

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen  
Faculté SNV & STU  
Département de biologie  
Master Biochimie Appliquée  
2019-2020

# **Chapitre 4: Spectrométrie de masse**

**Dr N. BENARIBA**

## **Partie 2: Méthodes d'identification et d'analyse structurale**

### Méthodes d'identification et de détermination de la structure chimique des molécules

- 1-** Les méthodes chimiques: Caractérisation d'un groupement fonctionnel par un réactif chimique
- 2-** Les méthodes physiques: Méthodes spectroscopiques
  - 2-1** La Spectroscopie moléculaire ultraviolet-visible: caractérisation des groupements fonctionnels
  - 2-2** La Spectroscopie moléculaire infrarouge: caractérisation des groupements fonctionnels
  - 2-3** La spectrométrie par diffraction des rayons X : caractérisation de la structure des molécules cristallisée
  - 2-4** La spectrométrie de masse : caractérisation de la masse des molécules
  - 2-5** La Spectroscopie RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) : caractérisation de la structure des molécules par la RMN du proton et du carbone-13.

#### 4- Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier les molécules inconnues par mesure (avec grande précision) de leur masse.

Les molécules biologiques sont formés essentiellement de: **C, H, O, N, P, S**

Chaque atome a sa propre masse atomique. Connaissant la formule brute d'une molécules on peut calculer sa masse moléculaire

**Exemple:** l'alanine  $C_3H_7NO_2$

$$(3 \times 12) + (7 \times 1) + (1 \times 14) + (2 \times 16) = 89 \text{ Da}$$

$$(3 \times 12,01115) + (7 \times 1,00797) + (1 \times 14,0067) + (2 \times 15,9994) = 89,09474 \text{ Da}$$

L'unité de la masse (U) est le Dalton (Da):  $1U = 1 \text{ Da} = 1,660540 \times 10^{-27} \text{ Kg}$

## 4- Spectrométrie de masse

**Principe:** Le principe général de la spectrométrie de masse repose sur une ionisation et une fragmentation des molécules. Leur ionisation entraîne en effet une accumulation d'énergie qui, en se dissipant peut provoquer la rupture des liaisons interatomiques et donner naissance à des fragments caractérisés par le rapport de leur masse à leur charge. Elle permet la séparation (en phase gazeuse) des molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ). Le recueil sélectif des différents ions permet l'établissement d'un spectre caractéristique appelé le spectre de masse.

Cette technique est applicable pour des composés solides, liquides et gazeux

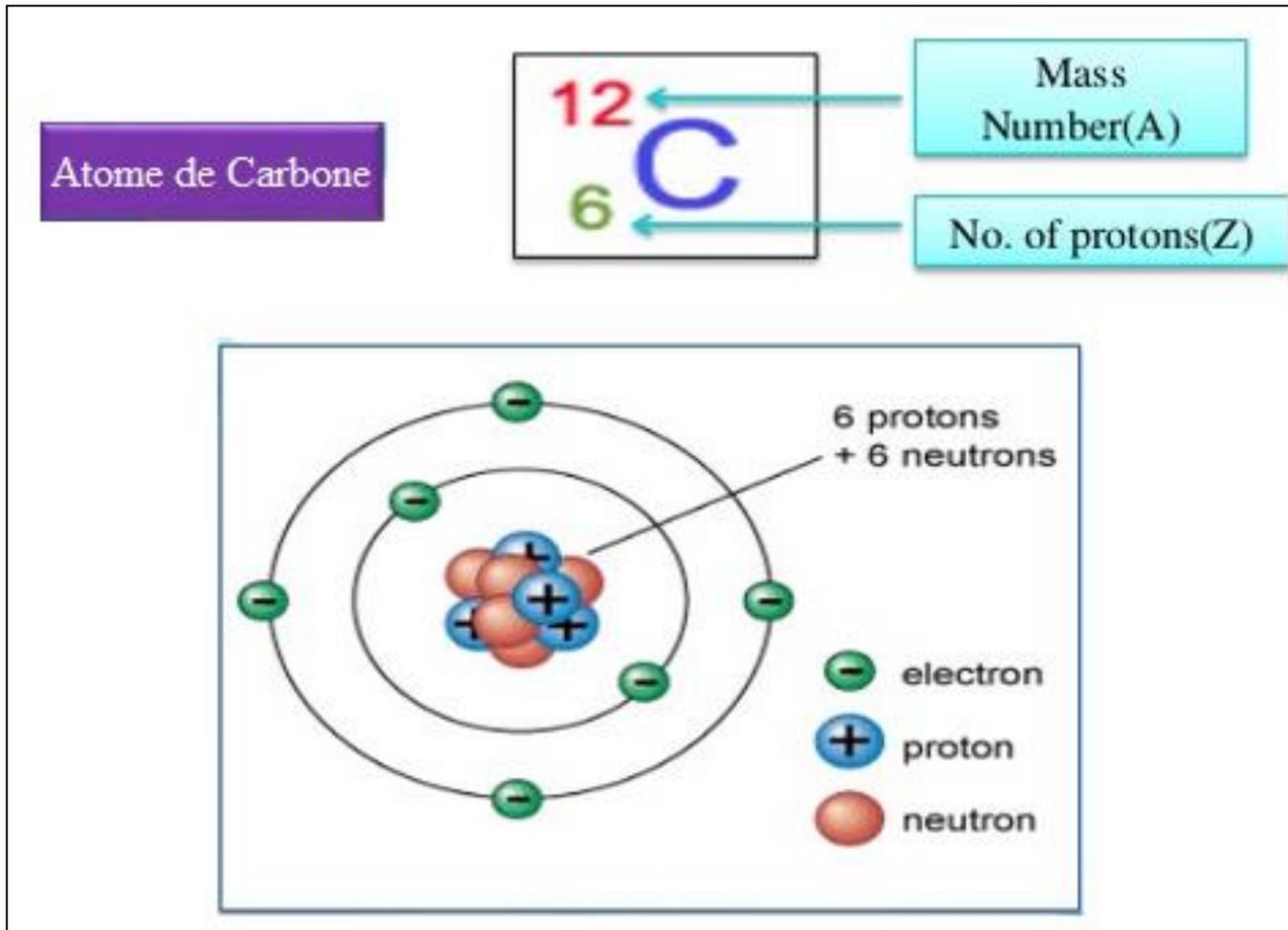
Elle permet :

- Détermination de la masse molaire
- Analyse structurale
- Explication des mécanismes de ruptures de liaisons...
- Analyse quantitative (limites de détection: nanogramme, picogramme)

Avantages de la technique: sensibilité, sélectivité et la rapidité

## 4- Spectrométrie de masse

le rapport masse/charge ( $m/z$ ). Exemple atome de carbone



## 4- Spectrométrie de masse

L'analyse des molécules par spectrométrie de masse est une succession des étapes auxquelles l'échantillon est soumis :

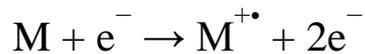
- *Volatiliser* : On passe de l'état de matière condensée à un état gazeux (Séparer les molécules les unes des autres).
- *Ionisation et fragmentation*: l'échantillon porté sous forme de gaz ou de vapeur est transformé en ions par bombardement électronique. La fragmentation de l'ion aura lieu lorsque son énergie interne est supérieure à l'énergie d'activation.
- *Accélération* : les ions sont *focalisés* et *accélérés* par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.
- *Séparation* : les ions sont séparés selon leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) par l'*analyseur*
- *Détection* : après séparation, les ions sont captés par un détecteur dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus.
- *Affichage du spectre de masse* issu du traitement du signal envoyé par le détecteur, et qui représente l'abondance des ions en fonction de leur rapport  $m/z$ .

