

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

FR 890 1338

CENTRE D'ETUDES NUCLEAIRES DE SACLAY

CEA-CONF - -9415

Service de Documentation

F91191 GIF SUR YVETTE CEDEX

NI

FOREST E.-

CEA Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, 38 (FR). IRDI

UTILISATION DE DIFFERENTS MODES D'IONISATION DANS L'ETUDE DE  
MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE

**Communication présentée à :** Workshop on mass spectrometry

Marcoule (FR)  
22-23 Oct 1987

**UTILISATION DE DIFFERENTS MODES D'IONISATION DANS L'ETUDE  
DE MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE.**

**E. FOREST**

**Journées CETAMA "Spectrométrie de masse" - 22-23 octobre 1987**

**RESUME**

Depuis dix ans, nous avons pu assister à une avance révolutionnaire en spectrométrie de masse appliquée aux molécules d'intérêt biologique. Cette avance s'est effectuée principalement au niveau de l'ionisation avec l'apparition de nombreux nouveaux modes permettant l'analyse d'échantillons non volatils, polaires ou thermiquement instables. La difficulté réside dans la désorption d'ions moléculaires dont l'énergie interne soit suffisamment faible pour que leurs durées de vie soient au moins de quelques  $\mu$ s. Ces sources d'ionisation douce mettent en jeu soit le bombardement de particules : atomes, ions ou fragments de fission, soit un chauffage rapide de l'échantillon, soit un champ électrique intense ou un faisceau laser.

Quelques exemples de spectres obtenus sur des molécules de masse assez élevée telles que : vitamine, fragment de protéine, porphyrine (chlorophylle ou site actif de l'hémoglobine), polysaccharide, seront présentés en utilisant quelques uns de ces nouveaux modes.

Il n'existe pas une technique d'ionisation universelle permettant l'analyse de toutes les molécules organiques, mais la variété de celles qui existent permet de répondre quasiment à tous les problèmes.

---

TILISATION DE DIFFERENTS MODES D'IONISATION DANS L'ANALYSE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE DES MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE

E. FOREST

CEA - IRDI - DERDCA - DCAEA - SEA - S.R.C.A.

INTRODUCTION

Dans cet exposé concernant la spectrométrie de masse (SM) organique (plus précisément appliquée aux molécules d'intérêt biologique), je me limiterai à l'utilisation pour l'identification ou la vérification de synthèse de produits relativement purs obtenus après le passage par différentes techniques chromato. ou d'extraction.

Dans ce cadre là, la SM est le complément indispensable des autres techniques d'analyse telles que l'analyse élémentaire, les absorptions UV et IR, la RMN ou les RX, les applications se situant en chimie, biochimie ou médecine. Nous sommes ainsi confrontés à une grande variété de problèmes

avec des échantillons plus ou moins volatils, solubles, polaires, thermiquement instables, de masse moléculaire élevée.

Depuis 10 ans, nous avons assisté à une évolution très importante de la SM organique avec, en particulier, l'apparition de nombreuses nouvelles sources d'ionisation. En effet, dans cette SM, le point important se situe au niveau de l'ionisation.

Le but d'une source d'ionisation est de transformer un échantillon (quantité  $\mu\text{g}$  à  $\text{ng}$ ), sous forme solide, liquide ou de poudre, en ions : d'une part en ion moléculaire (ou quasi-moléculaire), ce qui donne la masse moléculaire ; d'autre part en ions fragments, ce qui donne la masse des fragments et donc une information structurale.

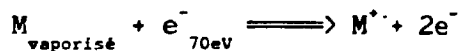
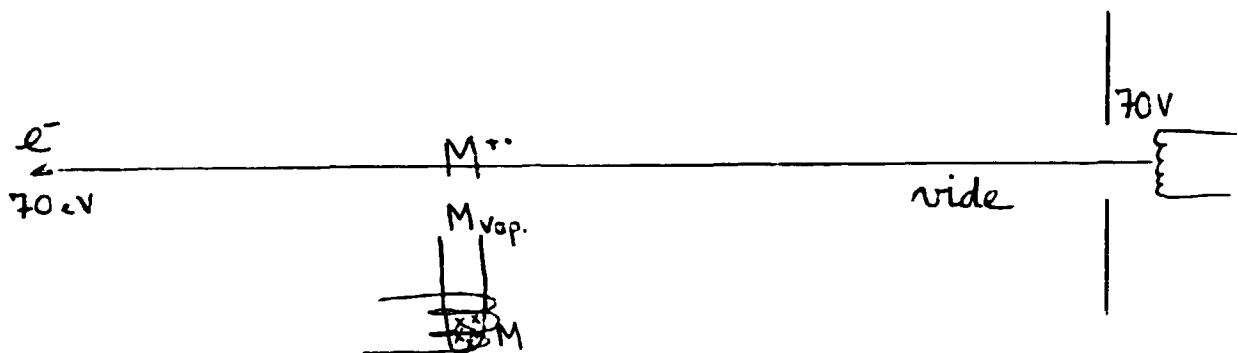
Pour cela, on arrache ou on colle à la molécule ou à ses fragments, un électron, un proton, un anion ou un cation, et on observe les spectres des ions positifs ou les spectres des ions négatifs. Avec quels moyens ? Soit avec des particules accélérées : électrons, ions, atomes, fragments de fission, soit avec un chauffage rapide ou un champ électrique intense ou un laser.

Passons maintenant en revue ces différentes sources d'ionisation.

## I - IONISATION ELECTRONIQUE

EI : "Electron ionization"

### I-1 Principe



L'échantillon, déposé dans un creuset, est vaporisé en le chauffant par effet Joule. Sa vapeur est traversée par un faisceau d'électrons d'énergie 70 eV, un électron en arrachant un autre à la molécule pour l'ioniser.

### I-2 Caractéristiques

- 1<sup>ère</sup> source utilisée pour la SM (début du siècle)
- vendue en série sur tous les appareils
- utilisable avec le couplage chromato.gaz
- utilisable uniquement pour les produits volatils et peu fragiles
- en effet, cette source fournit beaucoup d'énergie interne aux ions, ce qui entraîne une fragmentation importante (avec parfois disparition de l'information moléculaire).

### I-3 Exemple d'application

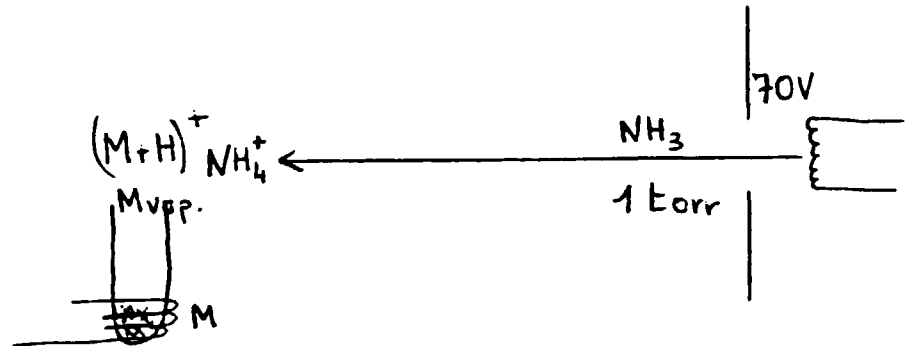
Sur la figure 1 est présenté le spectre de masse d'un produit simple et volatil. On observe ainsi le pic de l'ion moléculaire  $M^{+}$  (338) ainsi que les pics des différents fragments correspondant à la perte successive des acétates (296, 254, 194, 152, 134, 43).

