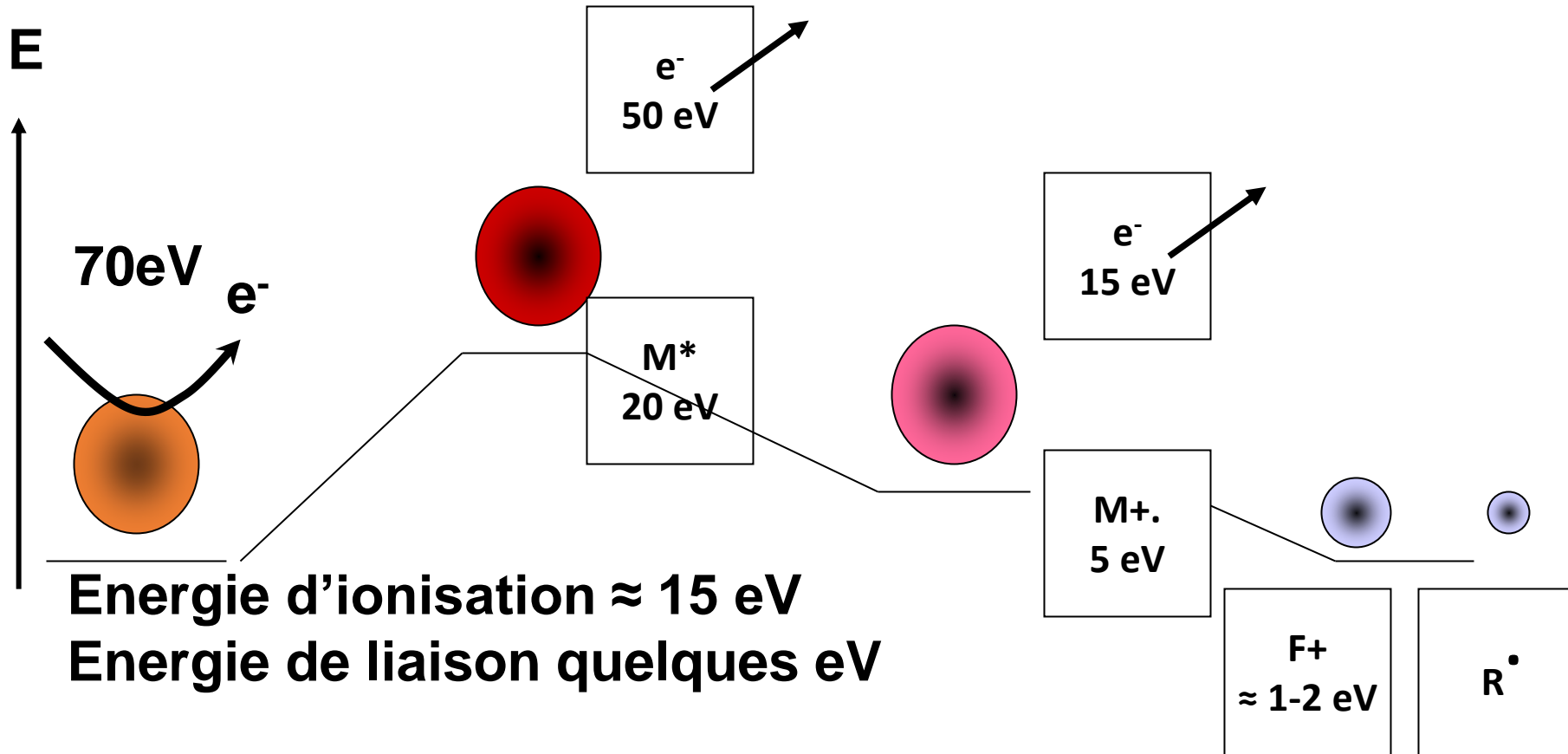
Les ions qui sortent du quadripole sont détectés,

Systemes à impact électronique et analyseur quadripolaire

- L'énergie apportée par les électrons est de 70 eV
- L'ionisation s'effectue en phase vapeur
- L'ensemble Source/analyseur/ détecteur d'ions est sous vide ($\approx 10^{-5}$ Torr) pour augmenter le libre parcours moyen des ions.
- Avantage et défauts de l'analyseur quadripolaire:
 - Rapide (plusieurs balayage par sec)
 - Plus sensible pour les basses masses que pour les hautes masses
 - Gamme de masse limitée ($m/z < 1000$).

Principe de fragmentation en impact électronique

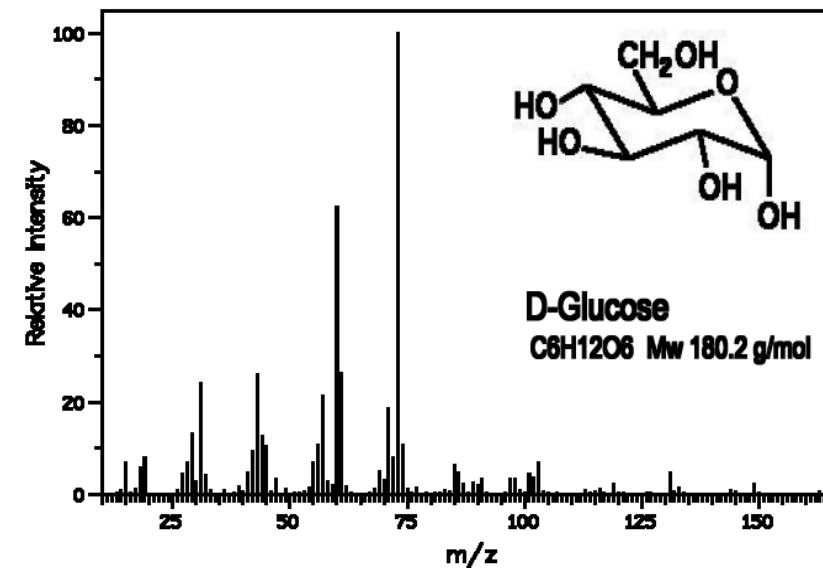
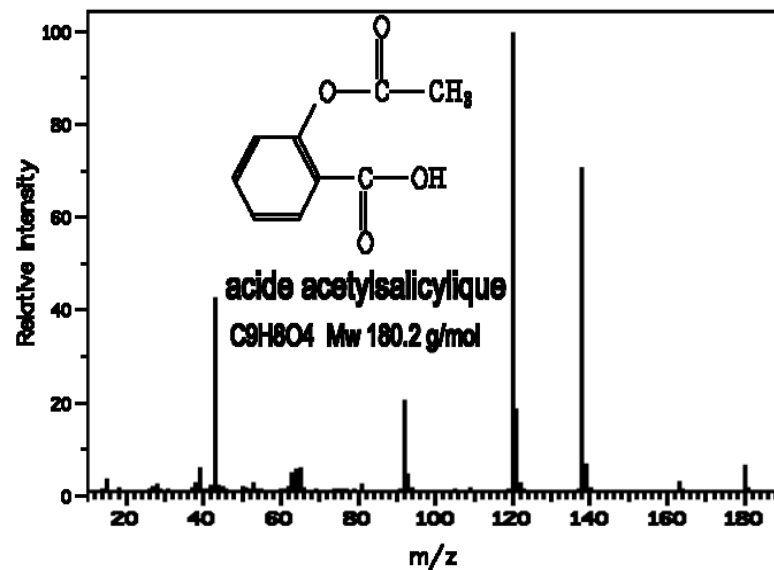
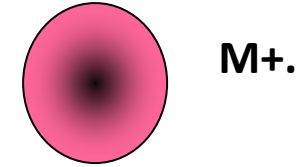
Principe de la fragmentation



