

# Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

Stéphane Bouchonnet et Danielle Libong

**Résumé** Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse est aujourd'hui l'une des techniques les plus utilisées en chimie analytique. L'objectif de cet article est d'expliquer simplement les principes de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse et de montrer comment l'association de ces deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant. Des exemples choisis en toxicologie analytique illustrent les protocoles d'analyse les plus couramment utilisés.

**Mots-clés** **Couplage, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse.**

**Abstract** **Gas chromatography-mass spectrometry coupling**  
Gas chromatography-mass spectrometry coupling constitutes one of the most widespread techniques of analytical chemistry. The aim of this article is to simply explain the principles of gas chromatography and mass spectrometry and to show how the association of both techniques provides an outstanding analytical tool. The most current analysis modes are illustrated by examples chosen in the field of analytical toxicology.

**Keywords** **Coupling, gas chromatography, mass spectrometry.**

Nombreux sont les laboratoires de chimie analytique aujourd'hui équipés d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse. La technique est généralement désignée par ses utilisateurs sous le terme abrégé de « GC-MS » pour « gas chromatography-mass spectrometry ». La GC-MS est aujourd'hui à son apogée et trouve des applications dans des domaines aussi variés que l'industrie agroalimentaire, la médecine, la pharmacologie ou l'environnement [1]. L'objectif de cet article est d'expliquer le plus simplement possible les principes de la chromatographie en phase gazeuse et de la spectrométrie de masse et de montrer combien l'association des deux techniques constitue un instrument indispensable en chimie analytique. La chromatographie en phase gazeuse est une technique physico-chimique abondamment utilisée depuis de nombreuses années ; c'est pourquoi les chapitres consacrés ici à chacune des techniques sont de tailles inégales : cet article fait « la part belle » à la spectrométrie de masse dont les aspects techniques sont généralement moins bien connus que ceux de la chromatographie en phase gazeuse. Parce que de plus en plus de laboratoires de toxicologie s'équipent de ce type d'appareil et que cette discipline est plus que jamais d'actualité, l'article est illustré par des exemples choisis en toxicologie analytique.

## Le chromatographe en phase gazeuse

Le rôle du chromatographe est de séparer les constituants d'un mélange. La chromatographie en phase gazeuse est réservée à l'analyse de composés relativement volatils et thermiquement stables. Le chromatographe en phase gazeuse est constitué de trois modules : un injecteur, une colonne capillaire dans un four et un détecteur. Il existe différents types de détecteurs mais le spectromètre de masse

tend aujourd'hui à supplanter tous les autres car c'est le seul à fournir des informations structurales sur les composés séparés par chromatographie.

## L'injecteur

L'injecteur est une zone chauffée où l'échantillon est introduit en solution au moyen d'une seringue, puis vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Le gaz vecteur, classiquement de l'hélium, constitue la phase dite « mobile ». Son rôle consiste à véhiculer les analytes depuis l'injecteur jusqu'au détecteur *via* la colonne analytique. La viscosité d'un gaz variant avec la température, la plupart des injecteurs sont aujourd'hui équipés d'un régulateur électronique de débit. Ce dernier ajuste la pression du gaz en fonction de la température, de manière à ce que le débit gazeux dans la colonne soit constant, ce qui améliore considérablement les performances du chromatographe.

Il existe deux familles d'injecteurs. La première regroupe les injecteurs dits « à fuite ». Le mode d'injection le plus répandu est l'injection en « split » ou injection avec « division de flux », utilisé pour l'analyse de solutions concentrées. L'injection se fait à haute température. L'échantillon est rapidement introduit dans l'injecteur où il est instantanément vaporisé et mélangé au gaz vecteur. Une électrovanne permet de régler le débit de fuite. Ce procédé permet de faire en sorte qu'une fraction importante du flux gazeux soit évacuée, diminuant ainsi la quantité d'échantillon qui pénètre dans la colonne, ce qui évite de saturer la phase stationnaire (voir ci-après). Très simple à mettre en œuvre, l'injection en mode « split » présente néanmoins un inconvénient : des problèmes de discrimination sont fréquemment rencontrés lorsque la solution à analyser contient des composés dont les volatilités sont très hétérogènes (les produits « légers »

auront tendance à s'échapper par la fuite alors que les produits « lourds », mal vaporisés, resteront majoritairement dans l'injecteur). Plus rarement utilisé, l'injecteur « à aiguille de verre » ou injecteur « de Ross » permet d'injecter de grands volumes. Il est composé d'une aiguille de verre d'environ 10 cm de long, placée dans un tube muni d'une vanne de fuite et percé de deux orifices latéraux, l'un pour l'arrivée du gaz vecteur, l'autre pour l'injection de l'échantillon. L'échantillon est déposé sur l'aiguille ; le courant de gaz vecteur permet l'évaporation du solvant qui est éliminé par la fuite. L'aiguille est alors amenée au niveau de la colonne capillaire où l'échantillon est vaporisé. Ce mode d'injection est particulièrement utilisé pour l'analyse de traces en environnement. Il permet d'injecter de grands volumes d'échantillon et de réaliser des introductions successives pour concentrer l'analyte dans l'aiguille. Il ne permet cependant pas l'analyse de produits très volatils, ces derniers étant éliminés avec le solvant.

La seconde famille regroupe les injecteurs « sans fuite ». L'injection « splitless », ou « sans division de flux », est utilisée pour introduire des analytes en solution diluée. L'électrovanne est fermée pendant les quelques dizaines de secondes qui suivent l'injection, de manière à ce qu'une quantité maximum d'analyte pénètre dans la colonne. Elle est ensuite ouverte pour purger l'injecteur d'éventuels résidus. L'échantillon est injecté à une température telle que solvant et solutés sont instantanément vaporisés à l'entrée de la colonne. Pendant l'injection, la température du four est inférieure de 20 à 30 °C à la température d'ébullition du solvant afin de condenser ce dernier en tête de colonne et de piéger les molécules. Dans un premier temps, le solvant joue le rôle de phase stationnaire vis-à-vis des différents constituants du mélange. Sa polarité doit donc être compatible avec celle de la phase stationnaire de manière à ce que le solvant se répartisse de façon homogène en tête de colonne. En raison de son pouvoir de rétention important, cette phase condensée permet de ralentir les molécules volatiles jusqu'à ce qu'elles soient entraînées par le gaz vecteur. Plus performante que le « splitless » en termes de répétabilité et de sensibilité, l'injection « on column » consiste à introduire directement l'analyte en solution dans la colonne ou dans une précolonne dont la fonction est de permettre l'injection d'un grand volume d'échantillon et/ou de protéger la colonne analytique d'éventuels polluants matriciels. Longue de 1 à 10 m, cette précolonne est chimiquement neutre ; elle possède un diamètre interne suffisamment important pour que l'aiguille de la seringue y pénètre. La solution étant directement injectée dans la précolonne, 100 % de l'échantillon est effectivement introduit. Ce type d'injection permet l'introduction de volumes d'échantillon dix fois supérieurs à ceux injectés en « split » ou en « splitless » (jusqu'à 10 µL en « on column »). L'injection s'opère le plus souvent « à froid » : l'échantillon est introduit à l'état liquide en tête de colonne avant d'être rapidement vaporisé et condensé. A chaud, en effet, l'expansion brutale du volume de la solution injectée entraînerait dans la colonne une surpression telle que le gaz refluerait vers l'injecteur.

