

Principes de la spectrométrie de masse

Marie-Claude Menet^{a,*}

RÉSUMÉ

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation ou dans une chambre de collision. Ces ions proviennent de la molécule à analyser. Dans le cas de méthodes d'ionisation dites « douces », l'ion moléculaire ou pseudomoléculaire formé peut être consécutif à l'addition d'un ion (H^+ par exemple) ou à la soustraction d'un électron à la molécule. Dans le cas de méthodes d'ionisation moins douces ou dans une chambre de collision, les ions pseudo-moléculaires ou moléculaires se fragmentent pour donner des ions fils en suivant des règles de fragmentation connues et caractéristiques des structures des molécules à analyser. Il est donc possible, avec cette méthode, d'obtenir des informations structurales. Le graphique représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport m/z est appelé spectre de masse. Depuis plusieurs années, la spectrométrie de masse est couplée aux méthodes séparatives telles les chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide. Le spectromètre de masse fonctionne alors comme un détecteur classique en donnant une réponse, l'aire du pic chromatographique, proportionnelle à la quantité de produit injectée. Cependant, lors des études quantitatives, il est indispensable d'utiliser un étalon interne de préférence l'analogue lourd (marqué au C^{13} ou au D^2) du produit à analyser et qui présente le même temps de rétention en chromatographie.

Spectrométrie de masse – sources d'ions – analyseur quadripolaire – mode tandem – chromatographies – étalon interne marqué par des atomes lourds.

1. Introduction

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires des composés analysés ainsi que leur identification et leur quantification. Elle est fondée sur la séparation et la détection d'ions formés dans une source d'ionisation. Ces ions proviennent de la molécule à analyser. Dans le cas de méthodes d'ionisation dites « douces », l'ion formé peut être consécutif à l'addition d'un ion (H^+ , Na^+ , K^+ , NH_4^+) ou d'un électron, ou, à la soustraction d'un électron ou d'un hydrogène ionisé (hydrure ou proton), à la molécule. Cet ion est appelé ion pseudo-moléculaire ou ion moléculaire.

a Laboratoire de chimie analytique
UFR des Sciences pharmaceutiques
4, av. de l'Observatoire
70006 Paris

* Correspondance

marie-claude.menet@parisdescartes.fr

article reçu le 2 septembre, accepté le 10 octobre 2011

© 2011 – Elsevier Masson SAS – Tous droits réservés.

SUMMARY

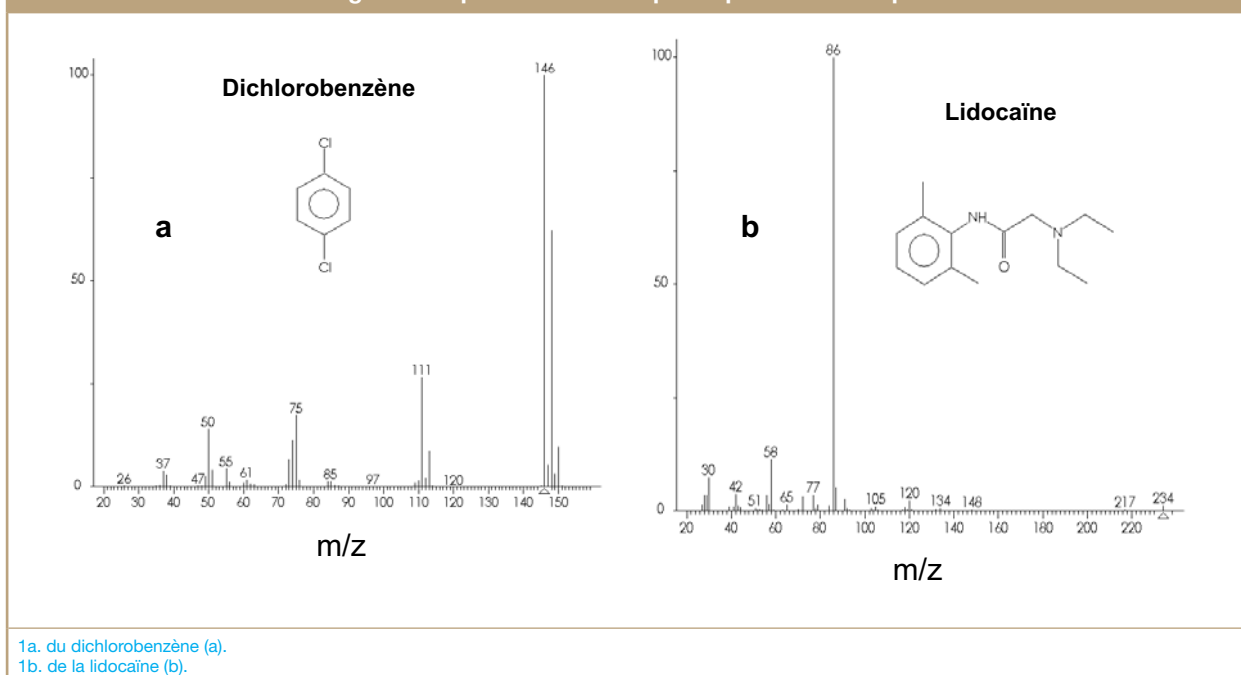
Mass spectrometry

The mass spectrometry is an analysis method, which allows the molecular weight determination of compounds, their identification and quantification. It is based on the separation and the detection of ions appeared in the ion source or in a collision cell. These ions come from the molecule to analyze. In the case of soft ionization, ion is consecutive to the addition or the subtraction of an ion (such as H^+) or an electron. This ion is called pseudomolecular ion or molecular ion and allows the molecular weight determination. In the case of hard ionization or in a collision cell, the molecular ions are fragmented to lead to the daughter ions. The fragmentations occur following well-known rules characteristic to the structure of compound to analyze. The variation of the ion intensity versus their m/z ratio is called the mass spectrum. For several years, mass spectrometry has been coupled with gas and liquid chromatography. The chromatographic behavior of the molecule brings another dimension in the molecule identification. The mass spectrometer coupled to a chromatograph works as a classical detector and gives for each peak an area proportional to the injected quantity of compound. However, it is essential to use an internal standard, generally the heavy standard.

Mass spectrometry – ion source – quadrupole – tandem mode – chromatography – internal standard deuterated.

Dans le cas de méthodes d'ionisation moins douces, les ions pseudo-moléculaires ou moléculaires se fragmentent pour donner des ions appelés « fragments » ou « fils » en suivant des règles de fragmentation connues et caractéristiques des structures des molécules à analyser. Ces derniers peuvent aussi se former après la source d'ions dans la chambre de collision du spectromètre de masse par exemple. Ces ions fragments permettent d'obtenir des informations structurales sur la molécule analysée mais aussi sont utilisables lors des études de quantification. Actuellement, la spectrométrie de masse est facilement couplée aux méthodes séparatives telles les chromatographies en phase gazeuse et en phase liquide. Le comportement chromatographique des molécules, par l'intermédiaire des indices de rétention en chromatographie en phase gazeuse par exemple, apporte une dimension supplémentaire pour l'identification de la molécule étudiée. Mais ces couplages permettent aussi de purifier et concentrer les molécules d'intérêt avant leur arrivée dans la source d'ions et facilitent ainsi leur détection et leur quantification.

Figure 1 – Spectres obtenus par impact électronique.



Dans ce chapitre, seront tout d'abord données les définitions de plusieurs termes classiquement utilisés en spectrométrie de masse. La description du spectromètre de masse sera ensuite abordée en détail, tant au niveau des sources que des analyseurs. Puis seront développées quelques applications afin de montrer les possibilités qu'apporte la spectrométrie de masse dans l'analyse qualitative et quantitative des molécules d'intérêts pharmacologique et toxicologique.

2. Notions élémentaires et définitions

2.1. Le spectromètre de masse

C'est un instrument qui comprend différentes parties placées en série et qui permettent successivement, après introduction de l'échantillon, l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), l'accélération des ions formés, la séparation de ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) (analyseur) et enfin leur détection.

2.2. Le spectre de masse

C'est un graphique ou un tableau à double entrée produit par un spectromètre de masse. Il présente le courant d'ions mesuré en fonction du rapport masse (dalton) sur la charge (m/z en Thomson ou Th), unité généralement omise. Le graphique peut se présenter sous la forme de deux tracés différents. Le premier, qualifié de vrai spectre de masse ou spectre continu (mode «profile») est le reflet fidèle du courant ionique que reçoit le détecteur en fonction du rapport m/z et se présente sous la forme d'un ensemble de pics plus ou moins larges. Le deuxième, spectre «barres» (mode «centroïde») est obtenu après traitement informatique du vrai spectre de masse, chaque pic étant présenté sous la forme d'un trait vertical (figure 1). Le pic le plus intense du

spectre, correspondant au type d'ion le plus abondant, est appelé le pic de base, son intensité est chiffrée à 100 %. Les intensités des autres pics s'expriment en % de celle du pic de base.