## II IONISATION CHIMIQUE

CI : "Chemical Ionization"

Cette source a été mise au point pour l'analyse de produits volatils fragiles.

## II-1 Principe



Dans cette source, l'échantillon est également déposé dans un creuset et vaporisé par effet Joule. Cependant, les électrons de 70 eV ne réagissent pas directement sur les molécules mais sur un gaz réactant à la pression de 1 torr ( $\text{NH}_3$ ,  $\text{iC}_2\text{H}_5$ ,  $\text{CH}_4$ ...). Ceci produit, dans le cas de l'ammoniac des ions  $\text{NH}_4^+$  qui réagissent avec les molécules vaporisées pour former des ions  $(\text{M}+\text{H})^+$  dont l'énergie interne est relativement faible.

Cette source est également vendue en série sur tous les appareils et utilisable en couplage avec un chromatogaz.

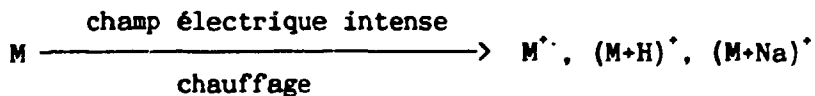
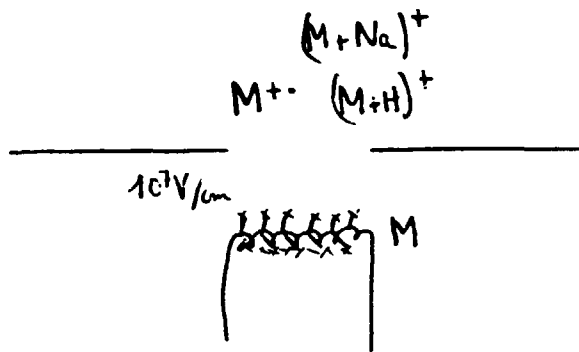
## II-2 Exemple d'Application

La figure 2 montre les spectres obtenus en EI et CI pour le tributylphosphate TBP (solvant utilisé pour le retraitement des combustibles nucléaires). En EI, on observe l'absence d'ion moléculaire (266) et la présence de nombreux fragments, alors qu'en CI l'ion moléculaire protoné est très intense par rapport à des fragments de très faible intensité.

Cependant, ces deux sources ne sont utilisables que pour des produits volatils puisqu'elles nécessitent leur vaporisation. Les échantillons non volatils y sont pyrolysés. C'est pourquoi, les spectrométristes de masse ont imaginé d'autres sources permettant d'analyser ces produits.

**II - DESORPTION DE CHAMP**

F D : "Field Desorption"

**III-1 Principe et caractéristiques**

L'échantillon est déposé (avec l'aide d'un solvant volatil intermédiaire) sur un filament recouvert de fines aiguilles de carbone. Ce filament est légèrement chauffé et soumis à un champ électrique intense, l'ensemble permettant la désorption d'ions  $M^+$ ,  $(M+H)^+$  ou  $(M+Na)^+$  avec très peu de fragmentation, même pour des produits fragiles et non volatils. Le gros inconvénient de cette source réside dans la difficulté de manipulation du filament ainsi que de sa préparation avec les aiguilles de carbone. De ce fait elle est beaucoup moins utilisée à l'heure actuelle.

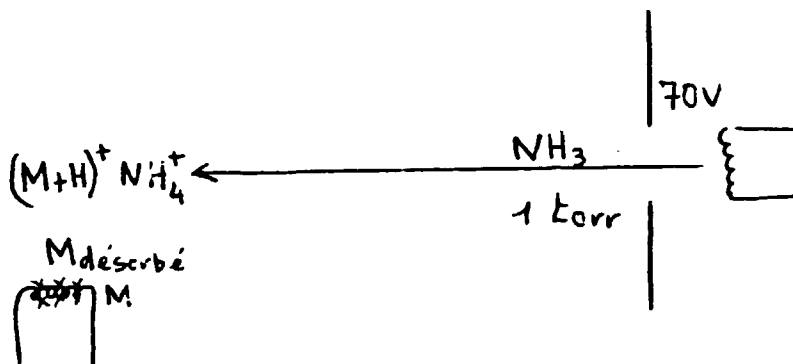
**III-2 Exemple d'application**

La figure 3 montre les spectres obtenus en EI et FD pour la vitamine C (acide ascorbique) avec peu de fragments et un ion moléculaire (176) intense en FD, alors qu'il est presque inexistant en EI.

## IV - DESORPTION IONISATION CHIMIQUE

D C I : "Desorption Chemical Ionization"

### IV-1 Principe



Comme en CI, on utilise un gaz réactant à la pression de 1 torr formant avec les électrons de 70 eV, des ions  $NH_4^+$ . Mais, cette fois-ci, l'échantillon est déposé sur un filament chauffé très rapidement de façon à obtenir une désorption des molécules plus rapide que leur pyrolyse. Ces molécules désorbées réagissent avec les ions du gaz réactant pour former des ions  $(M+H)^+$ , parfois  $(M+NH_4)^+$ , avec relativement peu de fragmentation. Cette source est commercialisée de façon courante.

### IV - 2 Exemple d'application

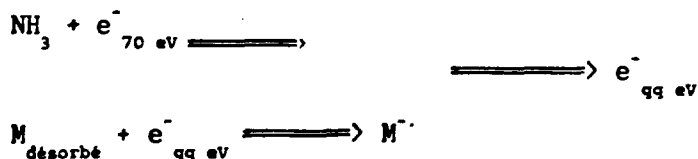
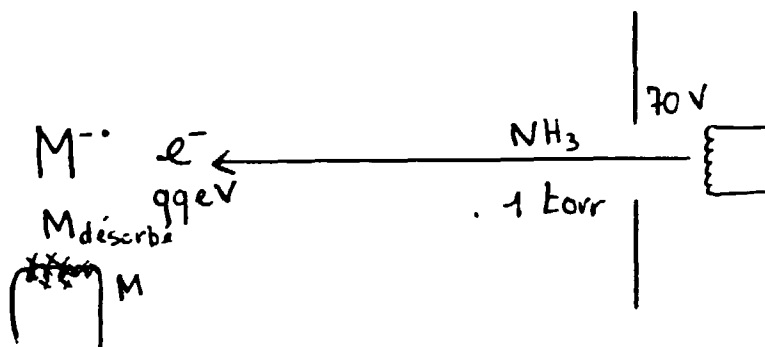
Toujours en comparant avec l'EI, le spectre obtenu en DCI pour la guanosine est présenté sur la figure 4. La guanosine est un nucléoside (formé d'une base nucléique et d'un sucre). C'est un fragment de l'ADN, macromolécule en forme de double hélice composée de nucléosides liés entre eux par des phosphates.