Réaction globale: $M+e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$

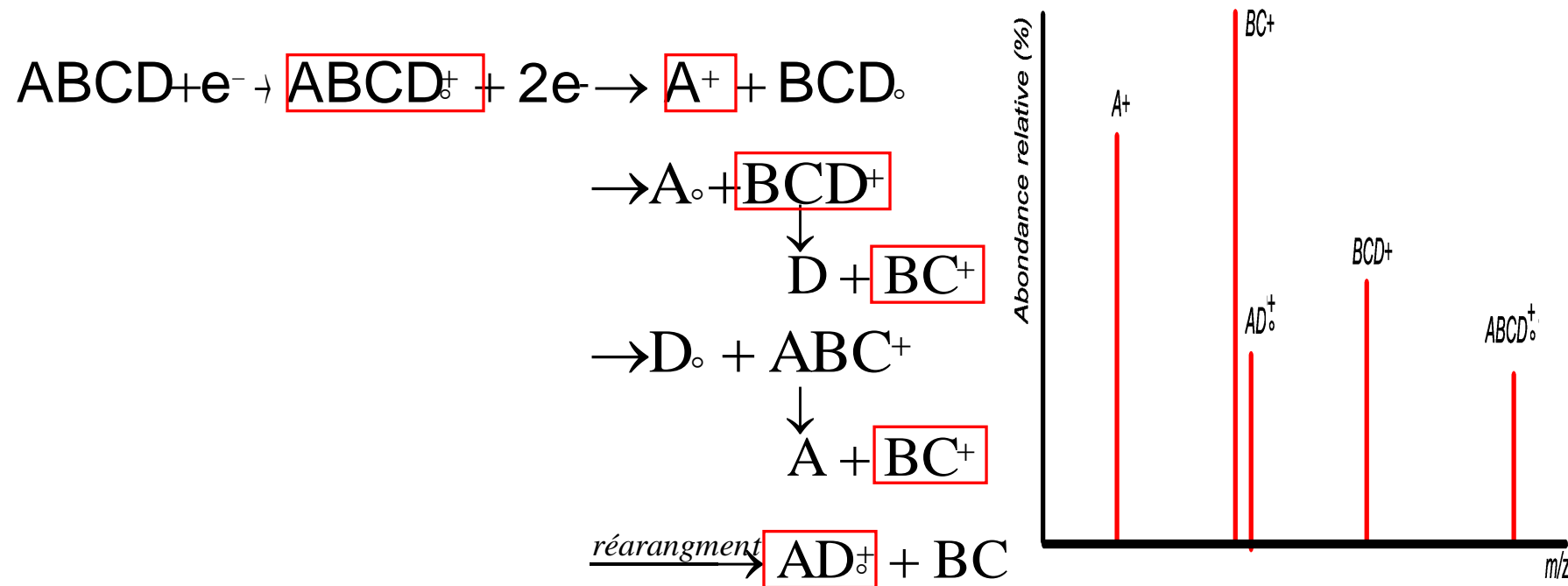
L'ion moléculaire

- Est un ion radicalaire
- Suit la règle de l'azote
 - si sa formule brute contient un nombre impair d'azote, son rapport m/z est impair.
- N'est parfois pas observé car trop instable



La fragmentation

Les ions fragments observés sont ceux issus des réactions qui aboutissent aux fragments les plus stables.