## 4- Spectrométrie de masse

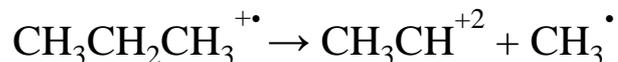
L'ionisation des molécules peut se faire par

- ❖ Par protonation:  $A-BH^+$
- ❖ Par déprotonation :  $A-B^- \bullet$
- ❖ Par perte d'électron:  $A-B^+$
- ❖ Par cationisation:  $A-B-Na^+$

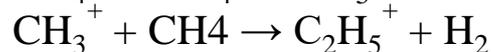
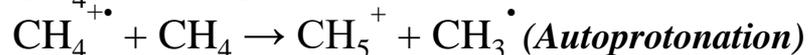
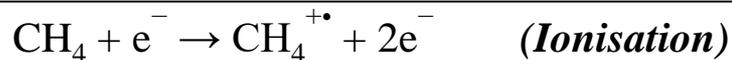
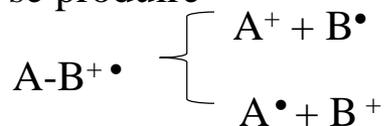
**(Ionisation)**



**Fragmentation**



La fragmentation: lorsque l'énergie interne des ions est suffisamment élevée d'autres fragmentation peuvent se produire

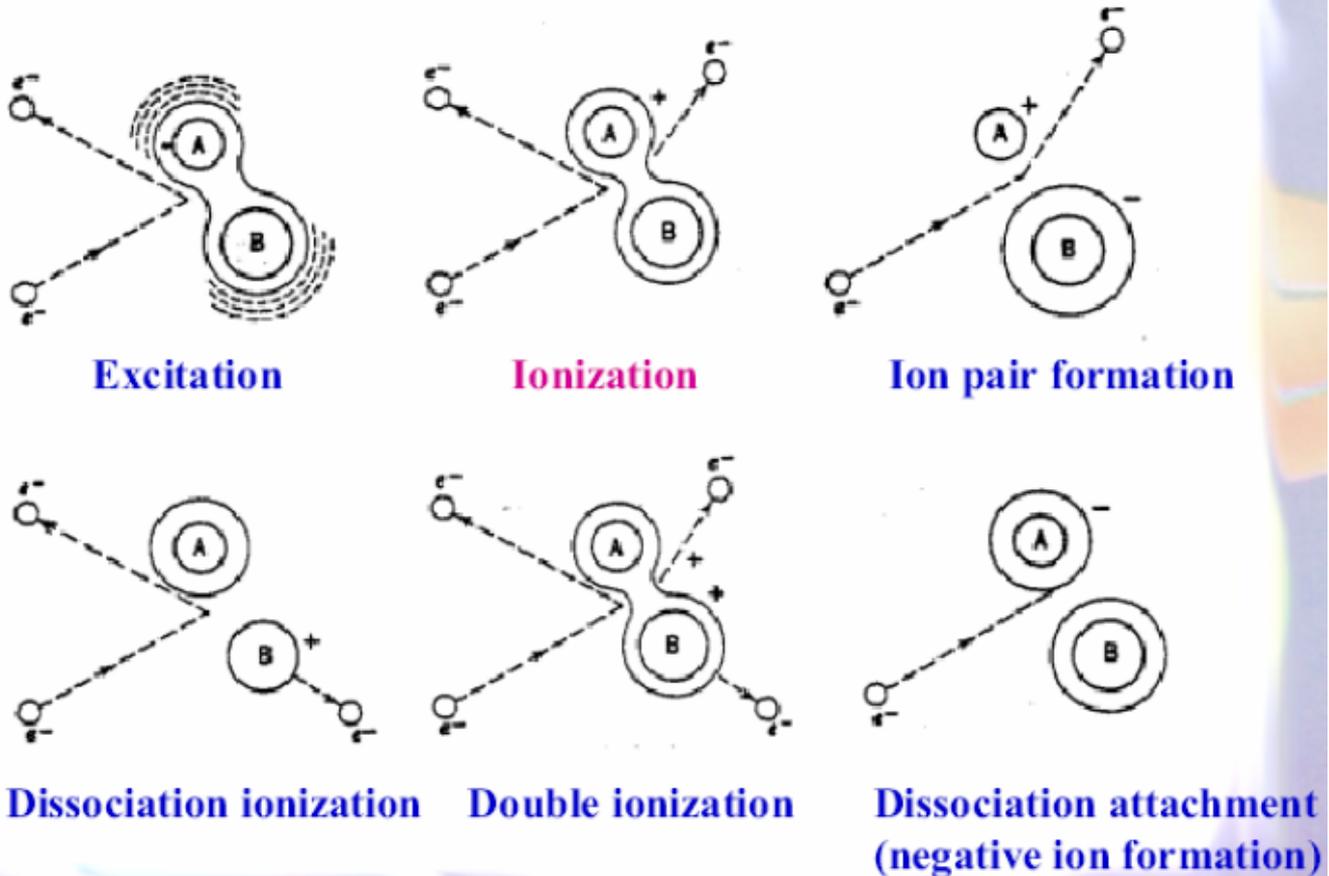


Certains facteurs favorisent la fragmentation:

- ❖ Rupture facile des liaisons faibles
- ❖ Les fragments stables se forment préférentiellement
- ❖ Les fragmentations avec réarrangement sont favorisées (réarrangements de McLafferty) est une transformation classique qui apparaît de façon très générale pour les ions moléculaires possédant un carbonyle  $C=O$  ou une double liaison  $C=C$

## 4- Spectrométrie de masse

**Ionisation par impact électronique:** L'ionisation de la molécule **M** conduit à un ion moléculaire positif. Tous les électrons étant appariés dans la molécule neutre, l'ion moléculaire formé noté **M<sup>+</sup>** comporte à la fois une charge positive et un électron célibataire  $M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2e^-$



