



HAL
open science

**Analyse d'Acides Aminés non dérivés par
Chromatographie en Phase Liquide avec le Détecteur
Evaporatif à Diffusion de la Lumière et Couplage avec la
Spectrométrie de Masse**

Patrick Chaimbault

► **To cite this version:**

Patrick Chaimbault. Analyse d'Acides Aminés non dérivés par Chromatographie en Phase Liquide avec le Détecteur Evaporatif à Diffusion de la Lumière et Couplage avec la Spectrométrie de Masse. Autre. Université d'Orléans, 2000. Français. NNT : . tel-00152167

HAL Id: tel-00152167

<https://theses.hal.science/tel-00152167>

Submitted on 6 Jun 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE D'ORLEANS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS.

Discipline : Chimie et Physicochimie des Composés d'Intérêt Biologique.

PAR

CHAIMBAULT

PATRICK

**Analyse d'Acides Aminés non dérivés par Chromatographie en
Phase Liquide avec le Détecteur Évaporatif à Diffusion de la
Lumière et Couplage avec la Spectrométrie de Masse.**

Soutenue le : 8 Février 2000

MEMBRES DU JURY

M. André BRACK	Président	Directeur de Recherche au CBM, CNRS Orléans.
M. Alain TCHAPLA	Rapporteur	Professeur à L'Université d'Orsay.
M. Bernard SEBILLE	Rapporteur	Professeur à l'Université de Paris XII.
M. Michel DREUX	Examineur	Professeur à l'Université d'Orléans.
M. Michel LAFOSSE	Examineur	Professeur à l'Université d'Orléans.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA) dans le service de chimie analytique sous la direction du professeur M. DREUX que je remercie chaleureusement pour toute la confiance qu'il m'a apportée. Je tiens à associer à ces remerciements le professeur M. LAFOSSE, car ils ont su tous deux par leurs précieux conseils et enseignements, leur patience comme par la passion de leur métier susciter mon intérêt pour la recherche et la chimie analytique. Qu'ils soient pour toutes ces raisons assurés de mon plus grand respect et ma plus profonde reconnaissance !

Je souhaite également remercier le professeur G. GUILLAUMET, directeur de L'ICOA pour son accueil au sein de son institut.

Je remercie messieurs les professeurs A. TCHAPLA de l'université de d'Orsay et B. SEBILLE de l'Université de Paris XII de m'avoir fait le très grand honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. De même, j'adresse ma profonde gratitude à monsieur A. BRACK, directeur de recherche au Centre de Biophysique Moléculaire (CBM) du CNRS d'Orléans pour avoir accepté de juger ce même travail et pour avoir accepté d'en présider le jury.

J'adresse mes sincères remerciements à N. BROMET, directeur de la société BIOTEC Centre pour le soutien financier apporté au cours de ces trois années d'étude.

Je remercie tout particulièrement C. ELFAKIR pour sa gentillesse, sa grande disponibilité, ses précieux conseils et fructueuses discussions ayant contribué à l'aboutissement de ce travail ainsi que P. ALBERIC pour m'avoir permis à travers ses travaux sur les organismes marins de pouvoir appliquer de façon concrète une partie des recherches décrites dans ce mémoire. Je souhaite également associer à ces remerciements tous les autres enseignants chercheurs du laboratoire, Ph. MORIN, B. HERBRETEAU, S. GUENU.

Je remercie également tous les étudiants séjournant ou ayant séjourné au laboratoire, qu'ils soient doctorants, étudiants en DEA ou stagiaires. Vous aurez contribué tous à ce séjour agréable qui aura marqué ma mémoire. Je tiens à remercier plus particulièrement (le docteur)

Carole FRANCOIS, (les désormais docteurs) Arnaud SALVADOR, Jean-Philippe. MERCIER, (le futur docteur) Konstantinos PETRITIS (dit Kostas ou le Grec) pour leur étroite collaboration.

Je salue aussi mes autres collègues doctorants ou déjà docteurs : Xavier, Cécile, Sylvie, Isabelle sans oublier les stagiaires DEA (David, Christelle), IUP, IUT ou licence de chimie (Anne-Françoise, Victor), et CNAM (Philippe, Catherine, Christine, Véronique, Didier, Jean-Claude), les techniciens : Dany, Richard et Franck (dit le petit monsieur)... pour la bonne ambiance qu'ils ont su créer au laboratoire et un petit encouragement à mon successeur dans le sujet : Sylvain. J'aimerais aussi associer à ces remerciements Gérard et Maryline, techniciens à BIOTEC Centre.

A tous ceux que j'aurais oubliés au cours de ces remerciements et qui ont apporté quelque contribution à la bonne réalisation de ce travail, je vous prie de m'excuser et d'ajouter votre nom à cette liste :

Avant de refermer cette page de remerciements, je tiens à y inclure mes parents et frères sans le soutien desquels rien n'aurait été possible...

P. Chaimbault.



Introduction Générale

Introduction générale	9
-----------------------	---

Chapitre I : la détection par Spectrométrie de Masse

La détection par Spectrométrie de Masse	11
A] Le SPECTROMETRE de MASSE API-Triple Quadripôle	15
1) LES SOURCES D'IONISATION A PRESSION ATMOSPHERIQUE	15
1-1) L'IonSpray	15
1-2) Le Nébuliseur Chauffé	23
1-3) Respect de la polarité des composés à analyser	27
2) L'INTERFACE A RIDEAU DE GAZ	28
3) L'ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE ET APPAREIL TRIPLE QUADRIPOLE	31
3-1) Le Fonctionnement du Quadripôle	32
3-2) Spectromètre Triple Quadripôle et spectrométrie de masse tandem	34
B] Le COUPLAGE avec les METHODES SEPARATIVES	43
1) UNIVERSALITE DE DETECTION	44
1-1) Ionisation des solutés	44
1-2) Systèmes chromatographiques utilisables avec les techniques API	45
2) SENSIBILITE DE DETECTION	46
2-1) Sensibilité liée à l'ionisation	47
2-2) Fréquence d'acquisition d'un signal	51
2-3) Résolution	54
3) SPECIFICITE DE DETECTION	55
3-1) Mélanges simples	55
3-2) Mélanges complexes	61

C] ANALOGIE ENTRE LA DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET LA DETECTION PAR DIFFUSION DE LA LUMIERE	65
1) FONCTIONNEMENT DU DEDL	65
1-1) Principe de fonctionnement	65
1-2) Utilisation, domaine d'application	66
2) ANALOGIE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE	67
D] CONCLUSIONS	70
Références bibliographiques	73

Chapitre II: Les Acides Aminés et leurs Méthodes d'Analyse

A] GENERALITES	77
1) STRUCTURE DES ACIDES AMINES PROTEIQUES	77
2) QUELQUES FONCTIONS DES ACIDES AMINES PROTEIQUES	80
2-1) Fonctions des protéines et peptides	80
2-2) Fonctions des acides aminés libres	80
3) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	82
3-1) Ionisation	83
3-2) Lipophilie	88
3-3) Polarité	91
B] METHODES D'ANALYSE ACTUELLES DES ACIDES AMINES	93
1) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES UTILISANT UNE ETAPE DE DERIVATION. AVANTAGES ET INCONVENIENTS	93
2) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ANALYSE D'ACIDES AMINES NON DERIVES	96
2-1) Détection spectrophotométrique	97
2-2) Détections électrochimiques	97
2-3) Détection par diffusion de la lumière	98
2-4) Détection par Spectrométrie de Masse	99

3) CONCLUSIONS	100
C] CHOIX DES SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES	103
1) ADAPTATION DE SYSTEMES EXISTANTS	103
1-1) Chromatographie d'échange d'ions	104
1-2) Chromatographie de paire d'ions sur silices greffées apolaires	107
2) DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES SEPARATIFS UTILISANT UNE PHASE STATIONNAIRE EN CARBONE GRAPHITIQUE POREUX	119
D] CONCLUSIONS	113
Références bibliographiques	115

Chapitre III:
MISE AU POINT DE SEPARATIONS D'ACIDES AMINES NON DERIVES SUR CARBONE GRAPHITIQUE POREUX PAR CPL-DEDL

A] LE CARBONE GRAPHITIQUE POREUX	119
1) PRESENTATION GENERALE DU PGC	119
2) COMPORTEMENT ATYPIQUE ENVERS LES COMPOSES IONIQUES	121
B] CHROMATOGRAPHIE PAR COMPETITION D'INTERACTIONS ELECTRONIQUES	125
1) PHASES MOBILES SALINES	126
2) CONCLUSIONS	132
C] CHROMATOGRAPHIE DE PAIRE D'IONS AVEC LES ACIDES CARBOXYLIQUES PERFLUORES COMME AGENTS D'APPARIEMENT D'IONS VOLATILS	133

1) PERFORMANCES COMPAREES DES DIFFERENTS AGENTS D'APPARIEMENT D'IONS TESTES	133
1-1) Quantités de tensioactif adsorbées et temps d'équilibrages	134
1-2) Cas particulier de l'acide trifluoroacétique	136
1-3) Influence de la longueur de chaîne de l'agent d'appariement d'ions sur la rétention	138
2) ANALYSE ISOCRATIQUE DES 10 ACIDES AMINES LES PLUS HYDROPHILES	139
2-1) Avec les acides carboxyliques à longue chaîne (C ₆ et C ₇)	139
2-2) Avec les acides carboxyliques à chaîne moyenne (C ₃ et C ₄)	141
2-3) Influence de la température	144
3) SEPARATION DES 20 ACIDES AMINES PROTEIQUES EN GRADIENT D'ELUTION	145
3-1) Gradient de concentration de l'agent d'appariement d'ions	145
3-2) Gradient d'élution utilisant un modificateur organique	146
4) COMPARAISON DES ANALYSES REALISEES SUR PGC ET SILICES GREFFEES C8 OU C18	148
5) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	151
D) CONCLUSIONS	153
Références bibliographiques	155

<p>Chapitre IV: ANALYSES D'ACIDES AMINES NON DERIVES PAR CPL-SM ET CPL-SM TANDEM. DOSAGES DANS DES MATRICES BIOLOGIQUES.</p>

A) ANALYSE des 20 ACIDES AMINES PROTEIQUES	157
1) DETECTION DES ACIDES AMINES PROTEIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE UTILISANT L'IONISATION A PRESSION ATMOSPHERIQUE	157

1-1) Spectrométrie de masse simple	158
1-2) Spectrométrie de masse tandem	164
1-3) Conclusions	166
2) COMPATIBILITE DE LA DETECTION SM AVEC LES ACIDES CARBOXYLIQUES PERFLUORES COMME AGENTS D'APPARIEMENT D'IONS VOLATILS	167
2-1) Influence de la nature et de la concentration en phase aqueuse de l'acide carboxylique perfluoré sur la réponse du détecteur	168
2-2) Influence du pourcentage d'acétonitrile sur la réponse du détecteur	169
2-3) Stabilité du signal en fonction du temps	171
2-4) Conclusions	174
3) ANALYSE PAR CPL-SM DES 20 ACIDES AMINES PROTEIQUES	174
3-1) Couplage direct de la méthode mise au point par CPL-DEDL	174
3-2) Réduction du temps d'analyse	179
4) ANALYSE DES 20 ACIDES AMINES EN CPL-SM TANDEM	182
2-1) Gain de sélectivité de détection et amélioration du rapport S/B	183
4-1) Limites de détection	185
5) APPLICATION de L'ANALYSE CPL-SM TANDEM à la CARACTERISATION d'un MOUT DE FERMENTATION	186
B] ANALYSE CPL-SM d'ACIDES AMINES SOUFRES chez des INVERTEBRES issus de MILIEUX MARINS	189
1) LA VIE AU VOISINAGE DES DORSALES OCEANIQUES	189
2) METHODES D'ANALYSE	190
3) ANALYSE PAR CPL-SM	192
3-1) Transposition du système mis au point par CPL-DEDL	192
3-2) Analyse d'acides aminés soufrés dans une matrice avec une détection SM simple	194

4) ANALYSE PAR CPL-SM TANDEM	196
4-1) Fragmentation de la taurine et de ces analogues	196
4-2) Amélioration de l'intensité du signal et la stabilité du spray	198
4-3) Analyse CPL-SM tandem d'acides aminés soufrés dans une matrice	201
4-4) Dosages d'acides aminés soufrés dans quelques espèces d'invertébrés	202
C] CONCLUSION	205
Références bibliographiques	207

Conclusion Générale

Conclusion générale	209
---------------------	-----

ANNEXES	213
I) Liste des pK des acides aminés protéiques.	213
II) Charge apparente des acides aminés en fonction du pH.	215
III) Liste des ions observés en SM tandem ...	217
IV) Exemples de fragmentation d'acides aminés ...	219
V) Liste des publications issues de ces travaux	223
VI) Appareillage et réactifs	225

INTRODUCTION GENERALE

Les protéines constituent avec les polysaccharides et les acides nucléiques une des trois classes de biopolymères intervenant dans la structure et dans le fonctionnement de tous les organismes vivants. Leur hydrolyse totale conduit aux acides aminés qui les caractérisent. Parmi les acides aminés isolés du règne vivant, une vingtaine seulement sont des constituants des protéines natives. Huit sont nécessaires à l'espèce humaine car nos cellules ne peuvent les synthétiser. Ils sont essentiels et doivent être présents dans l'alimentation; les douze autres acides aminés sont synthétisés dans les cellules à partir de substances plus simples contenant carbone, hydrogène, oxygène, azote et soufre

La détermination de ces acides aminés est donc importante, mais elle se heurte aux difficultés liées à des structures voisines influencées par le pH du milieu et surtout à l'absence de chromophore pour un certain nombre d'entre eux. L'analyse a été longtemps réalisée par chromatographie en phase liquide (CPL) sur échangeurs d'ions : la durée de la séparation est très longue et la détection nécessite une dérivation post colonne. Parallèlement la chromatographie en phase gazeuse a été proposée mais elle oblige la transformation des composés en dérivés volatils.

