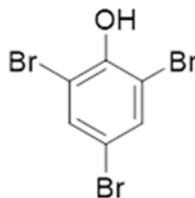


CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

1. Dessiner le spectre de masse, obtenu par ESI dans le mode négatif, du 2,4,6-tribromophénol. Identifiez tous les pics du spectre de masse ayant une intensité relative > 1%. Masse du proton = 1.007276 Da.



Abondance des isotopes

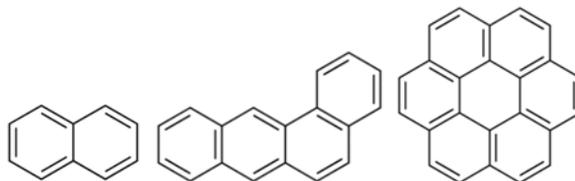
Classification	Atomic symbol	Atomic number Z	Mass number A	Isotopic composition	Isotopic mass [u]	Relative atomic mass [u]
(X) ^a	H	1	1	100	1.007825	1.00795
			2	0.0115	2.014101	
X+1	C	6	12	100	12.000000 ^b	12.0108
			13	1.1	13.003355	
(X+2) ^a	O	8	16	100	15.994915	15.9994
			17	0.038	16.999132	
			18	0.205	17.999116	
X+2	Cl	17	35	100	34.968853	35.4528
			37	31.96	36.965903	
X+2	Br	35	79	100	78.918338	79.904
			81	97.28	80.916291	

2. Quelle résolution minimale est nécessaire pour séparer l'ion monoisotopique $[M+H]^+$ du clenpentérol ($C_{13}H_{20}Cl_2N_2O$, $m/z_{théo}$ 291.1025) de celui du triméthoprime ($C_{14}H_{18}N_4O_3$, $m/z_{théo}$ 291.1452)?

Clenpentérol

Triméthoprime

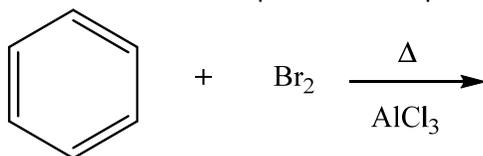
3. Quelle est l'exactitude sur la masse (en mDa) de la mesure du m/z du clenpentérol si la valeur expérimentale est m/z 291.1035? Et en ppm? (Utiliser la valeur théorique du clenpentérol donnée à l'exercice précédent).
4. Vous faites un stage en un laboratoire qui réalise des analyses par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) de sédiments de rivière contaminés. Dans votre projet, les analytes d'intérêt sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), spécialement ceux de la figure ci-dessous.



Structures moléculaires du naphtalène, du benzo[a]anthracène et du coronène, respectivement.

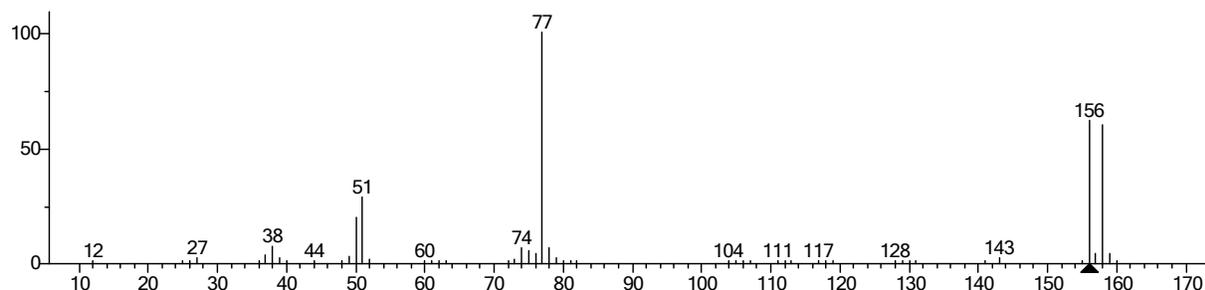
CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

- Parmi les sources discutées en classe, laquelle est la plus adéquate pour ioniser ces composés? Justifiez votre réponse et faites un schéma du fonctionnement de cette source.
 - Dessinez le patron isotopique attendu pour l'ion le plus abondant du coronène. Identifiez les axes et la composition de chacun des pics principaux avec une intensité relative supérieure à 0.1%. Supposez que vous utilisez un quadripôle comme analyseur de masse.
 - On vous demande d'ajouter des étalons internes pour réaliser la quantification de vos analytes. Quelle est la fonction de l'étalon interne dans l'analyse quantitative? Proposez un composé pouvant agir comme étalon interne pour l'analyse par GC-MS du naphthalène et indiquez ses propriétés principales. Justifiez votre réponse.
5. Identifier les pics observés dans le spectre de masse de l'azithromycine (m/z 375.3531, m/z 749.5188 et m/z 771.4997, voir diapositives du cours) et expliquer leur formation.
6. Vous faites un suivi de la réaction de substitution électrophile aromatique suivante par GC-MS :