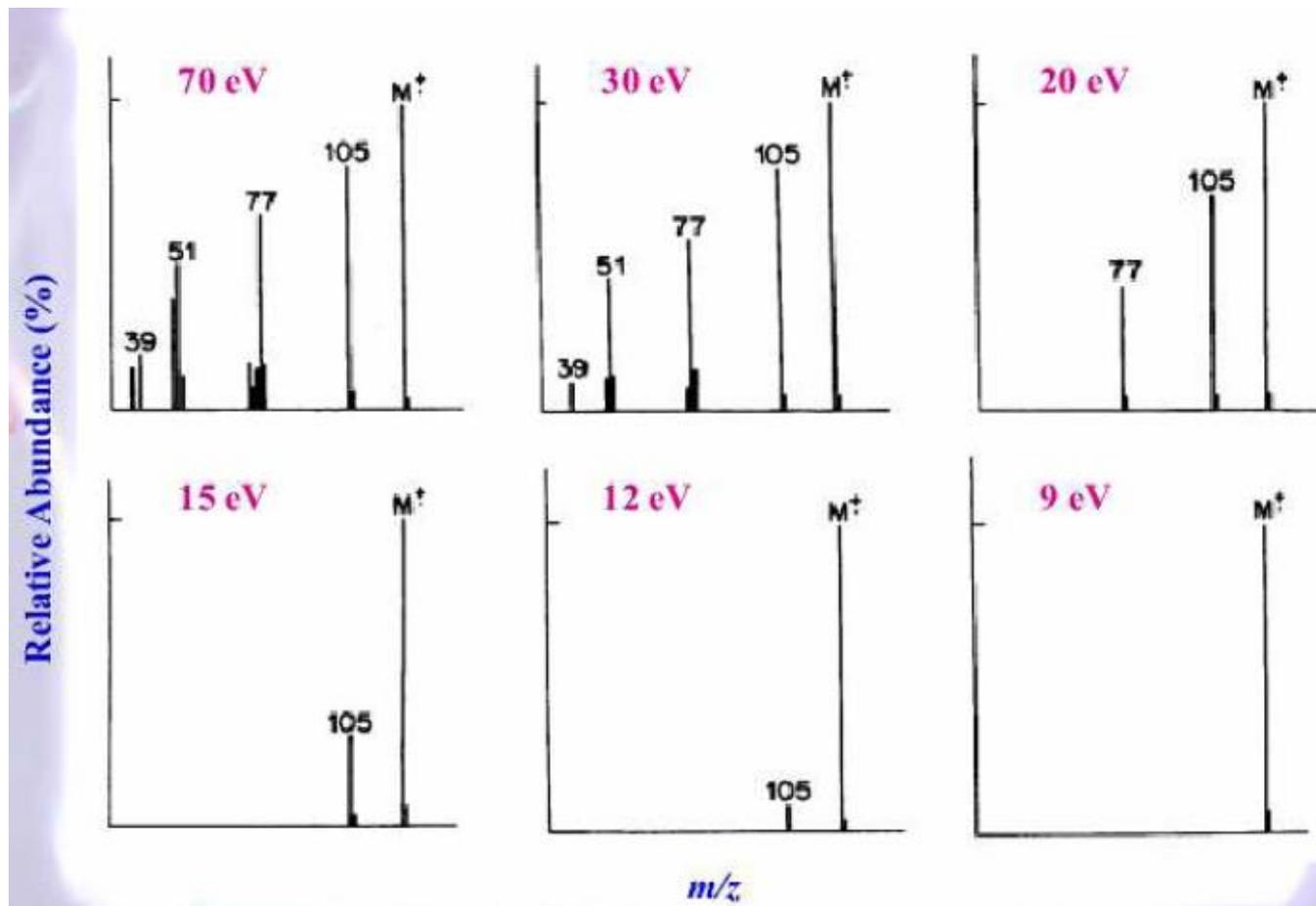


## 4- Spectrométrie de masse

- ❖ Un composé organique introduit dans la source de l'appareil le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique (6 eV - 70 eV).
- ❖ L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse moléculaire du composé.
- ❖ Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments. La quantité de fragments produit dépend de la « force » de l'ionisation
- ❖ Les ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électronique, puis collectés par un détecteur.
- ❖ L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse, représentant l'intensité des ions en fonction de leur rapport  $m/z$ , dont la lecture permet l'identification de la masse moléculaire, ainsi la structure moléculaire. Cette identification est possible par comparaison des données (provenant du spectre de masse) sur une base de données contenant une banque de spectre.

## 4- Spectrométrie de masse

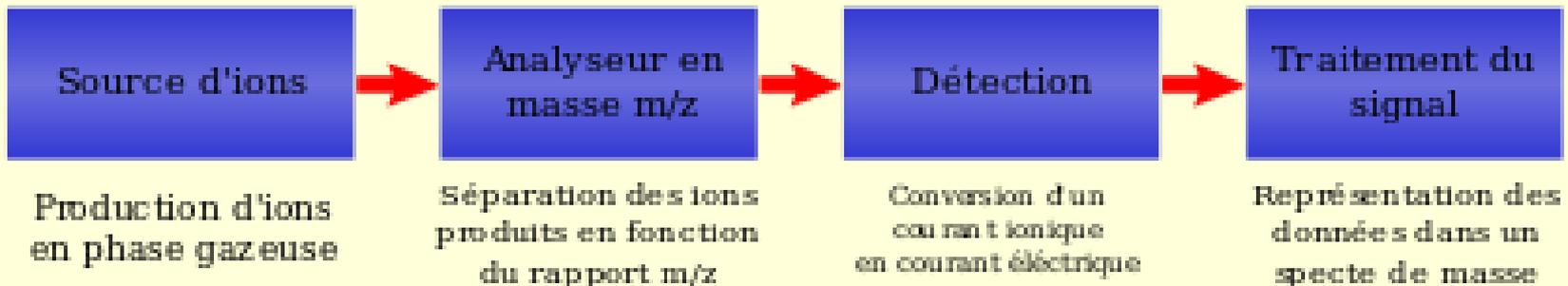
- ❖ Un composé organique introduit dans la source de l'appareil le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique (6 eV - 70 eV).



## 4- Spectrométrie de masse

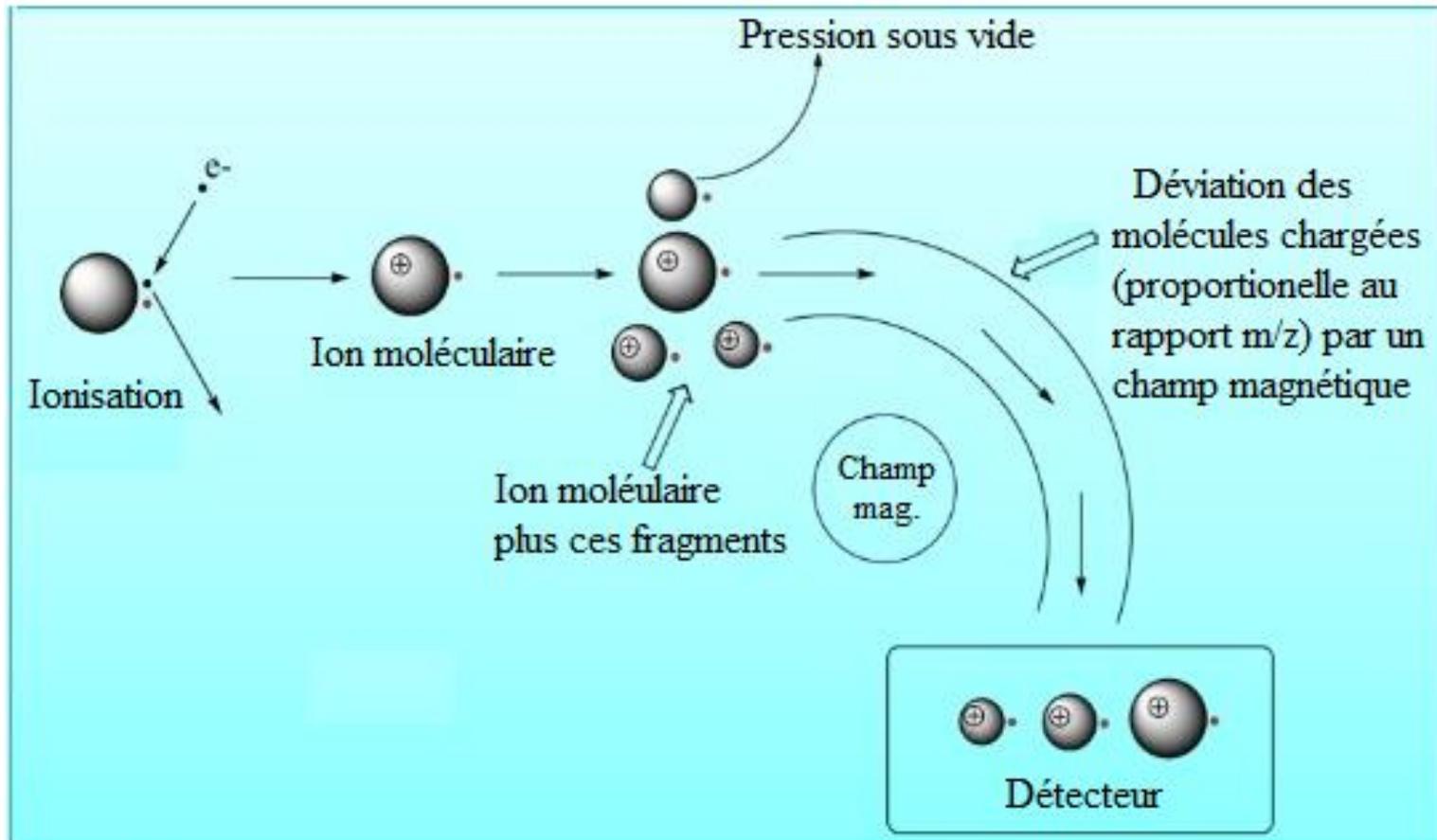
Le spectromètre de masse comprend :

- ❖ **Système d'introduction:** qui fait pénétrer l'échantillon dans le spectrophotomètre ( GC, LC...):
- ❖ **Source d'ionisation :** Dans la quelle les molécules sont ionisées. Il existe plusieurs méthodes d'ionisation. La plus importante est l'impact électronique
- ❖ **Analyseur :** permet la séparation des ions suivant leur rapport masse/charge en application d'un champ magnétique. Le plus grand seront le moins déviés.
- ❖ **Détecteur:** après séparation les ions sortant de l'analyseur sont captés par le détecteurs qui les exprime en fonction de leur abondance relative
- ❖ **Système de traitement de donnée:** système informatique qui permet de transformer les données reçus par le détecteur en spectre de masse.



