

LA SPECTROMETRIE DE MASSE

HISTORIQUE :

Première mesure de spectres de masse en 1912 par Thompson et méthode d'ionisation et passage dans un secteur magnétique par Arnot et Milligan en 1918. L'utilisation en 1919 des masses atomiques par Aston. Montage en 1946 d'un appareil à temps de vol (TOF-MS) par Stephens, celui d'un analyseur par filtre quadripolaire en 1953-1958 par l'équipe de Paul. Branchement de la chromatographie en phase gazeuse en 1956 par Gohlke et McLafferty. Utilisation en 1965 de l'appareil ionique à cyclotron par résonance par l'équipe Ripple et Son Equipe. Application de l'ionisation chimique par Munson et Field en 1966 de l'ionisation (Electrospray) par Dole et son équipe en 1968 et la (thermospray) par l'équipe de Blakely. Couplage de la chromatographie en phase liquide en 1973 par McLafferty. Depuis ce temps, la technique du spectromètre de masse s'est constamment améliorée.

I- INTRODUCTION

La spectrométrie de masse (Mass spectrometry ou MS) est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse. De plus, elle permet de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant et de réaliser des analyses quantitatives. Des limites de détection inférieures au nanogramme (10^{-9} g) et même au picogramme (10^{-12} g) sont souvent atteintes. La spectrométrie de masse est une méthode destructive, qui permet à la fois d'accéder à la mesure de la masse moléculaire d'une substance ainsi que d'obtenir des données structurales : la substance ionisée se trouve dans un état excité qui provoque sa fragmentation. L'analyse de ces fragments informe sur la structure de la molécule. Chacun des ions formés est caractérisé par son rapport masse/charge (m/z) et l'appareil est capable de séparer ces ions (par un champ magnétique) et de les détecter/caractériser (qualitativement et quantitativement).

Ils se répartissent en 5 catégories distinctes suivant leur conception. Certains utilisent, après ionisation, des champs électriques et magnétiques, d'autres uniquement des champs électriques. Les appareils sont utilisés seuls ou, le plus souvent, en aval de techniques séparatives (e.g. chromatographie en phase gazeuse) ou d'analyse thermique (identification des espèces libérées après une décomposition). La technique est très répandue en raison de son couplage possible avec d'autres techniques (Polyvalence) et de son extrême sensibilité.

II- Techniques utilisées et étapes dans l'obtention d'un spectre de Masse

1. préparation et introduction de l'échantillon

Le composé doit être à l'état de vapeur, idéal donc pour le gaz et les liquides dont la tension de vapeur est assez grande. Le gaz introduit dans la chambre d'ionisation par un tube muni d'une fuite. La pression dans le réservoir est $\approx 10^{-2}$ torr et a la source de 10^{-6} à 10^{-8} torrs.

Si le composé est un liquide ou un solide volatil, l'injection est directe mais le composé est chauffé pour être vaporisé ; ce qui peut entraîner de la pyrolyse. Le composé peut provenir directement d'un appareil de chromatographie liquide ou gazeuse ou d'un appareil d'électrophorèse capillaire.

2. Mode d'ionisation

a- L'impact électronique (I.E.)

Elle consiste à obtenir, sous vide, l'interaction d'une molécule M et d'un électron accéléré à quelques dizaines de volts (généralement 70 eV).

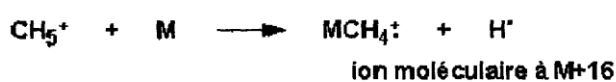
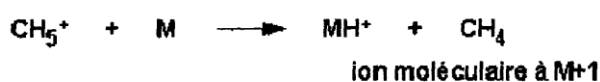
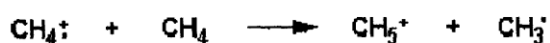
C'est la méthode la plus utilisée et celle qui donne le plus grand nombre de fragments



b- Source à ionisation chimique (C.I.)

Les ions primaires sont fournis par un gaz réactif (NH_3 , CH_4 , isobutane, etc...) soumis à l'impact électronique. La substance à analyser est injectée dans la source avec un large excès de méthane ou autre hydrocarbure de faible masse molaire.

L'hydrocarbure ionisé en premier, ionise la substance par transfert de charge.



c- Electrospray (ESI) (souvent couplé à HPLC)

Electrospray ionization (E.S.I.) Il s'agit d'une technique qui permet d'ioniser les molécules d'échantillons dissoutes dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique. Elle a lieu dans une source à la pression atmosphérique.

d- ICP (Inductively Coupled Plasma)

Ionisation par plasma (inductively coupled plasma) le gaz partiellement ionisé qui excite et ionise les atomes convient aux composés inorganiques et aux solutions aqueuses.

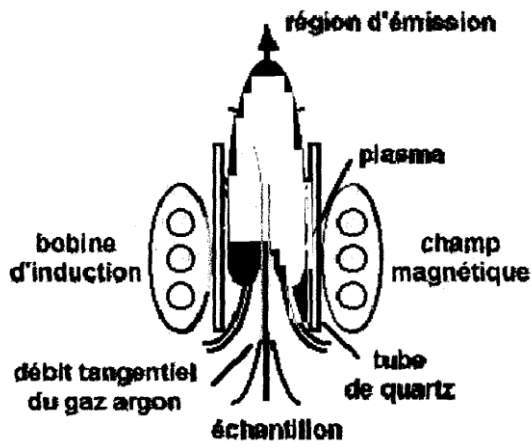


Fig.1 : Schéma d'un module de production de plasma par induction (ICP, inductively -coupled plasma)

e- Bombardement par atomes rapides (FAB):

Dans une source FAB (Fast Atomic Bombardement) Un faisceau d'atomes neutres comme Xe ou Ar dirigé sur un solide provoquant sa désorption et son ionisation. Causant peu de fragmentation mais donne des ions moléculaires intenses.