Abondance et massifs isotopiques

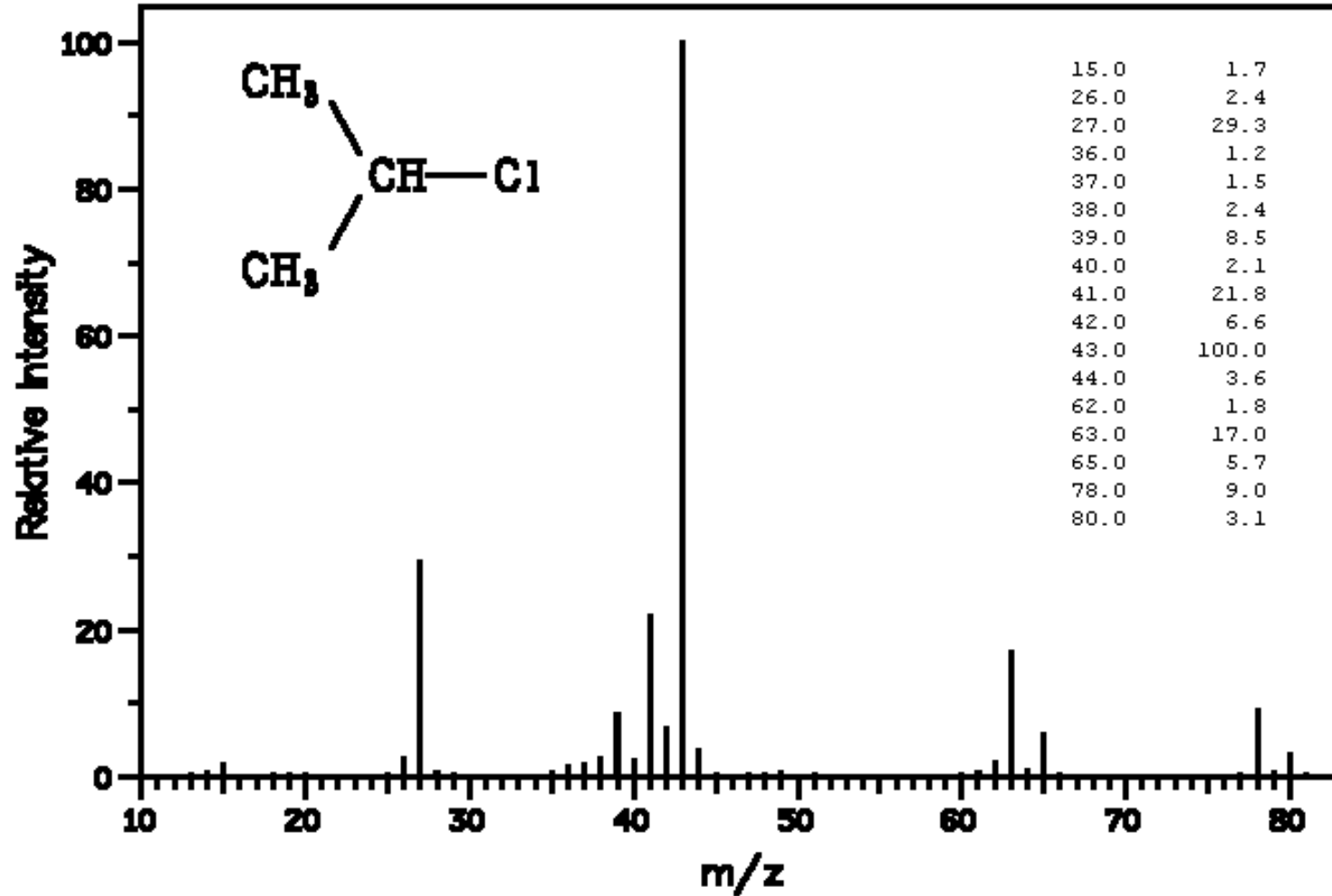
Principaux isotopes stables

- Certains éléments possèdent des isotopes stables qui permettent d'identifier des « massifs isotopiques » caractéristiques.

	Masse	abondance (%)
C	12	98.9
	13	1.1
Si	28	92.2
	29	4.7
	30	3.1
Cl	35	75.8
	37	24.2
Br	79	50.7
	81	49.3

Massifs isotopiques: Chlore

2-chloropropane masse moléculaire 78,5



35	37
75.8%	24.2%

Cl

Ionisation chimique

Source ionisation chimique

- A basse pression (10^2 Pa)
 - Source IE modifiée
 - Orifice pour entrée du gaz réactant
 - Confinement pour favoriser l'ionisation
 - Ionisation du gaz réactif et transfert en fonction de l'affinité protonique de la molécule.

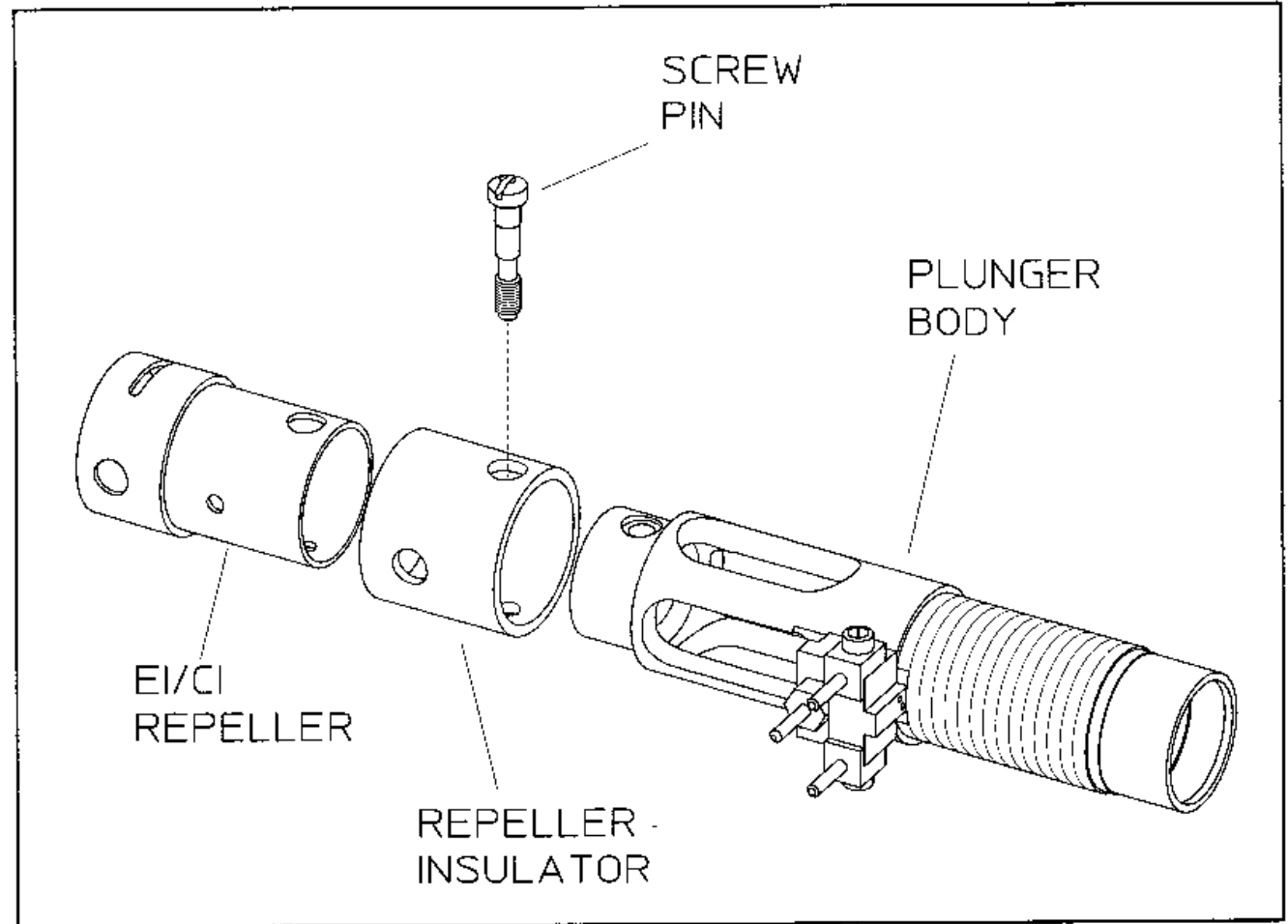
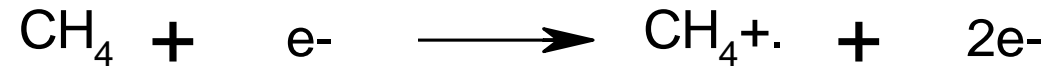


Figure 7-4. Plunger

Ionisation chimique positive

Exemple du méthane

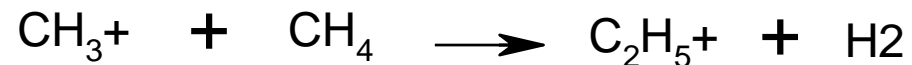
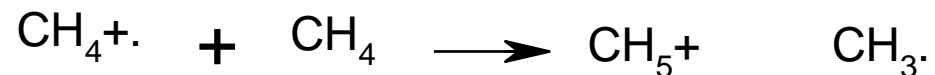
Le méthane est introduit dans la source et subit des réactions d'ionisation