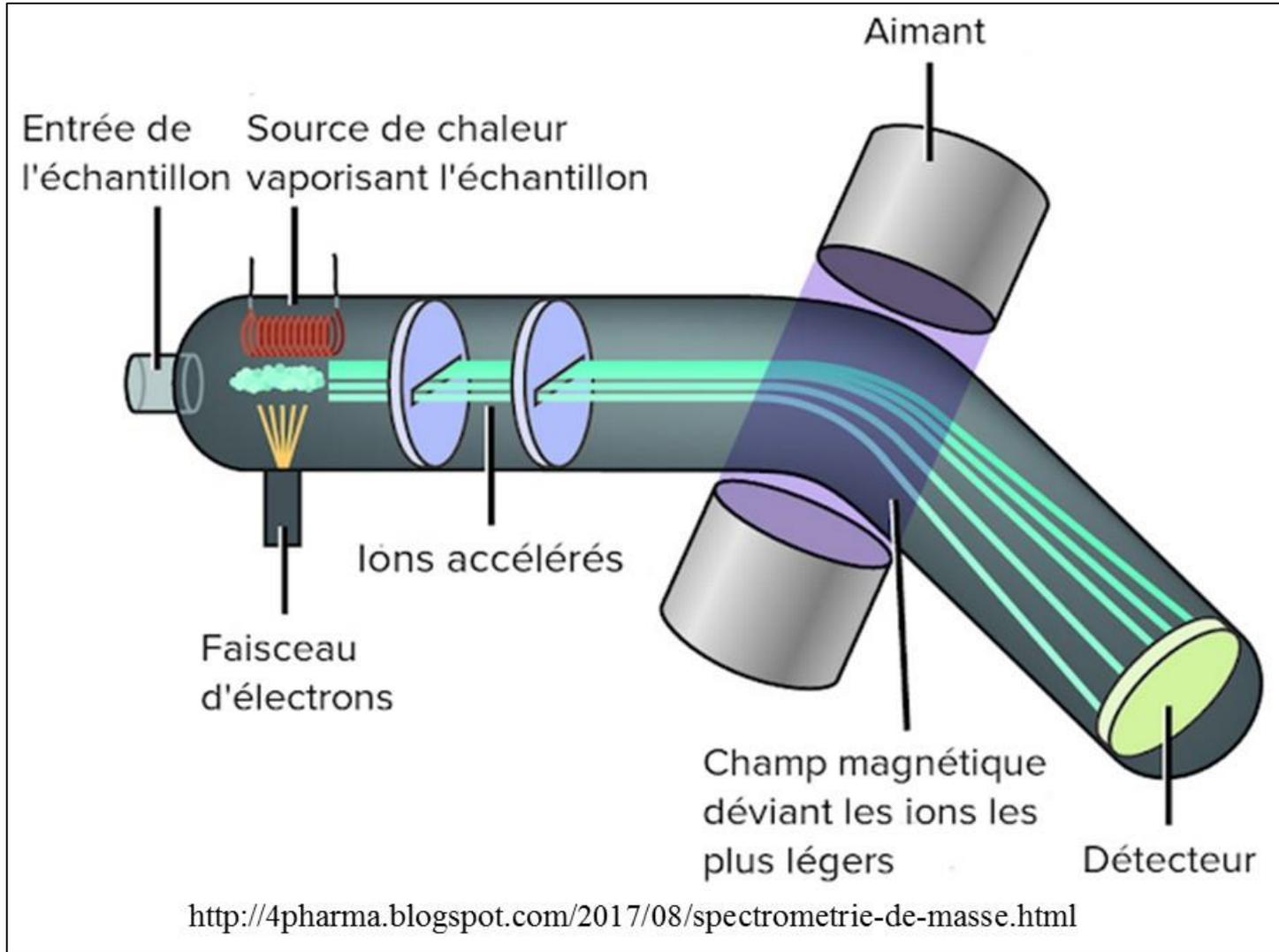
## 4- Spectrométrie de masse

Principe de base de la spectrométrie de masse: après ionisation des molécules, ces ions sont soumis, sous un très bon vide, à l'action d'un champ magnétique. Les forces exercées sur ces ions permettent leurs déviation en fonction de leurs rapport  $m/z$ . Le plus grand seront le moins déviés et détectés en dernier par le détecteur