### Le four et la colonne capillaire

Le four contient l'élément clé de la séparation chromatographique : la colonne analytique. De nos jours, les colonnes utilisées en GC-MS sont des colonnes dites « capillaires ». La figure 1 représente une coupe de colonne

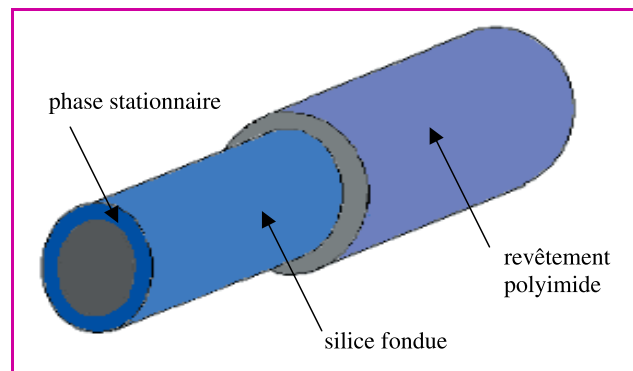


Figure 1 - Représentation schématique d'une colonne capillaire.

capillaire ; la colonne est constituée d'un tube de silice fondue dont la paroi interne est couverte d'un film chimique nommé « phase stationnaire » ; la paroi externe est gainée d'un revêtement en polyimide qui confère souplesse et robustesse à la colonne. La phase stationnaire est caractérisée par les fonctions chimiques greffées sur la silice. Si ces dernières sont peu polaires (chaînes alcanes ou groupements phényles par exemple), la colonne est dite « peu polaire ». Au contraire, si la phase stationnaire est constituée de composés polaires tels que, par exemple, des polyéthylènes glycols, la colonne est dite « polaire ». Les constituants d'un mélange sont séparés en fonction de leur polarité si la phase stationnaire est polaire, de leur volatilité si elle est apolaire ; leurs différences de propriétés physico-chimiques leur confèrent des vitesses d'éluion différentes et ils sont donc séparés en fonction du temps. Confronté à un mélange mixte, on privilégie souvent le choix d'une colonne peu polaire, les phases stationnaires peu polaires étant généralement plus robustes et thermiquement beaucoup plus stables que leurs homologues polaires.

En plus de la nature de la phase stationnaire, la colonne capillaire est caractérisée par trois paramètres géométriques : sa longueur (10 à 100 m), son diamètre interne (0,1 à 0,5 mm) et l'épaisseur de sa phase stationnaire (0,1 à 5 µm) ; chacun exerce une influence déterminante sur la qualité de la séparation. L'objectif du chromatographe est triple : obtenir des pics chromatographiques les plus fins possibles (grande efficacité), les mieux séparés possible (bonne résolution), en un temps d'analyse minimum. La figure 2 illustre la notion de résolution qui est directement liée à celles d'efficacité et de séparation. De l'efficacité de la colonne dépend la dispersion de l'ensemble des molécules d'un soluté autour de son temps de rétention : meilleure est l'efficacité et plus fins sont les pics chromatographiques. La qualité de la séparation dépend aussi des rétentions relatives des différents analytes en mélange. La résolution augmente avec la longueur de la colonne, au détriment du temps d'analyse et de l'efficacité. Une colonne de 15 mètres suffit à séparer des mélanges simples alors que l'analyse d'échantillons complexes nécessite une colonne de plus de 30 m. La plupart des applications de GC-MS utilisent des colonnes de 25 à 30 m. Augmenter l'épaisseur de la phase stationnaire augmente les interactions entre celle-ci et les solutés, ce qui améliore la séparation chromatographique mais augmente la durée de l'éluion, donc de l'analyse. On choisit généralement une épaisseur de film importante lorsque l'on souhaite séparer des composés très volatils. L'augmentation du diamètre interne permet de raccourcir les temps d'analyse mais se traduit par une diminution de

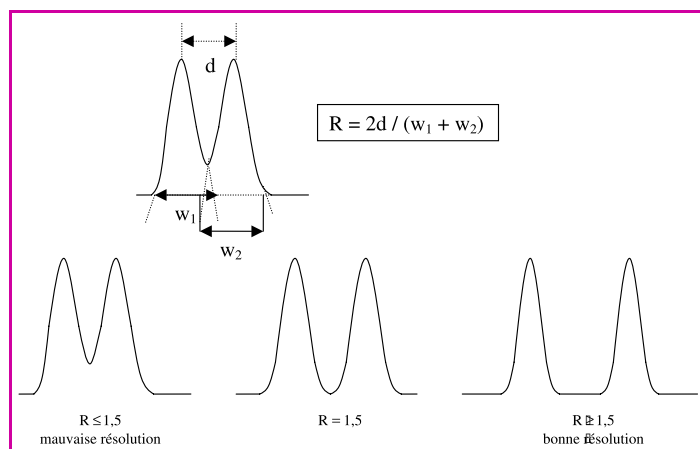


Figure 2 - Notion de résolution chromatographique.

l'efficacité. Lorsque l'on travaille en « fast GC », c'est-à-dire lorsque l'on souhaite des temps d'analyse très courts (quelques secondes à quelques minutes), on choisit une colonne courte avec un film de faible épaisseur (0,1 µm par exemple) ; il convient alors d'utiliser une colonne de faible diamètre interne pour ne pas trop perdre en efficacité [2].

La colonne capillaire est placée dans un four car les interactions entre les composés et la phase stationnaire sont fonction de la température. Augmenter cette dernière favorise l'élution des composés et diminue ainsi les temps d'analyse. La plupart des utilisateurs travaillent en « programmation de température » ; il est très fréquent que des méthodes dites de « screening » utilisent une programmation de température allant de 40 à 350 °C pour permettre la détection de toutes sortes de composés aux propriétés physico-chimiques variées. A titre d'exemple, la figure 3a montre le chromatogramme obtenu suite à un « screening » de benzodiazépines (principes actifs d'une large famille de médicaments aux propriétés anxiolytiques, hypnotiques, anticonvulsives et relaxantes).