Puis de fragmentation



Et de réaction entre molécules de gaz (en raison de la pression relativement élevée dans la source)



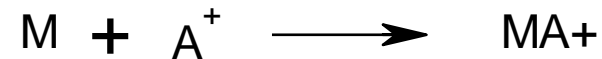
Réactions gaz ionisé-molécules

- L'ion réactif A^+ (CH_5^+ , $C_2H_5^+$) peut provoquer

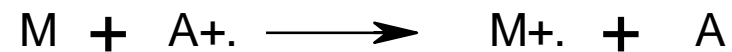
- Un transfert de proton



- Une condensation



- Un transfert de charge



- Un arrachement d'ion négatif



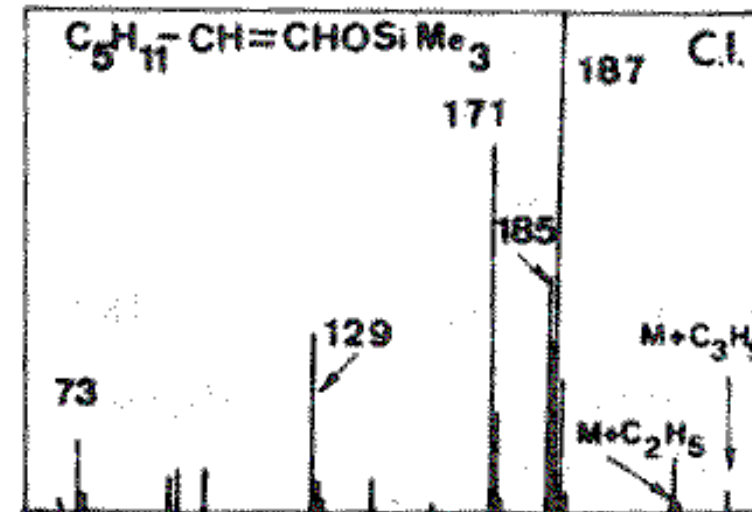
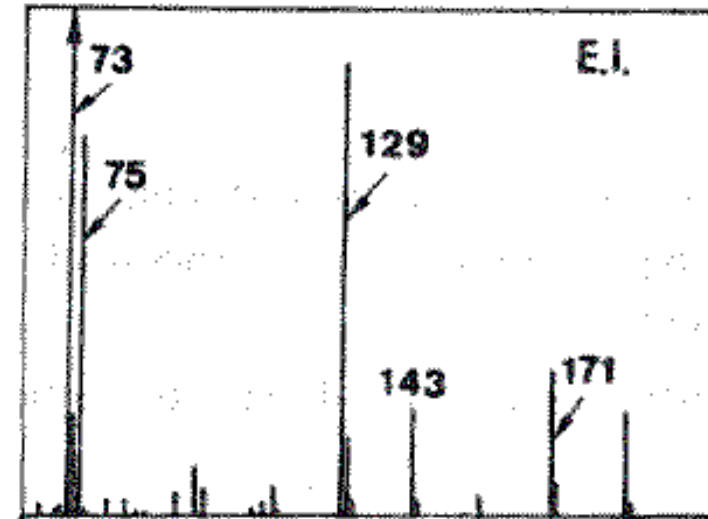
avec $Z=H$ ou $Z=R$

Ionisation chimique au méthane

Composé de masse moléculaire 186

Spectre en ionisation chimique ions

m/z	ion	mécanisme
185	$(M-H)^+$	arrachement de proton
186	M^+	transfert de charge
187	MH^+	transfert de proton
	$(M+C_2H_5)^+$ $(M+C_3H_5)^+$	condensation



Couplage aux techniques séparatives

Couplage à la chromatographie en phase gazeuse

- Chromatographie gaz-capillaire
 - Colonnes de plusieurs dizaines de mètres, grande efficacité de séparation
 - La colonne arrive directement dans la source du spectromètre de masse
 - Le système de pompage du spectromètre de masse permet d'éliminer le gaz vecteur (Hélium)