En EI il n'y a pas d'ion moléculaire, alors qu'en DCI on peut observer des pics correspondants à la molécule entière, ainsi qu'à la base et au sucre, les deux constituants de la molécule.

## V - DESORPTION CAPTURE ELECTRONIQUE

D C E

### V-1 Principe



Il s'agit d'une variante de la DCI. Comme précédemment, l'échantillon, déposé sur un filament, est désorbé par chauffage très rapide. Mais, cette fois-ci, on observe les ions négatifs. En négatif, l'ammoniac n'a plus un rôle de gaz réactant mais simplement de gaz freineur, ce qui permet d'obtenir des électrons de faible énergie (quelques eV). On a ainsi une capture de ces électrons de faible énergie par les molécules désorbées en donnant des ions  $\text{M}^-$  de très faible énergie interne et donc avec très peu de fragmentation.

Cette technique est donc particulièrement intéressante pour les composés fragiles. Elle l'est aussi pour ceux qui sont facilement réductibles comme les complexes de coordination dont le métal possède un degré d'oxydation inférieur stable. En captant un électron, la molécule facilement réductible donne un anion stable.



## V-2 Exemple d'application

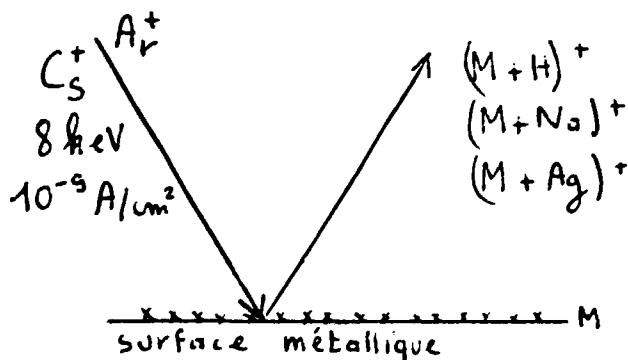
La figure 5 montre la structure d'une porphyrine de titane dihalogénée :  $TiCl_2(tpp)$  ( $tpp$  = tétraphénylporphyrine). Les porphyrines sont

des complexes de coordination que l'on rencontre très fréquemment dans la nature. En effet, les chlorophylles sont des porphyrines de magnésium et le site actif de l'hémoglobine est une porphyrine de fer.  $TiCl_2(tpp)$  possède des liaisons  $Ti-Cl$  très fragiles et donne très facilement par hydrolyse  $TiO(tpp)$ . Malgré cela, nous avons réussi à obtenir un ion moléculaire en DCE, alors que celui-ci est absent en EI (figure 6). On observe également sur ces spectres la perte d'un  $Cl$  ainsi que la formation de  $TiO(tpp)$ . Mais, alors qu'en EI on observe de nombreux autres fragments correspondant à des pertes de phényle et à des ions doublement chargés, en DCE il n'y a aucun fragment aux masses inférieures à celles de  $TiO(tpp)$ . Nous avons ainsi la preuve que cette source est particulièrement douce vis-à-vis des produits fragiles.

## VI - SONDE IONIQUE

S I M S : "Secondary Ion Mass Spectrometry"

### VI-1 Principe



L'échantillon est déposé sur une surface métallique plane (par exemple en argent) et bombardé par des ions accélérés (par exemple  $Ar^+$  ou  $Cs^+$  de 8 keV). Des ions sont ainsi éjectés sous forme  $(M+H)^+$  ou  $(M+Na)^+$  ou  $(M+Ag)^+$  (si l'argent est le support).

Cette source n'est commercialisée en chimie organique qu'avec les spectromètres de masse à transformée de Fourier.

## VI-2 Exemple d'application

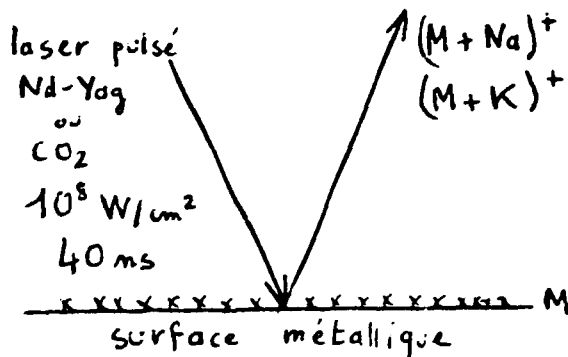
La figure 7 montre les spectres obtenus en SIMS avec la cyclosporine A. Ce peptide (ensemble cyclique d'acides aminés) est un immunodépresseur couramment utilisé pour les greffes de rein ou de coeur.

On observe d'une part des pics correspondant à la molécule  $(M+H)^+$ ,  $(M+Na)^+$  et  $(M+Ag)^+$ , d'autre part des pics aux masses inférieures correspondant à des fragments pouvant donner une information structurale.

## VII - DESORPTION LASER

L D : "Laser Desorption"

### VII-1 Principe



L'échantillon est également déposé sur une surface métallique plane. Cette fois-ci, il est irradié par un faisceau laser pulsé (Nd-Yag ou CO<sub>2</sub>) tirant dans l'infrarouge. Des ions sont ainsi désorbés sous forme  $(M+Na)^+$  ou  $(M+K)^+$  (si l'on a dopé l'échantillon avec KBr).

Cette source n'est commercialisée en organique qu'avec les spectromètres de masse à transformée de Fourier.

### VII-2 Exemple d'application

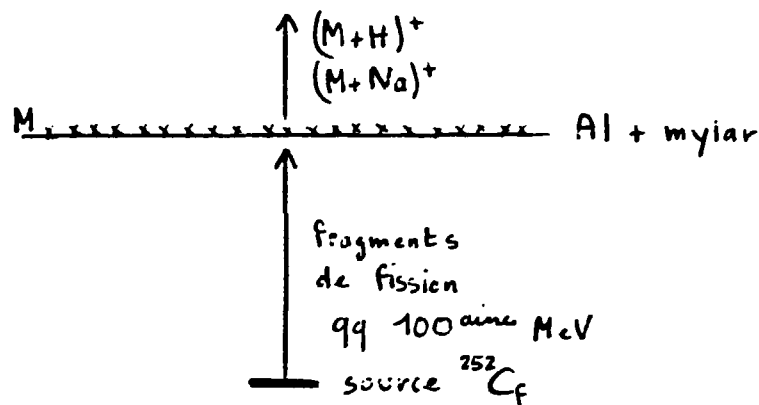
La gramicidine D est un peptide utilisé comme antibiotique. Son

spectre obtenu en LD est présenté sur la figure 8. On observe un ion quasimoléculaire  $(M+K)^+$  très intense ainsi que de nombreux fragments identifiés qui permettent de vérifier la séquence de ce peptide.

## VIII - DESORPTION DE PLASMA, $^{252}\text{Cf}$

P D M S : "Plasma Desorption Mass Spectrometry"

### VIII-1 Principe



L'échantillon est déposé sur une surface de mylar + aluminium. Cette surface est bombardée par derrière (en général) à l'aide de fragments de fission d'une source de Californium 252 ; ceux-ci ont une énergie de quelques centaines de MeV et produisent ainsi des ions  $(M+H)^+$  ou  $(M+Na)^+$ . Cette source est très peu commercialisée.