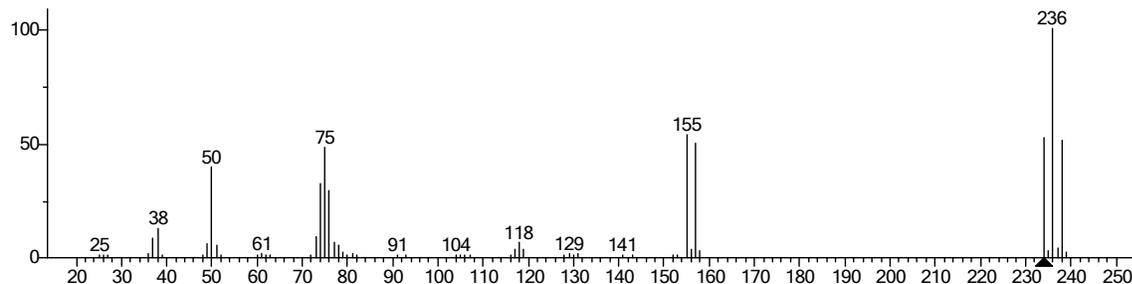


Dans le spectre de masse du mélange après la réaction vous observez deux pics chromatographiques avec les spectres de masse suivants :

Pic #1



Pic #2

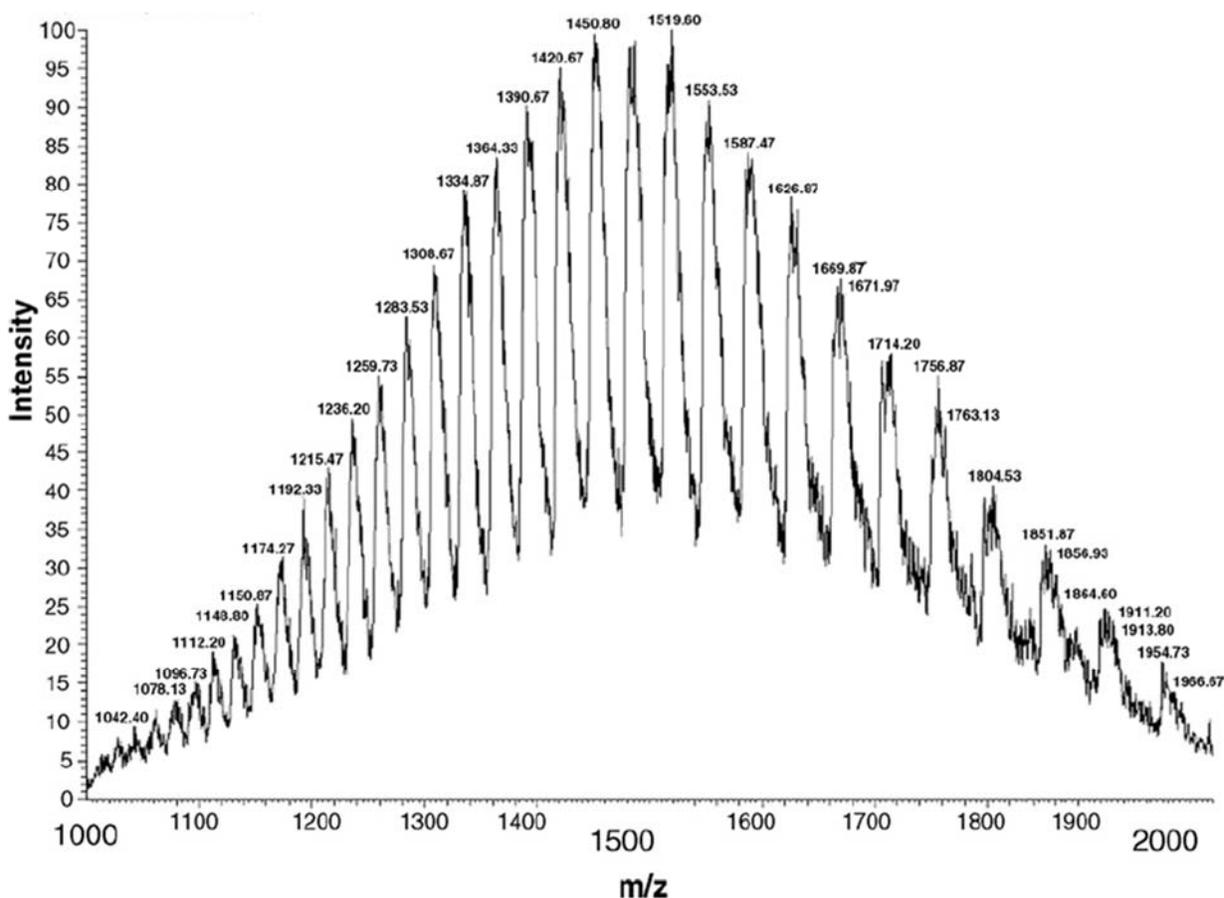


Vous constatez que le pic #1 a un signal plus élevé que le pic #2. Quel composé est le produit majoritaire?