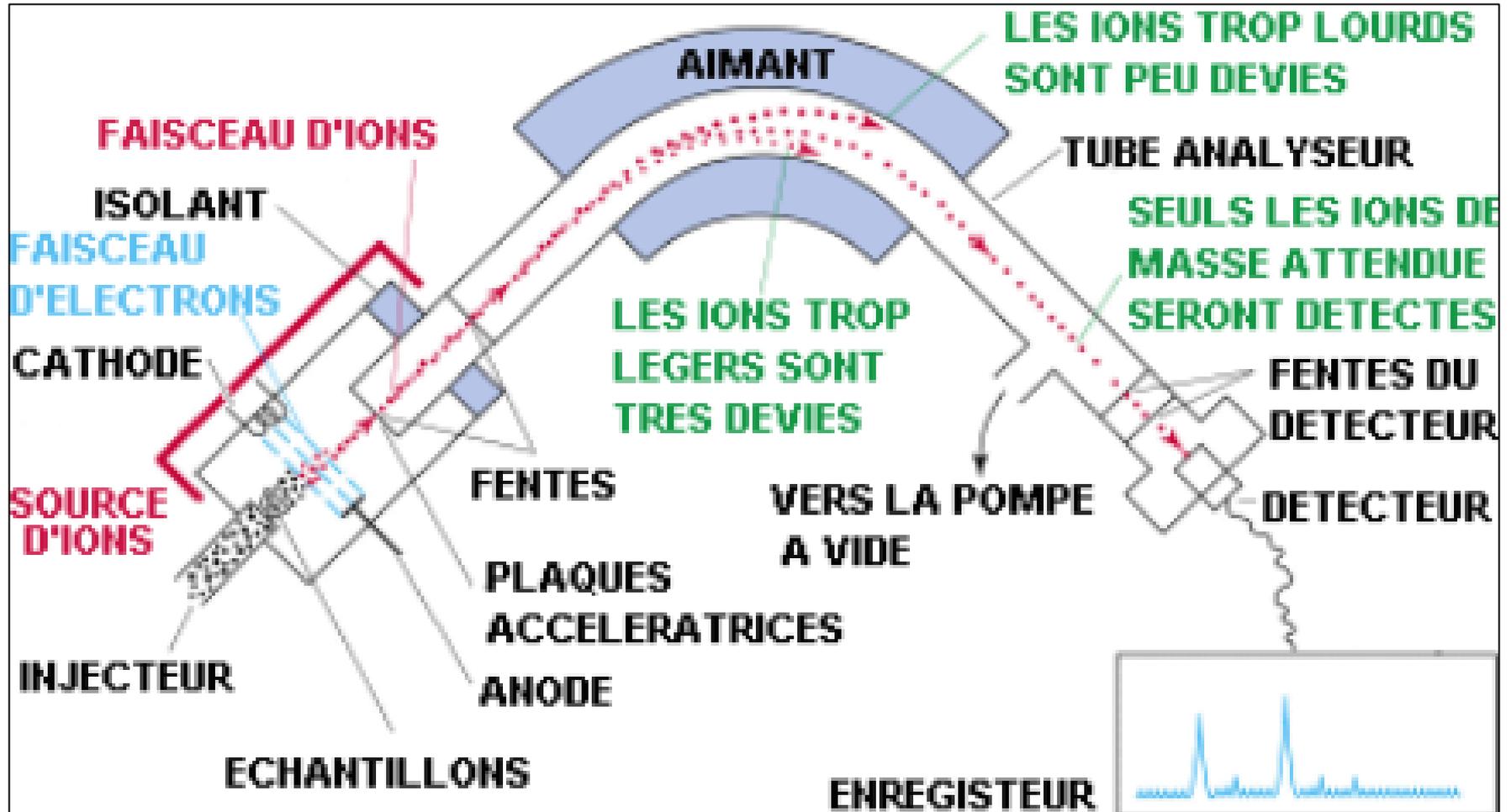
## 4- Spectrométrie de masse

### Schéma général du spectromètre de masse



## 4- Spectrométrie de masse

### Schéma général du spectromètre de masse

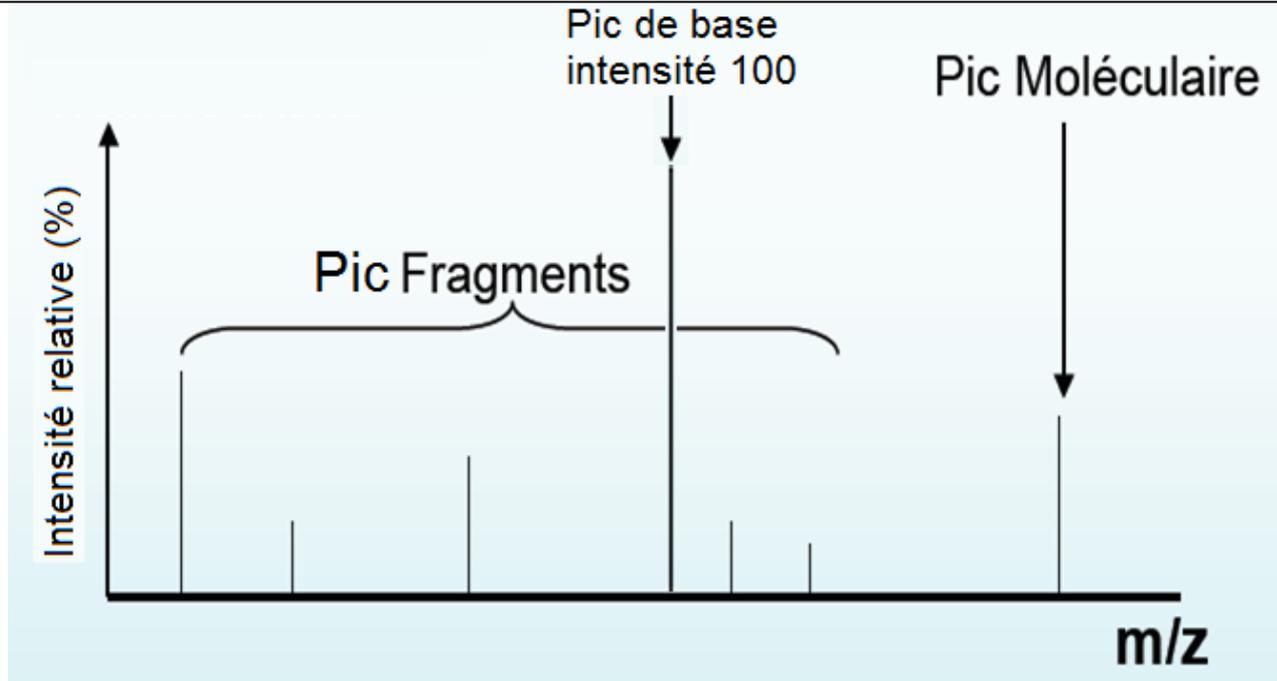


## 4- Spectrométrie de masse

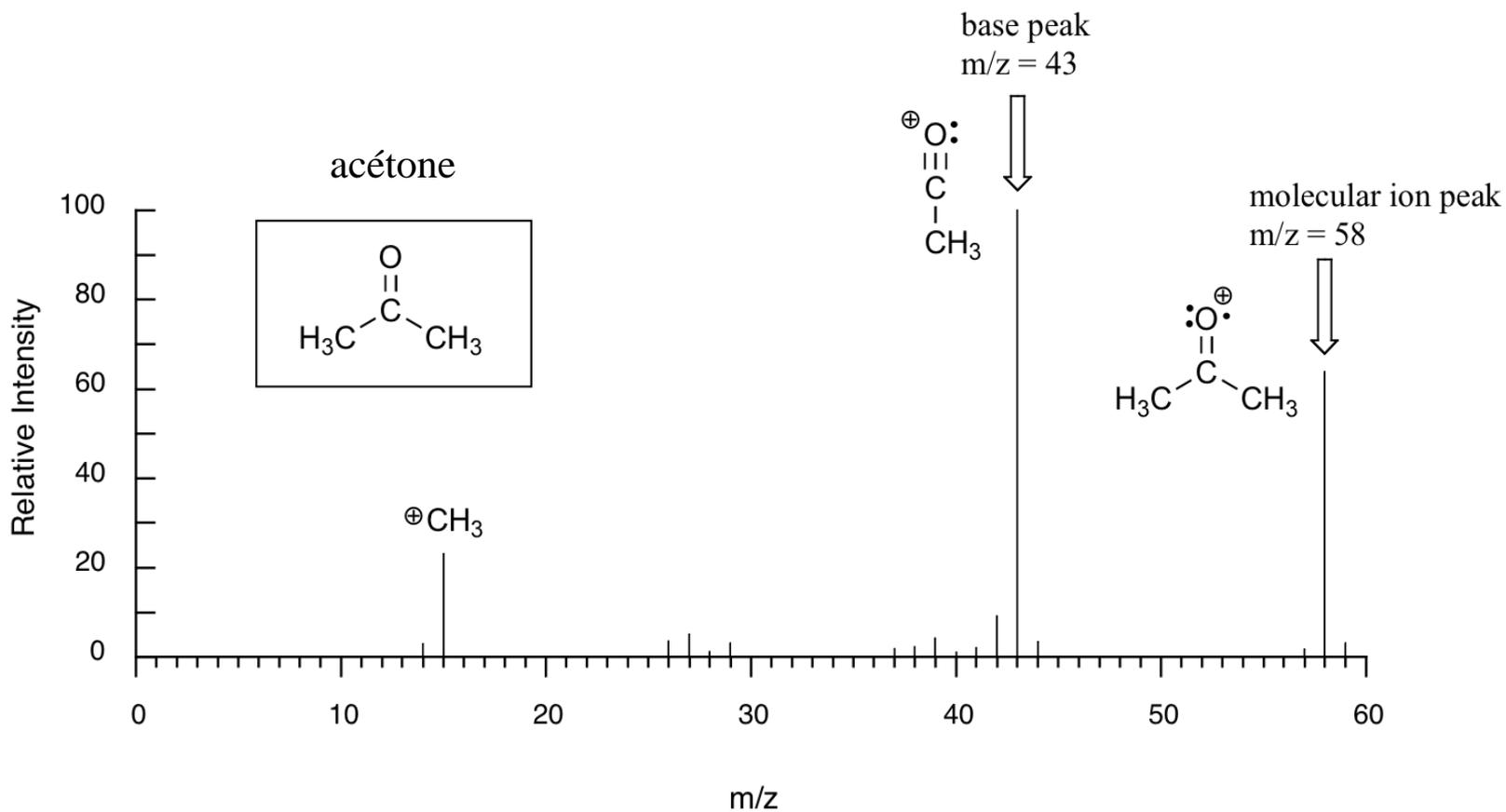
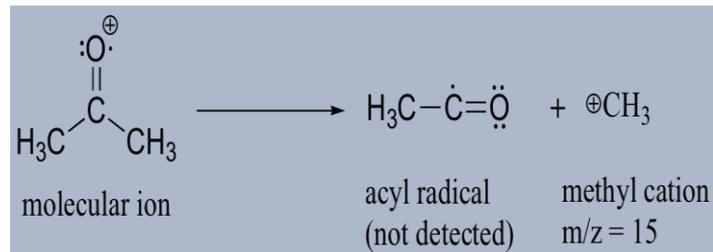
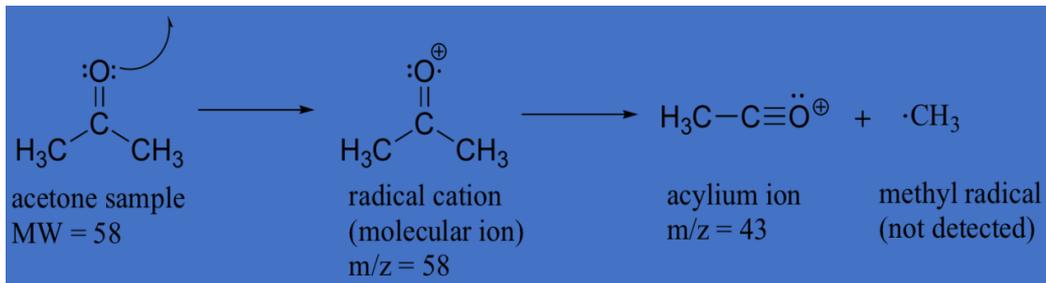
**Le spectre de masse** est un diagramme avec, en abscisse, le rapport  $m/z$  (exprimé en Dalton) et en ordonnée, l'intensité correspondant à l'abondance relative des ions.