2.3. Les unités de masse usuelles

Ce sont :

- l'unité de masse atomique (uma) (1/12 de la masse de l'isotope 12 du carbone) :

$1 \text{ uma} = 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1} / N = 1,661 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$ (N étant le nombre d'Avogadro)

- le dalton (Da) (masse de l'isotope 1 de l'hydrogène) :

$1 \text{ Da} = 1,673 \cdot 10^{-27} \text{ kg} = 1,007 \text{ uma}$

Pour une molécule, trois types de masse sont définis : les masses nominale, isotopique et moyenne ;

- la masse nominale est la masse calculée à partir de la composition élémentaire utilisant les masses atomiques nominales (en nombre entier) des isotopes les plus abondants ;

- la masse isotopique est la masse calculée à partir de la composition élémentaire utilisant pour chaque atome contenu dans la molécule, la masse atomique exacte des isotopes les plus abondants ;

- la masse moyenne ou masse chimique est la masse calculée à partir de la composition élémentaire utilisant les masses atomiques moyennes (qui tient compte de l'abondance relative des isotopes).

2.4. L'exactitude (justesse alliée à la fidélité) en masse

La justesse en masse est exprimée en erreur relative (%) ou en ppm (partie par million). Par exemple, la masse isotopique de la bradykinine étant 1060,5692, si la masse mesurée est 1060,6201, la justesse en masse est déterminée par : $(1060,5692 - 1060,6201) / 1060,5692 = 4,8 \cdot 10^{-5} = 48 \text{ ppm} = 0,0048 \%$.

2.5. La résolution (R)

C'est la capacité que présente un spectromètre de masse à distinguer des ions présentant des rapports m/z voisins mais différents. Elle est définie par $R = m/\Delta m$, où Δm , le pouvoir séparateur, est la différence de masse entre deux pics adjacents résolus (c'est-à-dire que l'intensité de la vallée entre les deux pics n'excède pas 10 % de la hauteur du pic le plus faible) et m est la masse du premier pic ou la moyenne des deux. Une autre formule permet de calculer la résolution sur un pic isolé. Dans ce cas m est la masse du pic et Δm sa largeur à mi-hauteur ; on parle alors de « full width at half maximum » (FWHM). Seuls les spectres obtenus en mode « profile » permettent d'effectuer ce calcul. Le terme « résolution unitaire » fait référence à la capacité d'un analyseur à distinguer l'ion de rapport m/z de l'ion de rapport $m/z + 1$. La résolution unitaire est rencontrée lors d'une utilisation des analyseurs de types quadripôle ou piège à ions.

2.6. Les ions

• **L'ion moléculaire** : c'est l'ion produit quand une molécule introduite dans la source d'un spectromètre de masse perd (M^+) ou acquiert un électron (M^-). L'ion moléculaire est toujours un ion à nombre impair d'électrons, de masse égale à celle de la substance neutre introduite dans la source. Il permet la détermination de la masse moléculaire. Cette masse est impaire si la molécule présente dans sa formule un nombre impair d'azote (comme par exemple, NH_3 de masse moléculaire 17 Da), elle est paire si la molécule ne présente pas d'azote ou contient dans sa formule un nombre pair d'azote (comme par exemple, C_6H_6 de masse moléculaire 78 Da et N_2H_4 de masse moléculaire 32 Da). La « règle de l'azote » énoncée ci-dessus s'applique parce que les isotopes les plus abondants des éléments usuels ont une masse et une valence de même parité exceptée l'azote (masse 14 Da, valence 3).

• **L'ion pseudo-moléculaire** : c'est l'ion résultant de la perte ou de l'addition d'atomes chargés à la molécule pour former un ion (comme par exemple $M + H^+$ pour donner MH^+ , ou $M + Na^+$ pour donner MNa^+). Il permet la détermination de la masse moléculaire.

• **L'ion parent ou précurseur** : c'est un ion qui engendre un ion fils ou fragment. Ce terme est applicable à tout ion susceptible de se fragmenter.

• **L'ion fils ou fragment (ou ion fils, F^+ ou F^{+*})** : c'est l'ion produit par la perte d'un ou plusieurs fragments d'un ion précurseur. Si cet ion est issu d'un réarrangement (rétro-Diels-Alder, Mc Lafferty) qui conduit à la perte d'un fragment neutre (H_2O (18 Da) ou NH_3 (17 Da), par exemple), sa parité est identique à celle de l'ion précurseur à condition que le fragment perdu ne contienne pas d'atome d'azote.

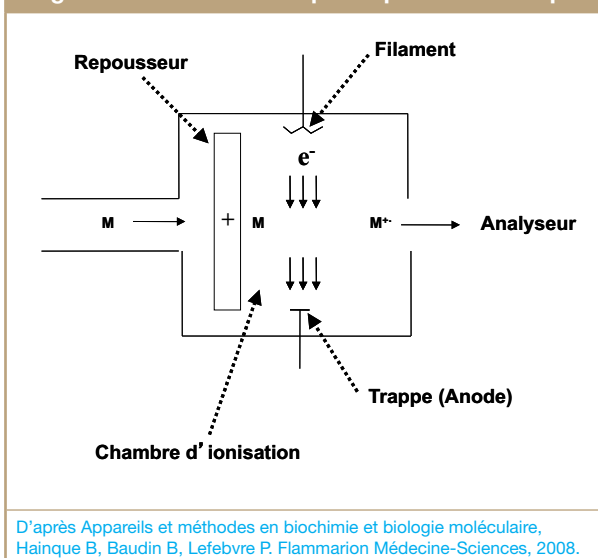
3. Principes et appareillages de la spectrométrie de masse

3.1. Les sources

3.1.1. Définitions

La source est l'élément du spectromètre de masse qui permet l'évaporation et l'ionisation des analytes contenus dans l'échantillon. Plusieurs méthodes d'ionisation

Figure 2 – Source d'ions par impact électronique



D'après Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, Hainque B, Baudin B, Lefebvre P. Flammarion Médecine-Sciences, 2008.

sont disponibles et leur choix d'utilisation dépend des propriétés physicochimiques des molécules à étudier et des renseignements désirés.

L'ionisation par impact électronique et l'ionisation chimique à pression réduite sont les plus anciennes et sont réservées aux composés facilement volatilisables, de faible masse moléculaire. Elles sont souvent couplées à la chromatographie en phase gazeuse. D'autres sources d'ionisation dites « douces » ont été développées depuis une vingtaine d'années. Elles permettent l'ionisation de molécules sans provoquer (ou peu) leur fragmentation. La désorption et ionisation par impulsion laser et assistées par une matrice (source MALDI pour « matrix assisted laser desorption ionization ») est fréquemment couplée à un spectromètre de masse à temps de vol (TOF pour « time of flight ») pour l'analyse de molécules présentant une masse moléculaire élevée (au moins supérieure à 500 Da) ; le fonctionnement de cette source ne sera donc pas détaillé dans ce chapitre dédié à l'analyse des petites molécules. L'électro-nébulisation (ESI pour « electrospray ionization ») et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI pour « atmospheric pressure chemical ionization ») font partie des méthodes d'ionisation à pression atmosphérique (API pour « atmospheric pressure ionization ») et sont idéalement utilisées pour l'ionisation de molécules de faible masse, en couplage avec la chromatographie en phase liquide.

3.1.2. Ionisation sous faible pression

• **Ionisation et fragmentation par impact électronique** : l'ionisation par impact électronique est la plus ancienne et la mieux connue des méthodes d'ionisation (figure 2). La source comprend un filament chauffé qui émet des électrons qui sont accélérés vers une anode, appelée piège ou trappe. Le faisceau d'électrons entre alors en collision avec les molécules sous forme gazeuse présentes dans la source et leur arrache un électron pour former l'ion moléculaire M^+ , lui-même expulsé vers l'analyseur grâce à une plaque portée à un potentiel positif et appelée repousseur. Généralement, le potentiel d'ionisation (PI) (énergie

nécessaire à l'ionisation d'une molécule par expulsion d'un électron de valence) se situe autour de 10 eV. Les composés à analyser étant bombardés par un faisceau de 70 eV, la différence augmente l'énergie interne de la molécule et intervient dans les processus de fragmentation si l'énergie apportée à la molécule dépasse le potentiel d'apparition (PA) (énergie nécessaire à l'apparition de fragments). Les principaux processus de fragmentation sont décrits dans les applications en fin de chapitre.

Cette méthode d'ionisation-fragmentation est particulièrement adaptée aux composés de masse moléculaire faible (inférieure à 1 000 Da), facilement volatilisables et stables à température élevée. Elle n'est pas douce, les spectres de masse présentent de nombreux pics, celui de plus haut rapport m/z correspondant à l'ion moléculaire, les autres de m/z plus faibles, à des ions fragment. Ce mode d'ionisation et de fragmentation très reproductible d'un spectromètre de masse à l'autre est fréquemment utilisé pour obtenir des renseignements structuraux ou pour identifier formellement une molécule en comparant le spectre obtenu à ceux contenus dans une bibliothèque comme celle du NIST (National Institute of Standards and Technology). Comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre, la formation d'ions fragment intenses et spécifiques est exploitée lors des études de quantification.

- **Ionisation chimique positive** : la source d'ionisation chimique est souvent identique à celle utilisée en impact électronique (source combinée) (figure 2) mais le mécanisme d'ionisation est indirect. Un gaz réactant R (ammoniac, méthane, isobutane) introduit dans la source à la pression de 1 mbar entre en collision avec un faisceau d'électrons générés par un filament et accélérés grâce à une différence de potentiels. Une énergie cinétique de 10 eV permet l'ionisation du gaz et la formation dans la chambre d'ionisation d'un plasma (mélange d'ions positifs R^+ et d'électrons). Les molécules M à analyser, introduites sous forme gazeuse dans la source, sont alors très peu voire non ionisées par les électrons provenant du filament. Elles réagissent avec les ions positifs du plasma. Trois types de réactions peuvent intervenir : le transfert de proton ($M + RH^+ \rightarrow MH^+ + R$), la formation d'adduits ($M + R^+ \rightarrow MR^+$), et l'abstraction d'hydrure ($MH + R^+ \rightarrow M^+ + RH$) (cas des hydrocarbures).