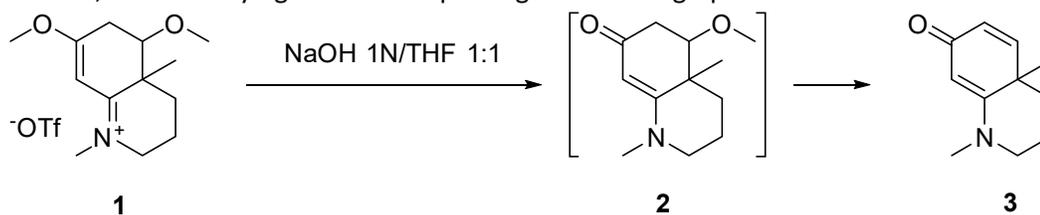
7. Déterminer la masse moléculaire de l'albumine de sérum bovin en utilisant son spectre de masse obtenu par ESI-TOF. m_{H^+} : masse du proton=1.00728 Da.
- Déterminer la masse moléculaire de cette protéine. Expliquez votre démarche et comparez votre résultat à une valeur de référence.
 - Quel est le nombre de charges minimum et maximum observé dans le spectre?

CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

- c. Quel modèle d'ionisation en ESI explique la formation des ions observés dans le spectre de masse? Expliquez.

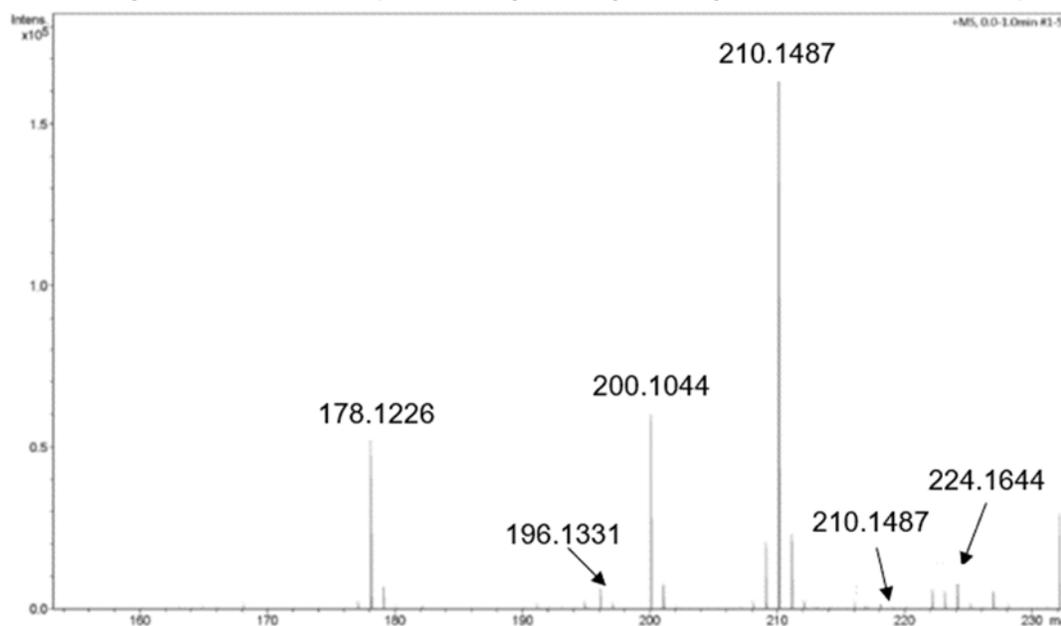


8. Vous travaillez dans un laboratoire de synthèse organique dans une entreprise privée et on vous a assigné un projet sur l'hydrolyse d'un iminium dans le but de former un squelette présent dans différentes classes d'alcaloïdes. Vous avez observé qu'une des seules conditions qui fonctionne est en un milieu aqueux basique. Dans ces conditions, l'amide vinylogue **2** formée peut également réagir pour former la molécule **3**.



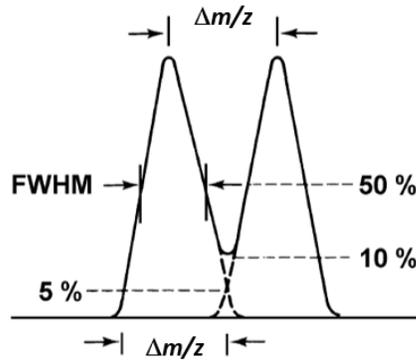
Afin de faire un suivi de la réaction, vous diluez votre mélange réactionnel dans une solution de 0.1 % acide formique dans MeOH-H₂O (1:1, v/v) et vous l'analysez directement par ESI-QqTOF. Vous observez le spectre de masse suivant :

CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)