### VIII-2 Exemple d'application

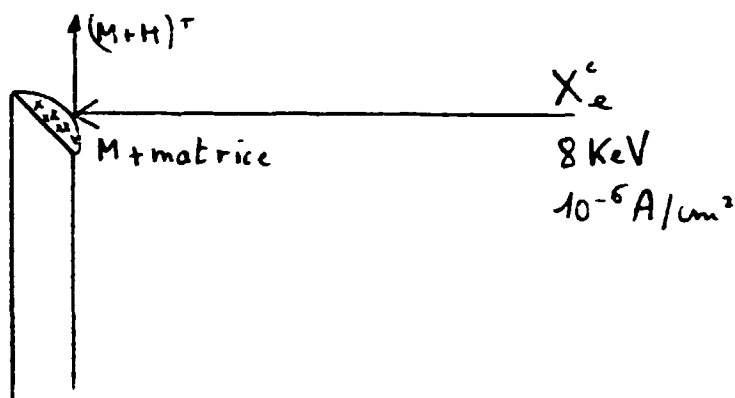
La figure 9 montre un spectre obtenu en PDMS avec la trypsine de porc. C'est un peptide de masse très élevée (23463), enzyme se formant dans l'intestin grêle et participant à la digestion. L'ion moléculaire a également été obtenu avec cette technique pour la pepsine de porc (34500), autre enzyme digestive.

## IX - BOMBARDEMENT D'ATOMES

F A B : "Fast Atom Bombardment"

### IX-1 Principe et caractéristiques

C'est la source la plus utilisée en chimie et biochimie pour les produits thermolabiles, polaires ou ioniques.



L'échantillon est dissous dans une matrice (solvant visqueux) comme le glycérol. L'ensemble est bombardé à l'aide d'un canon d'atomes accélérés (par exemple de xénon). La matrice a un rôle de :

- modérateur vis-à-vis des atomes incidents
- réservoir en renouvelant régulièrement la surface de la goutte en échantillon
- ionisation en facilitant la dissociation des molécules ioniques ou en fournissant des protons à celles qui ne le sont pas.

La source FAB présente cependant l'inconvénient d'être inutilisable pour les produits insolubles ou chimiquement fragiles (pouvant réagir avec elle ou avec les impuretés qu'elle contient).

### IX-2 Exemple d'application

La nitrogénase est une molécule présente dans certaines plantes et qui transforme l'azote atmosphérique en azote minéral. Les chimistes et biochimistes essaient de synthétiser un modèle de son site actif. Une des applications possibles pourrait être la synthèse beaucoup plus simple et moins coûteuse de l'ammoniac. Le spectre obtenu en FAB d'un de ces modèles est présenté sur la figure 10. On peut observer un ion de la molécule complète avec ses quatre groupements CO pourtant très labiles. On obtient également différents fragments permettant de confirmer au chimiste le succès de sa synthèse.

**CONCLUSION**

Nous travaillons avec les chimistes, les biologistes, les pharmaciens et les médecins. L'éventail des sources d'ionisation utilisables permet de répondre à la grande variété de problèmes qu'ils nous posent. Mais, en pratique, avec les quatre sources commercialisées de façon classique :

EI

CI

DCI et sa variante DCE

FAB

on répond à quasiment tous les problèmes.

- Figure 1 Spectre de masse obtenu avec une source EI à 70 °C.
- Figure 2 Spectres obtenus en EI et CI du tributylphosphate (TBP)
- Figure 3 Spectres obtenus en EI et FD de la vitamine C
- Figure 4 Spectres obtenus en EI et DCI de la guanosine
- Figure 5 Structure de  $TiCl_2(tpp)$
- Figure 6 Spectres obtenus en EI et DCE de  $TiCl_2(tpp)$
- Figure 7 Spectre obtenu en SIMS de la cyclosporine A.
- Figure 8 Spectre obtenu en LD de la gramicidine D
- Figure 9 Spectre obtenu en PDMS  $^{252}Cf$  de la trypsine de porc  
(M=23463)
- Figure 10 Spectre obtenu en FAB d'un modèle du site actif de la nitro-  
genase

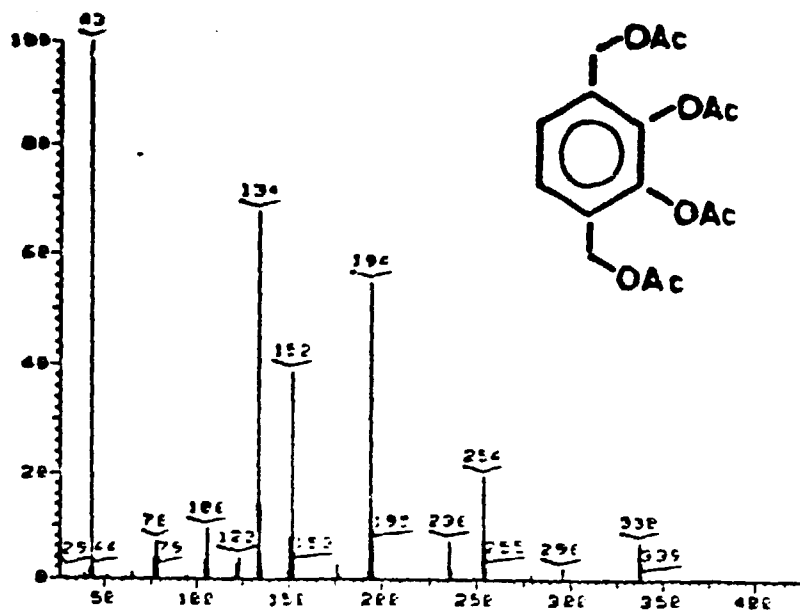
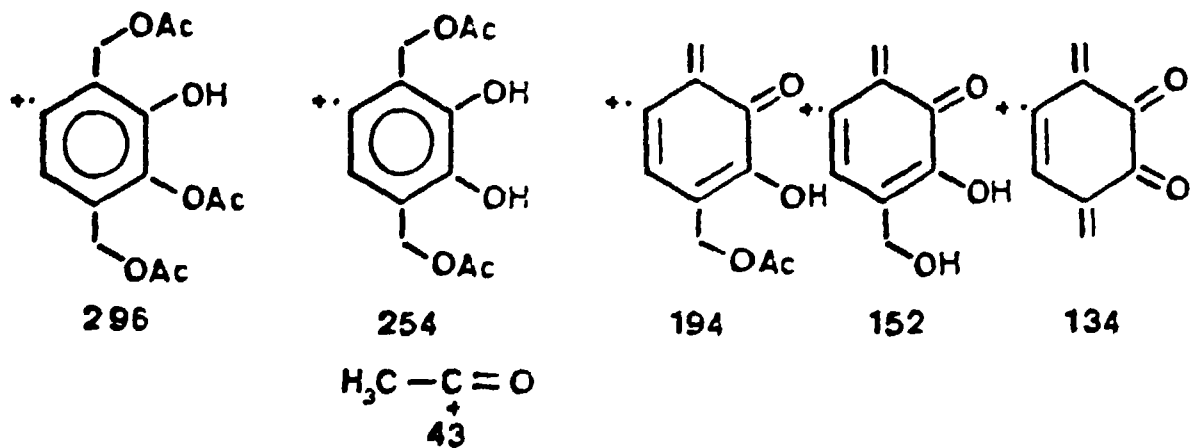