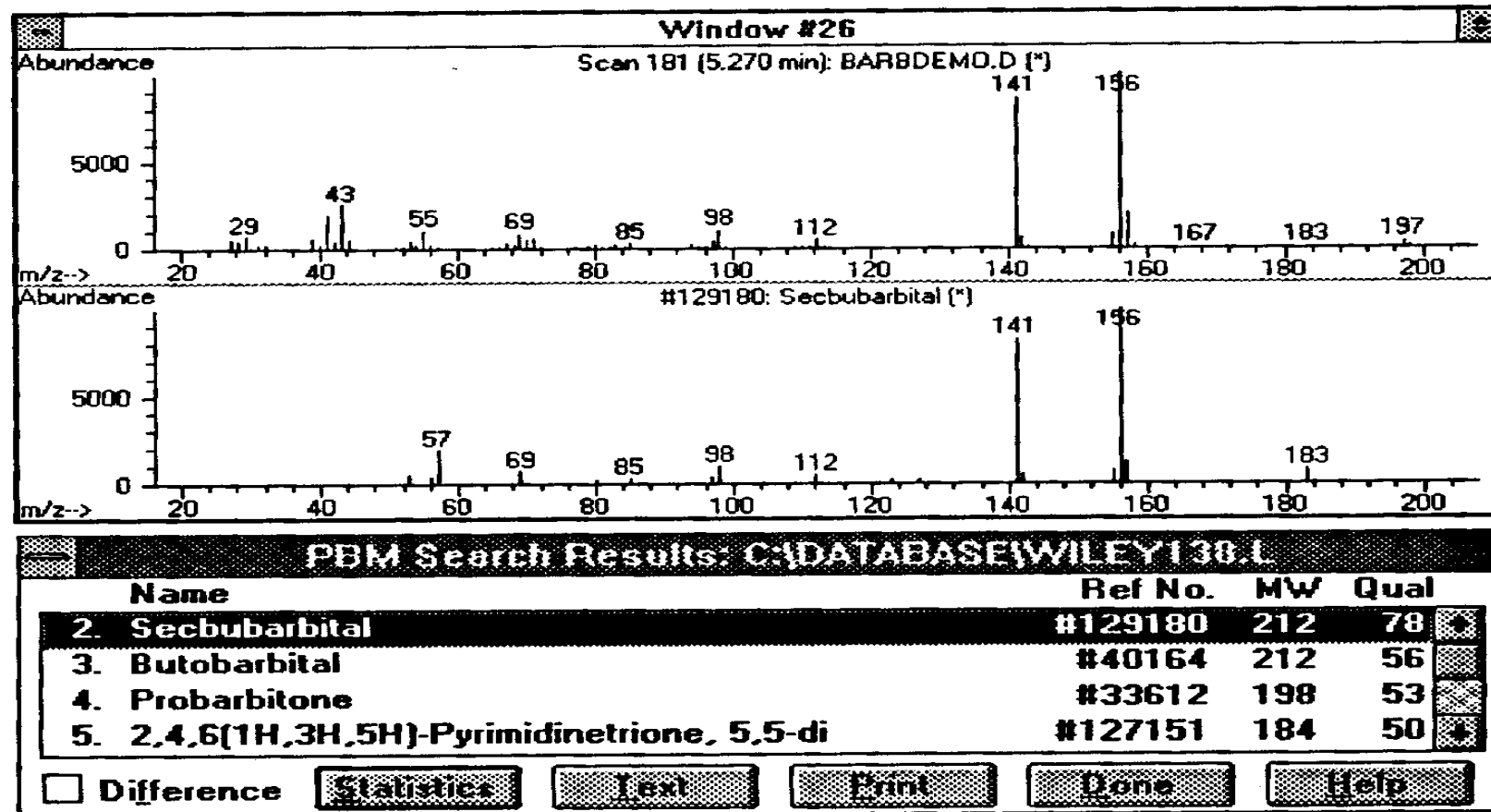


Bibliothèques de spectres

Plusieurs milliers (350 000/400 000) de spectres en mémoire



Fichier MS



Applications

En mode introduction directe de l'échantillon

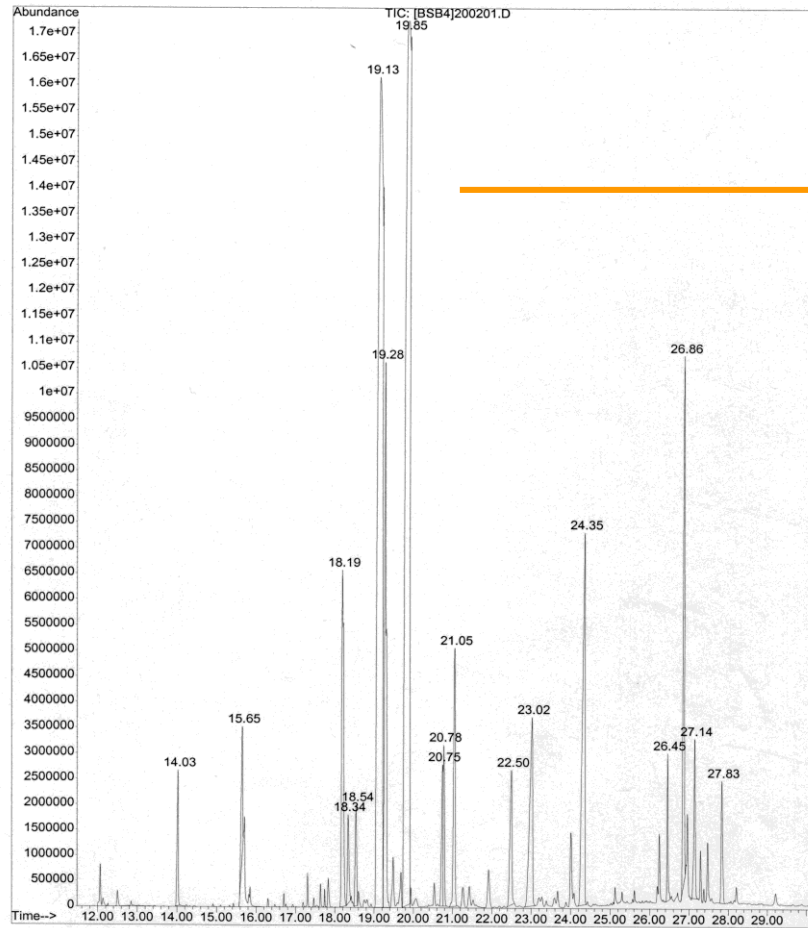
- Analyse structurale des principes actifs d'origine chimique (petites molécules)
 - Impact électronique: vérification de la structure
 - Ionisation chimique: détermination de la masse moléculaire

En couplage à la CG

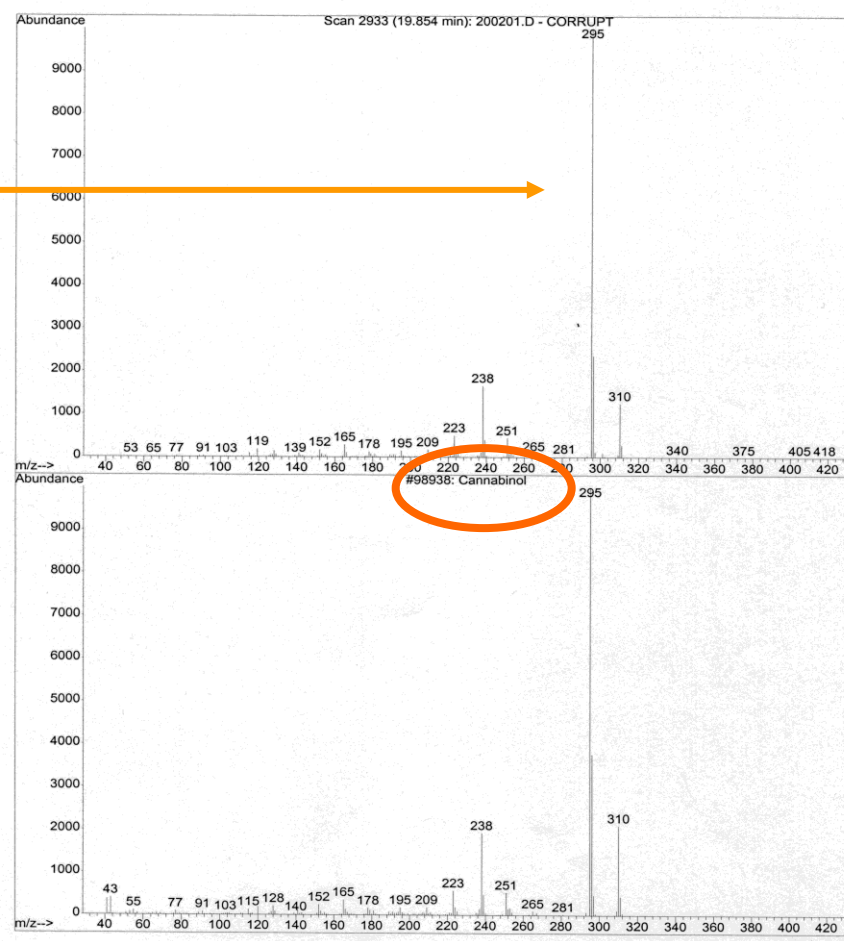
- Toxicologie analytique (dopage, lutte contre la toxicomanie, médecine légale)
 - Recherche de toxiques dans les prélèvements biologiques
- Recherche des solvants résiduels dans les principes actifs pharmaceutiques
- Études de métabolisme
 - Quantification en mode IC positive ou négative.