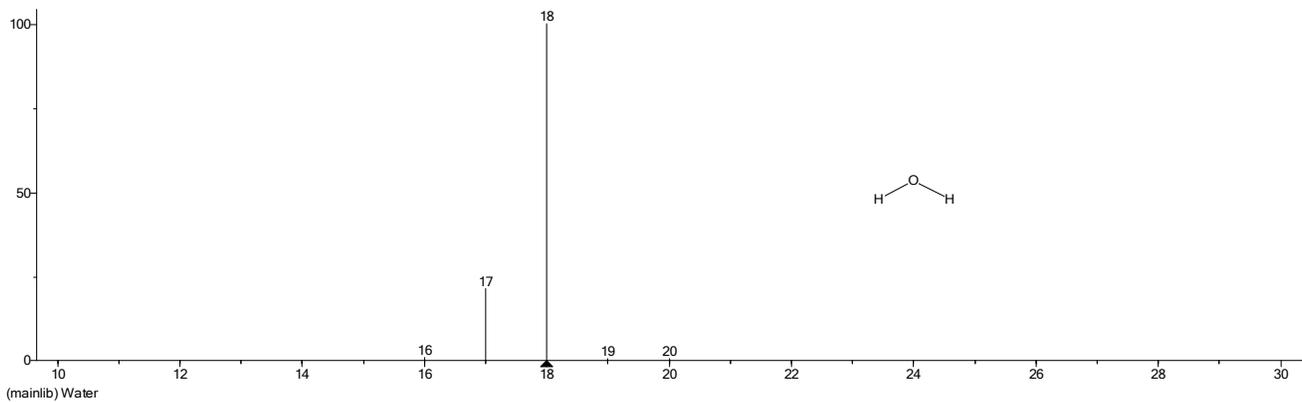
- a. Le responsable de la plateforme de spectrométrie de masse de votre entreprise vous a suggéré d'utiliser ESI comme source d'ionisation. Est-ce que la source d'impact électronique (EI) serait aussi un bon choix pour faire le suivi de votre réaction ? Expliquez.
 - b. En ionisation par électronébulisation (ESI), des ions adduits sont souvent observables. Expliquez la formation de ce type d'ion et déterminez s'ils sont présents dans votre spectre. À l'aide du spectre de masse, déterminez l'erreur sur la masse en ppm pour la molécule 2.
 - c. Le patron isotopique théorique de la molécule 3 correspond-il bien au patron isotopique expérimental? Expliquez.
9. La mission spatiale Rosetta (2004-2014) de l'Agence Spatiale Européenne a eu comme objectif l'obtention de données sur la composition du noyau de la comète 67P/Churyumov-Gerasimenko. Le 12 novembre 2014, le module *Philae* de la sonde spatiale Rosetta a fait contact avec cette comète. Philae était équipé de plusieurs instruments d'analyse dont l'analyseur de gaz *Cometary Sampling and Composition* (COSAC) muni d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse de type temps de vol (GC-TOF). Grâce aux analyses faites par COSAC, l'équipe de l'Agence Spatiale Européenne a détecté 16 composés dont quatre (acétone, isocyanatométhane, propanal et acétamide) n'avaient été pas reportés auparavant dans les comètes.
- a. Expliquez le fonctionnement d'un TOF avec réflectron et utilisez un schéma pour illustrer votre explication.
 - b. COSAC était muni d'une source d'impact électronique. Expliquez à l'aide d'un schéma le fonctionnement de cette source d'ionisation.
 - c. D'après l'équipe qui a conçu COSAC, la R_{FWHM} de cet instrument était ≈ 300 à m/z 28. Pour cette raison, les auteurs affirment que « les pics correspondant aux espèces moléculaires telles que CO, N₂ et C₂H₄ ne peuvent pas être résolus ». Expliquez à l'aide des équations vues en classe et de la figure ci-dessous cette affirmation.

CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)



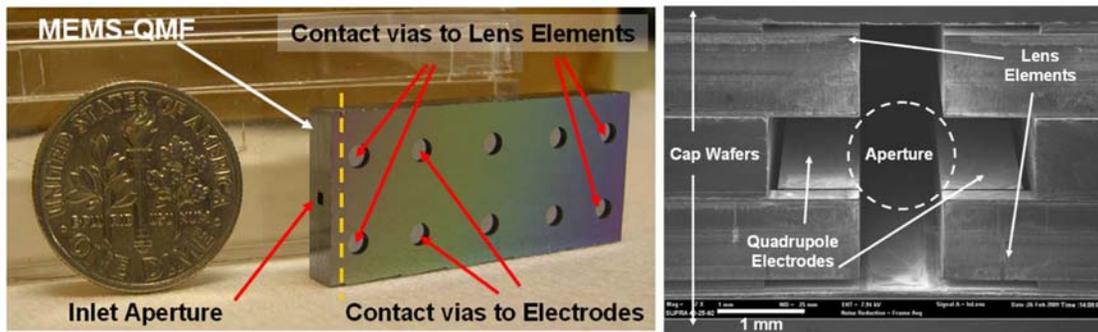
Note : Pour avoir deux pics complètement séparés, il faut que la $\Delta m/z$ entre deux pics soit égale ou supérieure à la largeur du pic à 10% de sa hauteur. Pour les pics gaussiens, la résolution à 10% ($R_{10\%}$) $\approx 1.8 \times R_{FWHM}$.

- d. L'absence des espèces telle que NH_3 dans les résultats obtenus par COSAC a surpris les chercheurs, puisque NH_3 est une composante connue de la glace cométaire. D'après les auteurs, la détection de faibles quantités de NH_3 a été difficile par la présence d'eau. Expliquez ce fait à l'aide du spectre de masse de l'eau.



Spectre de masse de l'eau obtenu par EI.

