

I-2 - Ionisation

Différents procédés d'ionisation sont mis en œuvre. Historiquement l'ionisation par bombardement d'électron ou impact électronique (EI), est la première méthode d'ionisation qui a été utilisée en routine en SM.

I-2-1- Ionisation par impact électronique (EI)

• Principe

L'échantillon gazeux est introduit dans la source où ses molécules sont frappées par un faisceau d'électrons de 70 eV d'énergie cinétique émis par un filament de rhénium ou de tungstène chauffé à 2000°C ; la collision a pour effet d'arracher un électron à certaines de ces molécules => ions M.+

On bombarde par des \bar{e} et on forme des ions positifs

Les électrons émis ce sont que des photons, leurs longueurs d'ondes dépendent de leurs énergies cinétique en eV.

Ou $1\text{eV} = 96 \text{ kJ/mol}$.

20 eV correspond au $\lambda = 0.27\text{nm}$

70 eV correspond au $\lambda = 0.14\text{nm}$ correspond au longueurs des liaisons entre atomes dans la molécule organique.

mode d'ionisation

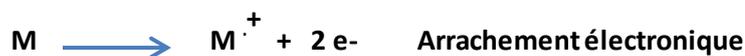
Le mode d'ionisation dépend de l'énergie cinétique des électrons incidents.

e- lents



quelques eV $\approx 1 \text{ eV}$

e- rapides



quelques dizaines d'eV $\approx 20 - 70 \text{ eV}$

La valeur de 70 eV a été établie comme fournissant le meilleur rendement en ions sur les premiers systèmes étudiés.

Ceux-ci peuvent ensuite se fragmenter suivant leur énergie interne.

Notion d'énergie interne

C'est l'excès d'énergie du système après ionisation, énergie répartie dans l'ion sous forme vibrationnelle, rotationnelle, translationnelle...

Eint. dépend de l'énergie des électrons ionisants et du potentiel d'ionisation de la molécule

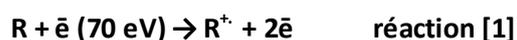
C'est cet excès d'énergie qui va éventuellement conduire à la fragmentation de $M^{\cdot+}$.

I-2-2- Ionisation Chimique Positive (PCI)

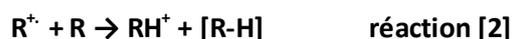
La substance à analyser est injectée dans la source avec un large excès de gaz (gaz : substance 100 :1). Le gaz (méthane, ammoniac, isobutane...) ionisé en premier, puis ionise la substance par transfert de charge, dans cette technique la pression doit augmenter (entre 0.1-1torr).

Principe de la CI

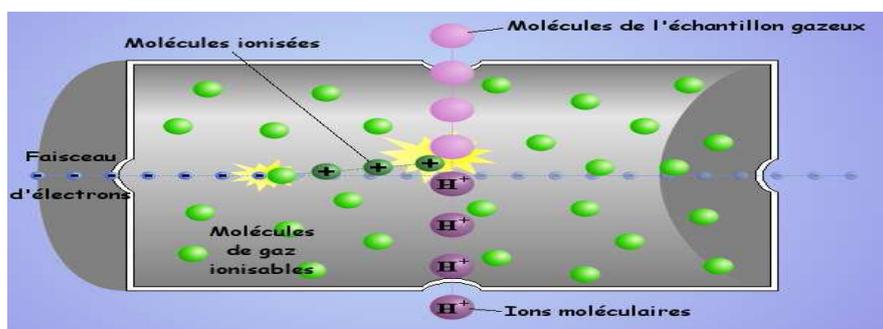
Ionisation du réactant



Autoprotonation du réactant

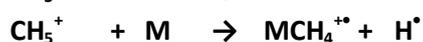
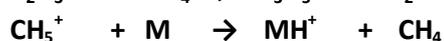
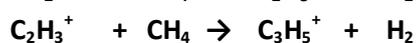


Transfert de proton à l'analyte



Ionisation Chimique Positive

Exemple d'ionisation Chimique Positive du Méthane

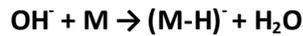
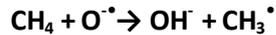
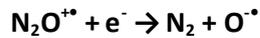


MH^+ = ion « proto-moléculaire » à M+1

MCH_4^{+*} = ion « pseudo-moléculaire » à M+18.

-2-3- Ionisation Chimique Négative (NCI)

exemple du mélange CH₄/N₂O



Cette ionisation douce permet d'obtenir dans ce cas un ion « pseudomoléculaire » (M-H)⁻ avec une détection à (M-1).