Ce mode d'ionisation est beaucoup plus doux que l'impact électronique. Le processus de fragmentation est pratiquement inexistant (sauf quand le méthane est utilisé comme réactant). L'ionisation de la molécule M conduit donc surtout à la formation d'ions pseudo-moléculaires qui permettent de déterminer la masse moléculaire du composé analysé. Comme pour l'impact électronique, cette méthode d'ionisation est particulièrement adaptée aux composés de masse moléculaire faible (inférieure à 1 000 Da), facilement volatilisables et stables à température élevée.

3.1.3. Ionisation à pression atmosphérique

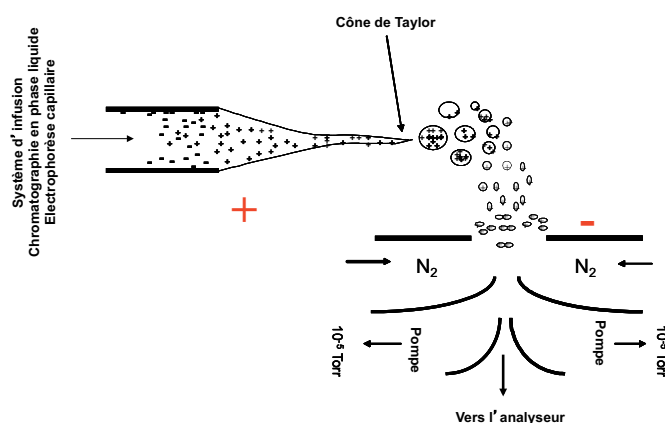
- **Ionisation par électro-nébulisation (ESI)** : l'électro-nébulisation (« electrospray ») peut être utilisée en aval d'un chromatographe en phase liquide. Elle consiste à pulvériser une solution (une phase mobile par exemple), à ioniser les espèces qui y sont présentes et à en assurer l'évaporation, ceci en appliquant à pression atmosphérique un champ

électrique sur un liquide traversant un capillaire (nébuliseur). On applique une différence de potentiel de quelques milliers de volts entre le nébuliseur et une contre-électrode (figure 3a). En mode positif par exemple (cas où l'embout du nébuliseur joue le rôle de l'anode), les ions chargés positivement ou négativement présents dans l'électrolyte vont migrer et se séparer à l'extrémité du capillaire, les ions positifs se plaçant à la surface du liquide (au niveau du ménisque) et les ions négatifs s'accumulant au niveau du capillaire. Les répulsions coulombiennes entre les charges positives tendent à étirer le ménisque et à former le cône de Taylor qui se transforme alors en filament liquide puis en fines gouttelettes au fur et à mesure que le champ augmente. L'échantillon est ainsi pulvérisé sous forme de fines gouttelettes à la sortie du nébuliseur. Le solvant contenu dans les gouttelettes est ensuite progressivement évaporé à l'aide d'un gaz neutre à contre-courant (azote). Les ions sont formés par la simple évaporation d'une gouttelette ne contenant qu'une molécule en présence de protons ou par éjection de molécules chargées de la gouttelette du fait des répulsions électrostatiques. Puis, ces ions entrent dans le spectromètre de masse. Pour des petites molécules organiques, en mode positif, l'ion formé est ionisé une seule fois. Pour un peptide ou une protéine, le nombre de charges positives par ion dépend du nombre d'acides aminés basiques contenus dans la molécule, en général une charge élémentaire est présente pour 1 000 Da. Plusieurs propriétés physicochimiques du liquide influent sur la qualité du nébulisat, en particulier la température d'ébullition (T_{eb}), la tension superficielle, la conductivité des solvants et électrolytes. Les liquides introduits dans la source ESI doivent être facilement volatilisables, les tampons minéraux (phosphate) sont en principe à proscrire. Ce sont pour les solvants présentant la plus faible tension superficielle que le cône de Taylor apparaîtra le plus facilement et que la nébulisation sera la meilleure (méthanol, acétonitrile, isopropanol). Ce n'est pas le cas des liquides riches en eau. Si la conductivité est trop élevée, un arc électrique peut apparaître avec pour conséquence une baisse de la sensibilité ; si la conductivité est trop faible le cône de Taylor sera trop court (cas de l'hexane et du cyclohexane, non utilisables lors de l'ionisation par ESI).

D'autres paramètres, comme le pH du solvant et la présence ou non de contre-ions en solution conjointement aux molécules, interviennent dans le degré d'ionisation des molécules. Peuvent être utilisés : l'acide acétique, l'acide formique, l'acide trifluoroacétique, l'acétate d'ammonium, la triéthylamine, l'acide heptafluorobutyrique (en mode positif) ; l'hydroxyde d'ammonium, l'ammoniaque (en mode négatif)... De plus, la présence de contre-ions influe sur l'intensité du signal, sur l'état de charge moyen ainsi que sur la répartition des charges. En effet, des paires d'ions neutres se forment en solution avec neutralisation, par le contre-ion négatif, des sites chargés positivement de la molécule à analyser, les trifluoroacétates formant des paires d'ions beaucoup plus stables que les formiates et les acétates. Ainsi la concentration conseillée d'utilisation de l'acide trifluoroacétique en solution est inférieure à 0,1 % (v/v) alors que celle en acide formique ou acétique peut dépasser 1 % (v/v).

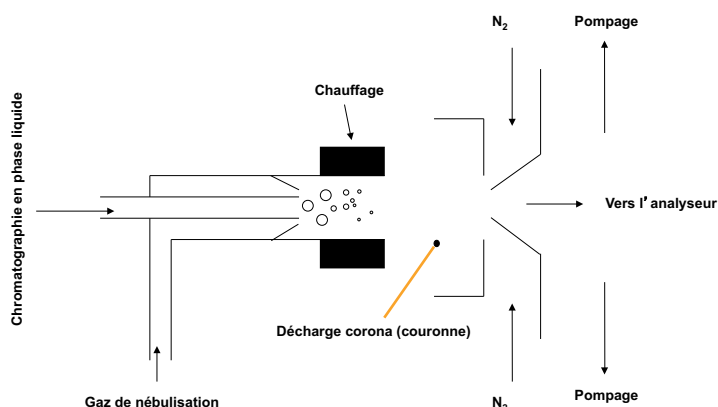
Figure 3 – Sources d'ionisation à pression atmosphérique (API).

3a. Source d'ions ESI (électronébuliseur) - Processus d'électronébulisation en mode positif. La configuration orthogonale augmente le rapport signal/bruit.



D'après Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, Hainque B, Baudin B, Lefebvre P. Flammarion Médecine-Sciences, 2008.

3b. Source d'ions APCI (ionisation chimique à pression atmosphérique).



Contrairement à l'impact électronique ce mode d'ionisation est peu reproductible d'un spectromètre de masse à l'autre. Il oblige à confectionner sa propre bibliothèque de spectres en vue d'identification.

• **Ionisation chimique à pression atmosphérique:** ou APCI (pour « atmospheric pressure chemical ionization ») (figure 3b) elle peut être utilisée en aval d'un chromatographe en phase liquide. Elle consiste, dans un premier temps, à nébuliser à l'aide d'un gaz (azote), une solution contenant les analytes d'intérêt. Cet aérosol est évaporé après son introduction dans un manchon chauffé. Le mélange des gaz de nébulisation et ceux issus de l'évaporation est entraîné vers une électrode à décharge couronne (ou « corona »). Celle-ci, source constante d'électrons, crée un plasma en ionisant le gaz ambiant pour former des ions réactifs (dits « réactants »). Il est communément admis que l'ionisation des molécules d'intérêt (M) provient de réactions acido-basiques, en phase gazeuse, entre les ions réactifs du plasma et M. La nature des ions « réactants » présents dépend du solvant solubilisant initialement les analytes. En APCI en mode positif, ce sont des ions réactifs dits acides tels H_3O^+ , CH_3OH_2^+ , CH_3CNH^+ , NH_4^+ qui permettent la formation d'ions de type MH^+ ; en APCI en mode négatif, ce sont des ions réactifs dits basiques tels OH^- , CH_3O^- , CH_2CN^- , CH_3COO^- , Cl^- qui permettent la formation de $(\text{M}-\text{H})^-$. L'ionisation des composés est très favorisée dans la source par la fréquence de collisions élevée à pression atmosphérique.

Les sources ESI et APCI sont complémentaires. La source APCI est peu compatible avec les nano-débits utilisés en nano-chromatographie en phase liquide contrairement à la source ESI. La source APCI permet cependant l'ionisation mono-chargée de composés de faible masse moléculaire et présentant une polarité moyenne.

Les constructeurs développent actuellement des sources mixtes (ESI/APCI) ou facilement démontables pour passer d'une source d'ionisation à l'autre. Lors de la mise au point d'une méthode d'analyse par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse, on ne peut que recommander d'évaluer la réponse relative de ces deux modes d'ionisation.