10. Le développement des systèmes microélectromécaniques (*Micromechanical systems* ou MEMS) depuis les années 1980 a révolutionné l'industrie électronique. Les MEMS sont des machines de taille microscopique capables réagir à des stimuli. Par exemple, un des premiers MEMS développés a été un accéléromètre, un dispositif capable de détecter les changements soudains de vitesse. Aujourd'hui, les MEMS sont omniprésents dans les sociétés modernes : les automobiles, les téléphones, et les montres intelligentes utilisent des MEMS. En 2010, une équipe du MIT aux États-Unis a développé un micro-quadripôle utilisant la technologie de fabrication des MEMS.



(Gauche) Photographie du quadripôle MEMS. (Droite) Image obtenue par microscopie électronique de balayage de la coupe transversale du quadripôle indiqué par la ligne pointillée de l'image à gauche.

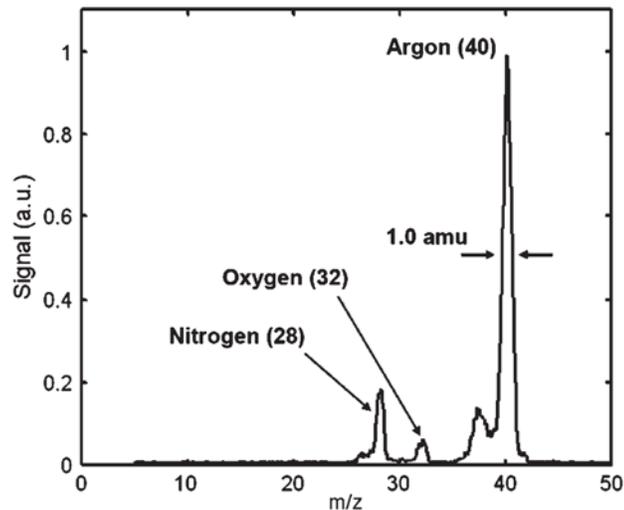
CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

- a. Expliquez à l'aide du diagramme de stabilité pour un quadripôle pourquoi les valeurs des paramètres a et q doivent être respectivement 0.237 et 0.706 pour qu'un ion de m/z donné soit détecté avec un maximum de résolution.
- b. Les auteurs indiquent que dans ce type de système, la résolution est déterminée par l'équation suivante :

$$R_{(FWHM)} \approx \frac{1}{h} \left(f \frac{L}{v_z} \right)^2$$

où h indique une constante de performance que pour ce système est de 15, L indique la longueur du quadripôle, f la fréquence d'opération et v_z la vitesse de l'ion. Quelle devrait être la longueur minimale du quadripôle afin d'avoir la résolution indiquée sur la figure ci-dessous?

- c. Quelle devrait être la distance maximale ($2 \times r_0$) entre les électrodes du quadripôle si l'on désire pouvoir transmettre des ions de m/z 400 en utilisant un potentiel alternatif maximal de 150 V à une fréquence linéaire f de 4 MHz?



Spectre de masse obtenu avec le quadripôle MEMS de l'argon contaminé par une fuite d'air mesuré à une fréquence linéaire f de 4 MHz. L'énergie cinétique des ions était de 3 eV. La largeur à mi-hauteur du pic de l'ion $\text{Ar}^{+\bullet}$ est de $\Delta m/z=1$.

11. Parmi les ions m/z 51, m/z 102 et m/z 199, :
- Lesquels seront transmis par le quadripôle de $r_0 = 0.26$ cm fonctionnant avec les conditions suivantes : $U=166$ V, $V=993$ V, $\omega=14.2 \times 10^6$ rad s^{-1} .
 - Quels ions seraient transmis si l'on utilise les mêmes paramètres, sauf $U=0$ V et $V=300$ V?
12. L'évaluation de la santé des tissus avant une chirurgie chez les patients atteints de tumeurs malignes est essentielle pour enlever un maximum de tissu cancérigène et préserver le tissu sain. L'analyse moléculaire des tissus cancérigènes utilise des biomarqueurs du cancer, c.-à-d. des composés spécifiques au cancer, afin d'améliorer la détection et la diagnose de cette maladie.
- En 2017 une équipe américaine a publié un article décrivant le développement et application d'un nouvel instrument pour l'échantillonnage et diagnose moléculaire non-destructive des tissus en temps réel. Cet instrument a été appelé le « MasSpec Pen » et consiste en une sonde portable branchée à un spectromètre de masse de haute résolution (Voir la figure suivante).
- La sonde est conçue avec un embout en polydiméthylsiloxane et trois conduits en polytétrafluoroéthylène, qui permettent l'entrée et sortie de l'eau et du gaz nécessaires à l'échantillonnage de tissus. La pointe du MasSpec Pen entre en contact avec le tissu pour analyse (Figure 6, C). L'encadré de la Figure 6C montre les trois conduits (#1 à #3) et le réservoir de solvant (#4) dans la pointe du MasSpec Pen. Lorsque le système est déclenché ($t = 0$ s) à l'aide de la pédale, une pompe fournit un volume contrôlé d'eau au réservoir par le conduit # 1. La goutte d'eau interagit avec le tissu et extrait des molécules en contact avec celui-ci ($t = 2$ s). Après 3 s d'extraction, les conduits # 2 (entrée de gaz) et #3 (sortie de l'eau et du gaz) sont simultanément ouverts pour transporter la gouttelette

CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

portant les molécules extraites de la sonde au spectromètre de masse à travers le système de tubulure pour analyse moléculaire. Les auteurs ont réalisé des analyses en mode MS et MS/MS à une résolution $R_{FWHM}=140000$ pour identifier les composés échantillonnés.