Figure 1 Spectre de masse obtenu avec une source EI à 70°C. On obtient le pic de l'ion moléculaire M<sup>+</sup> à la masse 338 ainsi que les pics des ions fragments suivants avec perte successive des acétates



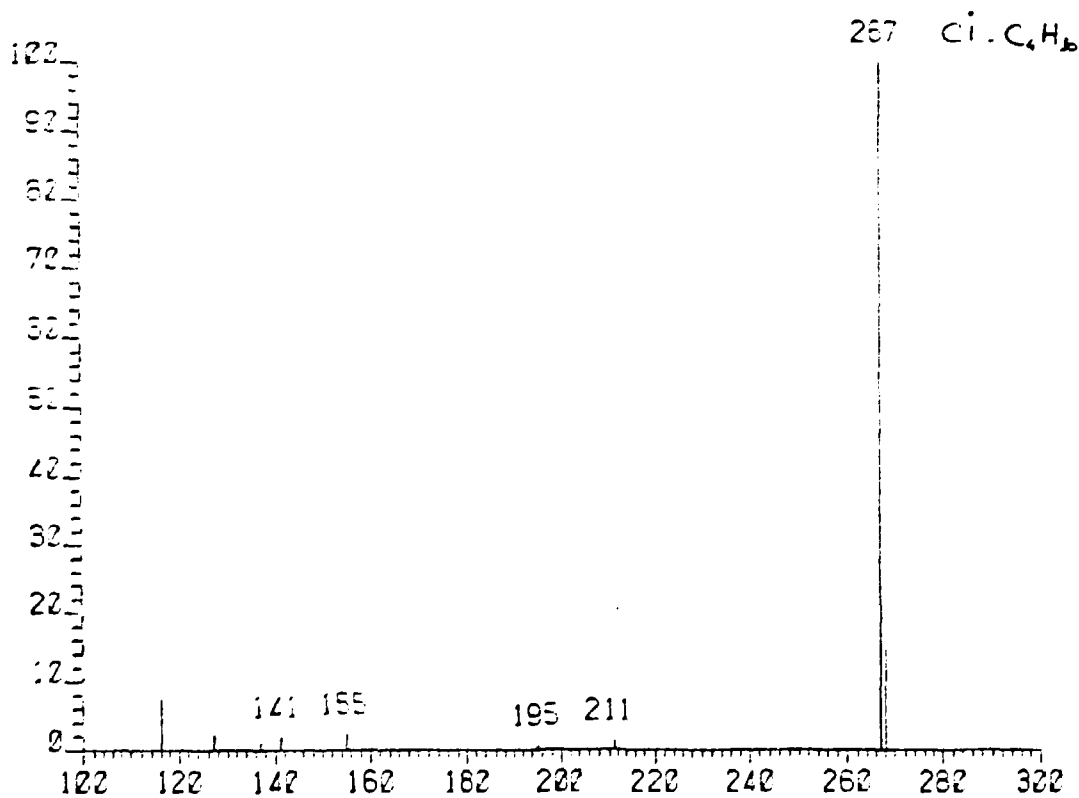
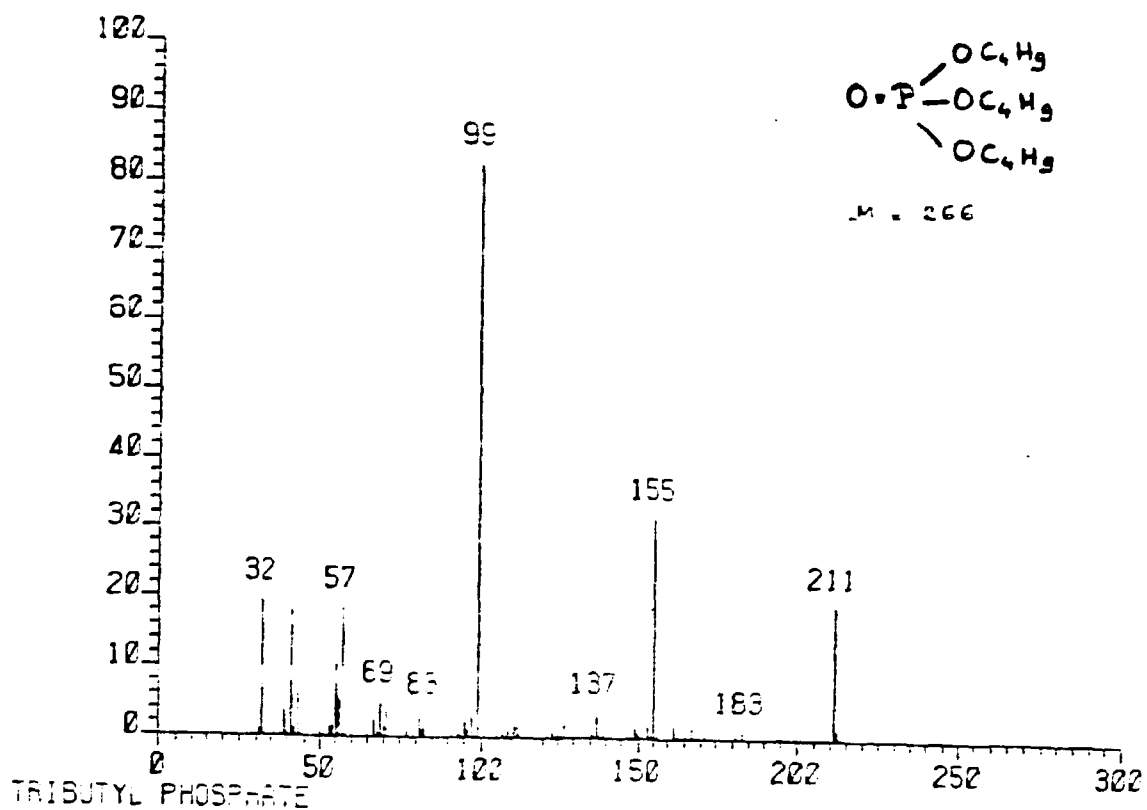


Figure 2 Spectres obtenus en EI et CI du tributylphosphate (TBP)