Surtout utilisé pour les grosses molécules.

f- Ionisation par ablation au laser (LA) :

Arrache des atomes a la surface d'un solide ; ce qui crée un micro plasma qui ionise une partie du substrat. Surtout appliqué sur des solides inorganiques.

g- Ionisation par désorption sur laser d'une matrice (MALDI):

MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) vaporise et ionise de grosse molécules biologiques (protéines et fragments d'AND) dispersées dans une matrice solide comme l'acide nicotinique (chromophore) qui absorbe l'excès d'énergie.

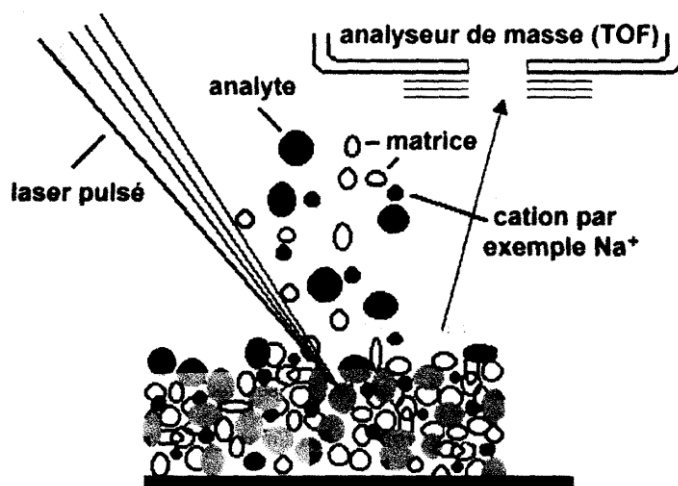


Fig.2 : Schéma du procédé MALDI, adapté de : J. chem. Edu, 1997, 1288.

Trois étapes :

- Chauffage rapide de la matrice par laser
- Désorption de molécules neutres et intactes
- Ionisation douce et sélective de molécules désorbées

L'analyse se fait par spectrométrie a temps de vol.

3. Modes de séparation – Types de spectromètres

a- Secteur magnétique :

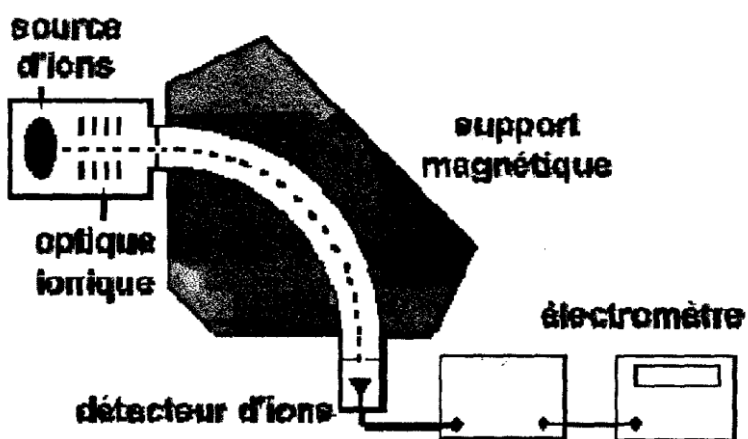


Fig. 3 : Schéma d'un spectromètre de masse avec secteur magnétique. Appareil a simple focalisation

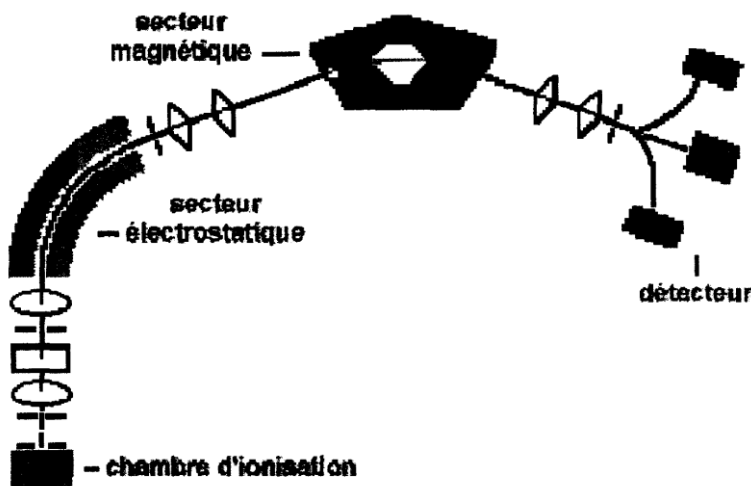


Fig. 4 : Schéma d'un spectromètre de masse avec secteur magnétique. Appareil a double focalisation

L'énergie cinétique acquise par les ions accélérés par la tension accélératrice est

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

- où **m** = masse de l'ion
- v** = vitesse de l'ion
- e** = charge de l'ion
- V** = tension accélératrice

Les ions traversant le secteur magnétique ou leur trajectoire est incurvée. Seuls les ions de m/z dont la force centrifuge = la force centripète passe dans le secteur magnétique

$mv^2/r = HeV$, r = rayon de courbure de la trajectoire de l'ion qui donne :

$$\frac{m}{z} = \frac{H^2 r^2}{2V}$$

Ce qui démontre que les ions de différents rapports m/z atteignent le détecteur en faisant varier H ou V .

b- Filtre quadrupolaire :