Si l'on veut doser les acides aminés à l'état de traces dans des matrices complexes, on comprend l'intérêt de mettre au point une analyse directe et simple à mettre en œuvre en réduisant le nombre d'opérations et améliorer ainsi la reproductibilité. La méthode de choix s'avère donc être la CPL car les molécules peuvent être séparées sous leur forme d'origine et l'utilisation d'une détection universelle pour s'affranchir de l'absence de chromophores.

Pour aborder l'analyse en milieu complexe, il faut pouvoir résoudre en plus les co-élutions possibles des acides aminés avec des impuretés. C'est pourquoi les méthodes d'analyse multidimensionnelles sont de plus en plus utilisées pour ce type de problèmes. Elles requièrent le couplage de la CPL avec la spectrométrie de masse (SM) qui offre de plus grandes potentialités que le couplage avec la spectrométrie UV à barrette de diodes (sans intérêt pour un grand nombre d'acides aminés) et une plus grande facilité de mise en œuvre que le couplage avec la Résonance Magnétique Nucléaire, de surcroît fort coûteuse. De plus, il est possible d'employer la SM en tandem (SM-SM) qui augmente la sélectivité de détection. Ainsi un tel couplage CPL-SM peut se suffire d'une séparation chromatographique incomplète des acides aminés.

Avec l'apparition des sources d'ionisation à pression atmosphérique (API) en SM, le couplage CPL-SM s'est vite démocratisé sur un domaine d'utilisation très élargi. Le nombre de publications concernant les couplages CPL-SM-API grandit chaque année si bien qu'il devient très difficile d'en faire une évaluation correcte. Ces méthodes se rencontrent aussi bien dans les congrès dévolus aux techniques séparatives (environ 14% des travaux présentés au congrès HPLC'99 à Grenade en 1999) que dans les congrès plus spécialisés en SM comme l'AS-SM Conference. Le « Montreux LC-MS Symposium » est même totalement consacré depuis 16 ans aux dernières tendances des couplages CPL-SM.

Avant de poser les problèmes spécifiques à l'analyse directe des acides aminés, nous avons d'abord cherché dans le premier chapitre à souligner l'intérêt de la SM en développant et comparant les différents aspects des sources d'ionisation à pression atmosphérique, en évoquant l'apport de la spectrométrie de masse en tandem (SM-SM) et enfin en montrant l'intérêt des couplages CPL-SM sans oublier leurs exigences. Ces différents points seront illustrés par des exemples non pas empruntés à la littérature mais s'appuyant sur l'analyse de différents tensioactifs non ioniques qui m'a été confiée lors de la mise en marche de la SM à l'ICOA, coïncidant aussi avec un projet européen (Projet FAIR DG XII n° 97-1829). L'étude de ces composés, bien que différents des acides aminés, nous a permis ainsi d'aborder les différents réglages du matériel et d'acquérir une plus grande maîtrise de l'ensemble.

Le chapitre II fera le point sur l'analyse des acides aminés avec un esprit critique des différentes méthodes utilisées notamment celles mettant en œuvre les dérivations pré et post colonne. Nous rappellerons l'intérêt du détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) comme mode de détection universelle. Ce chapitre se termine par la présentation du Carbone Graphitique Poreux comme support parfaitement bien adapté à l'analyse des molécules ioniques et donc potentiellement intéressant pour la séparation des acides aminés.

Le troisième chapitre développera cette utilisation du Carbone Graphitique Poreux pour la séparation de l'ensemble des acides aminés soit par un mécanisme utilisant des principes dérivés de l'échange d'ions soit par un mécanisme dérivé de l'appariement d'ions en comparant les avantages et inconvénients de chacun. Les phases mobiles sont choisies pour être compatibles avec le DEDL.

Le quatrième chapitre abordera la SM des acides aminés par ionisation API. L'influence des différents réglages est illustrée pour rechercher les meilleures conditions de détection et en utilisant les phases mobiles précédemment retenues pour le DEDL. Le couplage CPL-SM est alors étudié ainsi que l'emploi de la SM-SM dans le but de simplifier la chromatographie.

Chapitre I

LA DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Avant même de servir de détecteur aux méthodes séparatives, la spectrométrie de masse est d'abord une méthode d'analyse spectrale capable de fournir la masse moléculaire et des renseignements structuraux sur les molécules. Bien que les techniques mises en œuvre en spectrométrie de masse soient nombreuses [1-3], le principe de l'appareillage, décrit figure I-1, reste presque toujours le même.

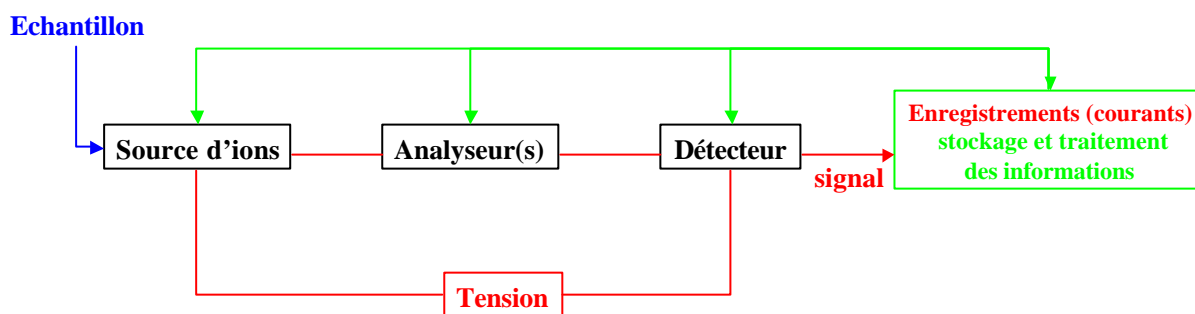


Figure II : Principe d'un spectromètre de masse. Fondamentalement, un spectromètre de masse contient 3 parties: une source de production d'ions, un (des) système(s) analyseur(s) des rapports masse sur charge (m/z) et un détecteur. Un système de traitement, stockage de données (microinformatique pour les appareils commerciaux) est associé au spectromètre pour gérer les signaux résultants de l'analyse et imposer un rétrocontrôle de l'appareil. D'après [1].

Le principe de l'analyse par spectrométrie de masse consiste à transformer des molécules échantillons en ions moléculaires et/ou en ions fragments. Les ions issus de la source sont ensuite séparés en fonction de leur masse par un ou plusieurs systèmes analyseurs avant d'être détectés (figure I-1). Les ions transmis par l'analyseur jusqu'au détecteur referment ainsi un circuit électrique. Le courant électrique créé est proportionnel à la quantité d'ions reçus par le détecteur. Sur le trajet menant au détecteur, différents champs de force (magnétiques, électriques...) sont appliqués, les uns servant à assurer la transmission des ions (par gradient de tension), les autres à filtrer les ions selon leur masse m et leur charge z . Le signal électrique enregistré lors d'un balayage des rapports m/z constitue un spectre de masse. Le traitement des données est effectué le plus souvent par microinformatique. Il est alors quasi instantané et le rétrocontrôle de l'appareil est assuré à tout moment (en vert sur la figure I-1).

D'une manière générale, deux points importants sont à retenir pour assurer le succès d'une analyse en SM (en couplage avec une méthode séparative ou non):

- Tous les spectromètres de masse possèdent au moins un point commun: analyseur(s) et détecteur doivent être dans le vide poussé pour assurer une transmission optimale des ions. Ce point est crucial et asservissant puisque, lors de couplage avec les méthodes séparatives, la totalité de l'échantillon, molécules à analyser et solvants, doit passer en phase gazeuse sous peine de polluer le spectromètre et d'affaiblir ses performances.
- Les sources d'ions sont nombreuses (impact électronique, ionisation chimique désorption laser, électronébulisation...) tout comme les systèmes analyseurs de masse (secteur électrique, secteur magnétique, quadripôle, analyseur à temps de vol...). L'emploi d'une technique (ionisation et/ou filtrage des ions) plutôt qu'une autre n'est pas sans conséquence [3]. Une source et un système d'analyseurs doivent être choisis en fonction du résultat escompté. Certains composés ne s'ionisent pas avec certaines sources ou ne donnent naissance qu'à des fragments de molécules difficilement interprétables. De même, la précision de la masse mesurée n'est pas la même avec tous les systèmes analyseurs.

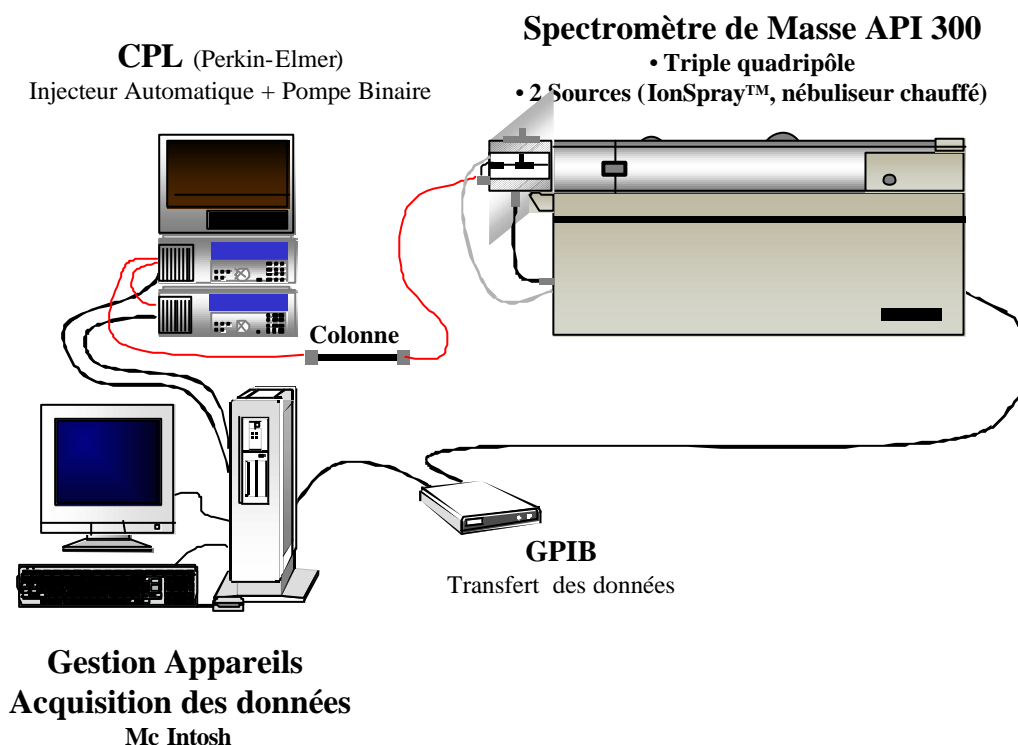


Figure I-2: Appareillage utilisé en couplage CPL-SM pendant ces travaux.