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

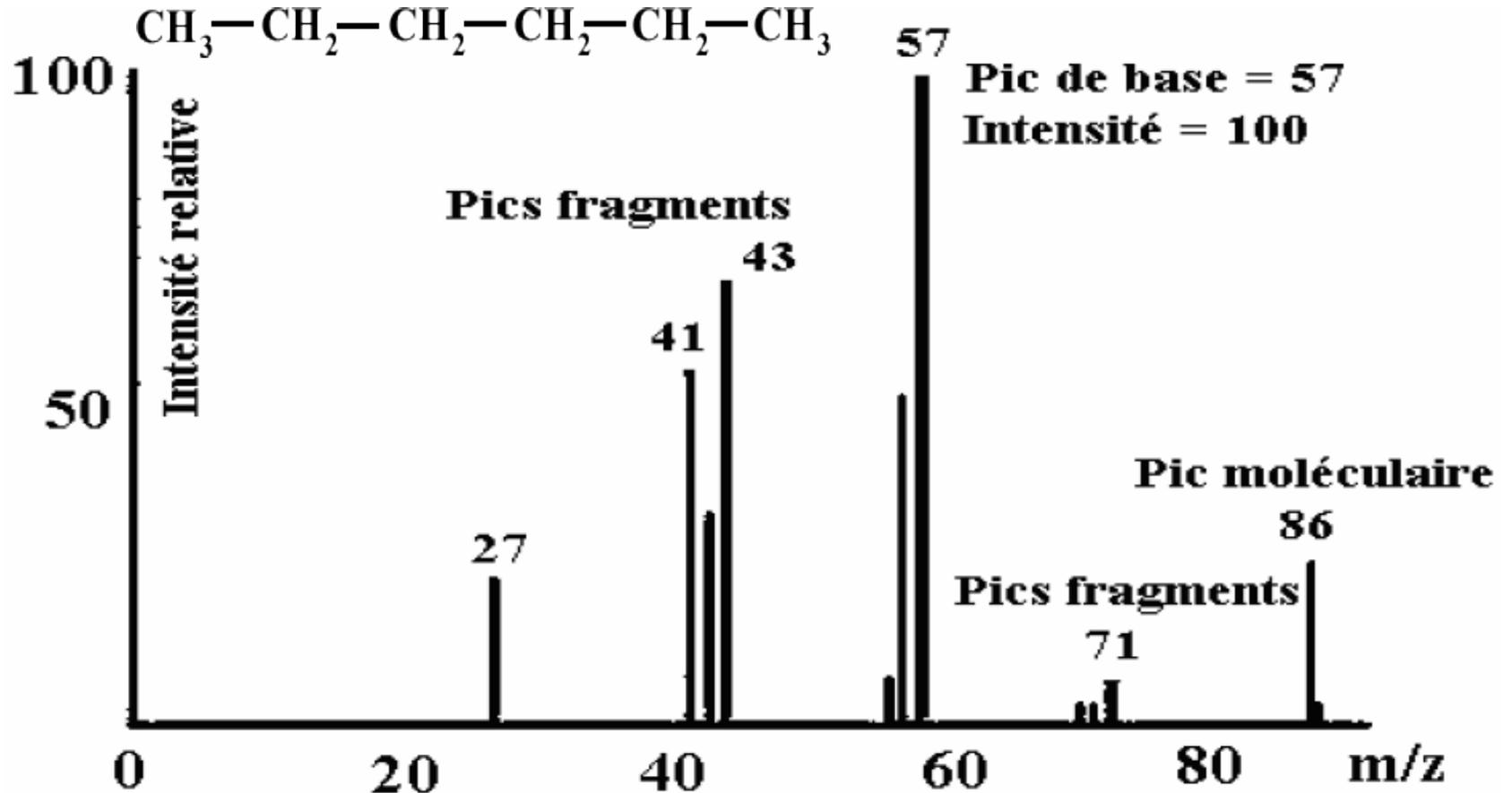
- ❖ **Le pic de base:** C'est le pic le plus intense du spectre. Il correspond à l'ion le plus abondant.
- ❖ **Le pic moléculaire ou pic parent:** Il correspond à l'ion de nombre de masse égal à la masse moléculaire de la substance.
- ❖ **Les pics fragments:** il correspond aux différents ions fragments



## 4- Spectrométrie de masse

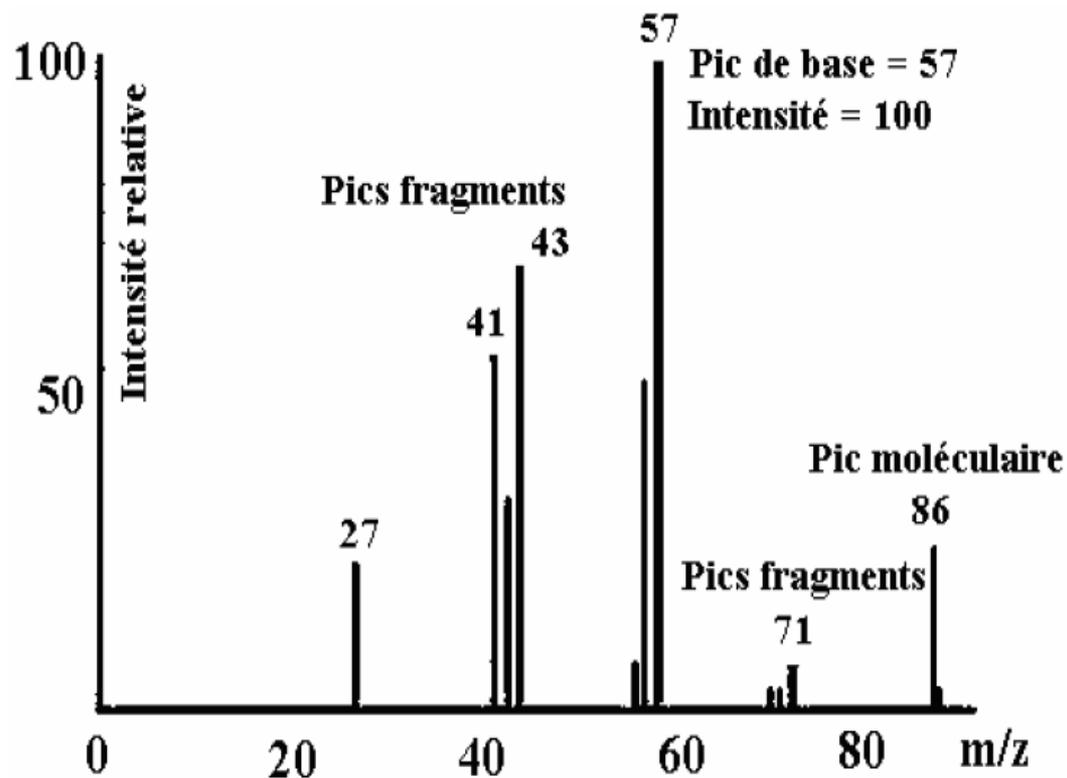
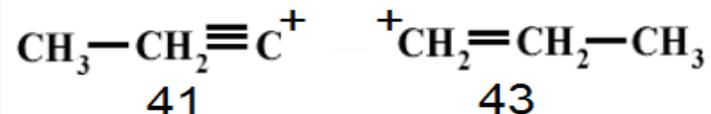
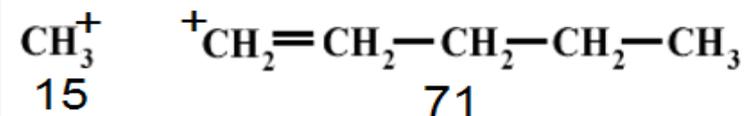
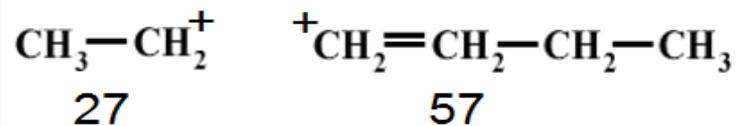