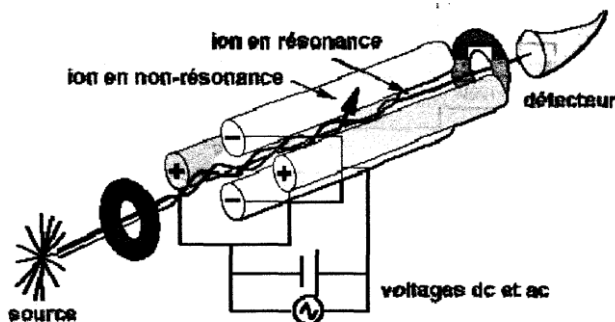


Fig. 5 : Schéma d'un filtre quadrupolaire

$$\text{Et } v = \sqrt{\frac{2qV}{m}}$$

Les ions de masse plus faible se déplacent plus vite que ceux de masse plus grande

Le temps t que met l'ion pour parcourir la distance correspondante à la longueur du tube sans champ = L/v ou L = longueur du tube et

$$t = \frac{1}{\sqrt{\frac{2qV}{m}}}$$

III - PRINCIPE D'IONISATION PAR IMPACT ELECTRONIQUE :

Dans le spectromètre, un faisceau d'électrons très énergétiques frappe l'échantillon. Il se produit alors une ionisation des molécules :



Est un cation-radical, appelé ion moléculaire. Il correspond à la masse molaire du composé. Cet ion moléculaire va pouvoir se fragmenter et produire des cations de masses inférieures, appelées ions fragments, et des fragments neutres (radicaux ou molécules). Les ions fragments chargés sont triés selon leur rapport m/z et mesurés selon leur abondance relative.

IV- Appareillage

Description d'un spectromètre de masse

Appareil dans lequel des ions sont produits à partir d'un échantillon

- Séparés selon leur rapport masse / charge
- Détectés
- Exprimés en fonction de leur abondance relative

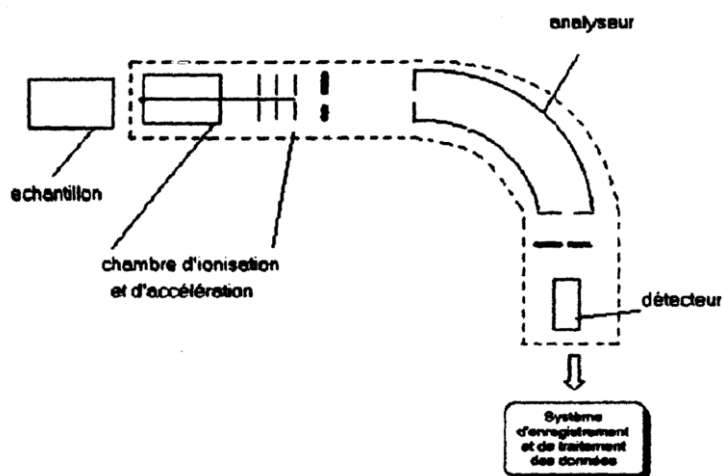


Fig. 8 : structure d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est constitué de cinq éléments principaux

Le système d'introduction qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectromètre.

La source d'ions dans laquelle les molécules sont ionisées. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation. La plus répandue est l'impact électronique.

L'analyseur qui sépare les ions en fonction du rapport (m/z) par application d'un champ magnétique et/ou électrique.

Le détecteur qui collecte les ions sortants de l'analyseur et les exprime en fonction de leur abondance relative.

Un ensemble informatique de traitement des données qui permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

Le bombardement des molécules au moyen d'électrons de haute énergie, atteignant habituellement 70 eV ou 6750 KJ/mol, convertit quelques molécules en ions.

Le taux d'ionisation est très faible, d'environ 1%. Les potentiels d'ionisation des molécules varient d'environ 10 à 14 eV (965 à 1350 KJ/mol). L'énergie des liaisons chimiques varie de 4 à 5 eV (386 à 480 KJ/mol). Le potentiel appliqué est 70 eV, donc suffisamment grand pour ioniser les molécules et rompre les liaisons. La séparation de ces ions accélérés se fait dans un champ électrique ou magnétique selon leur rapport masse /charge.

En générale on ne peut pas localiser la charge et c'est pour cette raison que les crochets [] Sont utilisés.

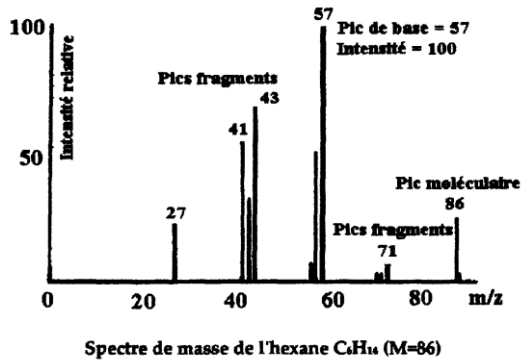
V- Spectre de Masse

Le spectre de masse est un diagramme qui représente :

- selon l'axe des abscisses : les rapports m/z des ions détectés (en impact électronique, $z = 1$; m/z s'exprime alors en Dalton).
- selon l'axe de ordonnées : l'abondance relative de ces ions. Celle du pic le plus intense est fixée arbitrairement à 100.

Les différents types de pics observés dans un spectre de masse sont :

- **Le pic de base** : c'est le pic le plus intense du spectre. Il correspond à l'ion le plus abondant donc le plus stable.
- Le pic moléculaire ou pic parent : il correspond à l'ion de nombre de masse égal à la masse moléculaire de la substance.
- Les pics fragments : ils correspondent aux différents ions fragments.