I-2-4- Bombardement par atomes rapides (FAB)

Ionisation par impact d'atomes lourds non ionisés (Ar, Xe) sur l'échantillon dispersé dans une matrice liquide peu volatile. Pour les composés polaires et peu volatils.

Principe de la technique FAB

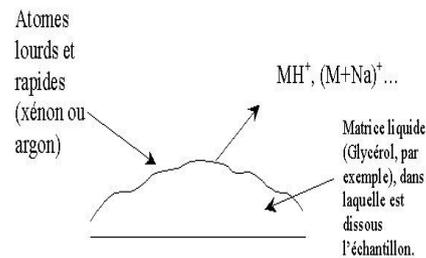
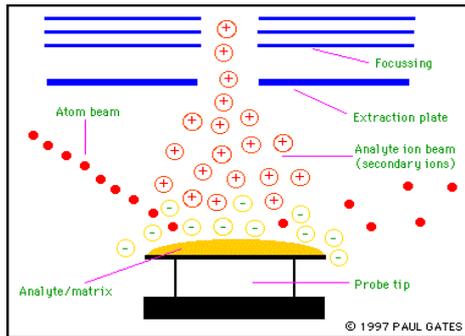
Dans cette technique, l'échantillon est déposé en mélange avec une matrice liquide (le plus souvent du glycérol, mais parfois des mélanges tels que le Magic Bullet, qui est un mélange 4/1 de 1,4-dithio-L-threitol et de 1,4-dithioerythritol) sur le méplat métallique d'une canne d'introduction. Des ions lourds tels que l'argon ou le xénon sont produits par une cathode froide placée à quelques centimètres de l'échantillon à analyser.



Les ions lourds produits lors de la décharge sont accélérés à haute énergie par un potentiel de quelques kV maintenu entre ces deux électrodes pour donner des cation moléculaires à grande énergie translationnelle $\text{Xe}^{\cdot+} \rightarrow$

A la sortie très étroite du canon, il se produit un échange de charges donnant des atomes lourds à partir de ces ions lourds. C'est le bombardement par ces atomes lourds, ayant une énergie cinétique de l'ordre du keV, qui produit des ions quasi moléculaires tels que (M+H)⁺, (M+Na)⁺, (M+K)⁺ en mode positif et (M-H)⁻ en mode négatif. Grâce à cette technique, on peut analyser des molécules polaires de haut poids moléculaire (peptides, protéines, nucléosides, saccharides, antibiotiques, sels d'acides minéraux) et faire des déterminations de structure ; mais malheureusement on obtient

souvent un bruit de fond important dû à la matrice liquide.



I-2-5- Désorption-ionisation laser assistée par matrice

Le Maldi est une méthode d'ionisation introduite en 1988 par Karas et Hillenkamp d'une part et par Tanaka d'autre part permettant d'analyser des molécules de hautes masses moléculaires, supérieures à 300 kDa*. Elle s'utilise pour analyser les peptides et les protéines.

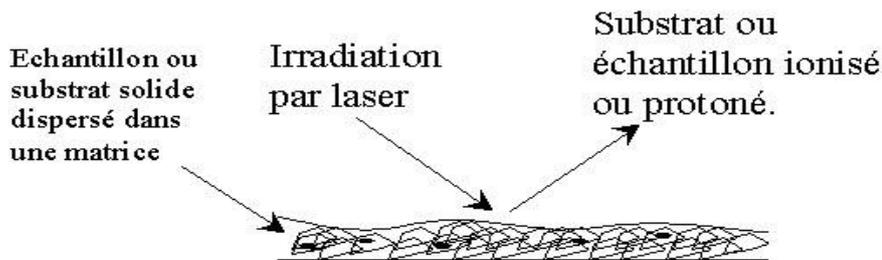
Cette méthode est composée de deux étapes :

- L'échantillon est mélangé avec une matrice sur une plaque. Le mélange matrice/échantillon va se co-cristalliser sur la plaque. Ce mélange co-cristallisé est bombardé par un faisceau laser, entraînant l'ionisation et la désorption des molécules (MALDI).
- Les molécules ionisées vont alors passer dans un tube de vol. Elles sont séparées selon leur rapport masse/charge (m/z) en fonction de leur temps de vol (TOF*). Les ions atteignent un détecteur qui va amplifier le signal traduit sous la forme d'un spectre caractéristique de chaque espèce.