3.2. Les analyseurs de masse

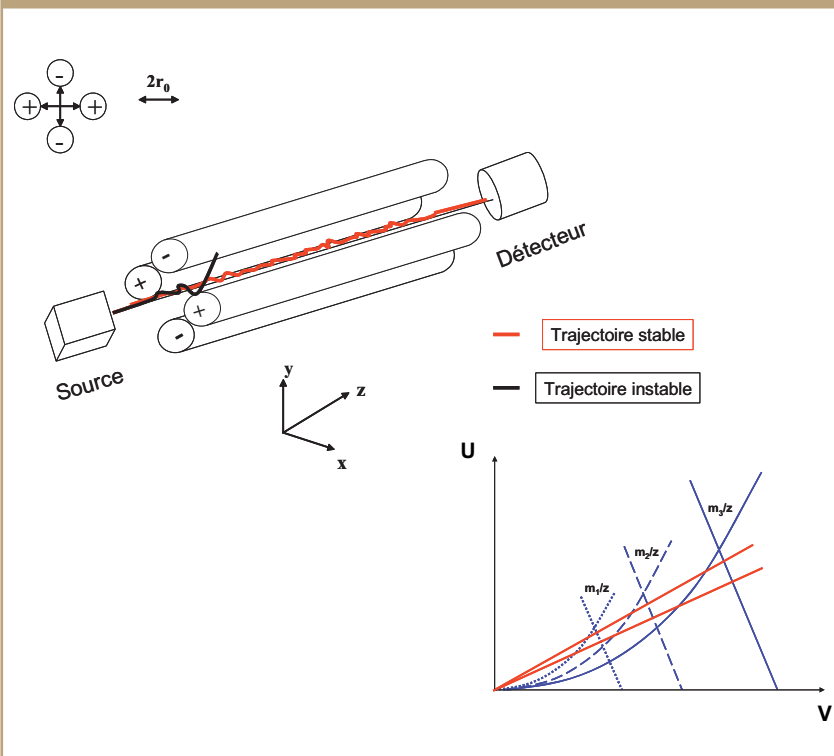
L'analyseur de masse correspond à la partie du spectromètre de masse qui sépare les ions formés dans la source en fonction de leur rapport m/z . Plusieurs types d'analyseurs sont disponibles. Leur mode de fonctionnement repose sur l'utilisation de champs électriques et/ou magnétiques. Le filtre quadripolaire et le piège à ions, fréquemment couplés aux sources API, allient coût et encombrement faibles, mais présentent des performances, en particulier en terme de résolution, beaucoup plus modestes que celles des analyseurs à temps de vol et des analyseurs électromagnétiques comme par exemple l'analyseur à résonance cyclotronique. Quadripôle et analyseur à temps de vol peuvent être utilisés en série et ainsi donner naissance à des appareils dits « hybrides ».

Les analyseurs permettent la séparation des ions mais non leur détection qui est assurée par un dispositif de multiplication d'électrons.

3.2.1. Analyseurs utilisant un champ électrique oscillant

Le fonctionnement de ce type d'analyseurs (filtre quadripolaire, piège à ions) est fondé sur le mouvement d'ions dans un champ électrique oscillant. En effet, si l'on considère le trajet d'un ion dans une dimension; placé entre deux électrodes, celui-ci se déplace et est accéléré vers l'électrode de signe opposé. Si la polarité de l'électrode

Figure 4 – Schéma du principe d'un triple quadripôle.



Zones A (à l'intérieur des zones bordées de bleu) obtenues à différentes valeurs du rapport m/z - droites de fonctionnement (en rouge)

D'après Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire, Hainque B, Baudin B, Lefebvre P. Flammarion Médecine-Sciences, 2008.

est inversée, l'ion se trouvera être accéléré dans l'autre direction. Lorsque l'amplitude et la fréquence auxquelles le champ électrique est modifié sont suffisantes, l'ion reste confiné entre les deux électrodes. Les champs électriques, dans un filtre quadripolaire et un piège à ions, sont générés par des électrodes dont la géométrie et la disposition dans l'espace diffèrent d'un analyseur à l'autre. Dans le filtre quadripolaire, ces champs permettent aux ions de maintenir une trajectoire dite stable jusqu'au détecteur. Dans le piège à ions, ils assurent le confinement des ions dans l'analyseur, leur détection s'effectuant après leur éjection sélective.

• **Analyseur-filtre quadripolaire** : il est constitué successivement d'une série de lentilles électroniques permettant la convergence et l'accélération des ions sortant de la source, puis d'un quadripôle formé le plus communément de quatre barres entre lesquelles sont établies des différences de potentiels, l'ensemble débouchant sur un détecteur (figure 4). L'ion entrant dans le quadripôle est soumis à l'influence d'un champ électrique total, constitué d'un champ alternatif quadripolaire superposé à un champ constant, résultant de l'application sur les barres, deux à deux, des potentiels $+(U - V\cos\omega t)$ et $-(U - V\cos\omega t)$, où U est la tension continue (en volt), V et ω respectivement l'amplitude de la tension alternative (en volt) et la pulsation de radiofréquence ($\omega = 2\pi f$ en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$, f la fréquence en Hz). L'ion de masse m, de charge Z_0 (cette notation est employée

pour éviter la confusion avec l'axe z) accéléré suivant l'axe z, pénètre entre les barres du quadripôle et conserve sa vitesse selon cet axe. Si les tensions et la fréquence imposées sont telles que cet ion entre en contact avec une barre, il sera déchargé et ne pourra pas sortir du quadripôle ni par conséquent être détecté (il aura ainsi été « filtré ») ; on dit qu'il a présenté une trajectoire instable. Si le potentiel appliqué à une barre change de signe avant que l'ion ne s'y décharge, l'ion changera de direction. Ainsi il oscillera en cheminant selon l'axe z jusqu'au détecteur. Seuls seront détectés les ions ayant présenté une trajectoire dite stable, c'est-à-dire ceux qui ont traversé le quadripôle sans jamais se heurter aux barres. Tant que simultanément x et y, qui mesurent la distance par rapport au centre des barres, restent inférieures à r_0 , l'ion pourra traverser le quadripôle sans toucher les barres. Pour différents ions, les zones de stabilité (dites « zones A » à l'intérieur des courbes présentées figure 4) ou zones de valeurs de U et V telles que x et y n'atteignent pas, au cours du temps, des valeurs supérieures ou égales à r_0 , peuvent être superposées sur un diagramme (figure 4). Ce dernier permet d'expliquer le principe de la séparation des ions, en superposant, les zones A obtenues à différentes masses et des droites dites de « fonctionnement » (droites en rouge (figure 4)).

Ainsi, un balayage des potentiels U et V suivant un rapport U/V constant (droites de « fonctionnement ») permet de laisser passer à travers le quadripôle jusqu'au détecteur, successivement, les ions présentant des rapports m/z_0 différents. Plus la pente de la droite de fonctionnement est élevée plus la résolution est importante, mais moins d'ions sont détectés. Plus la pente est faible moins la résolution est bonne mais plus d'ions sont détectés. Si la valeur de U est nulle, la résolution est nulle et tous les ions ont une trajectoire stable tant que la valeur de V est dans les limites de leur zone de stabilité. L'analyseur quadripolaire peut être utilisé selon deux modes. En mode balayage ou « scan », qui permet la détection de tous les ions, les valeurs de U et V varient selon une droite de fonctionnement. En mode SIM (« single ion monitoring ») les valeurs de U et V sont fixées pour ne détecter spécifiquement qu'un ou plusieurs ions. C'est ce mode SIM qui est utilisé lors des études de quantification par le couplage de la chromatographie en phase gazeuse avec un spectromètre de masse de type quadripôle. La molécule est formellement identifiée par son temps de rétention et le rapport m/z d'un ion fragment. Elle est aussi quantifiée avec une limite de quantification faible puisque le rapport signal/bruit est optimisé dans ce mode d'utilisation du spectromètre de masse. En effet, l'ion sélectionné au temps de rétention de la molécule étudiée est l'ion fragment le plus intense du spectre.

Plusieurs quadripôles peuvent être couplés entre eux en série et constituer un spectromètre de masse utilisable en mode « tandem ». Ce dispositif permet après la

Tableau I – Modes d'utilisation d'un triple quadripôle.

		Q_3	
		Mode statique	Mode scan
Q_1	Mode statique	(1) « Selected reaction monitoring »	(2) Spectre de masse des ions fragments
	Mode scan	(3) Spectre de masse des ions précurseurs	(4) Perte de fragment neutre

sélection d'un ion par le premier quadripôle de le fragmenter dans le deuxième et d'analyser les ions fils apparus dans le troisième. Le premier et le troisième quadripôles (Q_1 et Q_3) sont des analyseurs susceptibles de séparer les ions. Le deuxième (Q_2) est une « chambre de collision », c'est-à-dire un quadripôle à radiofréquence uniquement (valeur de U nulle) qui n'a pour rôle que de focaliser les ions au centre des barres puisque c'est le lieu de formation des ions fragments par collisions (CID, « collision induced dissociation »). Un gaz de collision y est introduit à une pression telle qu'un ion précurseur entrant dans ce quadripôle Q_2 subira plusieurs collisions. Si le gaz est inerte, une partie de l'énergie de collision est convertie en énergie interne. L'ion précurseur parent se fragmente et les ions fragments fils sont analysés par le troisième quadripôle. Plusieurs configurations peuvent être mises en œuvre dans l'utilisation d'un tel couplage en fonction du réglage des deux analyseurs Q_1 et Q_3 : elles sont résumées dans le **tableau I**. Lorsqu'un quadripôle est utilisé en mode statique ou SIM, il ne laisse passer qu'un ion à un rapport m/z_e donné. Lorsqu'un quadripôle est en mode balayage, il laisse passer tous les ions dans une gamme de rapport m/z_e prédéfinie. La combinaison de ces deux modes permet de réaliser 4 types de procédures.