VI - Analyse spectrale

L'interprétation d'un spectre de masse peut se décomposer en deux étapes :

- Exploitation de l'ion moléculaire (la masse moléculaire, la parité, les isotopes, la formule brute...)
- Exploitation des ions fragments qui dépendent de la nature et de la structure de la molécule.

VI.1 - Masse de l'ion moléculaire

La spectrométrie de masse permet de connaître la masse moléculaire d'une substance inconnue à partir pic moléculaire.

VI.2 - Parité de l'ion moléculaire

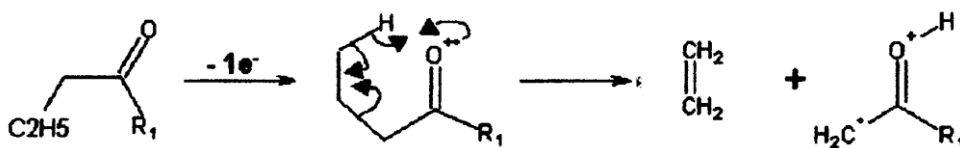
Un ion moléculaire donne un pic à une masse impaire s'il comporte un nombre impair d'éléments trivalents (N, P...).

Exemple : Ammoniac NH₃ : pic moléculaire a m/z = 17.

VI.3 - Exploitation des ions fragments

Les facteurs influençant le processus de fragmentation sont les suivants :

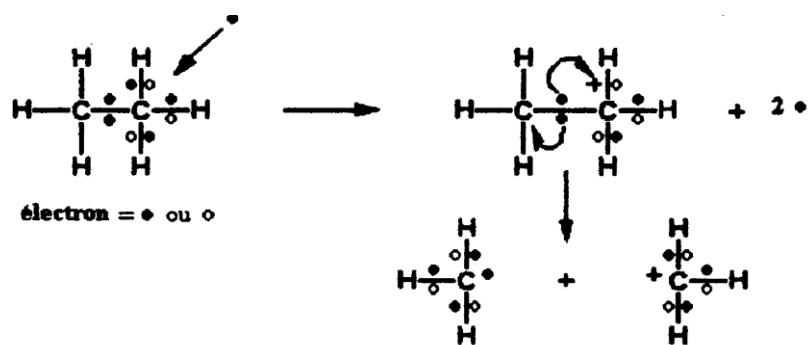
- Les liaisons faibles se coupent plus facilement.
- Les fragments stables ont tendance à se former plus facilement.
- Les fragmentations avec réarrangement sont favorisées si la molécule possède un état transitoire à 6 centres.
- Réarrangement de McLafferty : H en γ d'une insaturation.



VII – Fragmentations caractéristiques de quelques classes chimiques :

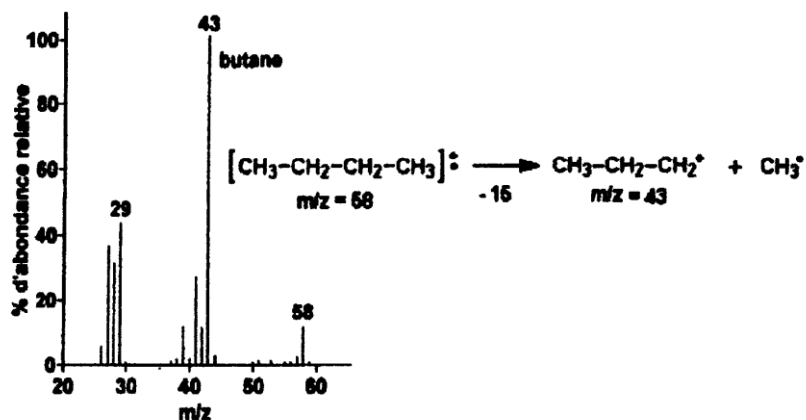
VII.1 - Les hydrocarbures aliphatiques

La fragmentation des hydrocarbures a lieu par clivage homolytique.

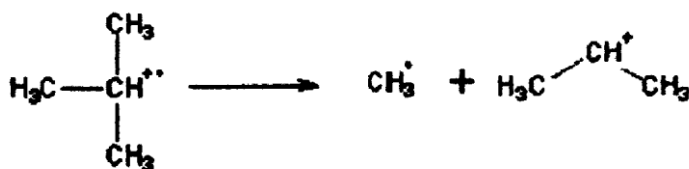


Pour tous les hydrocarbures linéaires, les ions 43 et 57 sont les pics les plus intenses du spectre car ils correspondent aux cations les plus stables.

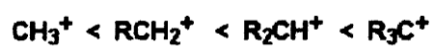
Ion R ⁺	CH ₃ ⁺	CH ₃ -CH ₂ ⁺	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ ⁺	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ ⁺
m/z	15	29	43	57



Dans les hydrocarbures ramifiés, la fragmentation se fait dans le sens à donner le carbocation le plus stable

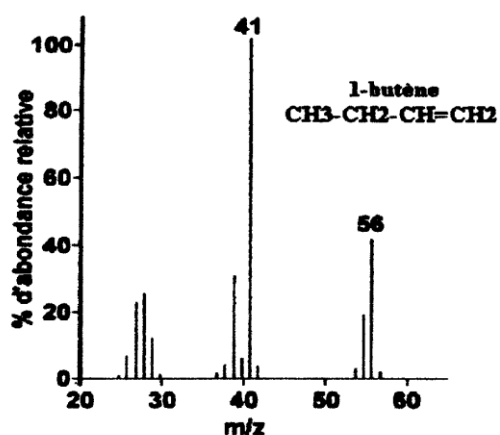
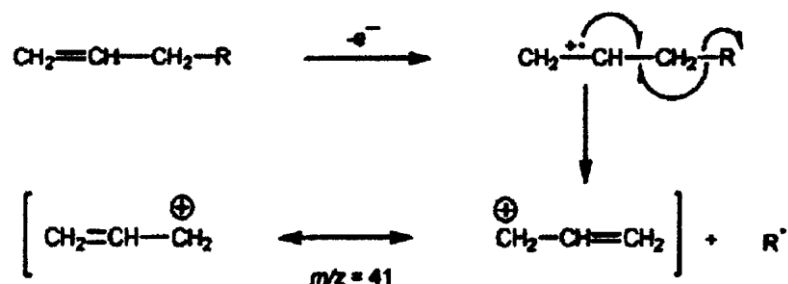