Il convient de préciser que dans le contexte particulier du couplage GC-MS, nombreux sont les utilisateurs qui privilégient le temps d'analyse au détriment de la séparation

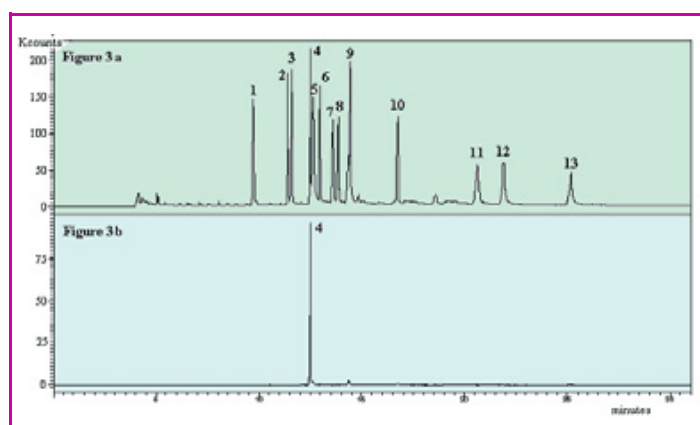


Figure 3 - Chromatogramme d'une solution de 13 benzodiazépines à 2,0 µg/ml dans l'acétonitrile.

**3a** : « screening » des benzodiazépines en « fullscan » (ionisation chimique) : médazépam (1), tétrazépam (2), diazépam (3), clotiazépam (4), midazolam (6), flunitrazépam (7), bromazépam (8), prazépam (9), flunitrazépam (10), estazolam (11), alprazolam (12), triazolam (13).

**3b** : même chromatogramme si l'on ne visualise que l'ion  $m/z$  319 caractéristique du clotiazépam.

chromatographique car les co-élutions partielles de pics ne posent pas de problème, chaque pic chromatographique étant « intégré » à partir du courant d'un ion caractéristique de l'analyte (voir ci-après). Le changement de colonne capillaire nécessitant généralement la mise à pression atmosphérique du spectromètre et donc l'arrêt du système de pompage, les utilisateurs de GC-MS changent rarement de type de colonne capillaire. Aujourd'hui, la colonne « de référence » est, pour une large majorité, une colonne peu polaire (greffée à 5 % avec des groupes phényles), longue de 30 m, de diamètre interne 0,25 mm et d'épaisseur de phase stationnaire 0,25 µm. L'hélium est le seul gaz vecteur utilisé en GC-MS car les ions  $\text{He}^+$  résultant de l'ionisation électronique n'interfèrent pas avec ceux de l'analyte en raison de leur faible rapport  $m/z$  ; l'hydrogène est proscrit en raison de la présence d'un filament chauffé dans la source (voir ci-après). Le débit d'hélium est classiquement de 1 cc/min.

La colonne capillaire sort du chromatographe et entre dans le spectromètre de masse via une « ligne de transfert ». Il s'agit d'un cylindre intensément chauffé (environ 300 °C) de manière à éviter que les molécules éluées ne se recondensent entre les deux appareils. La figure 4 présente un schéma d'appareil de couplage GC-MS.

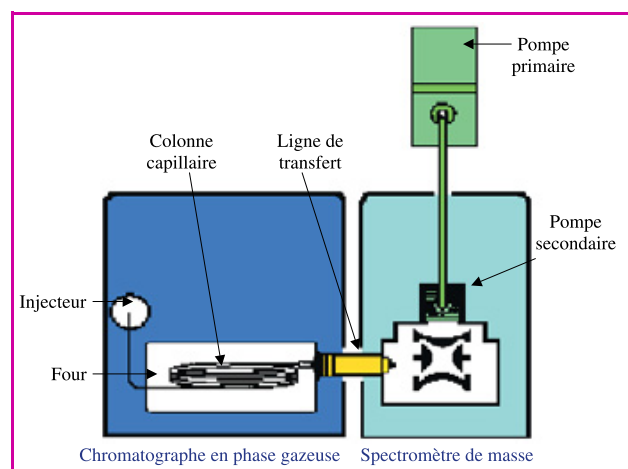


Figure 4 - Schéma d'un appareil de couplage GC-MS.

## Le spectromètre de masse

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des analytes. Il existe de nombreux types de spectromètres de masse ; tous ont en commun trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur [3]. Le principe de fonctionnement de chacun de ces éléments est détaillé dans ce qui suit. Ne sont présentés ici que les spectromètres de masse équipés d'analyseurs dits « quadripolaires » qui représentent la très grande majorité des analyseurs utilisés en couplage GC-MS pour trois raisons principales : leur « vitesse de balayage » très élevée, leur coût raisonnable et leur facilité de maintenance. Ces spectromètres sont équipés de systèmes de pompage assurant un vide de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$  mbar. La qualité du vide est un facteur déterminant pour l'analyse. Il s'agit d'évacuer les molécules résiduelles telles que l'azote, l'oxygène et l'eau atmosphériques ainsi que les molécules éluées du chromatographe qui, pour la plupart, n'auront pas été ionisées (les rendements d'ionisation sont très faibles) et qui pourraient polluer le spectromètre de masse. Il s'agit

également de garantir le bon fonctionnement du filament et du multiplicateur d'électrons qui sont extrêmement fragilisés par une pression trop élevée.

### La source

La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. La nature de la source utilisée dépend de l'état physique de la substance à analyser. On peut ainsi utiliser une source d'ionisation-désorption lorsque l'analyte est un solide, et une source d'ionisation-désolvatation lorsqu'il s'agit d'un liquide. En couplage avec un chromatographe en phase gazeuse, où les composés élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux, les sources utilisées sont dites à « ionisation électronique » ou à « ionisation chimique » ; on parle d'« EI » pour « electron ionization » et de « CI » pour « chemical ionization ». Leur usage est réservé à l'analyse des composés gazeux ou facilement volatilisables (point d'ébullition n'excédant pas 400 °C). La source est maintenue à une température élevée (généralement comprise entre 100 et 250 °C) pour éviter la condensation des analytes.