1) « Selected reaction monitoring » (SRM) ou « multiple reaction monitoring (MRM) » : il y a détection, après passage dans Q_3 , d'un ion ou de plusieurs ions fils fragment(s) spécifique(s) formé(s) à partir de la fragmentation d'un ion précurseur spécifique. Q_1 est réglé pour la sélection exclusive de l'ion parent, Q_3 celle du ou des ion(s) fils. La détection d'un ion précurseur et un de ses ions fragments correspond à une « transition ». Le mode MRM facilite les études de quantification. En effet, la double sélection de l'ion précurseur et de l'ion fragment, correspondant à une transition, permet de diminuer le bruit de fond ; le rapport signal/bruit obtenu est alors favorable à une diminution de la limite de quantification. Le spectromètre de masse de type triple quadripôle est généralement couplé à une méthode séparative telle que la chromatographie. Dans ce cas, l'identification et la quantification d'une molécule sont assurées par son temps de rétention en chromatographie et au moins deux transitions ion précurseur/ions fragments, la première permettant la détection de l'ion fragment le plus intense est utilisée pour la quantification, la deuxième confirme l'identification de la molécule en diminuant le taux de faux positifs.

2) Spectre de masse des ions fils : Q_3 laisse passer tous les ions fils obtenus après fragmentation dans Q_2 d'un ion précurseur préalablement sélectionné par Q_1 . Ce mode est utilisé lors de la détermination de structure de petites molécules organiques ou biologiques.

3) Spectre de masse des ions précurseurs : Q_1 laisse passer les ions précurseurs présentant un ion fils fragment commun (repéré par Q_3). Ce mode est utilisé, par exemple, pour l'identification structurale de métabolites d'une molécule, ces derniers présentant un ion fragment en commun.

4) Perte de fragment neutre : Q_1 et Q_3 sont en mode balayage en maintenant entre eux une différence constante en rapport m/z_e (masse du fragment neutre perdu). Q_1 sélectionne tous les ions parents qui présentent un ion fils de rapport m/z correspondant au rapport m/z_e de l'ion parent moins la masse du fragment neutre. Comme pour le spectre des ions précurseurs, ce mode est une aide à l'étude structurale et à l'identification de molécules apparentées.

• **Analyseur-piège à ions** : le piège à ions (ou trappe d'ions) est constitué de trois électrodes, une électrode annulaire et deux électrodes « chapeau », ces dernières étant quasiment identiques et de géométrie hyperbolique. L'électrode « chapeau » supérieure possède en son centre une ouverture qui permet l'introduction des ions issus de la source. L'électrode « chapeau » inférieure possède une série de trous permettant l'éjection des ions vers le détecteur. Les ions entrant dans la trappe sont piégés sur une trajectoire oscillante, de fréquence spécifique pour chaque ion, formant une sorte de huit en trois dimensions. Ce mouvement provient de l'application d'un potentiel alternatif Φ_0 sur les électrodes, de la même forme générale que celui employé dans un quadripôle ($\pm \Phi_0 = \pm V \cos \omega t$), la tension continue U étant, dans ce cas, de valeur nulle. Alors que dans les quadripôles on règle les potentiels de manière que seuls les ions d'un rapport m/z déterminé traversent les barres, ici le principe est différent. Les ions de différents rapports m/z sont présents simultanément dans le piège. Le spectre est obtenu en les expulsant en fonction de leur rapport m/z_e en déstabilisant leur trajectoire suivant l'axe z, soit par augmentation progressive de la tension V (modulation de l'amplitude) soit en appliquant un potentiel oscillant supplémentaire (éjection par résonance ou modulation axiale). De plus, il est nécessaire d'introduire systématiquement dans l'analyseur un gaz neutre (hélium), pour garantir un confinement efficace et focaliser le nuage d'ions au centre de la trappe, puisque ces ions, s'ils présentent la même charge, peuvent se repousser mutuellement et déformer leur trajectoire, voire la déstabiliser.

Un analyseur de type trappe d'ions peut être utilisé en mode « tandem », mais contrairement au triple quadripôle, il ne nécessite pas une mise en série de plusieurs pièges. L'analyseur successivement isole l'ion précurseur, le fragmente, sépare et fait sortir vers le détecteur les ions fragments apparus. L'ion parent est sélectionné par expulsion de tous les autres ions en jouant sur les tensions

ou la radiofréquence. Cet ion isolé est ensuite fragmenté par collision (CID). Il est d'abord « excité » en appliquant entre les électrodes une radiofréquence de faible amplitude, dite de résonance, caractéristique de l'ion. L'ion n'est pas expulsé, mais voit son énergie cinétique augmenter ; il entre alors en collision avec des molécules d'hélium présentes dans le piège. L'énergie cinétique est convertie en énergie interne qui, si elle est suffisante, permet la fragmentation de l'ion. Après fragmentation, les ions fils formés, qui ne présentent pas la même fréquence de résonance que l'ion précurseur, sont immédiatement piégés au centre de la trappe. Ils sont ensuite expulsés du piège en fonction de leur rapport m/z , puis détectés.

Une variante de la trappe d'ions, la trappe linéaire, a été développée récemment. Elle présente le même type de fonctionnement que les pièges à ions mais les ions, dans ce cas, sont piégés entre les barreaux d'un quadripôle à radiofréquence (valeur de U nulle) et expulsés ensuite en fonction de leur rapport m/z . L'espace de confinement des ions est plus grand que dans un piège classique. Parce que les ions peuvent être stockés en plus grand nombre ; ce type d'analyseur conduit à une limite de détection plus basse que celle rencontrée pour l'analyseur-piège à ions classique.

Le principe de fonctionnement de ce spectromètre de masse repose sur une accumulation des ions d'intérêt dans le piège. Il est donc capable de détecter plusieurs ions dont ceux faiblement présents puisqu'ils seront « cumulés » dans l'analyseur. Cet analyseur produit donc en mode balayage (« full scan ») des spectres de masse plus intenses qu'un analyseur de type quadripolaire. De plus les pièges à ions sont généralement équipés d'une option MSⁿ ; c'est-à-dire qu'ils sont capables de fragmenter successivement un ion précurseur puis un ion fragment issu de ce premier ion précurseur, et ainsi de suite n fois. Les spectromètres de masse de type piège à ions sont donc plutôt dédiés aux études structurales. Cependant ils peuvent être utilisés lors d'études quantitatives en mode SIM ou en mode MRM. Dans la fin de ce chapitre nous aborderons les performances comparées d'un piège à ions et d'un triple quadripôle dans le cadre de la quantification.

3.2.2. Analyseurs utilisant un champ électrique constant – Analyseurs à temps de vol (« time of flight » TOF)

Le principe de fonctionnement de ce spectromètre de masse est simple. Généralement un TOF est associé à une source MALDI. Les ions y sont formés dans une région relativement limitée en présence d'un champ électrique E (généralisé par une différence de potentiels U) qui accélère ces ions sur la longueur s de la source avant leur entrée dans l'analyseur proprement dit. Ce dernier est constitué d'un tube de vol, région sans champ et de longueur D beaucoup plus élevée que s. Les ions sont détectés à l'autre extrémité du tube. Un ion de masse m et de charge z aura une vitesse v et une énergie cinétique (Ec) à l'arrivée au détecteur telle que : $E_c = \frac{1}{2} [m \cdot v^2] = z \cdot U$. Il parcourra la distance D en un temps t tel que : $t = D/v$ soit $t^2 = [m/z] [D^2/2U]$. Le temps de vol t est ainsi direc-

tement lié au rapport m/z . La mesure du temps de vol permet alors une détection différentielle des espèces ayant un rapport m/z différent. Actuellement, avec les perfectionnements apportés, en particulier les miroirs électrostatiques, et les développements des systèmes d'acquisition, les valeurs de résolution rencontrées en analyse par un TOF peuvent être très supérieures à 5 000.

3.2.3. Analyseurs hybrides

Ils comprennent au moins deux analyseurs séparant les ions selon deux processus différents.

• **Couplage source ESI – analyseurs quadripolaires et à temps de vol (ESI-Q-TOF)** : cet analyseur est composé d'une source ESI reliée à une série de quadripôles (Q_0 qui guide les ions, Q_1 qui les sépare, Q_2 qui est utilisé comme chambre de collision) puis à un TOF placé perpendiculairement pour obtenir une bonne résolution et une bonne précision dans la mesure des temps de vol. Ce spectromètre de masse allie la source ESI qui est facilement couplée avec un chromatographe en phase liquide et l'analyseur de type TOF hautement résolutif. Ce dernier critère permet d'obtenir pour chaque ion détecté un signal hautement spécifique. Cette particularité est exploitée lors des études structurales (spectre des ions fragments issus d'un ion précurseur) mais aussi lors des études de quantification en modes SIM et MRM. Pour ce dernier point nous avons vu précédemment que la qualité d'un signal exploité en quantification dépendait du rapport signal/bruit. La haute résolution obtenue avec le spectromètre de masse ESI-Q-TOF permet de diminuer le bruit de fond et ainsi d'optimiser le rapport signal/bruit.