Le cation isopropyle est plus stable que le cation CH₃⁺



VII.2. Les alcènes :

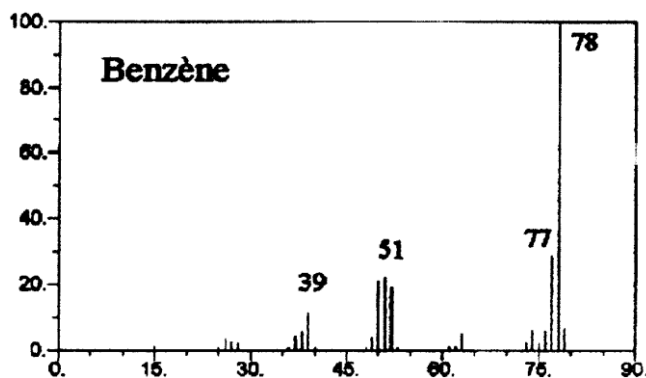
Les alcènes se fragmentent de façon à générer un cation allylique stabilisé par résonance.



VII.3. Les Composées benzéniques :

Ces composés donnent des spectres de masse facilement interprétables. Le pic moléculaire est toujours intense car l'ion moléculaire est fortement stabilisé.

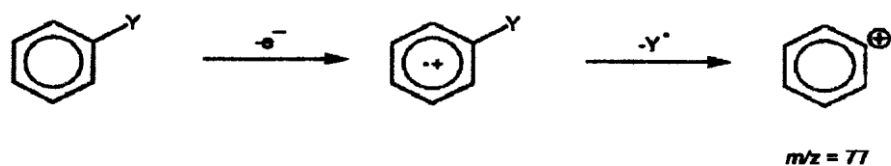
a- le benzène :



Les fragmentations du benzène produisent des ions caractéristiques : $m/z = 77$ $[\text{M}-\text{H}]^+$, $m/z = 51$: C_4H_3^+ $[77-26$ (acétylène)] et $m/z = 39$: ion cyclique C_3H_3^+ .

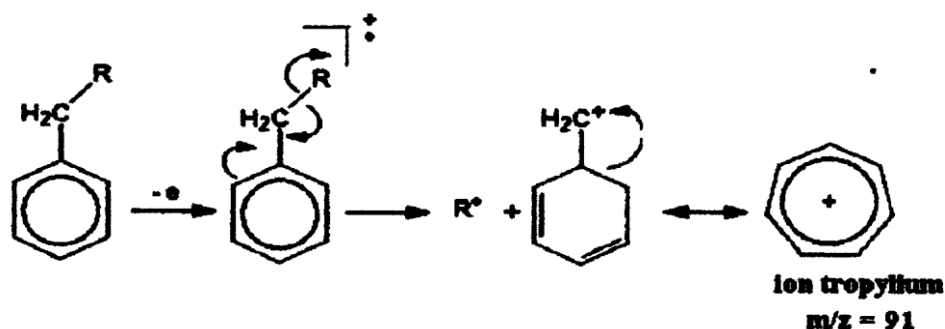
b- les benzènes monosubstitués :

Si le substitut n'est pas un alkyle, les benzènes monosubstitués perdent fréquemment leur substituant former le cation phényle a $m/z = 77$.



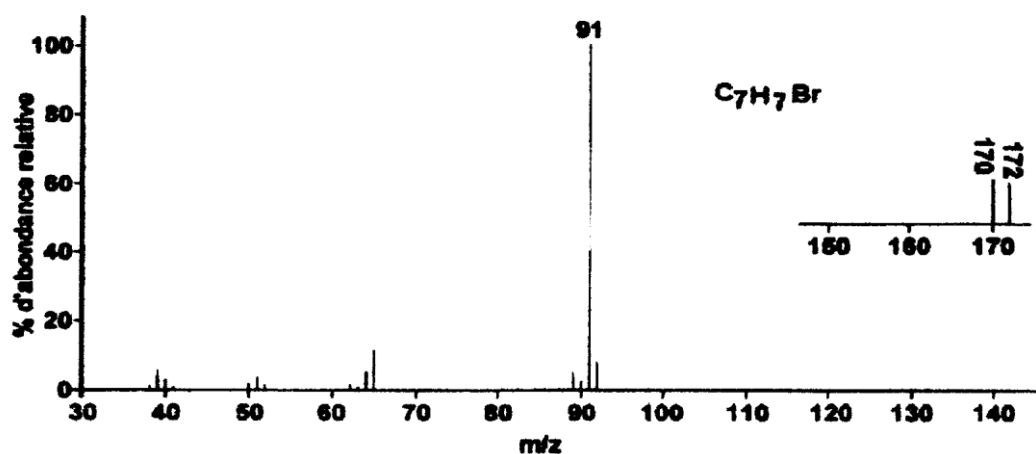
Clivage β :

Les benzènes substitués par un groupe alkyle ont une fragmentation prépondérante : la rupture en β du cycle aromatique, appelée rupture benzylique. Ils perdent un hydrogène ou un groupe alkyle de façon a formé le cation aromatique tropylium a $m/z = 91$.