Chaque technique peut avoir ses avantages et ses inconvénients vis à vis d'une méthode d'analyse et il faudra s'adapter aux exigences et aux possibilités de l'appareillage disponible au laboratoire.

L'ensemble des couplages CPL-SM (figure I-2) dans ce travail ont été effectués sur une chaîne chromatographique (Perkin-Elmer, Forster City, CA, USA) et d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle (QqQ) API300 pouvant être équipé de deux sources d'ions à pression atmosphérique (IonSprayTM ou nébuliseur chauffé) différentes. L'ensemble est géré par microinformatique (Mc Intosh). Pour réaliser les différents réglages de l'appareillage, il est possible d'acheminer en continu l'échantillon en solution par une pompe seringue (infusion de l'échantillon à quelques $\mu\text{l}/\text{min}$).

Pour qu'une méthode chromatographique couplée avec une détection par spectrométrie de masse soit performante, il faut bien connaître les exigences, les avantages et inconvénients de chaque étage du spectromètre (ses sources, ses systèmes analyseurs de masse mais aussi dans le cas des techniques d'ionisation à pression atmosphérique, son système d'interface entre la pression atmosphérique de la source et le vide requis par le spectromètre).

Avant de passer aux couplages, il va donc falloir déterminer les potentialités de notre spectromètre. Nous évoquerons ainsi au cours de ce chapitre un certain nombre de points importants qui ne seront plus repris par la suite et sauf dans certains cas particuliers, ils seront considérés comme ayant été optimisés ou ne pouvant pas influencer sur la détection de façon significative.

A] Le SPECTROMETRE de MASSE API-Triple Quadripôle ---

Cette première partie sera principalement consacrée à décrire les techniques mises en œuvre sur le spectromètre utilisé au cours de ce travail. Les lois physiques régissant les mécanismes d'ionisation, de transmission et de filtration des ions sont parfois compliquées. Cette partie essaiera de faire ressortir le plus simplement possible ce qu'il faut connaître de ces techniques pour réaliser un couplage avec une méthode séparative.

1) LES SOURCES D'IONISATION A PRESSION ATMOSPHERIQUE

Les sources d'ions à pression atmosphérique sont plus communément appelées sources API (du terme anglais: Atmospheric Pressure Ionisation). Deux sources au fonctionnement légèrement différent sont disponibles sur notre appareil.

1-4) L'IonSpray

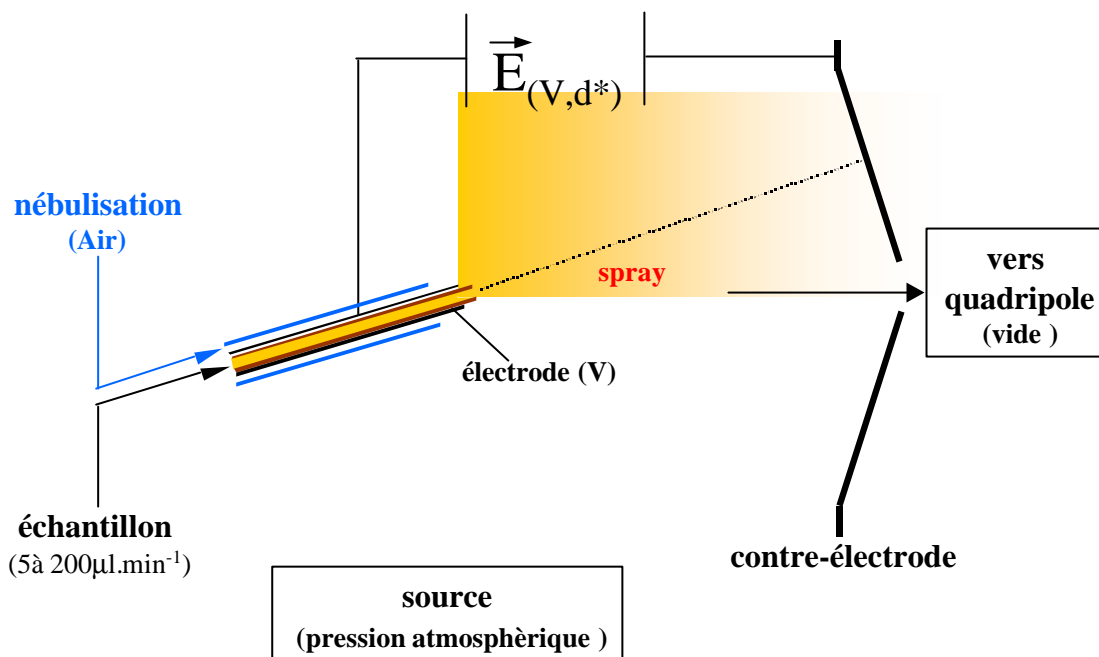
Le terme IonSpray (IS) est le nom donné à la source commercialisée par PE-Sciex et devrait lui être réservé. Cette source appartient à la famille de sources fonctionnant sur le principe de l'électronébulisation plus connu sous le vocable "électrospray" (ES).

1-1-a) Processus d'ionisation par électronébulisation

L'électronébulisation est un phénomène connu depuis 1917 [4], et nombreux sont les publications [5-9] et livres [1, 2, 10] traitant de sa théorie (mécanismes, lois...). Le principe de fonctionnement (figure I-3) de l'IonSpray peut être simplement décrit comme suit.

L'IonSpray est composé d'un capillaire en acier ou électrode (en noir sur la figure I-3), traversé par un capillaire en silice fondue de faible diamètre interne (30 à 100 μm) acheminant l'échantillon en solution à des débits de quelques $\mu\text{l}/\text{min}$. Sous l'effet d'un fort champ électrique créé en imposant une différence de potentiel V (de plusieurs kV) entre l'électrode et une contre-électrode, il se forme spontanément un

aérosol ionique constitué de fines gouttelettes (environ 1 μm de diamètre) chargées de même polarité que l'électrode en acier. Les composés ioniques de signe opposé à l'électrode se déchargent à son extrémité (figure I-4); le liquide s'enrichit alors des composés possédant une charge de même signe que l'électrode et se déforme (cône de Taylor).



*: distance de l'électrode à la contre-électrode

Figure I-3: Schéma général de l'ion spray.

Des gouttelettes chargées s'échappent du cône de Taylor (Figure I-4) et se dirigent vers la contre-électrode (dont le potentiel est plus faible que celui de l'électrode ou nul selon les appareils) puis vers l'intérieur du spectromètre dont l'optique électronique est de polarité opposée à ces mêmes gouttelettes. En changeant la polarité de l'électrode, la polarité du spray changera. Il y aura donc deux modes de travail possibles: le mode positif donnera un spray cationique et le mode négatif donnera un spray anionique. L'électrode n'est pas dirigée dans l'axe du spectromètre mais diagonalement pour réduire les risques de pollution de l'intérieur du spectromètre (par la pénétration d'espèces neutres et/ou non volatiles).

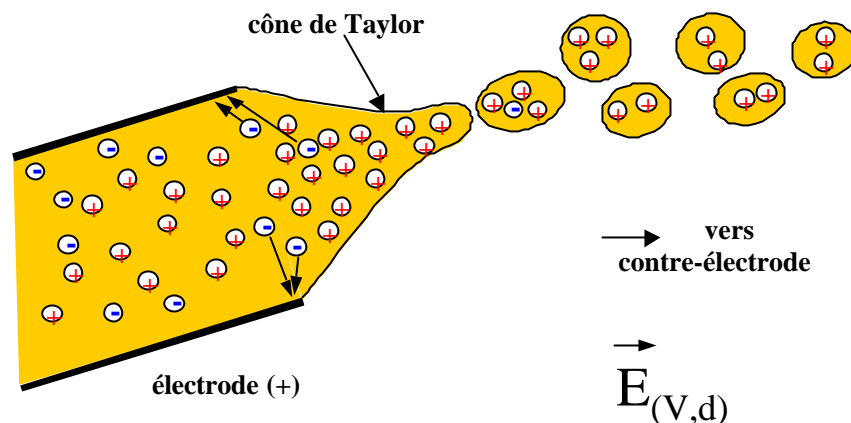


Figure I4: La charge des gouttelettes (ici positive) est obtenue par suppression (par décharge) des espèces de signe opposé (négatif) au potentiel de l'électrode à l'extrémité de cette dernière. L'enrichissement du liquide en composés chargés de même signe donne naissance à une protubérance (cône de Taylor) d'où s'échappent des microgouttelettes chargées repoussées vers la contre-électrode. D'après [5]

Sur le trajet qui mène les microgouttelettes chargées vers les analyseurs du spectromètre (figure I-5), le solvant s'évapore et, par conséquent, les charges de même signe (positif sur la figure) se rapprochent. Pour minimiser les forces de répulsion de type électrostatique, les charges ont tendance à remonter à la surface des gouttelettes. Quand ces forces électrostatiques deviennent supérieures à la tension de surface de la gouttelette, celle-ci explose (explosion coulombienne) en gouttelettes plus petites. Ce processus se répète un grand nombre de fois jusqu'à la désolvatation complète de l'ion échantillon.

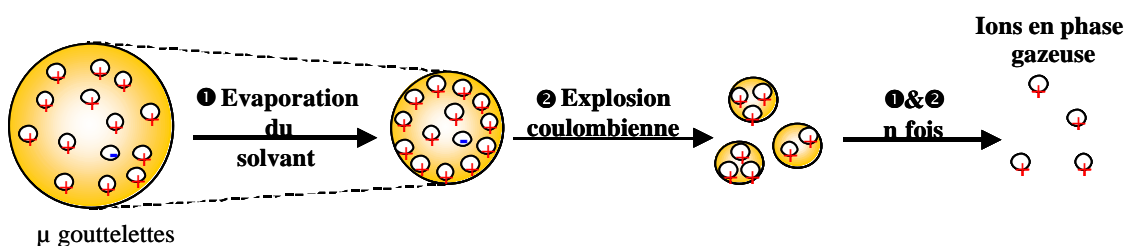


Figure I5: Processus de l'évaporation ionique suite à une électronébulisation à pression atmosphérique, la phase finale étant l'obtention d'ions en phase gazeuse. D'après [6, 7].

L'ultime étape de formation des ions en phase gazeuse est encore discutée. Il semblerait que lorsque les gouttelettes atteignent un rayon inférieur à 10 nm

(nanogouttelettes), celles-ci n'explorent plus, mais expulsent directement les ions dans l'atmosphère de la source. Ce processus d'évaporation ionique est en fait un peu plus complexe [8].

La production des gouttelettes et des ions en phase gazeuse ne pose pas de problèmes particuliers tant que le débit de liquide, la concentration en électrolyte et la tension de surface ne sont pas trop élevés. En revanche, une augmentation d'un ou plusieurs de ces paramètres peut nuire à la production de l'aérosol. En CPL, même en divisant le flux de la phase mobile, celui-ci reste parfois trop important pour une performance optimale de l'électrospray. Pour y remédier, une assistance pneumatique sous forme d'air comprimé a été ajoutée dans le cas de l'IonSpray. Celui-ci assure avant tout la formation de l'aérosol tandis que le champ électrique assure la charge des gouttelettes. L'utilisation de l'air pour l'assistance pneumatique est intéressante puisque l'oxygène va pouvoir servir de "piège à électrons libres" [11] (L'emploi de forts champs électriques entraîne l'apparition de flux d'électrons libres ou décharges corona nocifs pour l'ionisation dans la source, surtout en mode d'ionisation négatif). L'assistance à la désolvatation par ce flux d'air rend cette source moins sensible aux accroissements de débit que le simple électrospray (meilleure compatibilité avec le couplage CPL) et permet de travailler avec des solutions totalement aqueuses et avec des teneurs en sels plus importantes.