• **Couplage source ESI – quadripôle linéaire (LTQ[®]) et Orbitrap[®]** : depuis peu a été développé le LTQ-Orbitrap[®] associant une trappe d'ions linéaire (« linear ion trap quadripole », LTQ[®]) qui a pour rôle de stocker les ions produits par la source, puis, de les éjecter latéralement pour qu'ils soient détectés, ou co-axialement pour qu'ils entrent dans l'analyseur couplé en ligne, l'Orbitrap[®]. Les ions y sont alors soumis à un champ électrique particulier et suivent une trajectoire circulaire autour et le long d'une électrode cylindrique. La fréquence du mouvement est inversement proportionnelle à la racine carrée de leur rapport m/z . Plusieurs ions de rapport différent étant présents en même temps dans l'Orbitrap[®], c'est une somme de fréquences qui est détectée ; celle-ci permet le tracé du spectre de masse après calcul par transformée de Fourier. Les performances obtenues avec ce système, en terme de limite de détection, de résolution (jusqu'à 100 000) et de justesse en masse (< 5 ppm en étalonnage externe), sont supérieures à celles observées lors de l'utilisation du système hybride, quadripôle-spectromètre à temps de vol (Q-TOF) dont le fonctionnement est décrit ci-dessus. Dans le cadre de l'analyse des petites molécules, ce spectromètre de masse est surtout dédié aux études structurales.

3.2.4. Analyseurs utilisant un champ magnétique

La propriété des champs magnétiques à dévier la trajectoire des ions a été mise à profit dès le début du

vingtième siècle pour déterminer la masse des ions. Par exemple en 1933, le spectromètre de Bainbridge combinait champs électriques et champ magnétique. Les champs électriques accélèrent les ions et homogénéisent leur énergie cinétique, le champ magnétique les dévie sur des trajectoires circulaires dont le rayon dépend de leur rapport m/z . Actuellement l'action de ces champs est exploitée dans le spectromètre de masse à résonance cyclotronique ionique. Cet analyseur est peu usité, mais les valeurs de résolution très élevées qu'il présente (de l'ordre de 80 000) permettent la visualisation des massifs isotopiques et une précision en masse extrême (de l'ordre de 1 ppm) utiles dans la détermination de la composition élémentaire des composés ($C_xH_yN_zO_n$).

4. Analyse de molécules d'intérêt pharmacologique ou toxicologique

La spectrométrie de masse possède actuellement un large choix de sources et d'analyseurs. Chaque configuration présente ses propres caractéristiques, mises à profit lors de problèmes analytiques qualitatifs et quantitatifs. Les premiers, consistant essentiellement en la détermination de structures, peuvent être en partie résolus par l'analyse isotopique et la fragmentation des ions précurseurs. Les deuxièmes, consistant à déterminer la concentration d'un composé connu dans un mélange, exploitent la capacité de certaines sources à être couplées à la chromatographie.

4.1. Isotopes et détermination de la composition élémentaire des molécules

La spectrométrie de masse permet facilement de déterminer le nombre de carbones d'une petite molécule organique et de détecter la présence ou non d'halogène(s) dans sa formule brute. Pour cela, on utilise la notion d'abondance isotopique (AI) qui peut être définie par la probabilité de rencontrer dans la molécule un atome $A+1$ (^{13}C , ^{15}N ou 2H , **tableau II**) ou un atome $A+2$ (^{37}Cl , ^{81}Br , voir **tableau II**), soit $AI = (Abondance\ du\ pic\ M+1\ ou\ M+2) / (Abondance\ du\ pic\ M)$, si c'est un ion moléculaire M^+ de rapport m/z égal à M (masse moléculaire) qui est formé.

Dans le cas du pic à $M+1$, les probabilités d'abondance des différents éléments étant indépendantes on peut écrire $AI = (1,10\ nombre\ de\ C)\ \% + (0,015\ nombre\ d'H)\ \% + (0,37\ nombre\ d'N)\ \%$. Généralement l'abondance isotopique du pic $M+1$ donne directement le nombre de carbones présents dans la molécule ; elle peut être supérieure à l'abondance de l'ion moléculaire M si le nombre de carbones est supérieur à 100. Plusieurs pics peuvent être apparents ; on parle alors d'amas isotopique. Si la molécule contient dans sa formule un atome de chlore, le spectre de masse présente deux ions moléculaires séparés de 2 Th et d'intensités relatives 3 (^{35}Cl) et 1 (^{37}Cl). Si l'ion moléculaire contient dans sa formule n (> 1) atomes de chlore, le spectre présente $(n+1)$

Atome	Masse nominale	Masse exacte	Abondance relative (%)	Masse moyenne
H	1	1,0078	99,985	1,008
	2	2,0141	0,015	
C	12	12,0000	98,900	12,011
	13	13,0034	1,100	
N	14	14,0031	99,630	14,007
	15	15,0001	0,370	
O	16	15,9949	99,760	15,999
	17	16,9991	0,040	
	18	17,9992	0,200	
P	31	30,9738	100	30,974
S	32	31,9721	94,750	32,066
	33	32,9715	0,789	
	34	33,9679	4,440	
	36	35,9671	0,021	
Cl	35	34,9689	75,770	35,453
	37	36,9659	24,230	
Br	79	78,9183	50,690	79,904
	81	80,9163	49,310	

ions M^+ séparés de 2 Th et dont l'intensité relative est obtenue en développant le polynôme $(a + b)^n$, où a et b sont les intensités relatives des deux isotopes ($a = 3$ et $b = 1$ pour le chlore). Si par exemple la formule brute de l'ion M^+ contient 2 Cl (**figure 1a**), le nombre d'ions formant le massif moléculaire est de 3 et les intensités relatives de ces ions sont : 3^2 (a^2), $2 \times 3 \times 1$ ($2ab$), 1^2 (b^2) soit, 9, 6 et 1. La probabilité de trouver 2 ^{35}Cl dans la molécule est de 3^2 , la probabilité de trouver 1 ^{35}Cl et 1 ^{37}Cl est de $2 \times 3 \times 1$, la probabilité de trouver 2 ^{37}Cl est de 1^2 .

Si la molécule contient dans sa formule un atome de brome, le spectre de masse présente deux ions moléculaires séparés de 2 Th et d'intensité relative identique. Si la molécule contient plusieurs atomes de brome le raisonnement décrit pour le chlore peut être appliqué. Dans ce cas les intensités relatives des deux isotopes sont égales ($a = b = 1$).

4.2. Apport de la fragmentation dans la détermination de la structure moléculaire

Le spectre de masse obtenu grâce à la source d'impact électronique ou dans une chambre de collision comporte des pics d'intensités différentes à des rapports m/z différents. Les ions fragments sont formés, soit après perte

Tableau III – Pertes communes de radicaux et molécules neutres.

Perte (uma)	Nature	Commentaires
1	H	Hydrogène radicalaire
15	CH ₃	Radical méthyle
18	H ₂ O	Alcool, acide
19	H ₂ O + H	Alcool, acide
27	HCN	Amine aromatique simple
28	CO	Quinone, phénol simple, hétérocycle oxygéné
29	C ₂ H ₅	Dérivé éthylé
29	CO + H	Quinone
31	OCH ₃	Ester méthylique
33	HS	Dérivés soufrés
34	H ₂ S	Thiols
35	³⁵ Cl	Chlorure d'alkyle, d'acide, chlorhydrate
36	H ³⁵ Cl	Chlorure d'alkyle, d'acide, chlorhydrate

logique de fragments neutres ou radicalaires (**tableau III**), soit suivant des mécanismes de fragmentation bien connus comme les ruptures dites α ou i (**figure 5**) :

- **la rupture α** est une rupture homolytique de la liaison initiée par le radical, avec migration du site radicalaire et sans migration de la charge (**figure 5a**). La réactivité des sites suit l'ordre des basicités de Lewis ($N > S, O, C_6H_5 > F, Cl, Br, I$). En illustration, la **figure 1b** montre le spectre de la lidocaïne obtenu par impact électronique. Le pic de base, au rapport m/z 86, apparaît après une rupture α initiée par la charge positive positionnée sur l'azote (**figure 5b**) ;

- **la rupture i** est une rupture hétérolytique de la liaison initiée par la charge, avec déplacement de la charge. L'effet inductif est d'autant plus prononcé que l'atome Y est électronégatif ($F > Cl > Br > I > O, S \gg N, C$) (**figure 5a**). Cette rupture est moins favorable que la rupture α car elle nécessite la migration de la charge. Dans ce cas, les ruptures qui interviennent préférentiellement sont celles qui conduisent à la formation des ions fils stabilisés par effet mésomère ou inducteur ou par perte de l'électron célibataire.

De plus, l'apparition de fragment neutre (potentiel d'ionisation élevé) par réarrangement de la molécule est largement favorisée aussi bien en impact électronique qu'en mode CID :

- **le réarrangement d'hydrogène** décrit (**figure 5c**) peut intervenir en présence d'une fonction alcool. Il aboutit à la perte d'une molécule d'eau ;

- **le réarrangement de Mc Lafferty** consiste dans le transfert d'un atome d'hydrogène sur un groupement polaire. Il nécessite la présence d'une double liaison et d'un hydrogène en α de cette insaturation, comme le montre la (**figure 5d**).