Cet ion est fortement stabilisé et constitue souvent le pic de base du spectre de masse.

Exemple : Analyse du spectre du composé de formule brute C_7H_7Br

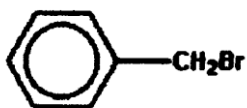


D'après la formule brute, cette molécule possède 4 degrés d'insaturation, ce qui fait penser à une structure aromatique.

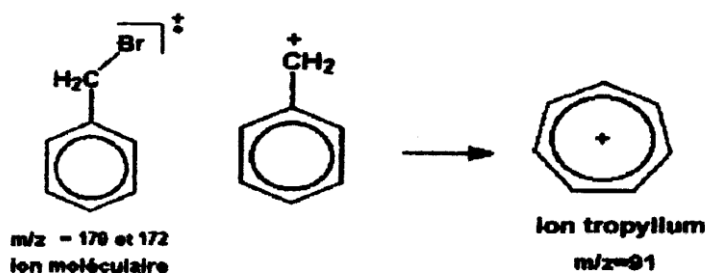
Le spectre montre autour de l'ion moléculaire deux pics assez petits et d'égale intensité suggérant la présence des deux isotopes du brome $\text{Br}^{79,92}$ et $\text{Br}^{80,92}$.

Le pic le plus important a $m/z = 91$ correspond à l'ion tropylium

La structure est alors ($91 + 79 = 170$; $91 + 81 = 172$)



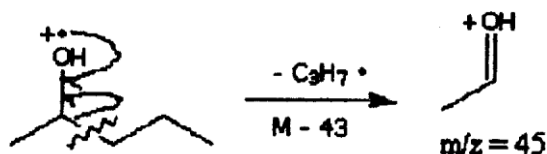
Les principaux fragments sont :



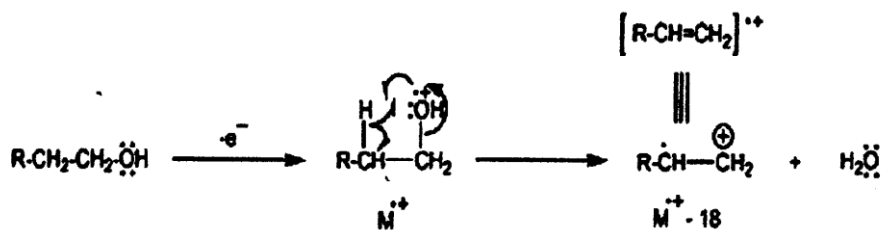
VII.4. Les alcools :

Le pic parent est souvent faible pour les alcools. La fragmentation la plus importante concerne la perte d'un groupe alkyle, préférentiellement le plus volumineux.

Exemple :

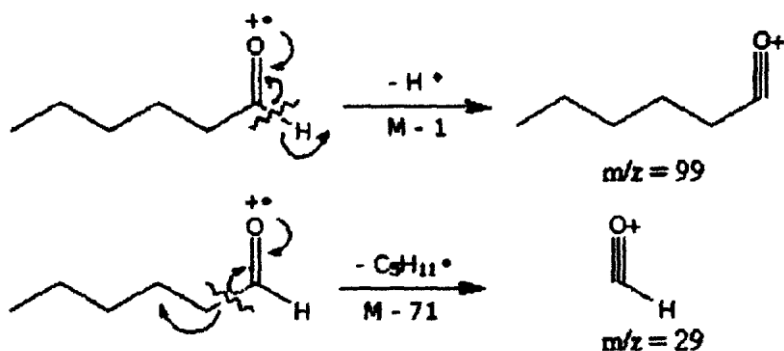


De plus, les alcools présentent souvent un pic important à $M-18$ résultant de la perte d'une molécule d'eau.

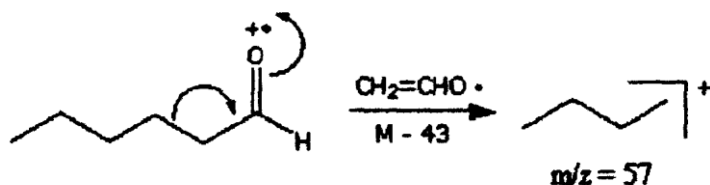


VII.5. Les aldéhydes

Clivage α :

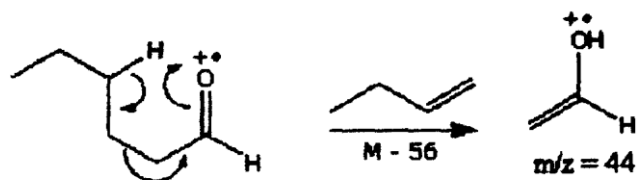


Clivage β :



Réarrangement de McLafferty :