1-1-b) Types d'ions produits

Compte tenu de son mode de fonctionnement, cette source ionique s'adresse avant tout aux molécules naturellement ioniques (anions ou cations) ou aux molécules de polarité élevée facilement ionisables par un transfert de charge (en général, un proton, grâce à la présence de sites plus ou moins acides ou basiques sur la molécule). L'électronébulisation est une méthode d'ionisation douce et permet d'obtenir principalement des ions moléculaires au contraire de méthodes plus destructrices engendrant une fragmentation importante comme l'impact électronique (IE), le bombardement par atomes rapides (connu sous le sigle FAB pour fast atom bombardment), la désorption par plasma (PDMS, pour plasma desorption mass spectrometry) [10].

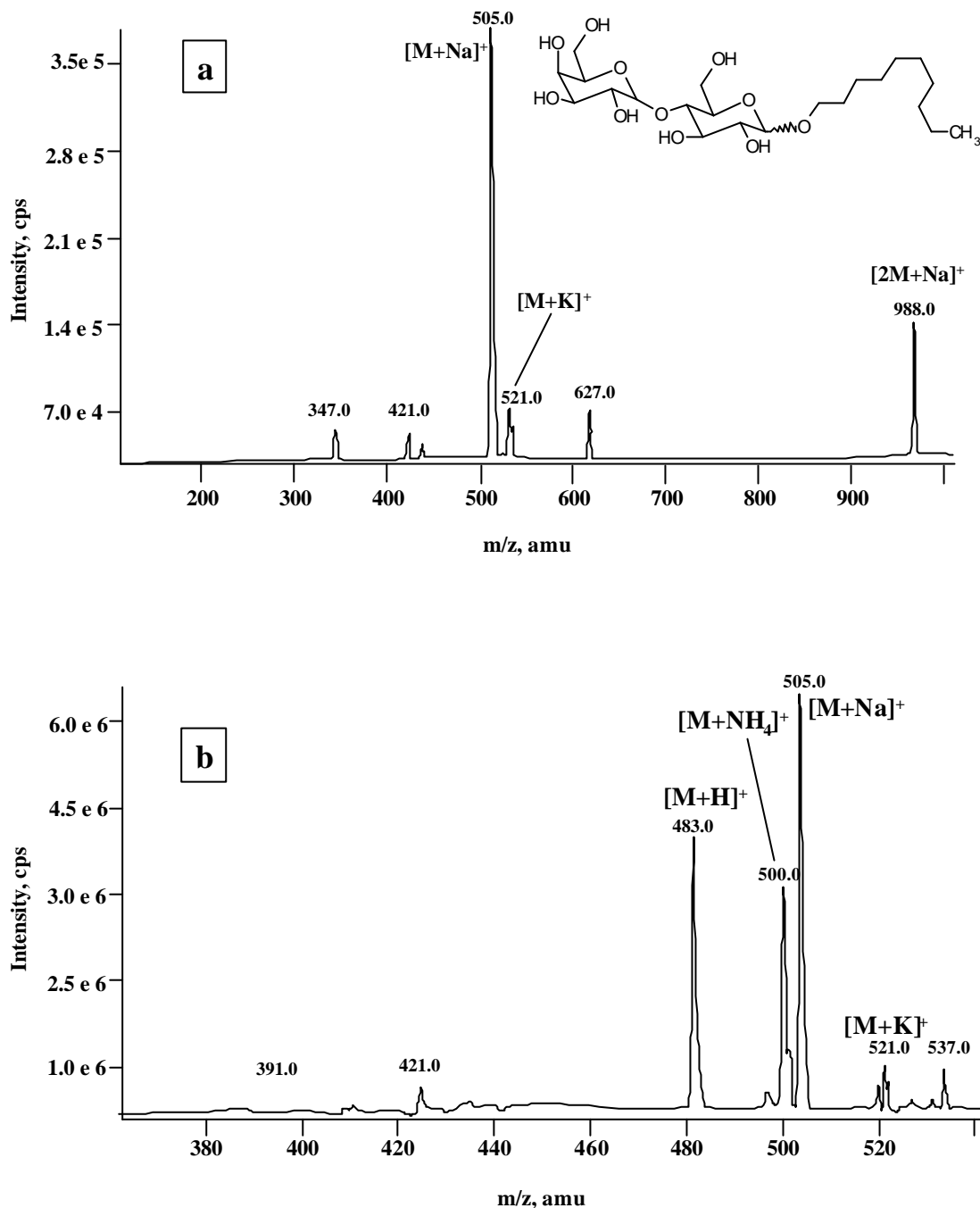


Figure 16: Spectre de masse en mode positif du décyl-lactoside ($M=482$). **a)** infusion à 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ dans un mélange acétonitrile-eau (75-25). Le pic à $m/z=505$ ($M+23$) correspond à l'ion adduit $[M+\text{Na}]^+$. La masse moléculaire est confirmée par la présence d'un adduit $[M+\text{K}]^+$ à $m/z=521$ ($M+39$) et la présence d'un ion dimère $[2M+\text{Na}]^+$ à $m/z=988$. **b)** En acidifiant la solution avec HCOOH , l'ion $[M+\text{H}]^+$ apparaît sur le spectre ainsi que l'ion $[M+\text{NH}_4]^+$ vraisemblablement à cause de trace d'ammoniac sur la contre-électrode ou sur le capillaire. Source: IonSpray (+5,7kV), orifice (60V), Anneau (400V). [P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 188].

En mode positif, l'obtention de l'ion $[M+H]^+$ par transfert d'un proton sur la molécule de masse M sera majoritairement recherchée. Cet ion est en effet le plus facile à interpréter. Très souvent aussi, la présence d'ions "adduits" peut être observée avec les cations de métaux alcalins (Na^+ , K^+) ou encore avec l'ion ammonium (NH_4^+). C'est le cas chaque fois que le composé est polaire mais que les sites ionisables ne sont pas assez basiques pour se protoner [8] comme pour le décyl-lactoside présenté figure I-6-a. Les adduits ammonium s'observent lorsque l'affinité protonique de l'ammoniaque est relativement voisine de celle de la molécule [12]. En modifiant l'acidité du milieu, on peut observer l'apparition de nouveaux ions (figure I-6-b) ou un changement de répartition des ions adduits. Lorsque les solutions sont trop concentrées en molécules échantillons ou que celles-ci possèdent une certaine affinité pour s'associer entre elles ou avec le solvant, il est possible d'observer des ions dimères protonés $[2M+H]^+$, des ions dimères adduits (dimère Na^+ , figure I-6a) ou encore des ions agrégats avec des molécules de solvant (ex: $M+33$ peut correspondre à $[M+H+CH_3OH]^+$, agrégat avec une molécule de méthanol).

D(m/z) observé		M			
Ions moléculaires	$[M+H]^+$	1	$[M+H]^+$		
	$[M+NH_4]^+$	18	17	$[M+NH_4]^+$	
	$[M+Na]^+$	23	22	5	$[M+Na]^+$
	$[M+K]^+$	39	38	21	16
Ions dimères	$[2M+H]^+$	M+1	M		
	$[2M+Na]^+$	M+23	M+22		M
Ion agrégats	$[M+solvant^*+H]^+$ *solvant de masse S	S+1	S		

Tableau I-1: Principaux écarts de masse permettant de confirmer la masse pour des ions monochargés d'un composé M en mode positif par la présence d'ions adduits, dimères ou agrégats avec un solvant (toutes les combinaisons intéressantes n'apparaissent pas sur ce tableau).

Tous ces pics additionnels peuvent rendre plus difficile l'interprétation des spectres. Cependant leur présence peut être utile pour certaines confirmations de masse moléculaire en recoupant les informations fournies (tableau I-1) par les différences de masse Δm (pour des ions de même état de charge).

Il existe encore d'autres types d'ions positifs produits par électronébulisation mais beaucoup plus "exotiques". Certaines molécules comme les carotènes et xanthophylles [13] peuvent s'ioniser (espèces dont les électrons sont particulièrement mobiles et à faible potentiel d'ionisation) en donnant des ions de type radicalaire M^+ , comme en impact électronique ou encore des ions $[M-H]^+$ [14].

Dans le cas d'une ionisation négative, les ions observés ($[M-H]^-$) seront le plus couramment issus de la déprotonation de sites acides ou à hydrogène particulièrement mobiles (phénols...). La formation d'adduit avec un anion est plus rare. La formation d'adduits avec les ions chlorures [15, 16] ou encore trifluoroacétates [10] a déjà été observée.

Par rapport aux autres méthodes d'ionisation, l'électronébulisation est la seule à donner naissance à des ions multichargés (positifs et négatifs) pour les molécules possédant plusieurs sites acido-basiques. Ils sont fréquents dans de nombreux domaines (protéines, acides nucléiques...) mais nous n'en verrons pas au cours de ce travail.

1-1-c) Le courant de spray

Pour que des gouttelettes chargées s'échappent du cône de Taylor à l'extrémité du capillaire, il faut appliquer un champ électrique E_{on} minimum [17] donc une tension V_{on} minimum qui dépend de la distance inter-électrodes d et du rayon r_c de l'électrode mais aussi de la tension de surface γ du solvant (tension d'autant plus faible que le solvant sera volatil).

$$V_{on} = 2 \cdot 10^{-5} \cdot (g r_c)^{1/2} \cdot \ln(4d/r_c) \quad (1)$$

Le courant de spray (I_{spray}) obtenu résultant de la formation des gouttelettes sera aussi influencé par le débit et par la conductivité de la solution échantillon. De plus, il arrive qu'un électrolyte soit ajouté à l'échantillon pour favoriser son ionisation (en général un acide capable de céder un proton au soluté en mode positif ou une base capable de capter un proton du soluté en mode négatif, ou encore un sel). Dans ce cas le courant de spray est modifié.

Ainsi, lorsque B est un électrolyte auxiliaire pour ioniser le soluté A, il influence le courant correspondant au soluté A et donc sa détection selon [18] :

$$I_A = fp \frac{K_A[A^+]}{K_A[A^+] + K_B[B^+]} I_{\text{spray}} \quad (2)$$

Cette équation montre que le courant I_A produit par le soluté A est proportionnel à sa concentration mais qu'il est influencé par la concentration de l'autre espèce (f représente la fraction de charges convertie en phase gazeuse, p la fraction transmise à l'intérieur du spectromètre). La concentration de B est en général supérieure à celle de A et d'après l'équation précédente, la présence de B affaiblit le courant de A (phénomène de suppression ionique). La sensibilité de détection diminue. Ainsi, pour une bonne sensibilité, il faudra donc trouver la concentration idéale facilitant l'ionisation sans engendrer une suppression importante du signal.

En conclusion, l'IonSpray s'adresse donc surtout aux molécules ioniques et très polaires. Il donne naissance quasi exclusivement à des ions moléculaires (protonés, déprotonés et adduits). De nombreux paramètres influencent l'obtention d'un signal optimal pour un ion donné. Ces paramètres peuvent être liés à la nature des molécules analysées (choix d'un mode de détection, positif et/ou négatif) mais aussi à la qualité, débit et nature des solvants utilisés (purements aqueux, hydroorganiques ...), à la nature et concentration des additifs (auxiliaires d'ionisation). Bien entendu, solvants et additifs doivent rester impérativement volatils.

Le réglage de la source consiste à déterminer, pour un composé donné dans un solvant donné (à un débit donné), la différence de potentiel optimale à appliquer, le débit du gaz de nébulisation. La position de l'électrode et du capillaire de silice fondue

couissant dans l'électrode est un réglage essentiel qui n'est malheureusement que visuel dans le cas de la source de l'API300.

1-2) Le Nébuliseur Chauffé

Le nébuliseur chauffé est une source d'ionisation chimique à pression atmosphérique aussi connue sous son sigle anglo-saxon d'APCI (pour Atmospheric Pressure Chemical Ionisation). Comme ce terme l'indique, le processus d'ionisation va comporter quelques similitudes avec l'ionisation chimique (IC) traditionnelle bien connue obtenue par transfert de charges à partir d'un gaz réactant (isobutane, ammoniac,...) ionisé sous vide.