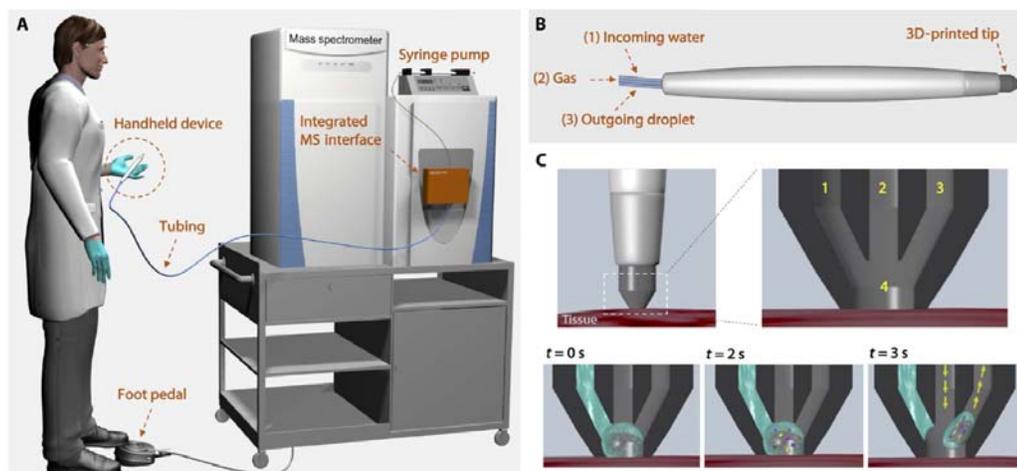
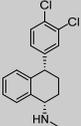
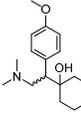
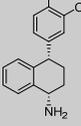
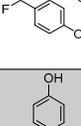
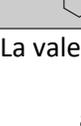


Schéma montrant la sonde MasSpec Pen et le spectromètre de masse. **A** : opérateur avec la sonde MasSpec Pen dans sa main. **B** : composants (conduits et réservoir) de la sonde. **C** : processus d'échantillonnage de molécules dans les tissus par l'eau. Les molécules extraites des tissus solubilisées dans l'eau sont ensuite introduites dans le spectromètre de masse par l'action du gaz.

- Expliquez, à l'aide d'un schéma, comment le rapport m/z des ions est mesuré dans un analyseur de masse de type orbitrap.
 - Les auteurs ont fait les analyses avec spectromètre de masse hybride de type quadripôle-orbitrap dans le mode MS^1 (c.-à-d. le quadripôle sert de guide ionique uniquement, permettant la transmission de tous les ions formés à partir des molécules extraites à l'analyseur de masse orbitrap). Expliquez à l'aide du diagramme de stabilité, comment un quadripôle peut servir de guide ionique.
 - Si la distance entre les tiges du quadripôle utilisé dans le spectromètre de masse est de 5 mm et l'amplitude du voltage alternatif est de 725 V avec une fréquence linéaire de 2.5 MHz, calculez la limite inférieure de m/z qui peut être transmise par le quadripôle en sachant que la valeur maximale de q pour qu'un ion puisse avoir une trajectoire stable en x et y est 0.908.
- 13.** Dans l'étude de la question précédente, les auteurs ont indiqué qu'une source d'ions n'avait pas été utilisée puisque les molécules échantillonnées par la sonde MasSpec Pen sont transformées en ions dans la phase gazeuse par des processus de désolvatation et d'ionisation (p. ex. équilibre acide base, association de cation ou anion) à l'entrée du spectromètre de masse. Dans le mode négatif, principalement des molécules déprotonées ont été observées (voir la figure suivante). Dans le mode positif, les ions observés ont été des adduits de sodium et de potassium.
- S'agit-il d'un processus d'ionisation douce ou dure? Expliquez les différences entre l'ionisation douce et dure et donnez des exemples des sources d'ions de ces types.
 - Calculez l'exactitude sur la masse des ions de la 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine en mDa et de l'acide palmitique en ppm.
 - Expliquez pourquoi l'instrument quadripôle-orbitrap est un excellent choix pour identifier des biomarqueurs du cancer dans les tissus échantillonnés par la sonde MasSpec Pen. Écrivez votre réponse en vous basant sur les propriétés et caractéristiques de cet analyseur de masse hybride et les contraintes de l'analyse directe (sans séparation chromatographique) faite par les auteurs.