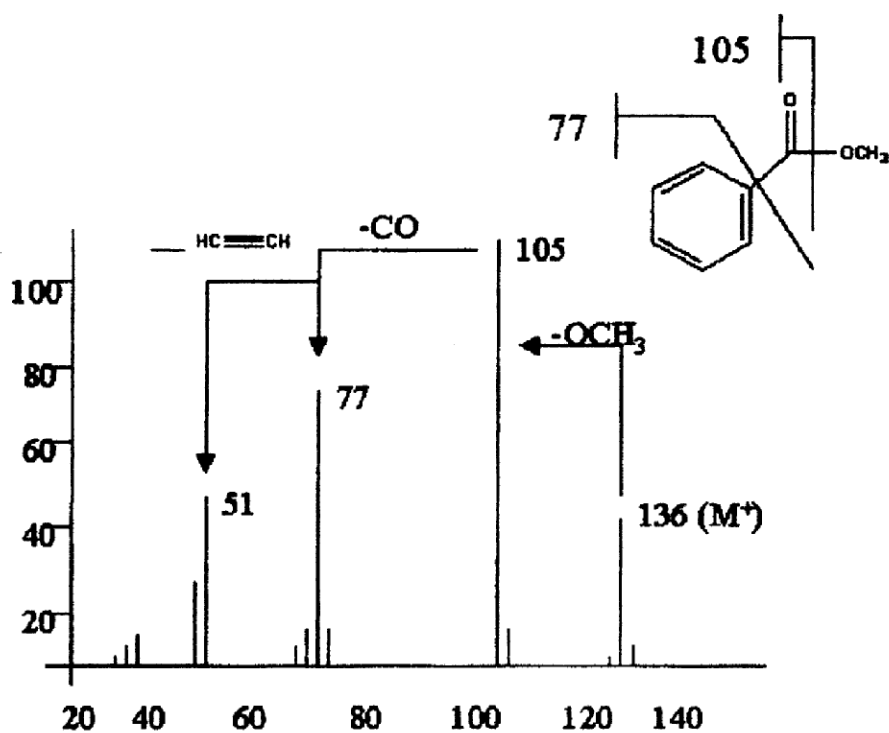
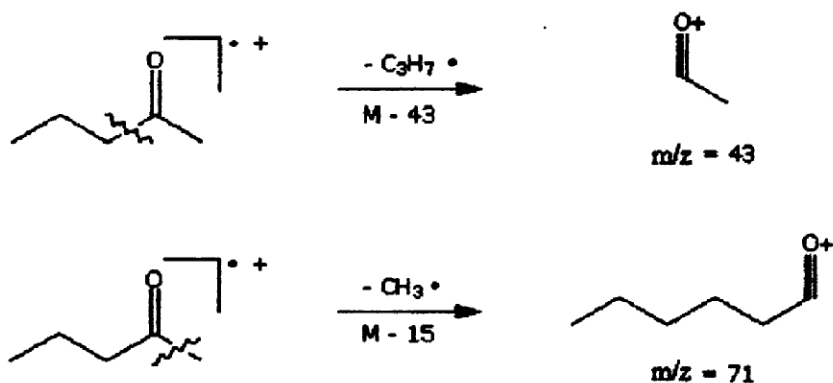
Dans cet exemple, on a un H en γ de l'insaturation (fonction aldéhyde).



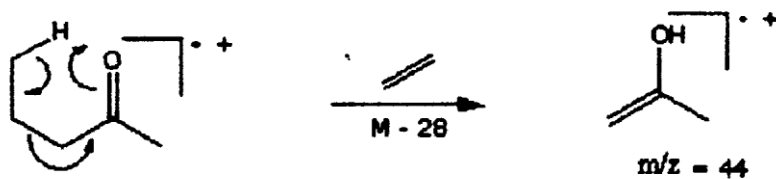
VII.6. Les cétones et les esters :

Le mode de fragmentation le plus fréquent des cétones et des esters ($\text{R}'\text{COR}''$ et $\text{R}'\text{COOR}''$) est la rupture en α qui peut donner $\text{R}'\text{CO}^+$ ou $\text{R}''\text{CO}^+$.

Clivage α



Réarrangement de McLafferty : si on a un H en γ de l'insaturation



Applications

La spectrométrie de masse est utilisée pratiquement dans tous les domaines scientifiques : chimie organique, dosages, astrophysique, biologie, médecine...

La grande sensibilité de détection de la spectrométrie de masse en fait une technique de choix pour l'étude des oeuvres d'art puisqu'elle ne requiert que des micro-prélevements.

Elle joue aujourd'hui un rôle important dans les études de pollution de l'environnement et de dopage grâce à sa sensibilité, sa sélectivité et sa possibilité de faire des analyses quantitatives rapides.

La spectrométrie de masse trouve ses applications aussi bien en recherche fondamentale que dans le contrôle de processus industriels :

Analyse organique et bio- organique structurale :

-Masse moléculaire

-Identification des fonctions chimiques (structurale)

-Analyse isotopique (^{13}C / ^{12}C , ^2H / ^1H). Utilisé pour la fraude alimentaire et police scientifique pour les stupéfiants.

-Applicable à des molécules très variées (petites molécules, macromolécules ...)

-**Très grande sensibilité = quelques μg d'analyte suffisent** (jusqu'à quelques pg).

-**Identification très spécifique :**

Il n'y a pas deux molécules qui ont le même spectre de masse quand on analyse dans les mêmes conditions.

-Possibilité de réactions (études d'interactions, mécanisme de dégradation ...)

- **Pharmacie :**

-Caractérisation de nouveaux principes actifs

-Analyse de produits de dégradation

-Etudes de biodisponibilité

-Etude pharmacocinétique

- « Screening » de principes actifs potentiels

-Identification de récepteur biologique

- **Biochimie :**

Il s'agit pour la plupart de méthodes de référence.

- Vitamine D : mise en évidence possible de la forme D2 (médicament) et de la forme D3 (synthèse endogène et aliments).

- Stéroïdes : formes non conjuguées par GC-MS/MS ; formes conjuguées par LC-MS/MS.

- Désordres métaboliques : La spectrométrie de masse fait partie des méthodes essentielles pour le diagnostic et le suivi des maladies héréditaires du métabolisme.

- Acides biliaires, acides gras libres, stérols.