1-2-a) Processus d'ionisation

L'ionisation chimique à pression atmosphérique est souvent classée avec l'électronébulisation parce qu'ayant lieu, comme son nom l'indique, à pression atmosphérique. L'optimisation des paramètres de détection de ces deux types de source a même été comparée [12]. Cependant, bien que similaire par certains cotés, le processus d'ionisation diffère légèrement. Celui-ci est décrit dans plusieurs publications et revues [3, 19-21], guides d'utilisation ou notes techniques [22, 23] ainsi que dans des ouvrages concernant la spectrométrie de masse [1, 2-8, 24] et son couplage avec la CPL [25].

La source (figure I-7) se compose de 2 capillaires concentriques en acier, l'ensemble se trouvant au centre d'un tube de quartz chauffé par une résistance. Sous l'action combinée d'une nébulisation pneumatique et de la chaleur, l'échantillon acheminé à fort débit (0,5 à 2ml/min) est nébulisé de façon quasi instantanée. L'aérosol est entraîné par un flux de gaz auxiliaire et est ionisé au voisinage d'une aiguille de décharge (électrode). Les ions créés seront positifs ou négatifs selon la polarité de l'aiguille de décharge.

Le mécanisme d'ionisation (figure I8) bien que donnant naissance à un aérosol ionique à pression atmosphérique est différent de l'électronébulisation. Le spray

produit est d'abord neutre avant d'être ionisé. La décharge corona est un courant d'électrons libres (de 1 à 5 μA) circulant entre l'extrémité de l'aiguille et la contre-électrode.

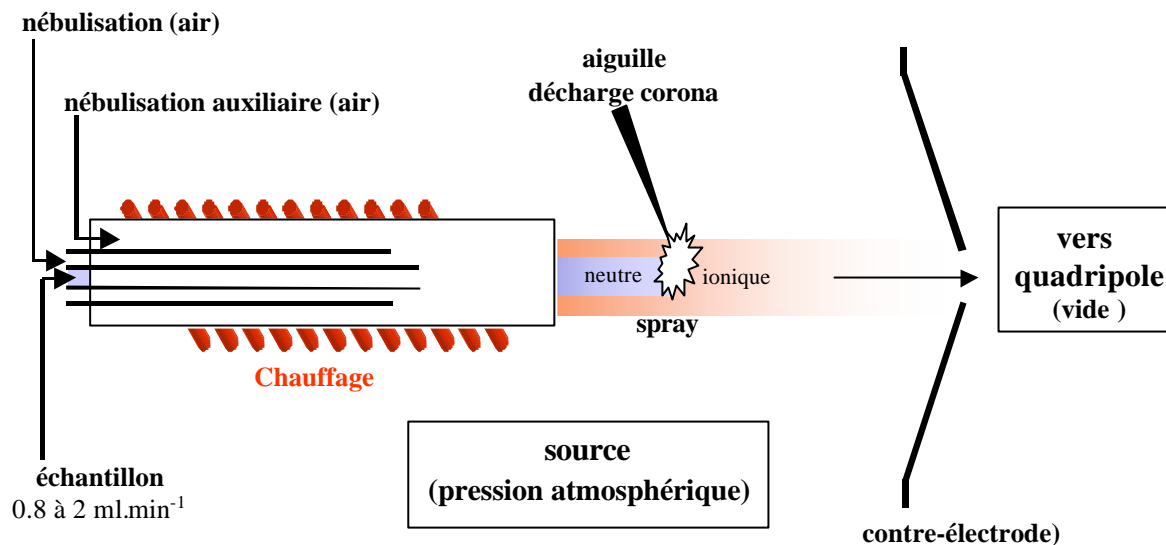


Figure I-7: Schéma du nébuliseur chauffé

Cette décharge peut être comparée à un impact électronique dont l'énergie des électrons émis serait modérée par le nombre important de collisions avec les molécules à pression atmosphérique. La décharge (❶) crée des ions radicaux primaires ($\text{N}_2^{\bullet+}$, $\text{O}_2^{\bullet+}$, $\text{NO}^{\bullet+}$) qui, par une suite de réactions de transfert de charge (électrons et protons) facilitées par les nombreuses collisions à pression atmosphérique, peuvent ioniser (❷) majoritairement le solvant ou ses additifs (protonation dans le cas du mode d'ionisation positif) [17, 18]. De nombreuses collisions (❸) se produisent entre le soluté neutre M (solvaté ou non) et le solvant ionisé ou ses additifs ; il y a alors transfert de charge (❹) entre le solvant et le soluté puis désolvatation (❺). Ce processus rappelle celui mis en œuvre en ionisation chimique traditionnelle (échange d'une charge par collision avec un gaz ionisé par impact électronique). La dernière étape de désolvatation (❺) par rupture des ions agrégats a bien souvent lieu dans l'interface entre la source à pression atmosphérique et le vide du spectromètre.

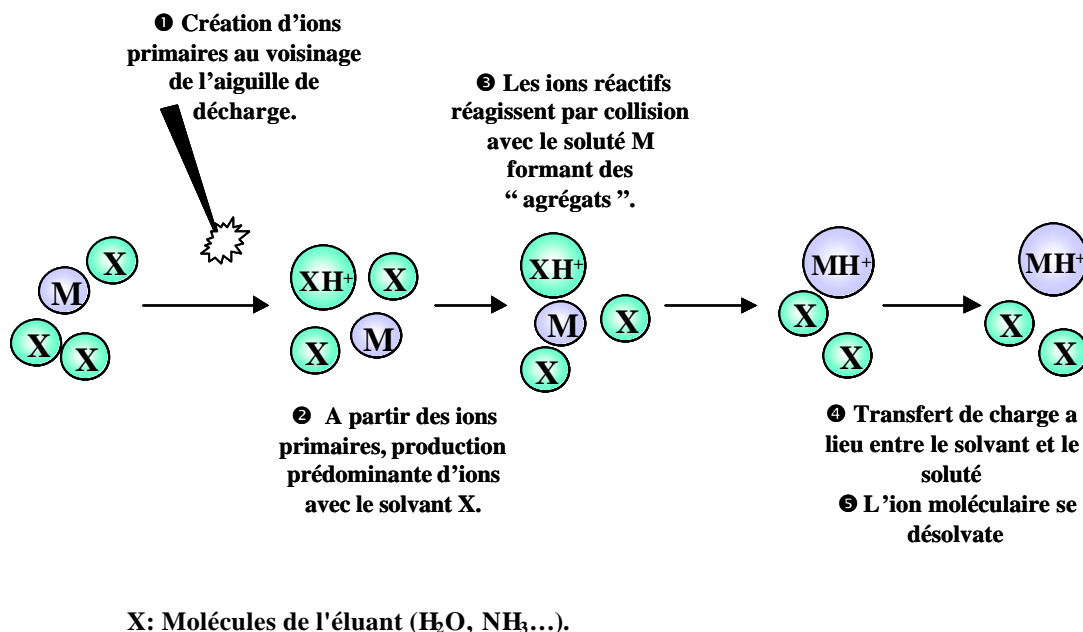


Figure I-8: Différentes étapes du mécanisme d'ionisation en APCI. D'après [19, 20].

1-2-b) Types d'ions produits

Les multiples collisions dans la source rendent l'ionisation très efficace. Les ions produits en APCI sont de même nature qu'en électrospray à l'exception des adduits alcalins et des espèces multichargées rarement observables. En revanche, les ions agrégats avec les solvants, les ions dimères $[2M+H]^+$ ainsi que les adduits $[M+NH_4]^+$ (figure I-9-②) peuvent être présents sur les spectres de masse.

Bien qu'ayant lieu dans une source chauffée et en présence d'un faisceau d'impact électronique, l'APCI reste une méthode d'ionisation douce.

- Sauf au voisinage de l'aiguille, les électrons émis sont freinés par les collisions avec les molécules de l'atmosphère et perdent rapidement de leur énergie.
- La chaleur sert avant tout à désolvater rapidement l'échantillon. Cette désolvatation rapide limite fortement les risques de décomposition thermique.
- Les molécules ionisées se stabilisent en dissipant leur énergie par les nombreuses collisions dans l'atmosphère de la source et les ions solvatés (agrégats) sont moins sensibles à la fragmentation.

En conséquence, les ions moléculaires restent souvent majoritaires sauf dans le cas de composés particulièrement thermolabiles.

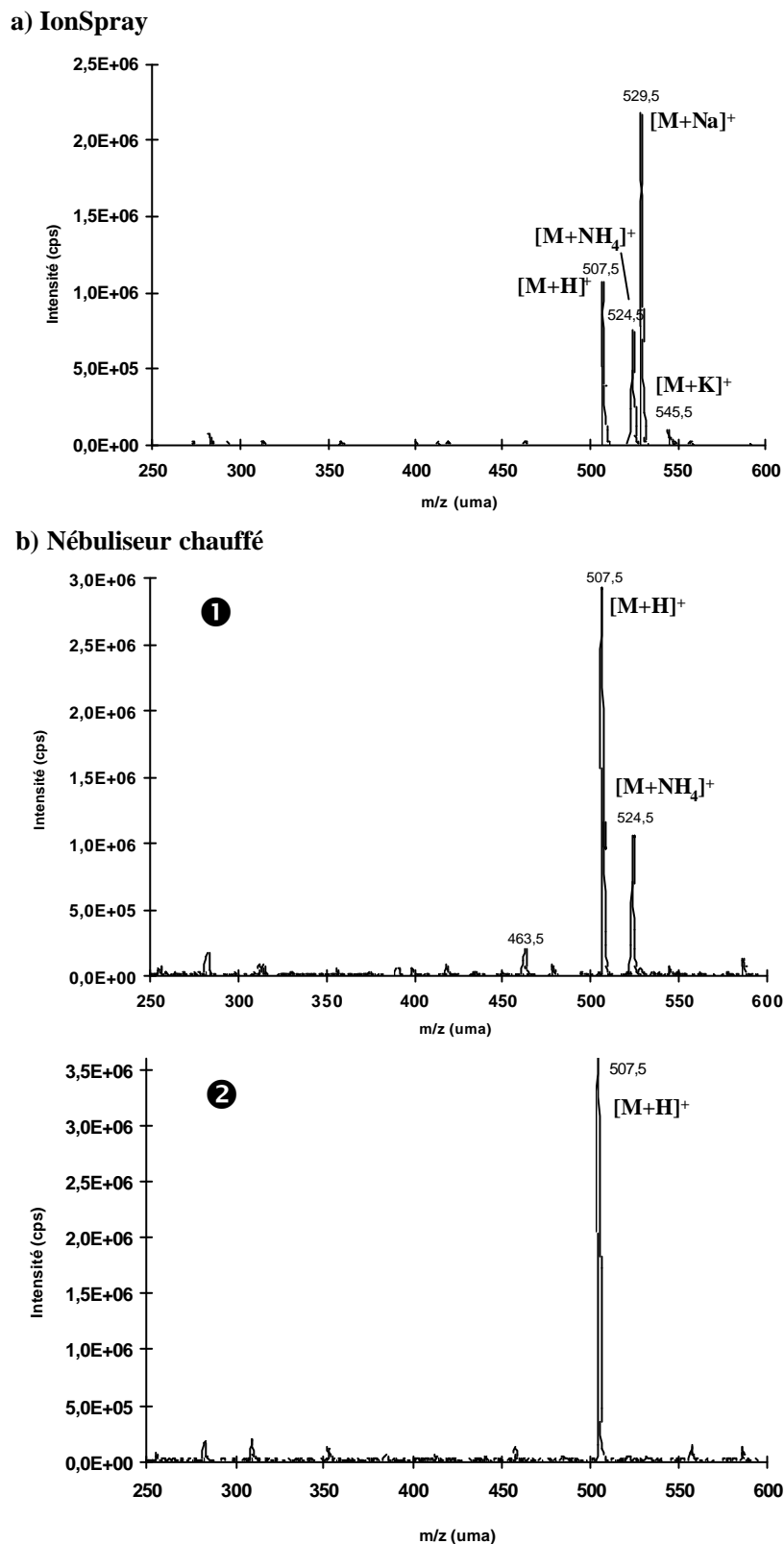


Figure I9: Spectres de masse de l'hexaéthylène glycol monohexadécylether ($C_{16}EO_6$). a) IonSpray (5,7kV) et b) nébuliseur chauffé ($3\mu A$, $400^\circ C$). On notera en b-**1** la présence de l'adduit ammonium qui disparaît en b-**2** après nettoyage de la contre-électrode et de l'orifice. Concentration: 100mg/l, dilué par 10 pour l'ionisation avec le nébuliseur chauffé. Solvant: méthanol-eau- $HCOOH$ 95/5/0,5 (v/v).