- **le réarrangement rétro-Diels-Alder (RDA)** intervient quand une double liaison est présente dans un cycle à 6 atomes de carbone, comme le montre la **figure 5e**. Si le potentiel d'ionisation (PI) de R est élevé ($R = H, PI = 10,5$), on dit qu'il y a rétention de la charge ; dans ce cas, la fragmentation par RDA intervient après deux ruptures α successives. Dans le cas contraire ($R = C_6H_5, PI = 9,1$), on dit qu'il y a migration de la charge ; la fragmentation par RDA intervient après une rupture α suivie d'une rupture i . La perte de fragment neutre s'accompagne en principe d'une conservation de la parité entre l'ion parent et l'ion fils, à condition que le fragment neutre ne comporte pas d'atome d'azote dans sa structure (règle de l'azote).

4.3. La quantification

4.3.1. Les spectromètres de masse

Le signal exploité lors des études quantitatives doit présenter un rapport signal/bruit le plus élevé possible. Ceci peut être obtenu de façon évidente en augmentant le facteur signal mais aussi en diminuant le facteur bruit. Ce principe trouve son application dans l'utilisation des spectromètres de masse de type ESI-triple quadripôle et ESI-analyseurs quadripolaire et à temps de vol (TOF).

Le premier, en mode MRM, utilise les transitions, c'est-à-dire détecte un ion fils issu de la fragmentation d'un ion précurseur sélectionné par le premier quadripôle. La double sélection de l'ion précurseur par le premier quadripôle et de l'ion fragment par le troisième permet d'obtenir un signal hautement spécifique palliant la résolution unitaire de l'ESI-triple quadripôle ; le rapport signal/bruit se trouve optimisé. Le signal obtenu par un ESI-Q-TOF est très spécifique, du fait de la haute résolution de l'analyseur TOF. Là encore le rapport signal/bruit se trouve optimisé.

Les pièges à ions présentent généralement des performances moindres en termes de limites de détection et de quantification. En effet, un triple quadripôle détecte, en modes SIM ou MRM, l'ion d'intérêt en continu, alors qu'un piège à ions doit dans un premier temps se remplir d'ions de rapports m/z différents pour ensuite éjecter l'ion d'intérêt afin qu'il soit détecté. Avec un piège à ions, le pic chromatographique résultant est moins intense et présente plus de bruit que celui obtenu avec un triple quadripôle.

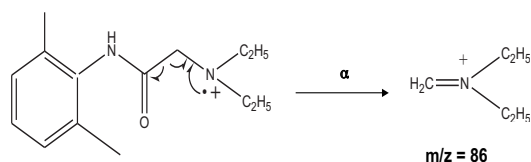
4.3.2. Les étalons

Lors des études de quantification, la qualité de l'étalonnage est primordiale. L'utilisation d'un étalon interne doit être chaudement recommandée, plus particulièrement quand le détecteur couplé est un spectromètre de masse. Il est bien connu que l'étalon interne pallie le manque de reproductibilité de la méthode d'analyse d'un échantillon à l'autre, au niveau du traitement de l'échantillon par exemple. Mais, si le détecteur est un spectromètre de masse, la détection d'une molécule dépendra aussi de la qualité de son ionisation dans la source. Le milieu dans lequel se trouve la molécule, quand elle arrive dans la source, conditionne cette ionisation. Par exemple, une molécule interférente et fortement concentrée peut provoquer une suppression ionique en captant préférentiellement les protons disponibles à la place des molécules d'intérêt.

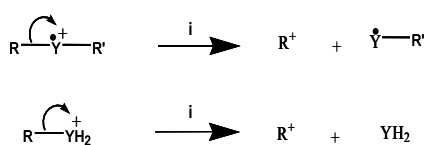
L'étalon interne de choix lors d'un dosage qui utilise la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse

Figure 5 – Principaux mécanismes de fragmentation des molécules.

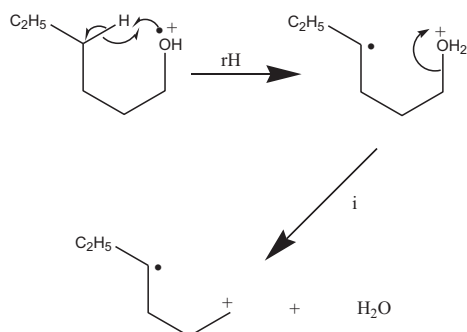
5a. Rupture α survenant dans la source d'ionisation par impact électronique pour la lidocaïne. Apparition de l'ion fragment à m/z 86.



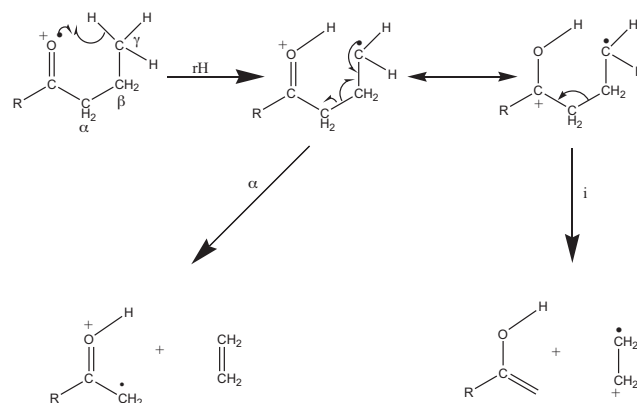
5b. Rupture i .



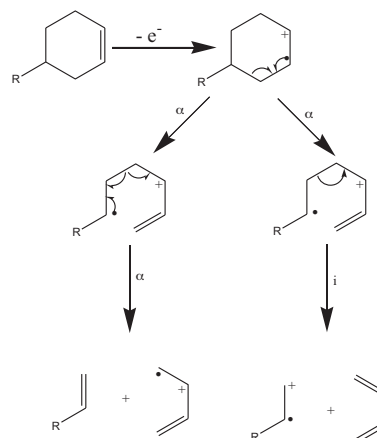
5c. Réarrangement d'hydrogène. Élimination d'une molécule d'eau.



5d. Réarrangement de McLafferty. Élimination de molécule neutre.



5e. Réarrangement « rétro-Diels-Alder ». Élimination de molécule neutre.



est la molécule à doser présentant des isotopes lourds (deutérium ou carbone 13). Un composé contenant des isotopes lourds présente généralement le même temps de rétention en chromatographie que son pendant léger. Molécules légère et lourde arrivent donc simultanément dans la source. Ainsi, une substance interférente éventuelle fera varier le taux d'ionisation des deux molécules lourde et légère de la même façon.

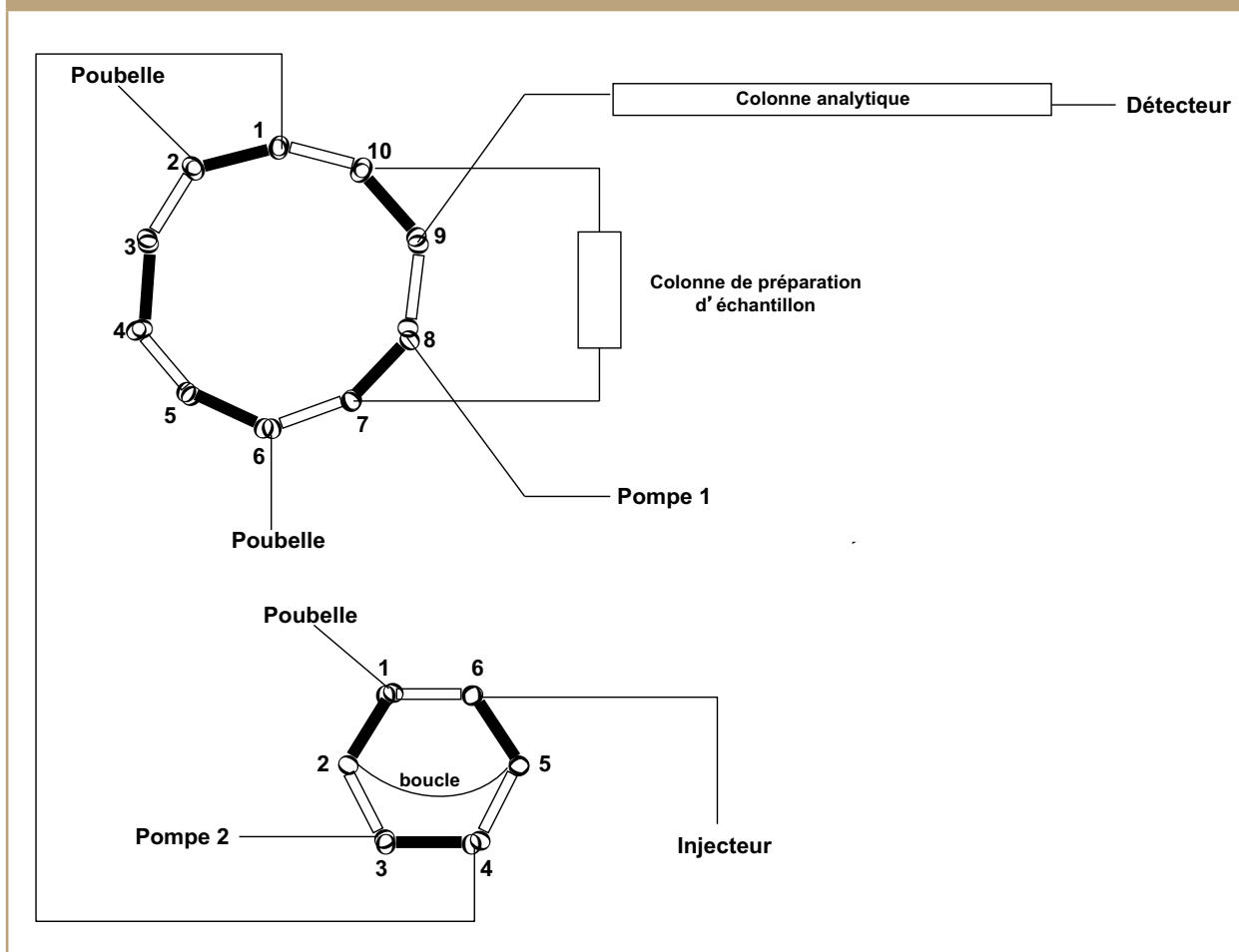
4.4. Couplage des méthodes séparatives avec la spectrométrie de masse

Les méthodes séparatives (chromatographies en phases liquide et gazeuse) sont fréquemment couplées à la spectrométrie de masse. Elles permettent d'introduire dans le spectromètre de masse un échantillon relativement pur et exempt de composés qui pourraient perturber l'ionisation des solutés d'intérêt dans la source.