-Biomolécule

-Protéines et peptides

Analyse de la structure de biomolécules, identification de protéines (séquençage d'acides aminés) et de microorganismes ; marquage isotopique de molécules par des isotopes stables, analyse de gaz, pharmacologie, toxicologie.

Toxicologie :

Métaux, cyanures.

Dopage : détection et identification de stéroïdes anabolisants.

Stupéfiants et soumission chimique :

Opiacés, cocaïniques, buprénorphine et norbuprénorphine, cannabis, LSD, dérivés de l'ecstasy, GHB, kétamine.

Suivi thérapeutique-pharmacologie

Immunosuppresseurs, neuroleptiques, hypnotiques dont les benzodiazépines, antimycosiques.

-Environnement / Agro-alimentaire

-Pesticides

-Contamination des sols, des eaux

-Analyses judiciaires / légales

-Application au séquençage des peptides ou des oligosaccharides

La spectrométrie de masse permet de réaliser un séquençage direct des peptides même lorsque l'extrémité terminale du peptide est bloquée et même si le peptide n'est pas pur.

Tableau I: Masses atomiques relatives des éléments (1981)

La Dr.								
	Nombre atomique	Nom	Symbole	Masse atomique relative	Nombre atomique	Nom	Symbole	Masse atomique relative
	1	Hydrogène	H	1,0079	54	Xénon	Xe	131,29
	2	Hélium	He	4,0026	55	Caesium	Cs	132,91
	3	Lithium	Li	6,941	56	Baryum	Ba	137,33
	4	Béryllium	Be	9,0122	57	Lanthane	La	138,91
	5	Bore	B	10,81	58	Cérium	Ce	140,12
	6	Carbone	C	12,011	59	Praséodyme	Pr	140,91
	7	Azote	N	14,007	60	Néodyme	Nd	144,24
	8	Oxygène	O	15,999	61	Prométhium	Pm	(145)
	9	Fluor	F	18,998	62	Samarium	Sm	150,36
	10	Néon	Ne	20,179	63	Europium	Eu	151,96
	11	Sodium	Na	22,920	64	Gadolinium	Gd	157,25
	12	Magnésium	Mg	24,305	65	Terbium	Tb	158,93
	13	Aluminium	Al	26,982	66	Dysprosium	Dy	162,50
	14	Silicium	Si	28,086	67	Holmium	Ho	164,93
	15	Phosphore	P	30,974	68	Erbium	Er	167,26
	16	Soufre	S	32,06	69	Thulium	Tm	168,93
	17	Chlore	Cl	35,453	70	Ytterbium	Yb	173,04
	18	Argon	Ar	39,948	71	Lutécium	Lu	174,97
	19	Potassium	K	39,098	72	Hafnium	Hf	178,49
	20	Calcium	Ca	40,08	73	Tantale	Ta	180,95
	21	Scandium	Sc	44,956	74	Tungstène	W	183,85
	22	Titane	Ti	47,88	75	Rhénium	Re	186,21
	23	Vanadium	V	50,942	76	Osmium	Os	190,2
	24	Chrome	Cr	51,996	77	Iridium	Ir	192,22
	25	Manganèse	Mn	54,938	78	Platine	Pt	195,08
	26	Fer	Fe	55,847	79	Or	Au	196,97
	27	Cobalt	Co	58,933	80	Mercure	Hg	200,59
	28	Nickel	Ni	58,69	81	Thallium	Tl	204,38
	29	Cuivre	Cu	63,546	82	Plomb	Pb	207,2
	30	Zinc	Zn	65,38	83	Bismuth	Bi	208,98
	31	Gallium	Ga	69,72	84	Polonium	Po	(209)
	32	Germanium	Ge	72,59	85	Astate	At	(210)
	33	Arsenic	As	74,922	86	Radon	Rn	(222)
	34	Sélénium	Se	78,96	87	Francium	Fr	(223)
	35	Brome	Br	79,904	88	Radium	Ra	226,0254
	36	Krypton	Kr	83,80	89	Actinium	Ac	227,0278
	37	Rubidium	Rb	85,468	90	Thorium	Th	232,0381
	38	Strontium	Sr	87,62	91	Proactinium	Pa	231,0359
	39	Yttrium	Y	88,906	92	Uranium	U	238,03
	40	Zirconium	Zr	91,22	93	Neptunium	Np	237,0482
	41	Niobium	Nb	92,906	94	Plutonium	Pu	(244)
	42	Molybdène	Mo	95,94	95	Américium	Am	(243)
	43	Technétium	Tc	(98)	96	Curium	Cm	(247)
	44	Ruthénium	Ru	101,07	97	Berkélium	Bk	(247)
	45	Rhodium	Rh	102,91	98	Californium	Cf	(251)
	46	Palladium	Pd	106,42	99	Einsteinium	Es	(252)
	47	Argent	Ag	107,87	100	Fermium	Fm	(257)
	48	Cadmium	Cd	112,41	101	Mendélévium	Md	(258)
	49	Indium	In	114,82	102	Nobélium	No	(259)
	50	Etain	Sn	118,69	103	Lawrencium	Lr	(260)
	51	Antimoine	Sb	121,75	104	Unnilquadium	Unq	(261)
	52	Tellure	Te	127,60	105	Unnilpentium	Unp	(262)
	53	Iode	I	126,90	106	Unnilhexium	Unh	(263)

Ces masses atomiques relatives sont fondées sur la valeur étalon de la masse atomique relative de $A_r(^{12}\text{C}) = 12$
 Ces valeurs entre parenthèses concernent les éléments radioactifs. La valeur donnée est le nombre de masse d
 l'isotope de plus longue demi-vie.