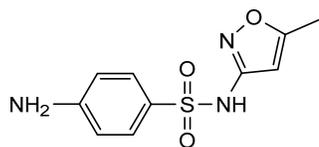
CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

Antidépresseur	Ion précurseur (m/z)	Ions produits* (m/z)	Transition SRM ● → ● (m/z)	Temps de rétention (min)
 Sertraline	306	306 (5%) 275 (100%) 159 (10%)	306 → 275	22.5
 Venlafaxine	278	278 (30%) 260 (100%) 215 (10%)	278 → 260	14.5
 Desméthylsertraline	292	292 (40%) 277 (65%) 275 (100%) 159 (5%)	292 → 275	22.5
 Fluoxétine	310	310 (5%) 290 (10%) 231 (100%)	310 → 231	17.1
 Desméthylvenlafaxine	264	264 (30%) 246 (100%) 201 (5%)	264 → 246	11.1

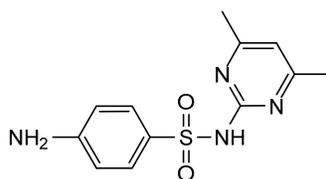
*La valeur entre parenthèses indique l'abondance relative de chaque ion produit avec l'énergie de collision utilisée.

- À l'aide du diagramme de stabilité, expliquez le fonctionnement d'une expérience SRM et suggérez un instrument qui peut être utilisé pour faire ce type d'expérience MS/MS.
- Parmi les composés que vous devez étudier, lesquels pourraient être affectés par du cross-talk d'après vos conditions expérimentales ? Lesquels ne pourraient pas être affectés ? Expliquez.
- Proposez un moyen pour éliminer les effets du cross-talk durant vos analyses par LC-MS/MS.

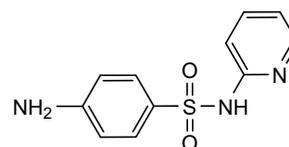
15. Vous vous intéressez à l'analyse de 3 sulfonamides (antibiotiques) dans le bœuf par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse à triple quadripôle (LC-QqQMS) utilisant une source ESI dans le mode positif.



Sulfaméthoxazole
 $t_R=2.5$ min



Sulfadimidine
 $t_R=4$ min

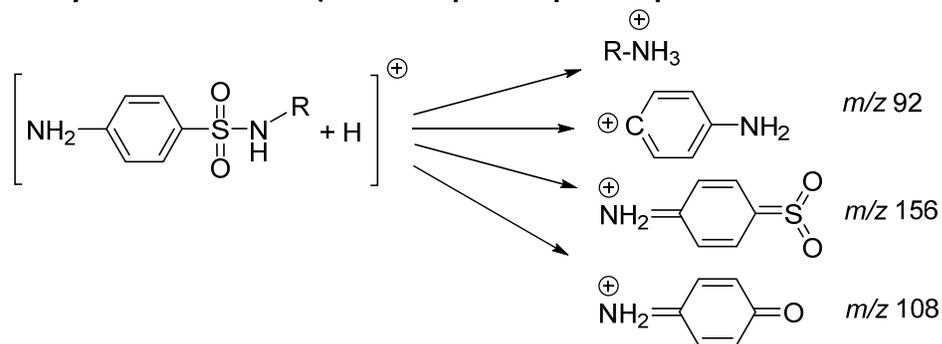


Sulfapyridine
 $t_R= 2$ min

Structures moléculaires des sulfonamides d'intérêt. Le temps de rétention est indiqué par t_R . La largeur des pics dans les chromatogrammes était de 0.2 min (mesurée à la base).

Les sulfonamides se fragmentent par dissociation induite par collision (CID) de la façon suivante:

CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)



Dessinez les chromatogrammes et spectres de masse correspondants d'un mélange de ces trois sulfonamides pour les expériences suivantes:

- Balayage des ions produits: m/z 279 \rightarrow m/z 50-300
- Balayage des ions précurseurs: m/z 50-300 \rightarrow m/z 156
- Suivi des réactions sélectionnées : m/z 254 \rightarrow m/z 156

16. Au Québec, la rainette faux-grillon de l'Ouest (*Pseudacris triseriata*, Figure 2) a un statut d'espèce vulnérable. La présence d'arbustes de nerprun bourdaine (*Frangula alnus*, Figure 2) aux abords des étangs de reproduction de *P. triseriata* est préoccupante car *F. alnus* produit de l'émodine (Figure 3), un métabolite connu pour causer des malformations chez *P. triseriata* à des concentrations de l'ordre de $50 \mu\text{g L}^{-1}$. La surveillance de l'émodine dans les étangs pendant la saison de reproduction est alors essentielle pour identifier les zones les plus préoccupantes et réduire l'exposition des embryons de *P. triseriata* à l'émodine.

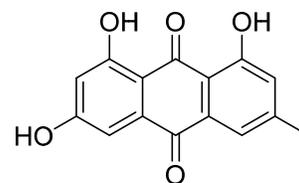


Figure 2. Photographies de la rainette faux-grillon de l'Ouest et du nerprun bourdaine. Sources : Wikimedia Commons (<https://commons.wikimedia.org/>); Flora-on (<https://flora-on.pt/?q=Frangula>)

Figure 3. Structure moléculaire de l'émodine (masse monoisotopique = 270.0528 Da). Ce composé a une température d'ébullition de $586.87 \text{ }^\circ\text{C}$ et une solubilité dans l'eau de 2.04 mg/L .

Une personne chargée de projets de conservation vous demande de l'assister dans le développement d'une méthode d'analyse quantitative de l'émodine dans les eaux d'étang de reproduction. Cette méthode sera appliquée à plus d'une quarantaine d'échantillons collectés en Montérégie. À cause de sa sensibilité, vous proposez une méthode de détection basée sur la spectrométrie de masse.