J.ULRICH



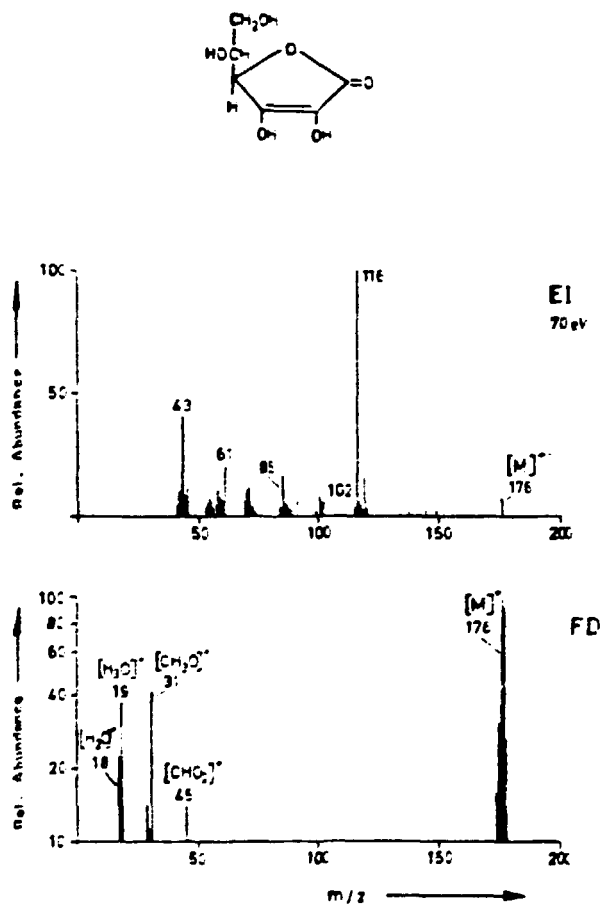


Figure 3 Spectres obtenus en EI et FD de la vitamine C  
H.R.SCHULTEN

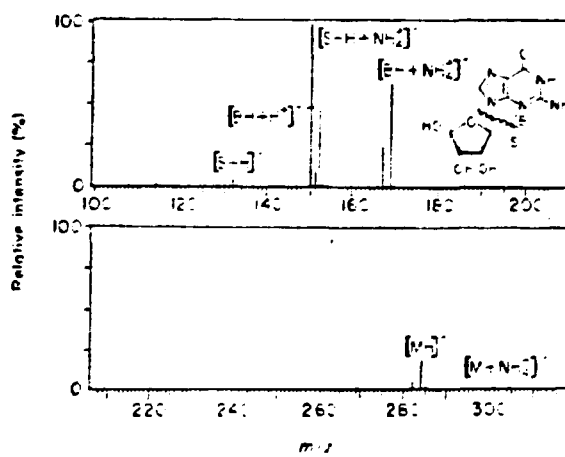
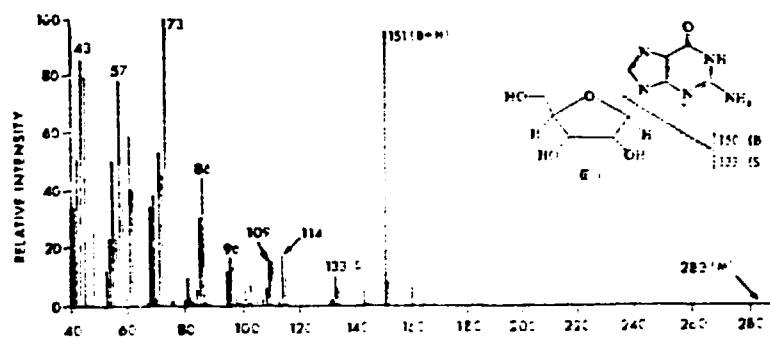


Figure 4 Spectres obtenus en EI et DCI de la guanosine  
P.BROWN et coll.;E.L.ESMANS et coll.