L'ionisation électronique consiste à « bombarder » les molécules par un faisceau d'électrons de haute énergie. L'« impact » d'un électron (on parle toujours d'« impact électronique » alors que les physiciens ont démontré l'impossibilité d'un réel impact) sur la molécule M a pour effet d'arracher un électron à cette dernière, conduisant ainsi à la formation d'un ion radicalaire  $M^{+\bullet}$ . L'énergie des électrons incidents est telle que l'ion  $M^{+\bullet}$  acquiert une grande quantité d'énergie interne qui l'amène généralement à se fragmenter spontanément en ions plus petits baptisés « ions-fils » ou « ions-fragments ». Les électrons sont produits par le chauffage d'un filament métallique (tungstène ou rhénium le plus souvent) et accélérés par une différence de potentiel de 70 V, ce qui leur confère une énergie cinétique de 70 eV. Le fait de disposer d'un standard mondial pour l'énergie des

électrons ionisants permet de comparer des spectres de masse réalisés sur différents appareils et d'avoir recours à des bases de données (comprenant plusieurs dizaines de milliers de spectres) dispensant d'interpréter les spectres obtenus pour identifier les analytes. Les algorithmes de recherche extraient des bases de données les composés dont les spectres de masse ressemblent le plus au spectre étudié et il est parfois difficile de trancher entre les solutions proposées. Les bases de données ne sont évidemment efficaces que si les spectres des composés étudiés y sont répertoriés. Lorsque ça n'est pas le cas, l'analyste doit tenter « d'interpréter » le spectre de masse, ce qui est souvent difficile ! L'universalité de l'ionisation électronique (la quasi-totalité des molécules sont « ionisables ») justifie l'immense succès de cette technique [4].

L'EI n'est pas le seul mode d'ionisation utilisé en couplage GC-MS ; l'ionisation chimique est également largement employée en complément de l'ionisation électronique. La CI est plus sélective et toutes les molécules éluées ne sont pas ionisées, ce qui peut constituer un avantage avec des échantillons particulièrement complexes. Comparée à l'EI, la CI est un mode d'ionisation « doux » : les ions  $MH^+$  obtenus en CI ont beaucoup moins d'énergie interne que les ions  $M^{+\bullet}$  produits par EI et se fragmentent donc beaucoup moins que ces derniers [5]. Le spectre d'IC informe presque toujours sur le poids moléculaire de l'analyte alors que celui d'EI fournit plus d'informations structurales mais pas de certitude sur le poids moléculaire. Par exemple, la *figure 5* compare les spectres de masse EI et CI de la molécule de venlafaxine. Le spectre de CI montre un ion  $MH^+$  majoritaire alors que l'ion moléculaire n'apparaît pas dans le spectre réalisé en EI. D'une façon générale, l'analyste n'a jamais la certitude que l'ion de rapport m/z le plus élevé est l'ion moléculaire dans un spectre d'EI, ce qui complique infiniment l'interprétation spectrale.

En CI, l'analyte n'est pas directement ionisé par les électrons. C'est un gaz R, dit « gaz réactant » qui, introduit dans la source, subit l'ionisation électronique. Ce gaz est à une pression telle que les ions  $R^{+\bullet}$  formés réagissent immédiatement avec les molécules R non ionisées pour former des ions  $RH^+$  à nombre pair d'électrons. Ce sont ces derniers qui, dans un deuxième temps, vont réagir avec l'analyte M en lui transférant un proton pour former des ions  $MH^+$ . Le transfert n'est évidemment possible que si l'affinité protonique de l'analyte (affinité de la molécule pour le proton, analogue de la basicité mais en phase gazeuse) se trouve supérieure à celle du gaz réactant. Si le gaz utilisé est, classiquement, du méthane, de l'isobutane ou de l'ammoniac, certains appareils permettent d'utiliser des liquides tels que le méthanol ou l'acétonitrile (on introduit dans la source la vapeur pompée en surface du liquide). Le choix du gaz réactant obéit à des critères chimiques précis [6]. Plus l'affinité protonique du gaz est élevée, plus le transfert de proton vers les analytes est difficile et, par conséquent, moins l'énergie interne des ions  $MH^+$  est élevée et moins ces derniers se fragmentent. En d'autres termes, on choisit un réactant à forte affinité protonique ( $NH_3$ ) si l'on ne souhaite pas fragmenter l'ion  $MH^+$  ; on a recours, au contraire, à un réactant de faible affinité protonique ( $CH_4$ ) si l'on veut dissocier cet ion pour obtenir un spectre de masse plus riche en informations structurales. Les affinités protoniques (en kJ/mol) des principaux réactants utilisés sont les suivantes : méthane : 550,1 ; méthanol : 760,3 ; acétonitrile : 787,5 ; isobutane : 818,9 et ammoniac : 852,7. La formation d'ions  $MH^+$  est souvent en compétition

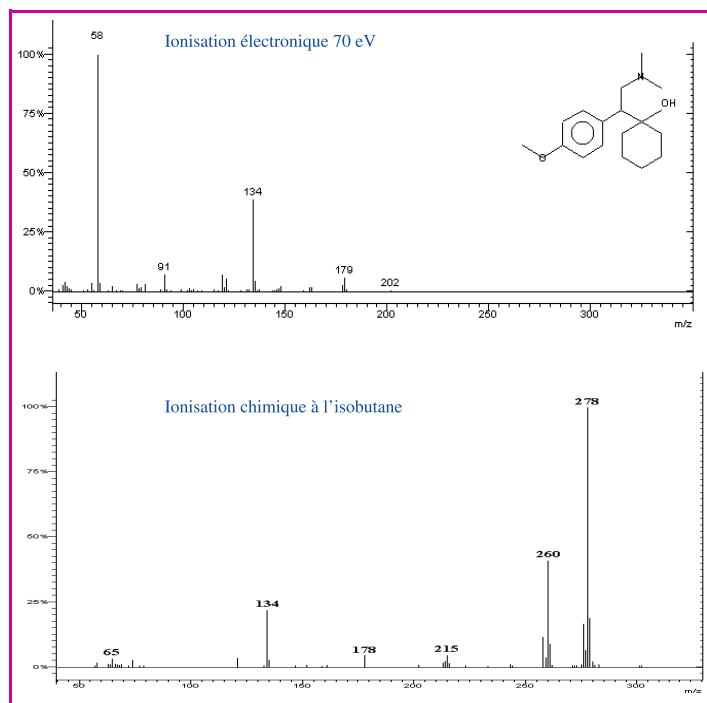


Figure 5 - Spectres de masse de la venlafaxine (PM = 277) en ionisation électronique et en ionisation chimique positive à l'isobutane.