## 4- Spectrométrie de masse



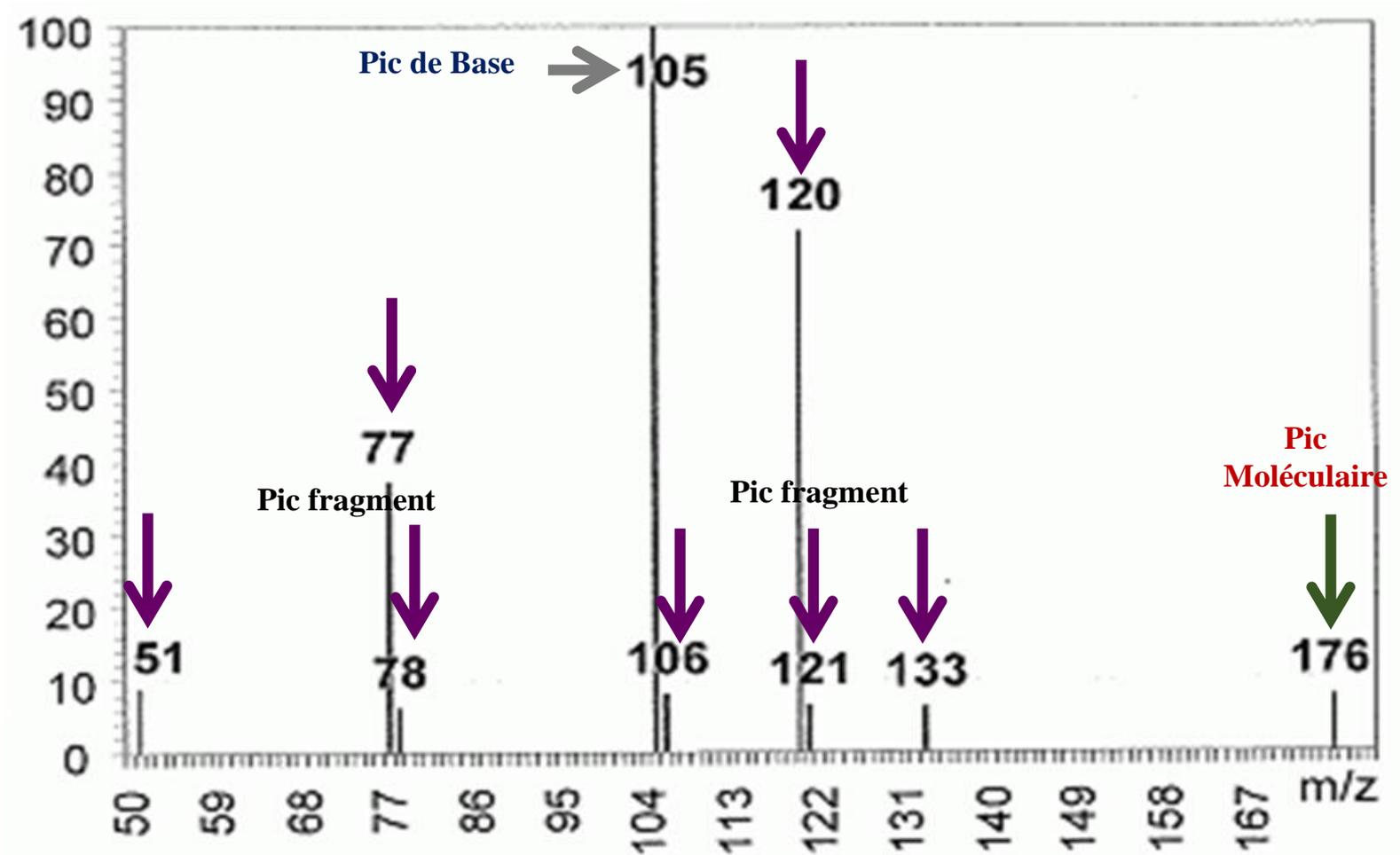
Spectre de masse de l'hexane  $C_6H_{14}$  ( $M=86$ )

## 4- Spectrométrie de masse



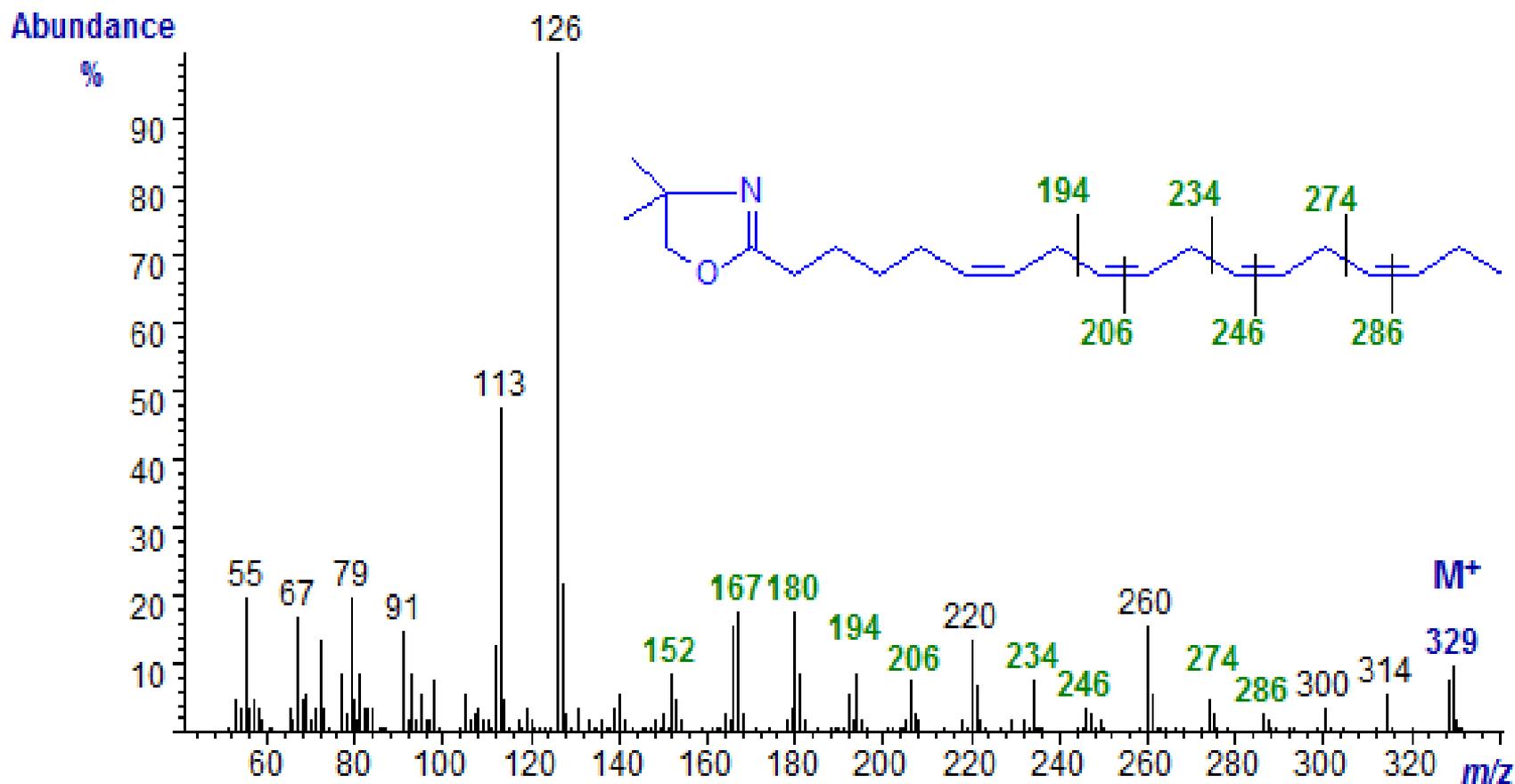
## 4- Spectrométrie de masse

L'analyse d'un composé aromatique sur un appareil à spectrométrie de masse à a donné le spectre de fragmentation suivant