Exemple toxicologie analytique

File : D:\ANALYSES\2002\FEVRIER\PLANTES A.C\BSB\200201.D
Operator : [BSB4]MBR
Acquired : 20 Feb 2002 11:12 using AcqMethod MSPARAM1
Instrument : MSD 5973
Sample Name: ECH VERT 1
Misc Info : TSdu 18/02/02
Vial Number: 1

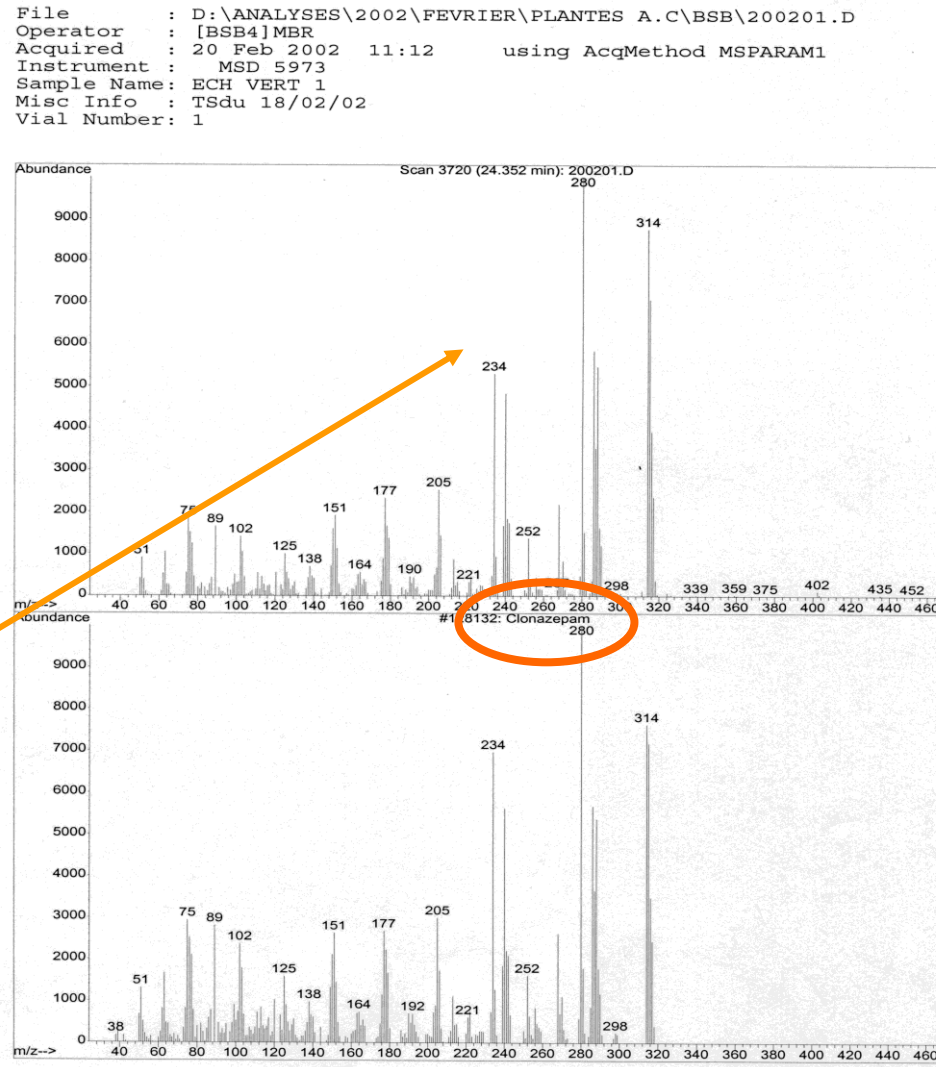
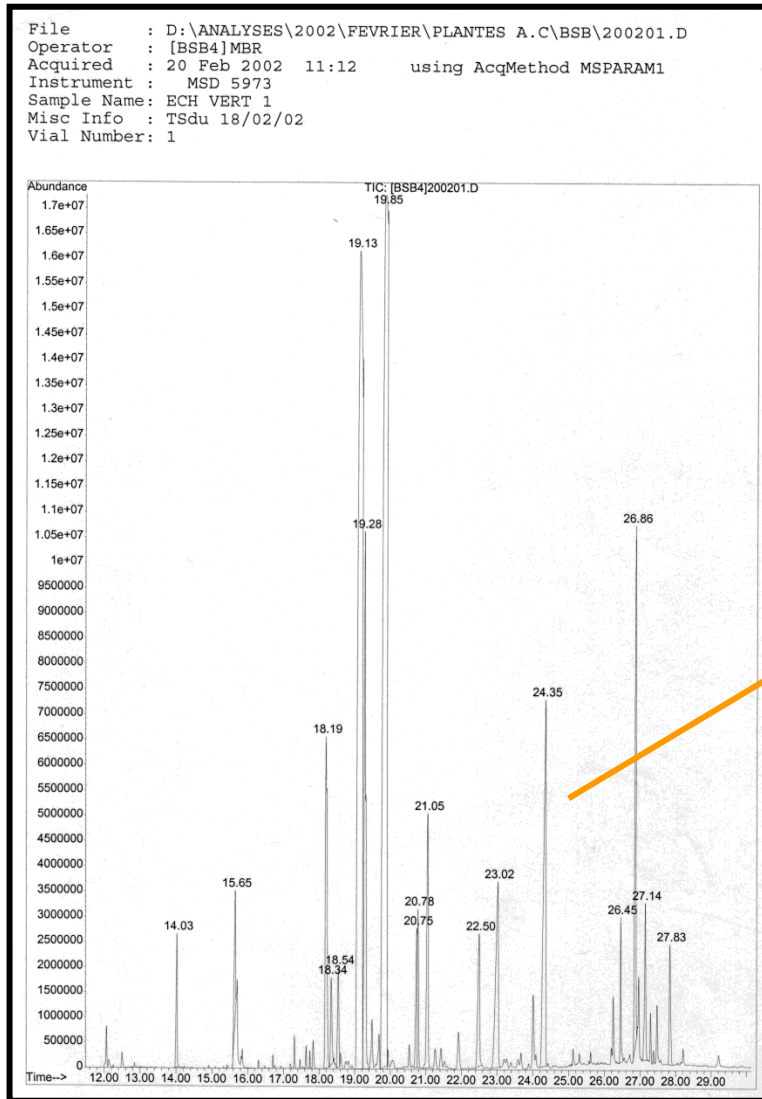