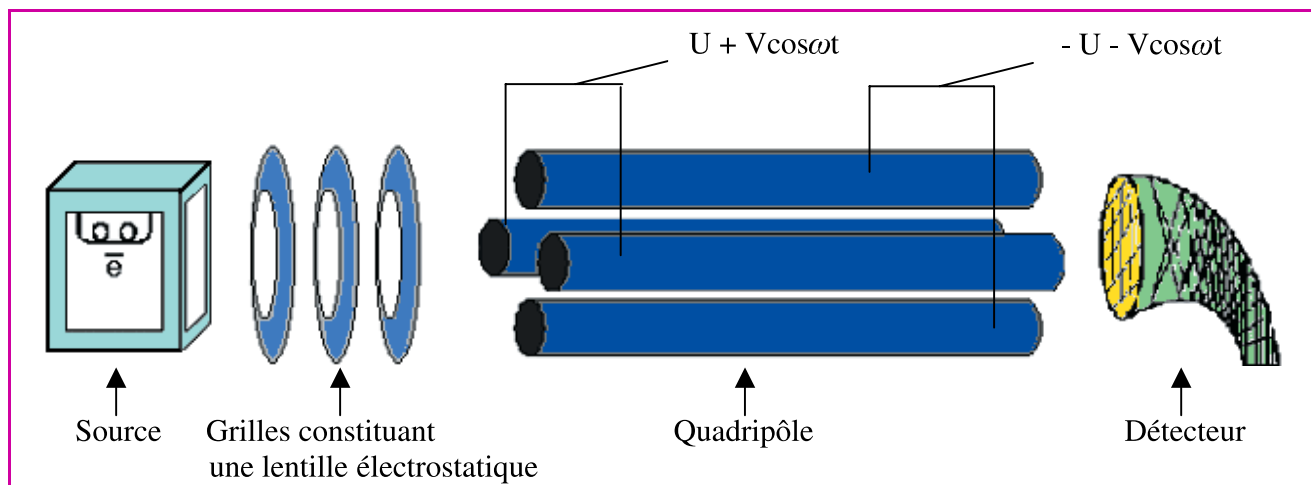


Figure 6 - Représentation simplifiée d'un quadripôle.

avec celles d'adduits. Ces derniers sont d'autant mieux observés que l'analyte est polaire et peu basique. Des adduits tels que  $[M+CH_3]^+$  avec le méthane ou  $[M+C_4H_9]^+$  et  $[M+C_3H_3]^+$  avec l'isobutane sont fréquemment observés, ils sont généralement moins abondants que les ions  $MH^+$ . L'ammoniac fournit, lui, un adduit  $[M+NH_4]^+$  souvent très abondant, parfois même plus que  $MH^+$ .

Plus anecdotique et un peu plus complexe à mettre en œuvre, l'ionisation chimique négative ne sera pas abordée ici ; elle est réservée à l'analyse de composés particulièrement électrophiles tels que certains halogénures et aromatiques.

### L'analyseur

L'analyseur sépare les ions produits par la source en fonction de leur rapport masse sur charge  $m/z$ . Dans un contexte de couplage GC-MS, on parle souvent abusivement de mesure de masse car  $z = 1$  (ou  $-1$ , beaucoup plus rarement, lorsque l'on utilise l'ionisation chimique négative), les ions étant trop petits pour être chargés plusieurs fois (on considère qu'en phase gazeuse un ion peut porter une charge pour environ 1 000 unités de masse).

Les analyseurs sont caractérisés par quatre paramètres : la résolution, la vitesse de balayage, la gamme de rapports masse/charge balayée et la transmission [7]. La résolution traduit la précision sur la mesure des rapports  $m/z$  des ions. Celle d'un analyseur dit « quadripolaire » est liée à sa vitesse de balayage en  $m/z$  : plus le balayage est rapide et moins bonne est la résolution. Avec un tel analyseur, on travaille le plus souvent avec une vitesse de balayage très élevée (jusqu'à 6 000 Thomson par seconde) et une résolution unitaire ; cela signifie que les rapports  $m/z$  des ions sont donnés sans chiffre après la virgule. En balayant beaucoup moins vite, on ne pourrait accéder qu'à deux chiffres significatifs sur la mesure des  $m/z$ , ce qui ne présente pas un grand intérêt en GC-MS dans la mesure où un rapport  $m/z$  avec deux chiffres significatifs ne permet pas de déterminer une formule brute. Balayer très vite permet en revanche l'enregistrement de plusieurs spectres par seconde et d'obtenir un tracé très précis des pics chromatographiques ; cela améliore la sensibilité et la résolution de l'appareil de GC-MS ainsi que la précision sur les dosages. Si la gamme de rapports  $m/z$  balayée par un analyseur quadripolaire peut atteindre 8 000  $m/z$ , elle est généralement limitée à

1 000  $m/z$  en couplage GC-MS où l'on analyse des composés volatils, donc de poids moléculaires faibles à moyens. La transmission caractérise la capacité de l'analyseur à conserver les ions entre leur formation et leur détection. Elle est difficile à évaluer car on ne connaît pas précisément la quantité d'ions formés en source.

Il existe deux catégories d'analyseurs quadripolaires : la première regroupe les quadripôles et la seconde est constituée des trappes ioniques (encore appelées « pièges à ions »).

### Quadripôles

Comme le montre la figure 6, un quadripôle est systématiquement associé à un système d'extraction et de focalisation des ions produits en source. Il s'agit le plus souvent d'un hexapôle ou d'une lentille électrostatique (analogue électrique d'une lentille optique). Le quadripôle est constitué de quatre électrodes métalliques parallèles raccordées électriquement deux à deux, de section idéalement hyperbolique. Ces électrodes sont cylindriques et longues de 12 à 20 cm selon les modèles. L'application d'un potentiel de type  $U + V\cos\omega t$  crée un champ quadripolaire entre les électrodes. Deux électrodes symétriques par rapport à l'axe central du quadripôle sont portées à un potentiel de type  $U + V\cos\omega t$ , les deux autres au même potentiel mais de signe opposé ( $-U - V\cos\omega t$ ).  $U$  et  $V\cos\omega t$  sont, respectivement, les composantes de tension continue et de tension alternative du potentiel de radiofréquence.  $V$  et  $\omega$  sont, respectivement, l'amplitude et la pulsation de la tension alternative. La valeur de  $\omega$  est fixée par le constructeur. Les polarités des électrodes sont rapidement inversées, ce qui confère aux ions un mouvement « en tire-bouchon » dont l'amplitude radiale dépend des paramètres  $U$  et  $V$ . Pour qu'un ion de rapport  $m/z$  donné ait une trajectoire stable dans le quadripôle et qu'il puisse ainsi atteindre le détecteur, il faut que les paramètres  $U$  et  $V$  soient tels que l'amplitude radiale de la trajectoire de l'ion soit inférieure à la distance séparant les électrodes. Dans la pratique, le quadripôle fonctionne comme un filtre à ions : on fait varier simultanément les valeurs de  $U$  et de  $V$  de manière à ce que les ions produits par la source soient stables à tour de rôle. A un instant  $t$  donné, ne sont détectés que les ions d'un rapport  $m/z$  donné. Les autres ions vont heurter les électrodes ou les parois internes du spectromètre ; ils se déchargent et sont entraînés par le système de pompage [8].