En conclusion, l'ionisation chimique à pression atmosphérique fonctionne sur un mode différent de l'électronébulisation. Ce mode d'ionisation est beaucoup moins bien adapté aux molécules ioniques (car souvent thermolabiles) mais permet d'étendre le domaine utilisable du spectromètre à des molécules beaucoup moins polaires.

Ce qui était vrai pour l'électronébulisation reste vrai pour l'APCI en ce qui concerne les solvants, additifs, composés à analyser...

Les paramètres de réglage de la source sont l'intensité du courant de décharge corona, le débit de gaz. Il existe aussi un réglage (visuel) de la position de l'aiguille de décharge (hauteur et latéralité par rapport au tube de quartz). La température est sans doute un des paramètres critiques car si celle-ci est trop basse, le processus de désolvatation est trop lent et les solutés se pyrolysent avant d'être vaporisés. Lorsque la température est trop élevée, il y a décomposition thermique.

1-3) Respect de la polarité des composés à analyser

Le choix d'une source se fait en fonction de plusieurs critères. Le principal critère est sans aucun doute la prise en compte de la polarité des molécules à analyser (même s'il existe parfois des moyens de contourner ce point important). Il est par exemple complètement illusoire d'analyser un alcane par électronébulisation car il est impossible de l'ioniser par une réaction acido-basique. De même, une analyse de protéines par impact électronique n'est pas adaptée parce que ces molécules sont ioniques, non volatiles, thermosensibles... La figure I10 aidera l'utilisateur dans son choix de la source.

Cette figure montre deux zones d'emploi différentes du nébuliseur chauffé et de l'IonSpray. L'IonSpray est plutôt dévolu aux composés ioniques et très polaires, et/ou de haute masse moléculaire tandis qu'il est possible d'utiliser le nébuliseur chauffé pour des molécules moins polaires sans toutefois permettre l'analyse de composés très peu polaires. Cependant, la frontière entre l'utilisation d'une source ou de l'autre n'est pas aussi nette que le graphique le laisse penser et l'ionisation de beaucoup de composés peut être obtenue avec les deux sources. Cependant, la sensibilité de détection est souvent différente comme le montre la figure I9. Nous reparlerons du choix de la source dans la partie B où nous verrons d'autres critères de choix.

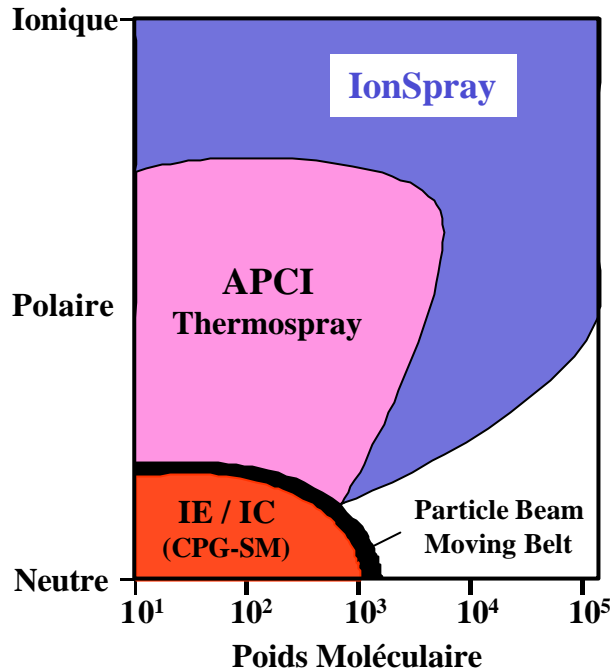


Figure I10: Différents domaines d'application des sources d'ions et interfaces de couplage en fonction de la nature du composé (polarité et poids moléculaire). D'après [1].

2) L'INTERFACE A RIDEAU DE GAZ

L'interface constitue la zone de transition entre la pression atmosphérique de la source et le vide interne du spectromètre. Le vide du spectromètre se situant aux environs de 10⁻⁵ Torr (1,333.10² Pa), on ne peut donc atteindre facilement un tel vide si les deux compartiments (source et spectromètre) sont contigus. Cette partie du spectromètre assurera donc un vide intermédiaire.

L'interface de l'API300 (Figure I-11) est dite "à rideau de gaz". En effet, avant même de passer dans la zone de vide primaire, les ions rencontrent un flux d'azote à température ambiante circulant derrière la contre-électrode. Un de ses rôles principaux est d'éliminer les molécules neutres qui en pénétrant dans le spectromètre, non seulement ne peuvent pas être analysées mais peuvent polluer celui-ci en se déposant un peu partout à l'intérieur. Les ions pénètrent à travers ce rideau de gaz par une lentille appelée "orifice" (OR) et sont refocalisés par "l'anneau". Un "écrémeur" élimine les derniers composés neutres. Le quadripôle (Q₀) situé immédiatement après l'écrémeur transmet les ions à travers ce vide primaire jusqu'au premier quadripôle analyseur (Q₁) du spectromètre.

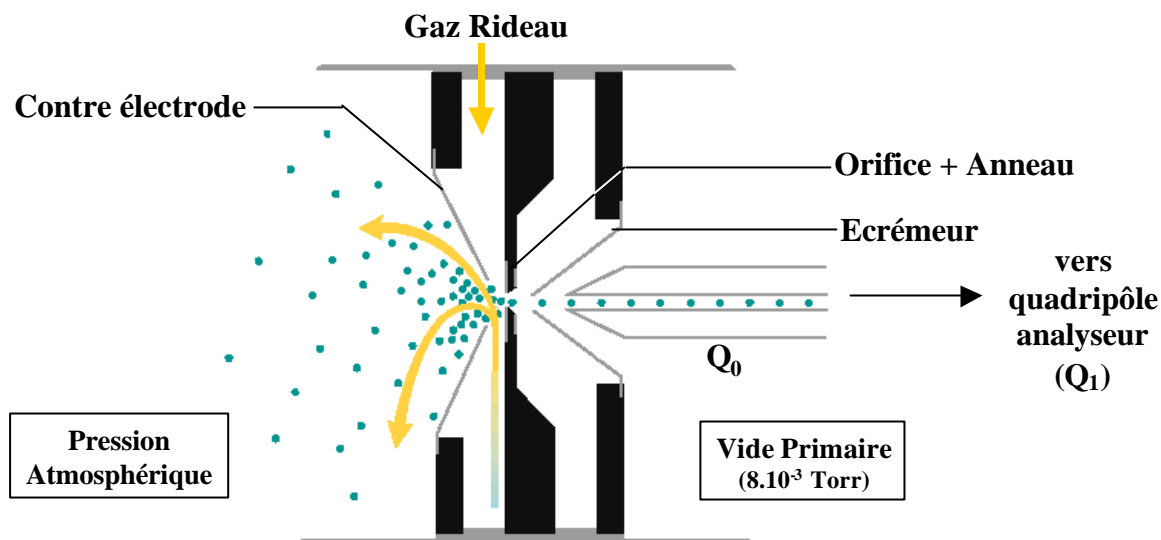


Figure I-11: Schéma d'une interface à rideau de gaz (azote). D'après documentation PE-Sciex

Ce schéma d'interface possède de nombreux avantages:

- Le travail à température ambiante est idéal pour les composés thermolabiles.
- Le rideau de gaz protège efficacement des pollutions par des composés neutres, permet d'assurer la désolvatation finale des ions agrégats [26] et limite la formation de dimères par de nombreuses collisions avec les molécules d'azote.
- De même, en faisant pénétrer les ions plus ou moins violemment dans le spectromètre en ajustant les tensions des lentilles (orifice et anneau) [26] ou en jouant sur le débit du rideau de gaz (figure I-12), il est possible d'obtenir une fragmentation par collision induite dans le rideau de gaz (connue sous le sigle "CID" pour collisionally induced dissociation) et avoir ainsi des informations structurales sans avoir forcément recours à la spectrométrie de masse tandem (abordée en 3 de cette partie).

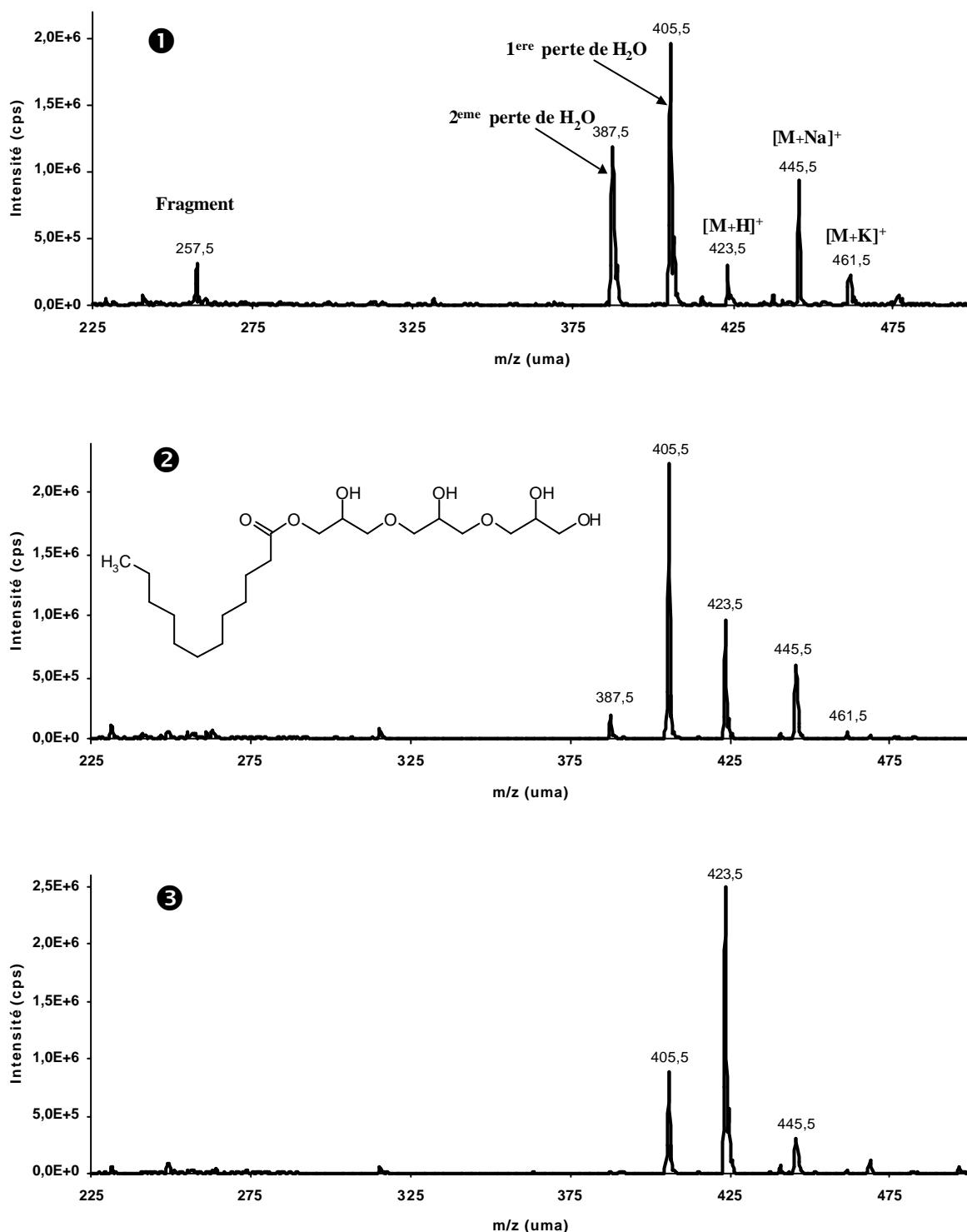


Figure I-12: Influence du débit du rideau de gaz sur la fragmentation d'un composé tensioactif (lauryl ester en position terminale du triglycérol). Tension d'IonSpray: +5,7 kV, Orifice: 20V, Anneau 200V. Infusion à 5 μ l/min dans méthanol-eau-acide acétique 95/5/0,5 (v/v). Débit du rideau de gaz (N₂): **1** 0,95; **2** 0,81; **3** 0,44 l/min. Le fragment (m/z=257,5) a été confirmé par SM tandem (réalisé pour le projet européen FAIR DG XII n°97-1829).