File : D:\ANALYSES\2002\FEVRIER\PLANTES A.C\BSB\200201.D
Operator : [BSB4]MBR
Acquired : 20 Feb 2002 11:12 using AcqMethod MSPARAM1
Instrument : MSD 5973
Sample Name: ECH VERT 1
Misc Info : TSdu 18/02/02
Vial Number: 1



Exemple toxicologie analytique

Laboratoire de Toxicologie et Pharmacocinétique / Service de Pharmacie Clinique et des Biomatériaux / GH BICHAT-CI. BERNARD



Ionisation en solution

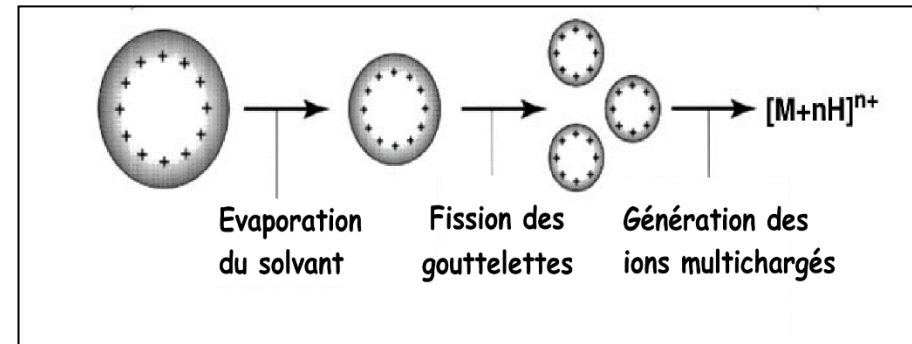
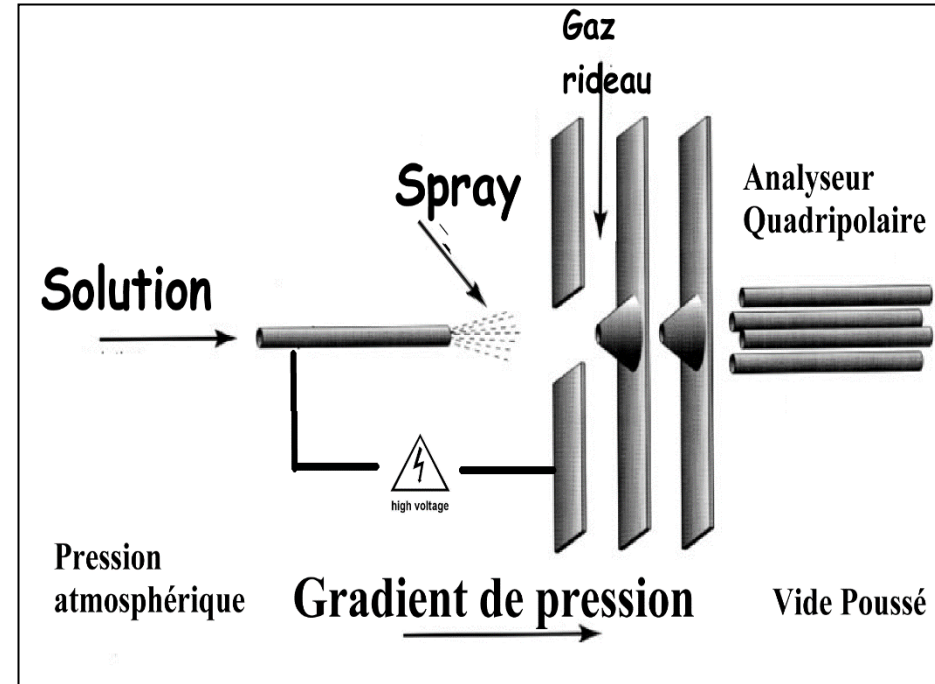
Electrospray (Electronébulisation)

Systeme electrospray.

Couplage: CLHP

Un potentiel de plusieurs kV provoque une électronébulisation de la solution suivie d'une fission des gouttelettes et de l'évaporation du solvant.