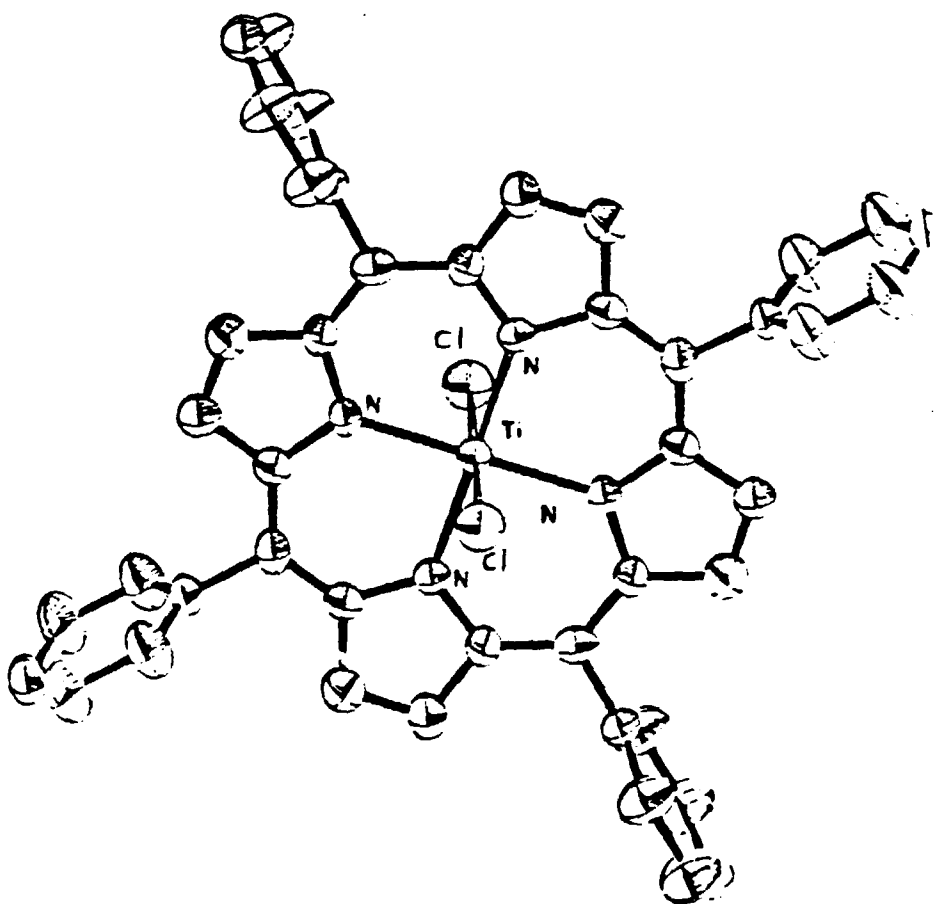


Figure 5 Structure de  $\text{TiCl}_2(\text{tpp})$

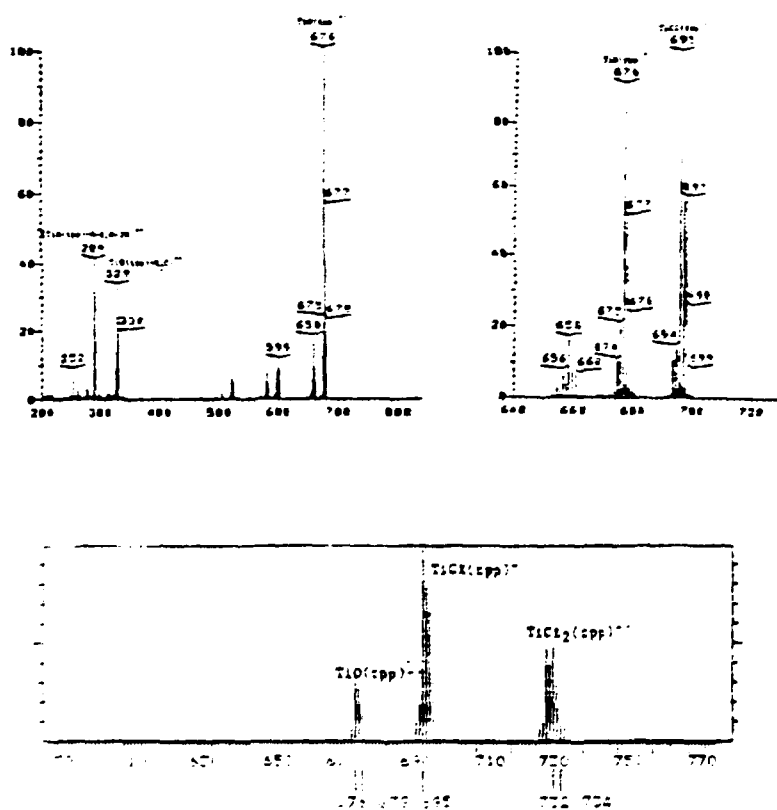


Figure 6 Spectres obtenus en EI et DCE de  $TiCl_2(opp)$   
E. FOREST et coll.

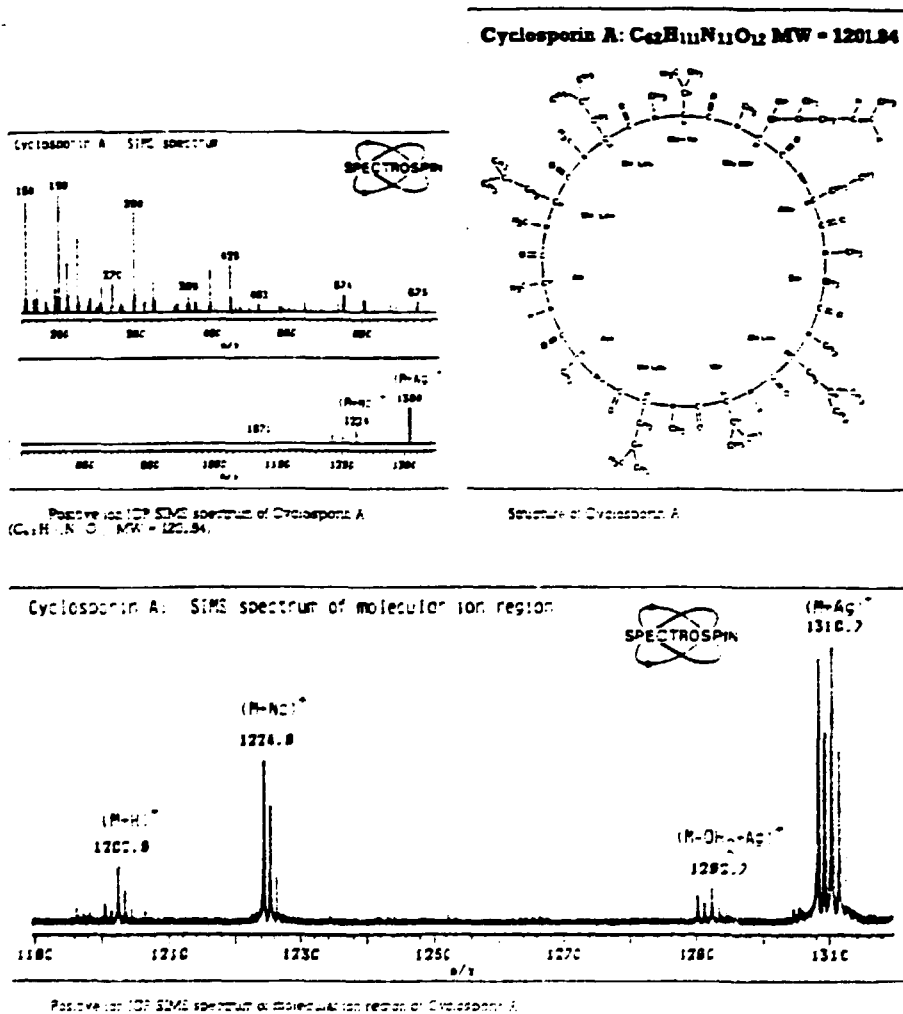


Figure 7 Spectre obtenu en SIMS de la cyclosporine A.