Ainsi en réglant le débit du rideau de gaz à 0,81 l/min, on obtient un spectre propre à chaque isomère [ester en position centrale (figure I-13) et en position terminale (figure I-12)] dû à des pertes d'eau en proportions différentes.

En conclusion:

- Ce n'est pas l'ionSpray qui induit la fragmentation mais le rideau de gaz.
- La présence du rideau de gaz permet ainsi une distinction structurale entre certains isomères sans avoir recours à la spectrométrie de masse tandem.

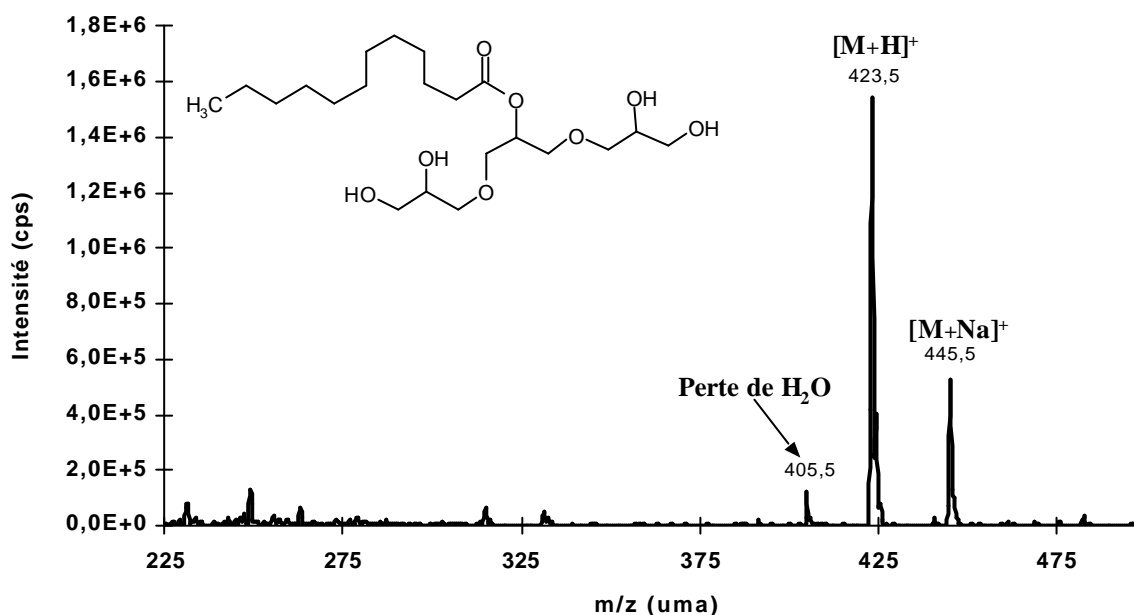


Figure I13: Comportement de l'ester en position centrale lors du passage du rideau de gaz dans les conditions de la figure I-12-②. Les pertes d'eau importantes observées pour l'ester en position terminale n'apparaissent plus pour l'ester en position centrale (réalisé pour le projet européen FAIR DG XII n°97-1829).

3) L'ANALYSEUR QUADRIPOLAIRE ET APPAREIL TRIPLE QUADRIPOLE

Les ions produits par la source ont pénétré le spectromètre par l'interface et sont acheminés par un gradient de potentiel vers le détecteur (électromultiplicateur) en passant par l'analyseur quadripolaire où a lieu le filtrage des ions selon le rapport masse/charge.

3-1) Le Fonctionnement du Quadripôle

Les lois physiques régissant le fonctionnement du quadripôle sont complexes. Pour une meilleure compréhension de certains phénomènes, elles ont même été modélisées [26]. Cependant les connaissances qu'il faut avoir pour utiliser les appareils quadripolaires comme détecteur en couplage avec les méthodes séparatives peuvent être trouvées dans des ouvrages plus généraux [1-3].

Le quadripôle (Figure I-14) est composé de 4 électrodes groupées deux à deux. Les deux groupes d'électrodes sont de polarité opposée et sont soumis à une tension possédant une composante continue (U) et une composante alternative ($V \cdot \cos \omega t$). Dans le cas où le quadripôle ne fonctionne qu'en radiofréquence ($U=0$), tous les ions sont transmis sans discrimination. Tout le long de leur parcours dans le quadripôle, les ions sont attirés par l'électrode de signe opposé mais sont repoussés avant qu'ils ne l'aient atteinte à cause de son changement de signe. Les ions rentrent en résonance avec la radiofréquence appliquée et sont transmis par le quadripôle. Ce n'est qu'avec l'application d'une composante continue (U) non nulle que les ions seront filtrés selon leur rapport m/z . Nous n'entrerons pas ici dans le détail des équations régissant le mouvement et la stabilité de la trajectoire de l'ion dans le quadripôle. Il suffit de savoir qu'un ion

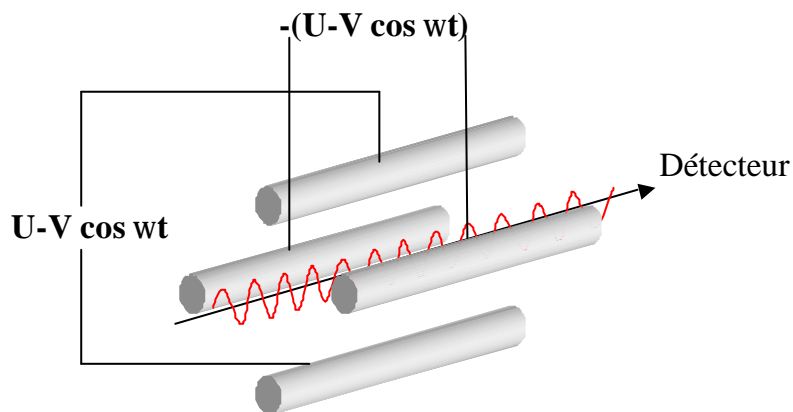


Figure I-14: Schéma d'un quadripôle.

de rapport m/z donné n'a de trajectoire stable que pour certaines valeurs de U et V (figure I-15). Les domaines de stabilité U/V sont différents pour chaque rapport m/z . La résolution entre deux rapports m/z donnés s'obtient en maintenant un rapport U/V

constant adéquat pendant le balayage de tension continue (U). Un balayage des tensions à U/V constant permet donc l'obtention d'un spectre de masse.

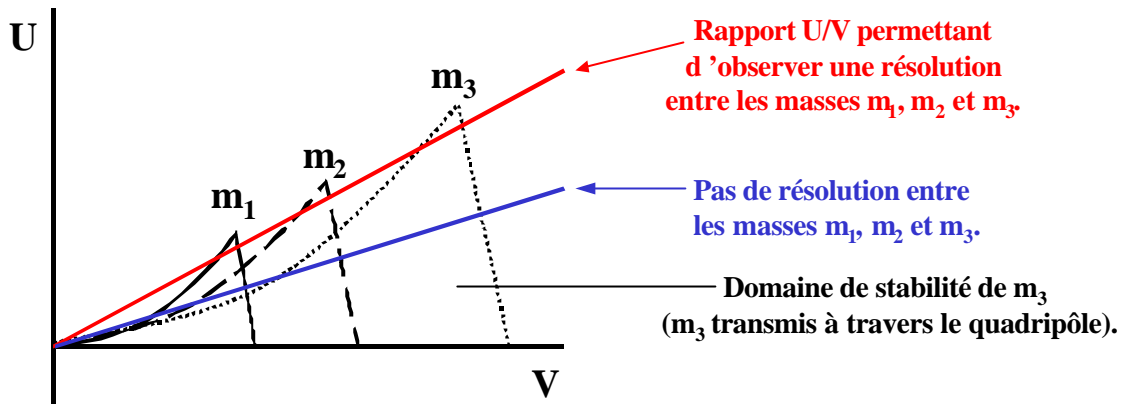


Figure I15: Pour un état de charge donné, un ion (de masse m) n'a de trajectoire stable dans le quadripôle que pour certaines valeurs de la composante continue (U) et de la composante alternative (V). En maintenant constant un rapport U/V adéquat, on obtient la résolution des ions m_1 , m_2 et m_3 . (avec $m_1 < m_2 < m_3$).

Les spectromètres quadripolaires ne possèdent qu'une résolution limitée puisqu'unitaire (sur toute la gamme de masse). Ceci signifie que la distinction au dixième de Th (le Thomson, noté Th, est l'unité des rapports m/z) ne sera pas possible entre deux composés de même masse nominale et qu'ils devront être considérés comme isobares.

La gamme de masse est aussi limitée puisque classiquement le quadripôle ne permet pas de gérer des rapports m/z supérieurs à 3000 Th.

Les deux points faibles précédemment cités sont compensés par les avantages suivants:

- 1) Le quadripôle est peu sensible aux différences d'énergie cinétique des ions incidents contrairement aux appareils à secteurs électromagnétiques qui demandent des systèmes complexes de focalisation pour compenser la dispersion en énergie cinétique.
- 2) L'énergie cinétique des ions est faible (quelques eV).

- 3) Le quadripôle refocalise en continu le faisceau d'ions en son centre.
- 4) Il peut gérer les ions en continu (contrairement au spectromètre à temps de vol qui nécessite un mode de détection impulsionnel).
- 5) Le balayage de U et V peut se faire à grande vitesse. Les modes positif et négatif peuvent être alternés rapidement.

Ces avantages ont leur importance lors de l'utilisation des quadripôles en spectrométrie de masse tandem (spectres à basse énergie de collision) et en couplage chromatographique (gestion rapide des ions...).

3-2) Spectromètre Triple Quadripôle (QqQ) et spectrométrie de masse tandem

L'IonSpray ne donne souvent que des ions moléculaires, adduits ou non, quelquefois même après passage dans le rideau de gaz car leur énergie interne est très inférieure à celle nécessaire à leur fragmentation. De plus, même en présence de fragmentations (CID avec le rideau de gaz), il peut être intéressant de s'assurer de la filiation des ions observés sur un spectre et que certains ions ne sont pas imputables à d'autres composés en mélange avec la molécule M d'intérêt dans l'échantillon à analyser.

L'appareil utilisé dans nos travaux est un triple quadripôle (figure I-16) ou QqQ. Cela signifie qu'il possède trois quadripôles de travail (Q_1 , Q_2 et Q_3). Des trois quadripôles de travail, seuls Q_1 et Q_3 servent de filtres de masse. Q_2 est situé dans une enceinte pouvant être rempli d'un gaz et sert alors de cellule de collision (il ne filtre jamais les ions et sa composante continue U_2 est toujours nulle). Les collisions permettent d'augmenter l'énergie interne des ions incidents (anciennement appelés ions parents et rebaptisés ions précurseurs) et de produire des ions fragments (anciennement appelés ions fils et rebaptisés ions produits). Chaque quadripôle fonctionne différemment suivant le type d'analyse demandé

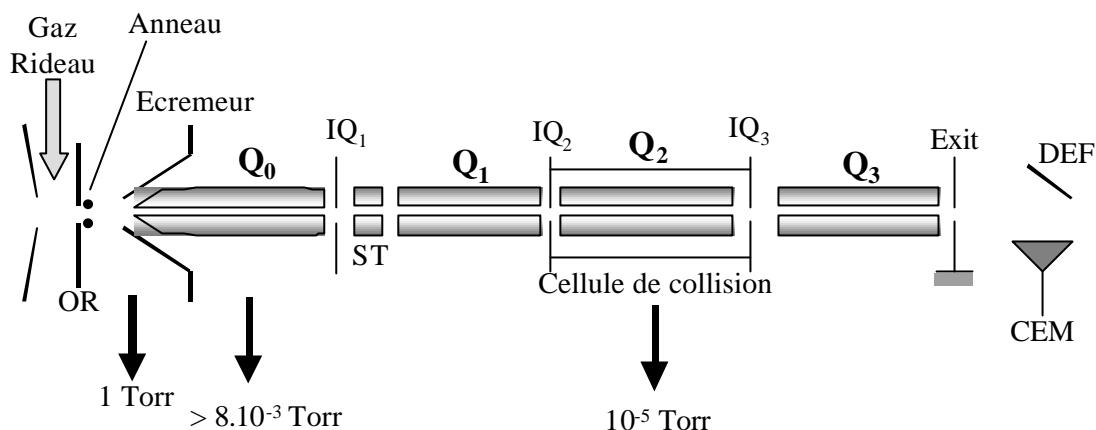


Figure I-16: Schéma d'un appareil triple quadripôle (QqQ). Les ions pénètrent par l'interface et cheminent à travers le vide jusqu'au détecteur (CEM) par un gradient de tension adapté imposé par les lentilles (inter quadripôlares IQ) et les trois quadripôles (Q_1 , Q_2 et Q_3) placés sur leur trajet selon différents modes.