**Les ions sont multichargés
 $N=1,2,..30$**

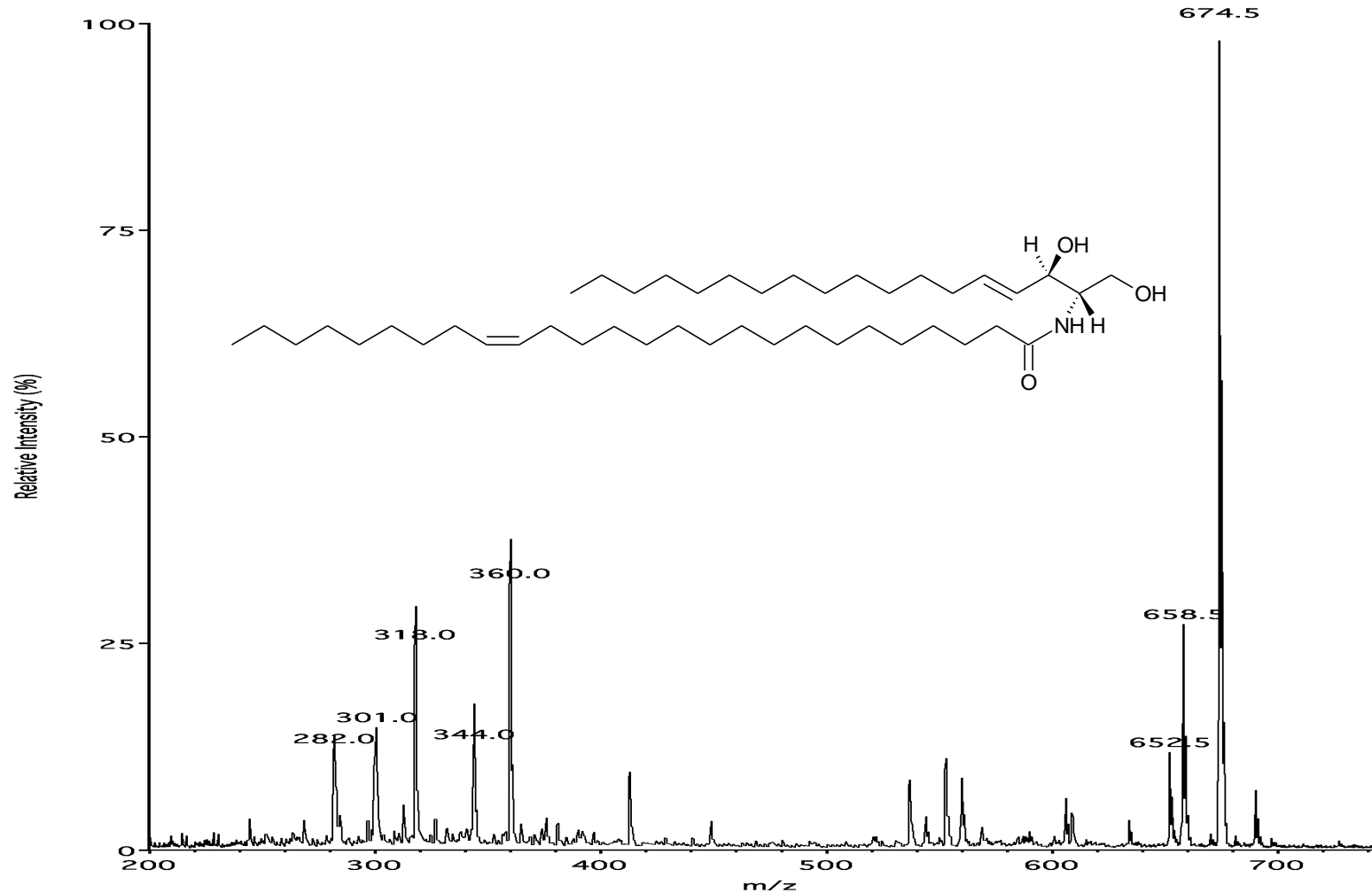


Fragmentation

- **Technique d'ionisation « douce » comparé à l'IE**
 - **Peut être utilisée en mode positif:**
 - **Ions $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$...**
 - **Et fragments mono ou multichargés**
 - **Peut être utilisée en mode négatif:**
 - **Ions $[M-H]^-$, $[M-2H]^{2-}$...**
 - **Et fragments mono ou multichargés**
- **Les petites molécules sont en général monochargées**
- **Des composés d'addition (solvant, sodium...) peuvent se former**

Exemple de spectre ES

Spectres de céramide en mode d'ionisation positif.



Electrospray Applications

- Compatible avec la CLHP, méthode plus « générale » que CPG
- Méthode d'ionisation « douce », peu de fragmentation.
- Masses moléculaires jusqu'à 10^5 Da grâce aux ions multichargés
- Pas de bibliothèques de spectres comme en GC/MS
 - Mais de nombreuses bases de données du protéome et du métabolome.

Ionisation par désorption

Technique MALDI

Source MALDI

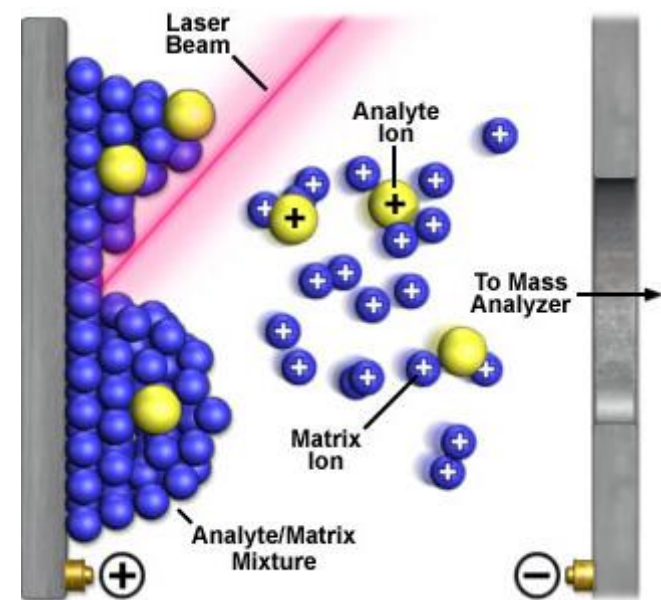
(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)

1. L'échantillon (A) est mélangé à une matrice (M) et déposé sur plaque, dans des puits.
2. L'impact du Laser provoque l'ionisation de la matrice et la désorption de l'échantillon
3. L'échantillon est ionisé par transfert de protons venant de la matrice



UE5 Sciences Analytiques (C) Techniques Spectrales

UE5 Sciences Analytiques: (C) Techniques spectrales

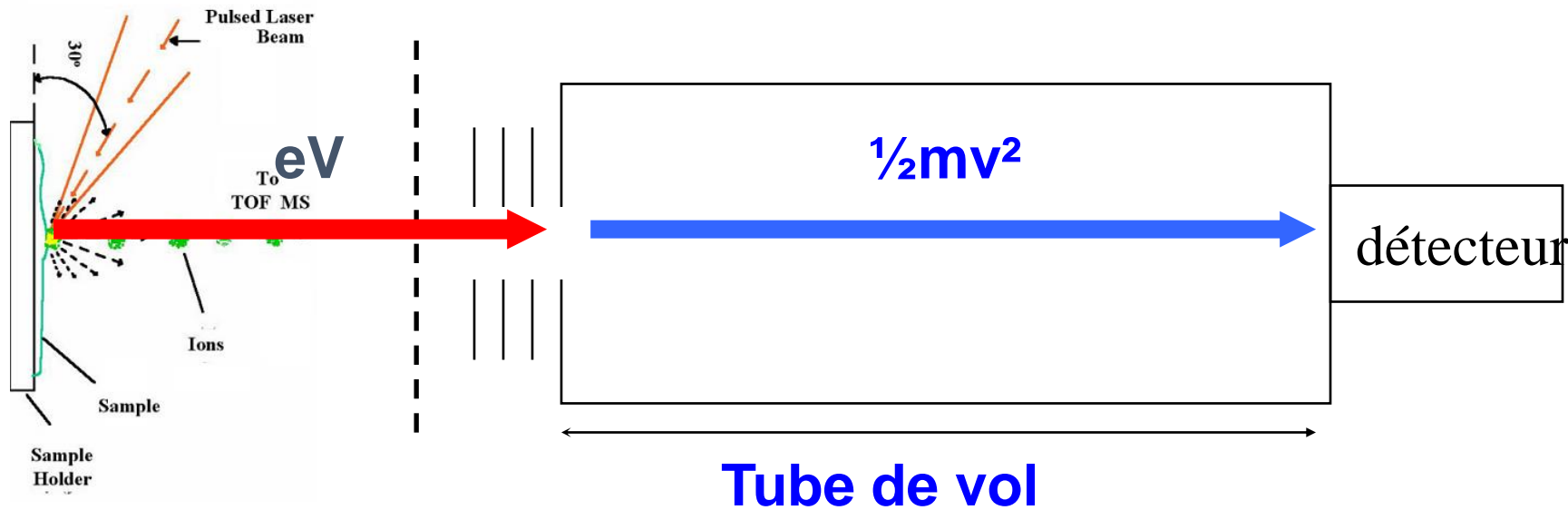


Analyseur à temps de vol (TOF)

Energie cinétique: $eV = \frac{1}{2} mv^2$

Seuls les ions sont accélérés,

Si m est petit v est grand et le temps de vol petit



Nécessite une source pulsée (MALDI)

Domaine de masse virtuellement illimité: molécules jusqu'à 300 kDa

Exemple de Spectre MALDI-TOF