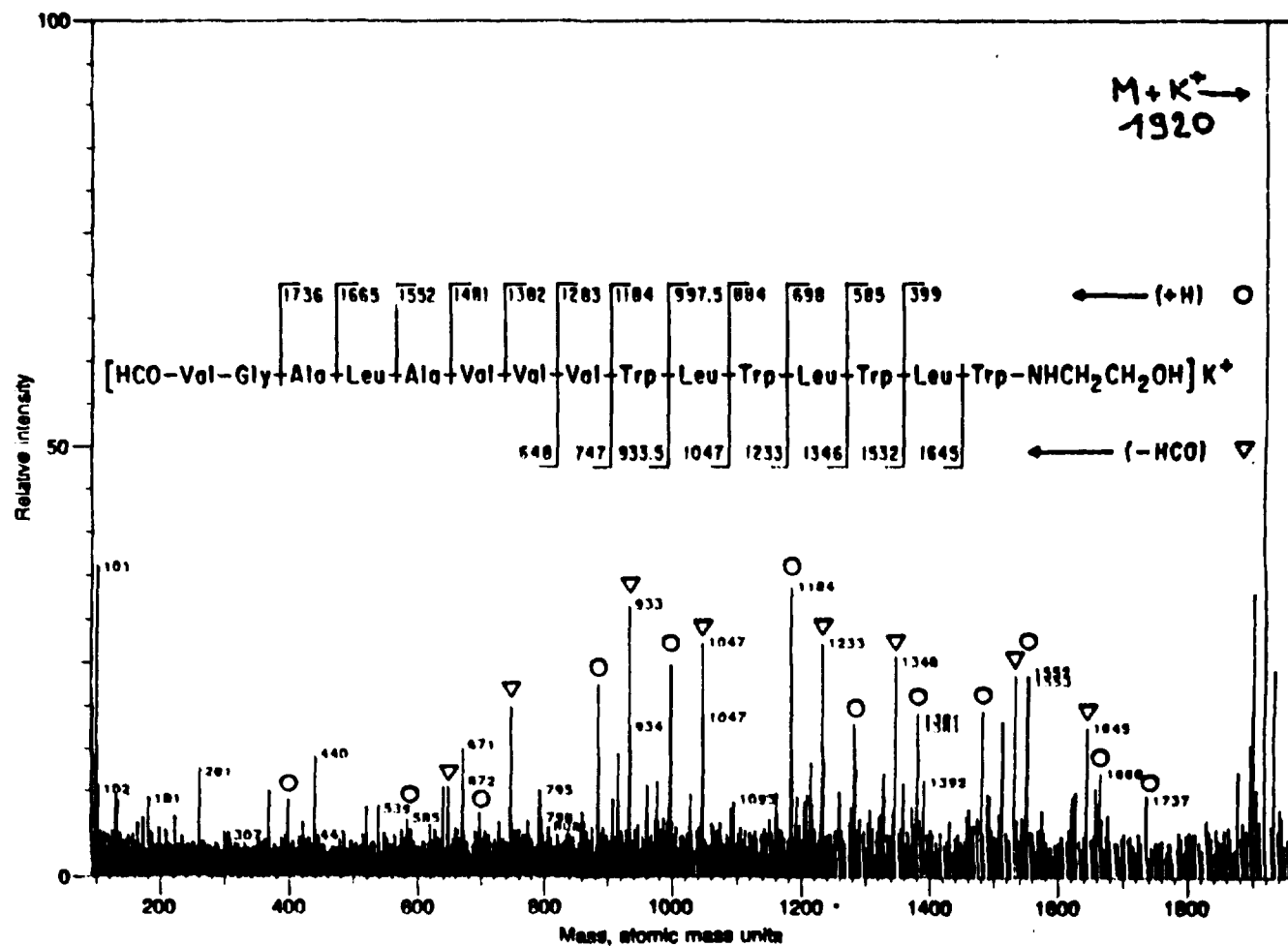


Figure 8 Spectre obtenu en LD de la gramicidine D  
NICOLET

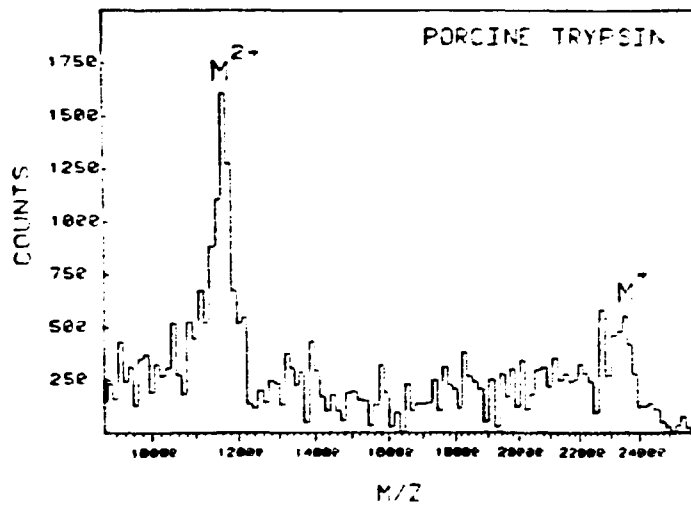


Figure 9 Spectre obtenu en PDMS <sup>252</sup>Cf de la trypsine de porc (M=23463)

E.SUNDOVIST et coll.

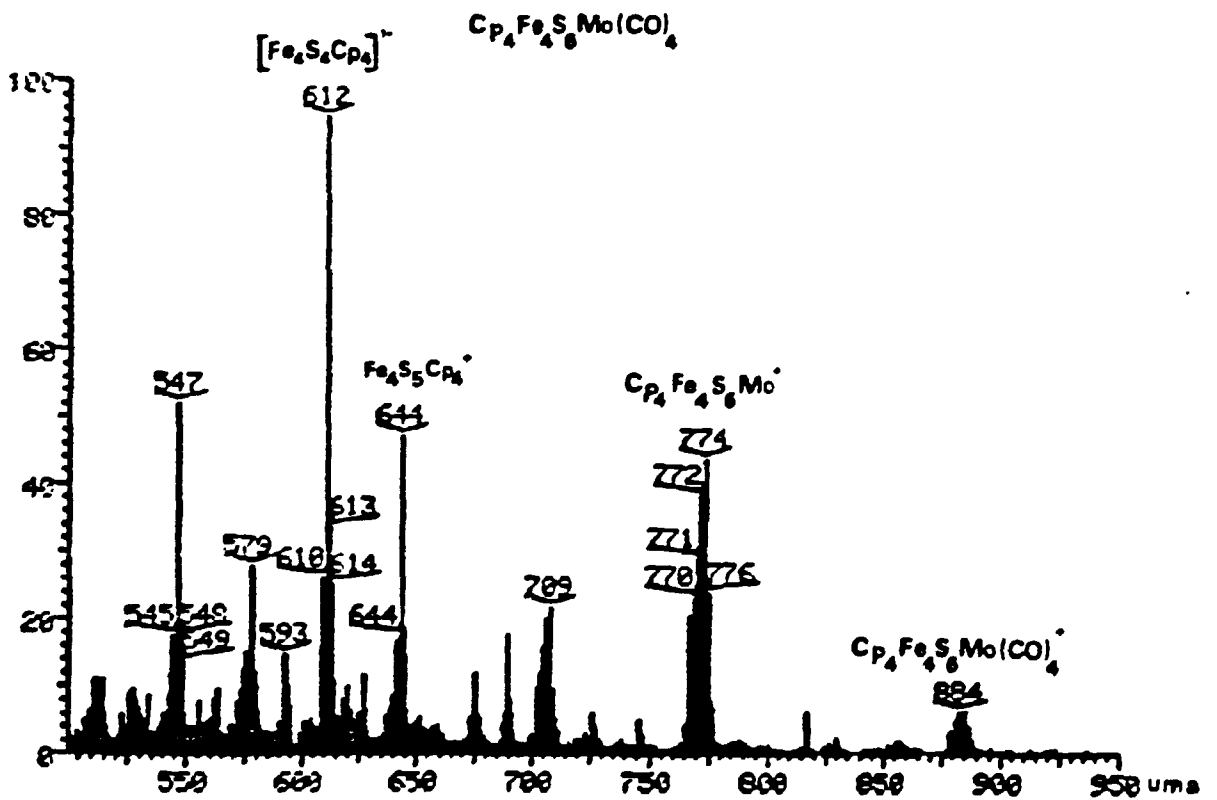
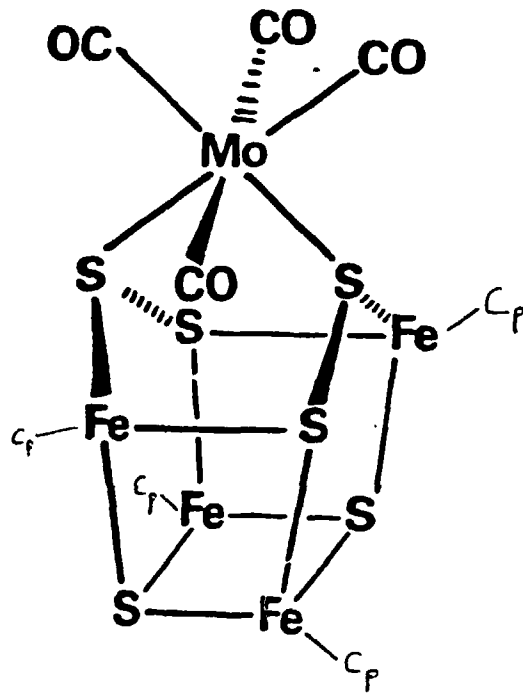


Figure 10 Spectre obtenu en FAB d'un modèle du site actif de la nitrogenase

J.ULRICH