### Trappes ioniques

Il existe deux types de trappes ioniques en couplage GC-MS. Lorsque les ions sont produits dans une source analogue à celle d'un quadripôle avant d'être introduits dans la trappe, on parle de « trappe ionique à source externe ». Lorsque les ions sont directement produits au cœur de la trappe (la colonne chromatographique « arrive » dans la trappe), cette dernière joue tour à tour le rôle de source et d'analyseur ; on parle alors de « trappe ionique à ionisation interne ». Une trappe ionique est constituée de trois électrodes métalliques : une électrode annulaire et deux électrodes dites « chapeaux ». Des « séparateurs » ou « spacers » en forme d'anneau jouent le rôle d'isolants électriques entre ces électrodes (figure 7). Les deux électrodes chapeaux sont percées en leur centre, l'une pour permettre l'introduction séquentielle d'électrons ou d'ions (selon que l'ionisation est interne ou non), l'autre pour permettre l'éjection des ions vers le détecteur. Précisons que, quel que soit le lieu de l'ionisation, les trappes ioniques permettent, comme les quadripôles, de travailler en ionisation électronique ou chimique. Contrairement au quadripôle, la trappe ionique possède la capacité de stocker les ions : l'application d'une radiofréquence de type  $V\cos\omega t$  sur l'électrode annulaire produit un champ quadripolaire au sein duquel chaque ion acquiert un mouvement oscillant dont l'amplitude et la fréquence dépendent du rapport  $m/z$  de l'ion et de la valeur de  $V$ . Le champ quadripolaire n'est homogène qu'au centre de la trappe ionique. Il faut éviter que les ions ne s'approchent des électrodes sinon leurs trajectoires deviennent instables et ils ne sont plus piégés. Pour cela, on introduit dans l'analyseur de l'hélium à une pression partielle de  $10^{-3}$  torr. Les ions subissent de multiples collisions avec les atomes d'hélium, ce qui a pour effet de diminuer les amplitudes de leurs trajectoires et de les confiner au centre de l'analyseur. Lors de la phase d'éjection et donc de détection des ions, la valeur de  $V$  est progressivement augmentée alors qu'une radiofréquence de type  $V_2\cos\omega_2 t$  est appliquée entre les électrodes chapeaux. Le balayage de  $V$  amène tous les ions, tour à tour et par  $m/z$  croissant, en résonance avec  $V_2\cos\omega_2 t$ . Il y a alors augmentation brutale de l'amplitude de la trajectoire de l'ion et éjection de ce dernier vers le détecteur [9]. L'écart entre les électrodes n'étant que de quelques millimètres, le

volume disponible pour le piégeage des ions est faible. Les premières trappes ioniques n'ont pas rencontré le succès commercial escompté en raison de phénomènes d'espace de charge importants : la répulsion électrostatique exercée par chaque ion vis-à-vis des autres ions provoque des distorsions spectrales en fonction de la quantité d'analyte introduite. Les trappes ioniques sont aujourd'hui équipées de régulateurs automatiques de gain qui ajustent le nombre d'ions présents dans l'analyseur, en jouant sur la durée d'ionisation. Le spectre de masse est toujours enregistré à partir du même nombre d'ions, quelle que soit la quantité d'analyte injectée en chromatographie ; le tracé du chromatographe prend en compte le temps d'ionisation optimisé, de manière à conserver l'aspect quantitatif de la méthode. Grâce aux régulateurs électroniques de gain, les trappes ioniques fournissent aujourd'hui une reproductibilité spectrale satisfaisante, néanmoins inférieure à celle des quadripôles.

### Le détecteur

Le rôle du détecteur est double : détecter les ions proportionnellement à leur nombre et amplifier le courant correspondant (de l'ordre de  $10^{-12}$  ampères) pour le rendre détectable par l'électronique du système. La plupart des appareils de GC-MS sont équipés de détecteurs de type « chaneltron » tels ceux représentés sur les figures 5 à 7. Un « chaneltron » présente la forme d'un entonnoir courbe ou d'une corne d'abondance. L'intérieur est enduit d'un alliage plomb/oxyde de plomb qui a la propriété d'émettre des électrons sous l'effet d'un choc. Une différence de potentiel de 1 000 à 3 000 V est appliquée entre l'entrée et la sortie de l'entonnoir. Lorsqu'un ion vient heurter la paroi interne, il y a émission d'électrons qui, accélérés par la différence de potentiel, rebondissent de part et d'autre de la paroi. Chaque choc décroche de nouveaux électrons qui sont eux-même accélérés ; on parle de « cascade électronique ». Un « chaneltron » fournit un gain de l'ordre de  $10^5$ , c'est-à-dire que l'arrivée d'un ion est traduite par un courant de  $10^5$  électrons.

## Principaux modes d'analyse et exemples d'applications

### Analyses en balayage ou « fullscan »

Le mode dit « de balayage » ou « fullscan » est utilisé lorsque l'on souhaite enregistrer des spectres dits « de source », c'est-à-dire des spectres où sont présents tous les ions produits dans la source à un instant donné. On parle de « balayage » car l'obtention d'un tel spectre nécessite le balayage des tensions  $U$  et  $V$  du potentiel utilisé. Les spectres « de source » permettent l'identification des analytes. La plupart des utilisateurs de GC-MS utilisent des bases de données qui répertorient des dizaines de milliers de spectres de masse et qui permettent l'identification instantanée des molécules analysées (sous réserve, évidemment, que ces dernières aient été enregistrées dans ces bases de données). Lorsque les molécules étudiées n'ont pas été préalablement répertoriées (nouveaux produits de synthèse, métabolites...), l'identification doit se faire par déduction, à partir des ions observés. Ceci est souvent fastidieux et nécessite impérativement une formation spécialisée en spectrométrie de masse. Les techniques dites de « MS-MS », décrites ci-après, permettent d'assister l'interprétation