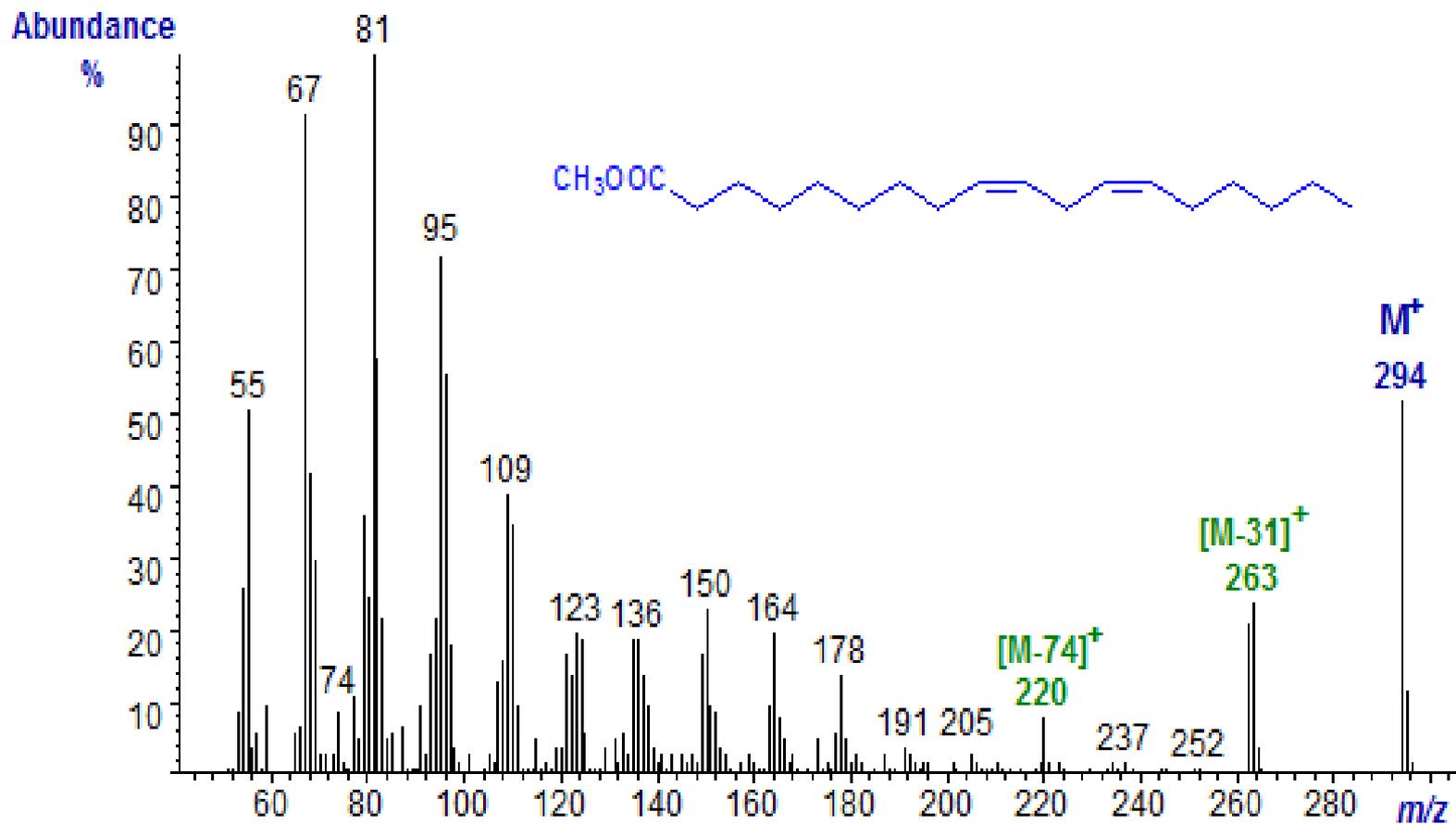
## 4- Spectrométrie de masse

L'analyse d'un composé aromatique sur un appareil à spectrométrie de masse à a donné le spectre de fragmentation suivant



## 4- Spectrométrie de masse

L'analyse d'un composé aromatique sur un appareil à spectrométrie de masse à a donné le spectre de fragmentation suivant



## 4- Spectrométrie de masse

Les domaines d'application de la spectrométrie de masse sont divers:

Dans le domaine médical:

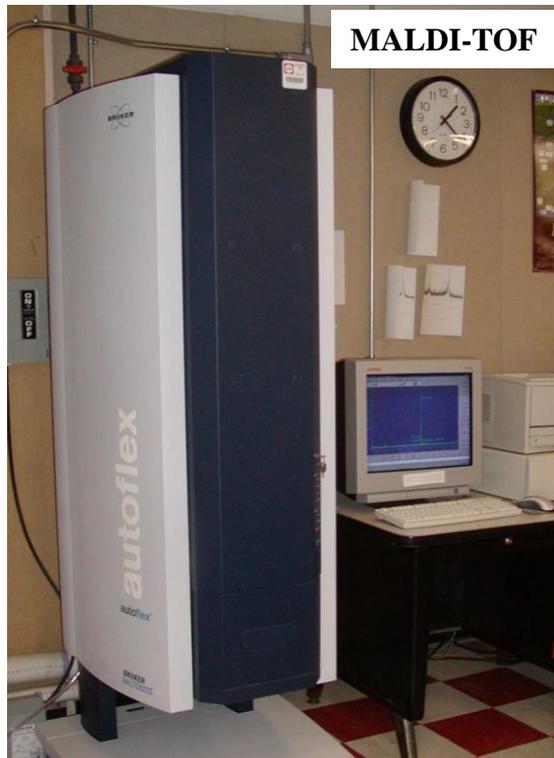
- ❖ La recherche biomédicale : recherche de biomarqueurs et identification de protéines
- ❖ la toxicologie : Dosage des drogues et alcool, les intoxications médicamenteuses
- ❖ La chimie clinique et analytique
- ❖ La Médecine Légale : Identification des drogues et toxiques
- ❖ La Pharmacie: Pureté des produits pharmaceutiques et étude de leurs métabolites

Le domaine non médical:

- ❖ L'analyse éco-toxicologique
- ❖ L'agroalimentaire
- ❖ Le cosmétique
- ❖ L'alimentation

## 4- Spectrométrie de masse

Les spectromètres de masse utilisés dans les laboratoires ont des combinaisons diverses entre un ionisateur et un analyseur de masse. Les plus connus sont les ESI-MS, ESI-MS/MS, MALDI-TOF/TOF, ESI-Q/Trap et Orbitrap. Ils sont choisis en fonction de leurs performances et de leur coût d'installation. Pour améliorer les performances d'un MS ou MS/MS, le spectromètre de masse est souvent couplé avec une méthode de séparation telle que la chromatographie gazeuse (GC) ou liquide (LC) pour une meilleure séparation des composés avant la MS.



<http://fr.slideshare.net/chemiub08/mass-spectrometry-6303274>