- Parmi les sources d'ionisation vues en classe (EI, APCI, ESI) laquelle serait plus adéquate pour ioniser l'émodine? Justifiez votre réponse. (3 points)
- Parmi les analyseurs de masse vus en classe (Q, TOF, QqQ, QqTOF, Q-Orbitrap, etc.) lequel serait plus adéquat pour détecter et quantifier l'émodine? Justifiez votre réponse. (3 points)
- Quel serait le rapport m/z de l'ion de l'émodine attendu selon votre réponse en a) et b) ? (1 point)

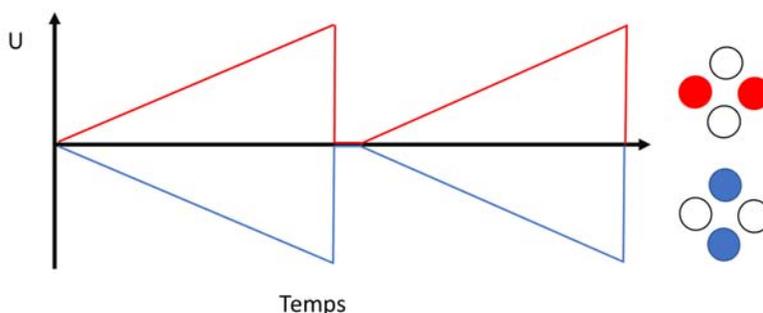
CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

- d) Les eaux d'étang de reproduction peuvent contenir des concentrations élevées de matière organique pouvant interférer avec l'analyse. Proposez un moyen de diminuer ces interférences. (3 points)
- e) Suggérez un type d'étalonnage pour cette analyse. Expliquez votre choix. (3 points)
- f) Quelle devrait être la limite de quantification de cette méthode? Justifiez votre réponse. (2 points)

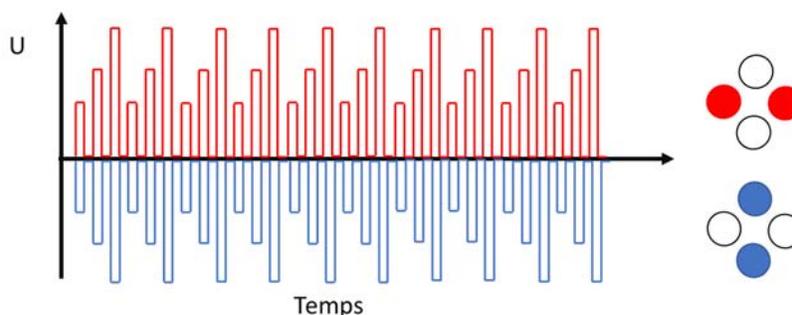
17. Depuis son introduction dans les années 1980, la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) est devenue la technique de choix pour la détermination des métaux et semi-métaux dans les matrices biologiques et environnementales.

- a. Expliquez pourquoi l'ICP-MS est généralement plus sensible que la spectroscopie d'émission à plasma à couplage inductif (ICP-AES).
- b. En ICP-MS l'analyseur de masse utilisé est généralement un quadripôle. Les figures ci-dessous illustrent deux modes de fonctionnement du quadripôle différents : le suivi des ions sélectionnés (*selected ion monitoring* ou SIM) et le balayage des masses (*mass scan*). Quel mode de fonctionnement est plus adéquat pour la quantification du fer, nickel et zinc en ICP-MS? Associez chaque mode à un diagramme et justifiez votre réponse.

A



B



Variation du voltage direct (U) appliqué aux tiges du quadripôle en fonction du temps de l'analyse. Les cercles à droite indiquent les tiges auxquelles le potentiel est appliqué (rouge pour potentiel positif et bleu pour potentiel négatif).

- c. En ICP-MS, une des interférences les plus notables pour l'analyse du fer est celle de l' ArO^+ . Une étude publiée en 1999 a exploré l'utilisation du quadripôle dans la zone de stabilité II pour améliorer la résolution en ICP-MS. Dans cette zone, il est possible d'atteindre une résolution à mi-hauteur du pic (R_{FWHM}) de 8800 à m/z 56. Cette résolution est-elle suffisante pour séparer ArO^+ de l'ion plus abondant de Fe? Comparez avec la résolution obtenue dans la zone de stabilité I. Justifiez votre réponse.

18. Identifier les ions susceptibles de causer une interférence spectrale dans un ICP-MS pour l'analyse des éléments suivants en supposant que l'instrument peut séparer des m/z d'une différence de ± 0.5 Da :

CAN 400 Analyse instrumentale (Exercices pour la partie Spectrométrie de masse)

Analytes	Ions potentiellement présents dans le système
^{75}As , ^{114}Cd , ^{98}Mo , ^{208}Pb , ^{51}V	$^{41}\text{K}_2^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$, $^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}^+$, $^{181}\text{Ta}^{16}\text{O}^+$, $^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^1\text{H}_2^+$, $^{37}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}_2^1\text{H}^+$, $^{100}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$, $^{81}\text{Br}^{17}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$,