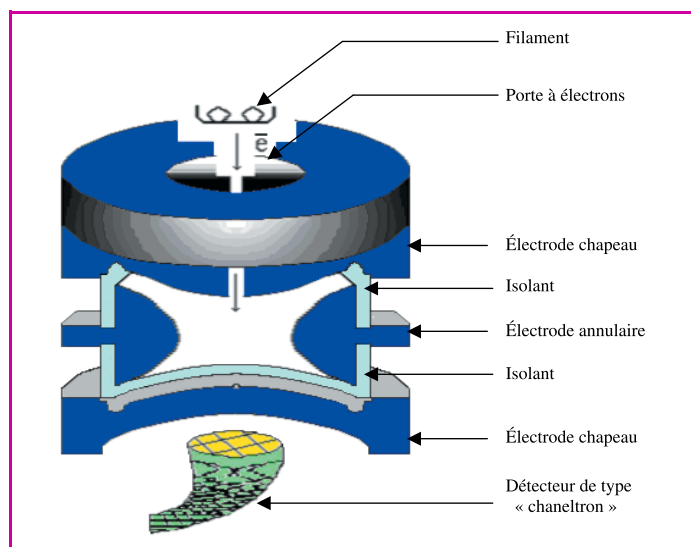


Figure 7 - Représentation simplifiée d'une trappe ionique.

des spectres de « source » ; il est généralement indispensable d'y avoir recours pour déterminer la structure d'un analyte. Précisons que chaque fois qu'il est possible, les laboratoires de chimie analytique associent la spectrométrie de masse à une autre technique d'identification, les plus courantes étant la RMN (résonance magnétique nucléaire) et la spectrophotométrie d'absorption. Les composés identifiés peuvent être quantifiés par GC-MS. Dans ce cas, l'intégration du pic chromatographique est réalisée sur le courant correspondant à un ion caractéristique de l'analyte. A titre d'exemple, la *figure 3b* montre comment, à partir du chromatogramme de la *figure 3a*, on peut observer sélectivement le pic correspondant à la molécule de clotiazépam en ne visualisant que le courant associé à la détection d'un ion caractéristique de cette molécule ( $m/z$  319). Même des produits co-élus peuvent ainsi être précisément quantifiés dès lors que leurs spectres de masse diffèrent d'au moins un ion.

### Analyses en « SIM » et « SIS »

Le terme « SIM » (« single ion monitoring ») est employé par les utilisateurs de quadripôles pour désigner l'opération qui consiste à ne détecter qu'un (ou quelques) ion(s). Le terme « SIS » (« single ion storage ») désigne la même opération sur une trappe ionique. En SIM ou en SIS, le spectromètre de masse fonctionne comme un filtre ; il est programmé pour ne détecter que quelques ions caractéristiques des analytes étudiés (1 à 4 en général). Le gain de sensibilité est spectaculaire car SIM et SIS augmentent le signal associé à la détection des analytes tout en diminuant le bruit de fond chromatographique. Avec un quadripôle, la durée du balayage des ions est proportionnelle à la gamme de rapports  $m/z$  balayée ; opérer sur peu de valeurs de  $m/z$  augmente donc considérablement le temps imparti à la détection des ions correspondants, comparativement au mode « fullscan ». Parallèlement, l'élimination des ions indésirables (ions issus de la phase stationnaire de la colonne chromatographique ou d'impuretés de l'échantillon) supprime le « bruit de fond » constitué par ces derniers, ainsi que les pics chromatographiques associés aux molécules parasites. On dit que la détection est « sélective ». En trappe ionique, le SIS diminue les seuils de détection car l'élimination des ions « parasites » libère de l'espace pour stocker plus d'ions d'intérêt dans l'analyseur. SIM et SIS sont très performants dans le cadre de la détection de traces en milieux complexes et sont ainsi particulièrement utilisés en analyses environnementales et toxicologiques.

### Analyses en MS/MS

Si le SIM et le SIS sont très performants en termes de sélectivité et de sensibilité, ils fournissent des spectres de masse peu intéressants pour caractériser les analytes car pauvres en ions. La technique MS/MS (on parle aussi de spectrométrie de masse « en tandem ») allie les avantages du SIM et du SIS à ceux du « fullscan » ; elle est sélective, sensible, et fournit des spectres de masse suffisamment riches en ions pour caractériser un analyte sans ambiguïté. La MS/MS ne peut être opérée sur un simple quadripôle et nécessite un triple quadripôle tel que celui présenté sur la *figure 8*. Elle est aisée à mettre en œuvre en trappe ionique, sans modification du spectromètre.

Un protocole de MS/MS comporte trois étapes : (i) isolation d'un ion caractéristique de l'analyte (ion « précurseur »), (ii) fragmentation de cet ion par collisions

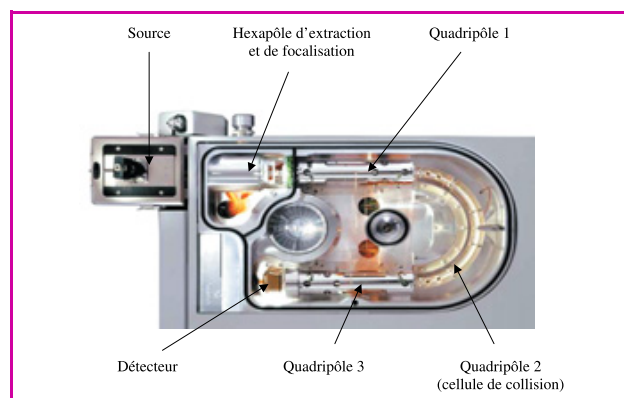


Figure 8 - Photographie d'un triple quadripôle (avec l'aimable autorisation de la société Varian).

dans un gaz inerte et (iii) balayage et détection des ions fragments obtenus. Les trois étapes sont séparées dans l'espace avec un triple quadripôle (une étape par quadripôle) et elles sont séparées dans le temps avec une trappe ionique. La première étape s'apparente au SIM ou au SIS : on y sélectionne les ions précurseurs correspondant à un  $m/z$  donné. La seconde est l'étape dite « de collisions ». Avec un triple quadripôle, les ions sélectionnés par le premier quadripôle (Q1) subissent des collisions avec des atomes de gaz (généralement de l'argon) introduits dans le second quadripôle (Q2). Les chocs augmentent l'énergie potentielle des ions, ce qui conduit à leur dissociation dans Q2. Dans une trappe ionique, on accélère les ions sélectionnés afin que les collisions avec les atomes d'hélium présents (voir précédemment) deviennent suffisamment violentes pour conduire à la fragmentation des premiers. Avec un triple quadripôle, un balayage « classique » (voir précédemment) du troisième quadripôle (Q3) permet de séparer les ions fragments issus de Q2. Le maximum de sensibilité est obtenu lorsque Q3 est opéré en SIM sur quelques fragments. On parle alors de « MRM » pour « multiple reaction monitoring ». En trappe ionique, la troisième étape de la MS/MS consiste en un balayage classique de la radiofréquence de piégeage (voir ci-dessus). Il existe d'autres modes d'analyse MS/MS tels que la recherche d'ions précurseurs en triple quadripôle ou la « MS<sup>n</sup> » en trappe ionique. Ceux-ci sont surtout utilisés en analyse structurale pour l'élucidation de structures inconnues (comme, par exemple, de métabolites) et pour la détermination de mécanismes réactionnels. Les principes et applications de ces techniques, ainsi que les avantages et inconvénients de chaque type d'analyseur quadripolaire, ont été présentés dans un précédent article [7].