4.4.1. Chromatographie en phase gazeuse

Le couplage avec la chromatographie en phase gazeuse est le plus facile. La colonne capillaire est introduite directement dans la source (impact électronique ou ionisation chimique) du spectromètre de masse puisque l'échantillon est élué de la colonne déjà sous forme gazeuse. Les spectres obtenus par ionisation par impact électronique peuvent être comparés à ceux contenus dans une bibliothèque (NIST) pour l'identification formelle du composé. Cependant ce mode de séparation présente plusieurs inconvénients. Le traitement de l'échantillon avant analyse est souvent long et fastidieux. Les molécules à analyser en chromatographie en phase gazeuse doivent être solubilisées dans un solvant organique compatible et leurs fonctions polaires dérivées. De plus ces molécules doivent être thermostables. La chromatographie en phase liquide ne présente pas ces inconvénients.

Figure 6 – Couplage de l'extraction liquide-solide en ligne avec la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse.



4.4.2. Chromatographie en phase liquide

Le traitement de l'échantillon peut être beaucoup plus rapide. Les développements technologiques actuels en chromatographie en phase liquide permettent d'envisager aisément une préparation en ligne d'échantillon, par extraction liquide-solide. La **figure 6** montre le type de montage habituellement utilisé : une colonne contenant de la phase solide d'extraction liquide-solide («colonne de préparation de l'échantillon») est positionnée au niveau d'une vanne 10 voies. Dans la position 1-10 de cette vanne, la «pompe 2» pousse l'échantillon dans la colonne d'extraction retenant les composés à analyser. Dans cette position, les deux circuits, «pompe 1-colonne analytique» et «pompe 2-colonne de préparation de l'échantillon» sont indépendants. La phase mobile pompée par la pompe 2 peut être judicieusement choisie afin de permettre une bonne rétention des composés à analyser et une élution (vers la « poubelle ») des impuretés contenues dans l'échantillon. Lorsque la vanne à 10 voies passe en position 1-2, les composés retenus dans la colonne d'extraction sont poussés dans la colonne analytique qui les séparera. Ce système peut être couplé en aval à un spectromètre de masse de type triple quadripôle qui isolera les ions de rapport m/z spécifiques (en mode SIM ou MRM) des composés séparés à leurs temps de rétention respectifs. Ce

couplage «colonne de préparation d'échantillon-colonne analytique-spectromètre de masse triple quadripôle» est classiquement utilisé en analyse quantitative en présence d'étalons internes deutériés.

De nouvelles phases stationnaires permettent l'analyse de composés hydrophiles sans dérivation des fonctions polaires. Elles utilisent les deux mécanismes de rétention essentiels en chromatographie en phase liquide, la polarité de phases inversée et la polarité de phases normale. Les premières sont des phases stationnaires hydrophobes, silices greffées alkyle par exemple, mais modifiées afin d'être utilisables à très faible pourcentage de solvant organique dans la phase mobile. Avec ce type de phase stationnaire, plus le composé est hydrophobe plus il est retenu, plus la phase mobile est riche en solvant organique plus le composé est rapidement élué. Un faible pourcentage de solvant organique dans la phase mobile la rend peu éluante et garantit une bonne rétention de composés hydrophiles. Les secondes sont des phases stationnaires de type HILIC (« hydrophilic interaction liquid chromatography ») ; avec ce type de phase stationnaire, plus le composé est hydrophile plus il est retenu, plus la phase mobile est riche en solvant organique moins le composé est rapidement élué. Les phases mobiles utilisées avec ces phases stationnaires

doivent être compatibles avec la détection par un spectromètre de masse. En effet, les liquides arrivant dans la source doivent être facilement volatilisables et présenter des propriétés physicochimiques telles qu'ils permettent une bonne ionisation des produits. Les phases mobiles sont généralement composées d'un mélange d'eau et d'acétonitrile additionné de divers réactifs. Les tampons ou réactifs dits « volatils » les plus utilisés dans les phases mobiles lors de l'utilisation d'une source ESI sont des solutions d'acétate et de formiate d'ammonium, de triéthylamine, d'acide heptafluorobutyrique, d'acide formique, d'acide acétique, d'acide trifluoroacétique (en mode positif), d'hydroxyde de tétraéthyl- ou tétrabutylammonium (en mode négatif) à la concentration de 10 à 100 mmol.L⁻¹. L'utilisation d'agents de cationisation (acétate de sodium ou de potassium 20 à 50 µmol.L⁻¹) permet la formation d'adduits sodique ou potassique dans la source. La stabilité des phases stationnaires contenues dans les colonnes de chromatographie en phase liquide doit être compatible avec la composition des phases mobiles.

Les progrès spectaculaires dans la qualité de la séparation ont été apportés par les améliorations technologiques qui permettent d'augmenter l'efficacité chromatographique, c'est-à-dire augmenter la finesse du pic. La chromatographie est utilisée pour déterminer la concentration d'un produit dans un échantillon parce que la surface du pic chromatographique est proportionnelle à la quantité de

produit introduite dans le système. Si le pic chromatographique est fin, il présentera une concentration à son maximum plus élevée qu'un pic moins fin obtenu après avoir injecté la même quantité du même produit dans un système chromatographique moins performant. Deux modifications instrumentales améliorent l'efficacité chromatographique, la miniaturisation de la colonne et la diminution du diamètre des particules de phase stationnaire. La première est mise en œuvre en diminuant le diamètre interne des colonnes, ce qui limite les phénomènes de diffusion des composés durant la séparation. Une colonne présentant un diamètre interne de 75 µm permet une augmentation théorique du rapport signal/bruit de 3 800 par rapport à une colonne classique de diamètre interne de 4,6 mm.

L'utilisation des colonnes contenant des phases stationnaires présentant un diamètre des particules faible (< 2 µm) permet d'augmenter la surface d'échange et limite la diminution de l'efficacité chromatographique à débit élevé ; les séparations peuvent donc être rapides. La vitesse d'acquisition élevée des nouveaux analyseurs autorise le couplage de ces colonnes avec un spectromètre de masse de nouvelle génération. Ces dispositifs sont particulièrement adaptés à l'analyse d'échantillons peu complexes et nombreux.

Déclaration d'intérêts : l'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Pour en savoir plus

Ouvrages de référence

- Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes. Rouessac F, Rouessac A, Cruché D. 6^e éd. Science Sup, Dunod, 2004.
- Current practice of gas chromatography-mass spectrometry. Niessen WMA. Chromatographic Science Series (86), CRC, 2001.
- Interpretation of mass spectra. McLafferty FW, Choi J. 4^e éd. University Science Books, 1993.
- Liquid chromatography: mass spectrometry. Niessen WMA. Chromatographic Science Series (79). 2^e éd. CRC, 1999.
- Liquid chromatography: mass spectrometry. Niessen WMA. Chromatographic Science Series (97), 3^e éd. CRC, 2006.
- Spectrométrie de masse: cours et exercices corrigés. de Hoffmann E, Charrette J, Stroobant V. 2^e éd. Dunod, 1999.

Articles originaux

- *Multi reaction monitoring*: Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review. Gros M, Petrović M, Barcelo D. Anal Bioanal Chem 2006;386:941-52.
- *Pertes de neutre et analyse des ions précurseurs*: Urinary profile of methylprednisolone acetate metabolites in patients following intra-articular and intramuscular administration. Panusa A, Regazzonii L, Aldini G, Orioli M, Giombini A, Minghetti P, Tranquilli C, Carini M. Anal Bioanal Chem 2011;400:255-67.

- *Triple quadripôle versus hybride quadripôle/TOF*: Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS² using triple quadripole and hybrid quadripole time-of-flight analysers. Hernandez F, Pozo OJ, Sancho JV, Lopez FJ, Martin JM, Ibanez M. Trends Anal Chem 2005;24(7):596-612.

Ressources Internet

- Agilent: <http://www.home.agilent.com/agilent/home.jsp?cc=FR&lc=fre>
- Applied Biosystems: <http://www.absciex.com/>
- Brücker: <http://www.bruker.com/>
- Dionex: <http://www.thermofisher.com/global/en/products/dionex/index.html>
- Millipore: <http://www.millipore.com/>
- NIST: <http://www.nist.gov/index.html>
- Shimadzu: <http://www.shimadzu.fr/home/>
- Thermo Electron: <http://www.thermofisher.com/global/en/products/dionex/index.html>
- Varian: <http://www.varianinc.com/cgi-bin/nav?/>
- Waters: <http://www.waters.com/WatersDivision/International/france/index.asp>
ou <http://www.waters.com/watersdivision/Contentd.asp?ref=CEAN-5KUSS8>