Principe de la technique MALDI

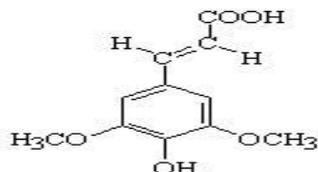
Il s'agit de placer l'échantillon sur une plaque cible en acier inoxydable et d'ajouter une solution matrice qu'il convient de laisser sécher pendant quelques minutes. L'addition de cette matrice permet une co-cristallisation rapide sur la plaque cible. La taille et les intensités des pics des molécules détectées sont tributaires de la matrice choisie pour l'expérience. L'échantillon est ensuite analysé par exposition à un faisceau laser pulsé fixe. Il y a un transfert d'ions entre les molécules de la matrice et celles de l'échantillon. Ainsi selon leur structure, les différentes protéines de l'échantillon vont se charger positivement ou négativement.

L'irradiation de la matrice et de l'échantillon va provoquer la création d'une grande quantité d'énergie dans la phase condensée, par excitation électronique des molécules de la matière. Des ions, formés par transfert de protons ou d'électrons entre la matière photoexcitée et l'échantillon analysé désorbent. Ce principe est illustré par la figure ci-dessous :

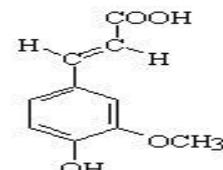


*le dalton est la masse de l'atome d'hydrogène = 1.007825 u.m.a
 L'u.m.a. = 1/12 de la masse de l'isotope 12 du carbon

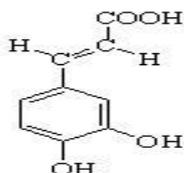
En général, la source MALDI est utilisée avec un analyseur à temps de vol (TOF). On obtient des ions en phase gazeuse en irradiant le composé à analyser en utilisant un laser à impulsion courte. L'échantillon est incorporé uniformément dans une matrice cristalline solide possédant une grande absorbance. Le rapport matrice-échantillon est un paramètre important pour réussir les analyses en MALDI, les rapports peuvent varier de 1000/1 à 5000/1. Les matrices sont des chromophores à faible enthalpie de sublimation, les plus utilisées sont les dérivés des acides cinnamiques et benzoïques : l'acide sinapinique, l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide gentisique.



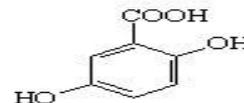
Acide sinapinique
 Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique
 Masse : 224,1
 pK = 4



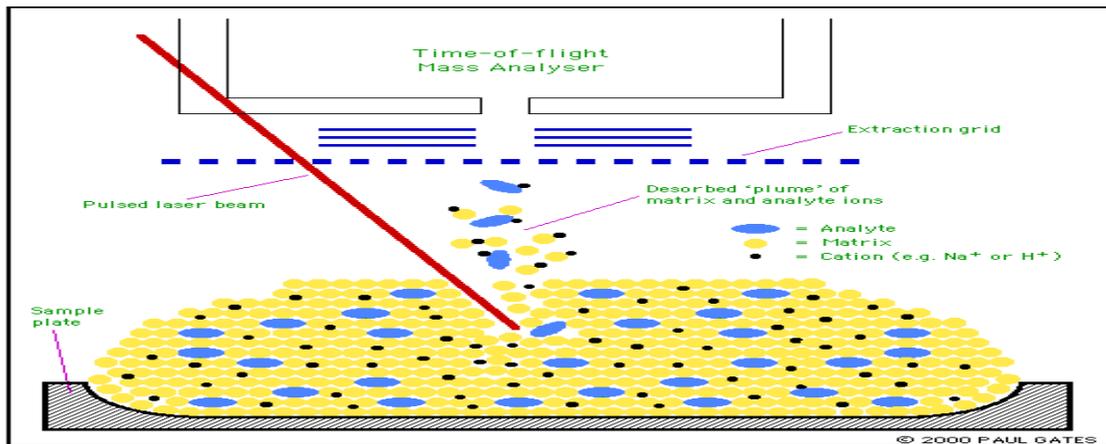
Acide férulique
 Acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique
 Masse : 194,1



Acide caféique
 Acide 3,4-dihydroxycinnamique
 Masse : 180,1



Acide gentisique
 Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
 Masse : 154,1
 pK = 2,97



Avec des techniques d'ionisation tels que FAB, MALDI, API... peuvent apparaître de pics correspondant à des dimères (2M) ou trimères (3M) voire des adduits de M avec des ions présents.

(Ex : M+Na ...); *Le pic à rechercher diffère selon la technique d'ionisation.*