La MS/MS est la technique « reine » pour les investigations en toxicologie clinique et judiciaire, tant en analyse structurale qu'en applications quantitatives. A titre d'exemple, la *figure 9* compare les chromatogrammes réalisés en « fullscan » et en MS/MS d'un extrait urinaire. La présence de LSD (acide lysergique diéthylamide), impossible à détecter en « fullscan », est très clairement mise en évidence en MS/MS.

### Conclusion

Les limites de la GC-MS sont celles de la chromatographie en phase gazeuse. Le facteur limitant étant la volatilité des analytes, cette technique est réservée à l'analyse de molécules aisément vaporisables et thermiquement stables,

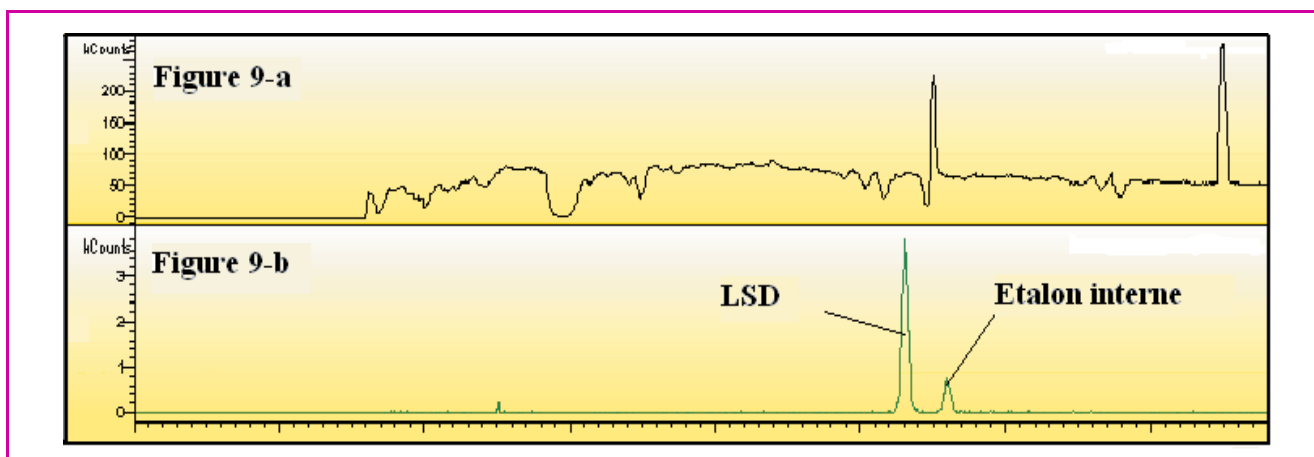


Figure 9 - Chromatogrammes d'un extrait urinaire réalisés en ionisation chimique positive (affaire de police, recherche de LSD).  
**9a** - Chromatogramme enregistré en « fullscan » : le LSD n'apparaît pas, le bruit de fond est très élevé.  
**9b** - Chromatogramme enregistré en MS/MS avec activation de l'ion  $m/z$  324 (ion  $MH^+$  du LSD et de l'étalon interne, isomère du LSD).

c'est-à-dire, en première approximation, de composés de poids moléculaire faible à moyen (inférieur à 700 Da). Ces limites admises, la GC-MS est un formidable outil d'analyse. La diversité des modes d'injection et des colonnes capillaires (géométrie, nature de la phase stationnaire) autorise la séparation de mélanges extrêmement complexes (huiles essentielles, métabolites, hydrocarbures...). Contrairement aux autres détecteurs, le spectromètre de masse fournit des informations structurales sur les analytes étudiés et peut permettre leur identification instantanée si ceux-ci sont répertoriés dans des bibliothèques de spectres. Le spectromètre de masse permet également de quantifier les analytes, même co-élués, à des concentrations inférieures au ng/L. C'est sa capacité à détecter spécifiquement une ou plusieurs molécules au sein d'un échantillon très complexe qui en fait un détecteur idéal pour l'analyse de traces en toxicologie, pharmacologie et médecine, environnement, pétrochimie, synthèse organique.

### Références

- [1] Tranchant J., *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*, Masson, 1995.
- [2] Rouessac F., Rouessac A., *Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes (5<sup>e</sup> ed.)*, Dunod, 2000.
- [3] Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T., Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques, *Spectra Analyse*, 1999, 207, p. 11.
- [4] De Hoffman E., Charette J., Stroobant V., *Spectrométrie de masse. Cours et exercices corrigés*, Dunod, 1999.

- [5] Longevialle P., *Principes de la spectrométrie de masse des substances organiques*, Masson, 1981.
- [6] Harrison A.G., *Chemical Ionization Mass Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1992.
- [7] Bouchonnet S., Comparaison des performances des analyseurs quadripolaires en spectrométrie de masse : trappes ioniques versus quadripôles, *Spectra Analyse*, 2001, 222, p. 11.
- [8] Dawson P.H., *Quadrupole mass spectrometry and its applications*, Elsevier Scientific Publishing Company, 1976.
- [9] March R.E., An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry*, 1997, 32, p. 351.



S. Bouchonnet

#### Stéphane Bouchonnet

est ingénieur de recherche à l'École polytechnique à Palaiseau\*.

#### Danielle Libong

est étudiante en thèse dans ce même laboratoire.



D. Libong

\* Département de chimie, Laboratoire des mécanismes réactionnels, École polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex.

Courriel :

stephane.bouchonnet@dcmr.polytechnique.fr

Vous avez un article, une information, un courrier... à nous proposer ?  
 N'hésitez pas à contacter la rédaction de L'Actualité Chimique  
 Courriel : ac@sfc.fr