En Spectrométrie de masse simple (présence de Q_1 uniquement) on peut effectuer les spectres de masse des composés par balayage à U_1/V_1 constant sur Q_1 . Sur l'appareil triple quadripôle, la cellule de collision est vide et Q_3 reste en radiofréquence ($U_3=0$) et n'assure que la transmission des ions filtrés en Q_1 jusqu'au détecteur. Ce mode de travail reste limité car sauf intervention possible du rideau de gaz (CID) pour induire une fragmentation, les informations structurales restent peu nombreuses.

En spectrométrie de masse tandem, la cellule de collision contenant le quadripôle Q_2 est plus ou moins remplie d'un gaz. Les ions filtrés par Q_1 pénètrent plus ou moins violemment dans la cellule de collision. La tension appliquée entre Q_0 (quadripôle de l'interface) et Q_2 détermine l'énergie de collision [26]. Q_2 travaille en radiofréquence et confine ainsi les ions dans la cellule augmentant ainsi la probabilité de collision avec le gaz de collision. Suite aux collisions, l'énergie interne de la molécule (jusqu'alors insuffisante pour fragmenter) augmente. Selon le gain en énergie interne de l'ion, des processus de fragmentation différents pourront être mis en jeu [28]. Les ions fragments sont ensuite extraits de la cellule de collision et analysés par Q_3 .

Type de spectre	Mode de travail	
	Q ₁	Q ₃
Ions Produits (fils)	Fixe	Balayage
Ions Précurseurs (parents)	Balayage	Fixe
Perte de Neutres	Balayage	Balayage
mode MRM*	Fixe	Fixe

*MRM : "Multiple Reaction Monitoring".

Tableau I2: Différents modes de travail des quadripôles en spectrométrie de masse tandem et types de spectre obtenu.

Suivant le mode de travail de Q₁ et Q₃, les informations structurales fournies par les spectres seront différentes. Le tableau I-2 présente les différents modes de travail. Certains seront illustrés par des applications dans les paragraphes suivants:

- **Le spectre d'ion(s) produit(s):**

Q₁ est focalisé sur un rapport m/z donné et seuls les ions correspondant à ce rapport m/z sont alors fragmentés dans la cellule de collision. Les différents ions produits par la collision sont analysés en faisant un balayage de rapport m/z par Q₃. Un spectre d'ions produits permet de connaître et de vérifier la filiation des ions fragments à partir d'un ion précurseur. La figure I-17 montre un exemple de spectre d'ions produits pour le triglycérol estérifié en position terminale présenté figure I-12. Ce spectre a été réalisé avec une énergie de collision de 20 eV. L'ion [M+H]⁺ à m/z 423,5 a complètement disparu du spectre au profit des ions résultant de pertes d'eau et comme l'énergie de collision est relativement élevée, des fragments supplémentaires apparaissent. Un certain nombre est en rapport avec des pertes de l'unité primaire glycérol polymérisée ($\Delta m/z=74$) et perte d'eau, d'autres ont perdu la partie lauryl ester (m/z = 131, 149, 187, 223,...). Ils apportent ainsi de nouveaux renseignements structuraux.

La figure I-18 montre qu'en jouant sur la valeur de l'énergie de collision, il est possible de favoriser un processus de fragmentation plutôt qu'un autre et en conséquence, comme avec le rideau de gaz, de pouvoir distinguer l'isomère central (❶) de l'isomère terminal (❷).

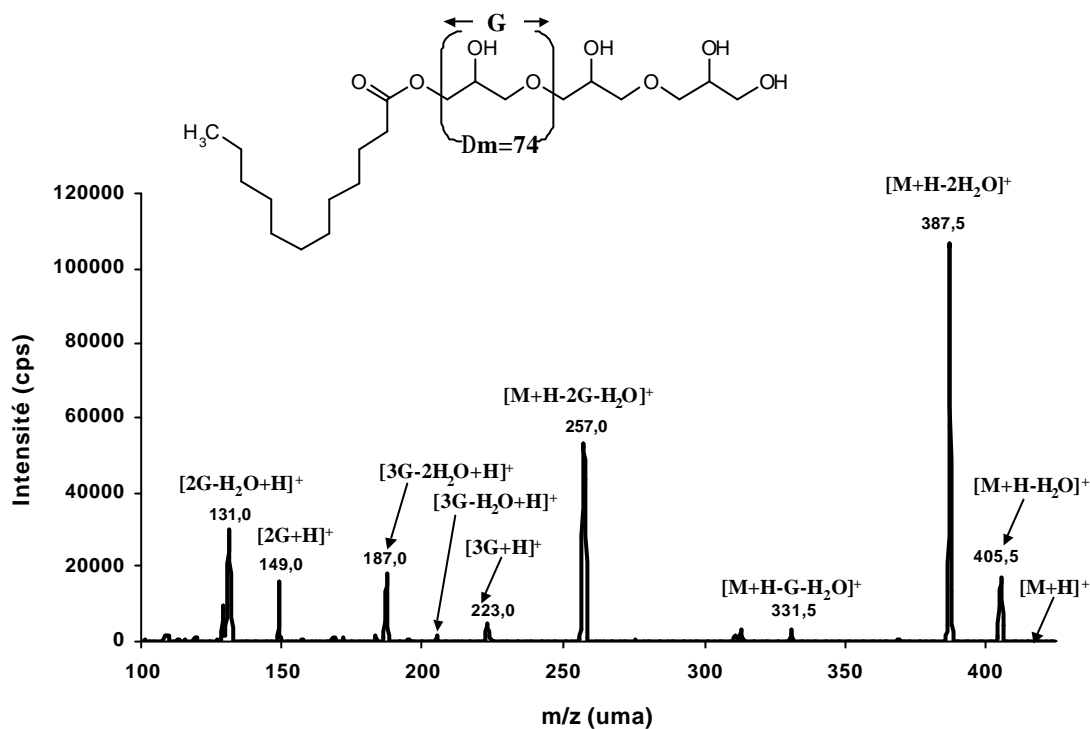


Figure I-17: Spectre d'ions produits (ions fils) à partir de l'ion $[M+H]^+$ ($m/z=423.5$) du triglycérol lauryl estérifié en position terminale. La source et l'interface sont réglées comme à la figure I-12. L'énergie de collision est de 20eV. La notation G correspond à l'unité primaire de polymérisation du glycérol. L'incrément en masse de cette unité est de 74 Th. (travail réalisé dans le cadre du projet européen FAIR DG XII n°97-1829)

▪ Le spectre d'ion(s) précurseur(s):

C'est le travail opposé au spectre d'ions produits. Il permet de vérifier la filiation d'ions précurseurs à partir d'ions produits. La figure I-19 montre qu'il est possible par ce biais de déterminer la présence de certaines familles de tensioactif au sein de mélanges complexes de différents tensioactifs. La figure I-19-❶ montre le spectre de masse simple d'un mélange de polyglycérols estérifiés par des acides provenant d'une huile de coprah additionnée artificiellement de Triton X-100 (formule figure I-19-❷) et de PEG 400 (polyéthylène glycol de degré de polymérisation moyen 8-9). L'étude des spectres d'ions produits des oligomères du Triton X100 montre la présence, pour une énergie de collision de 22eV, des fragments $m/z = 133, 177$ et 221 identifiés comme

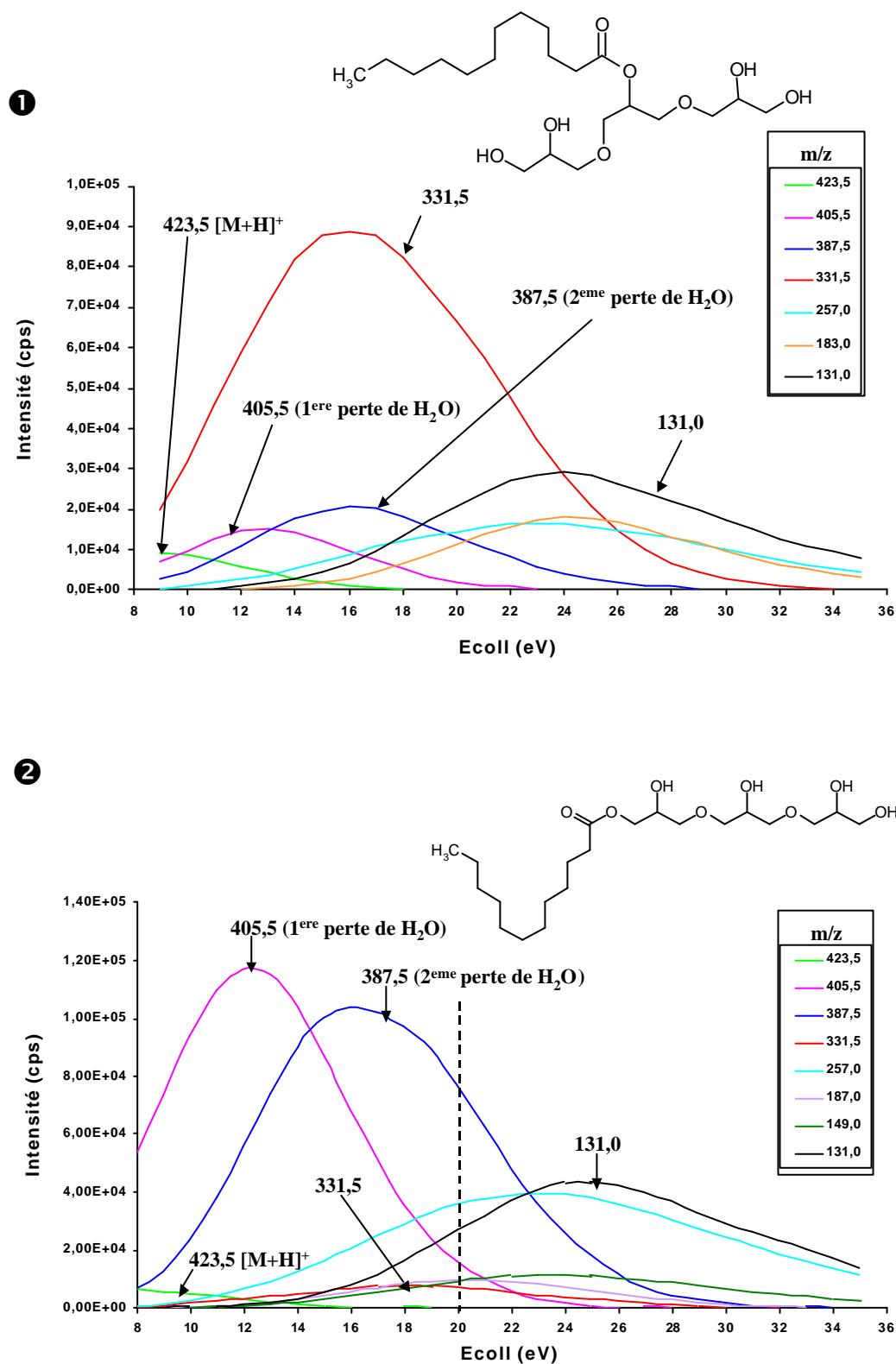


Figure I18: Evolution de la fragmentation de l'isomère central (❶) et terminal (❷) du triglycérol lauryl estérifié en fonction de l'énergie de collision (E_{coll}). Certains fragments sont communs mais leurs intensités permettent de les distinguer. Le spectre de l'isomère terminal à 20eV a été montré à la figure I-17. (travail réalisé dans le cadre du projet européen FAIR DG XII, n°97-1829).

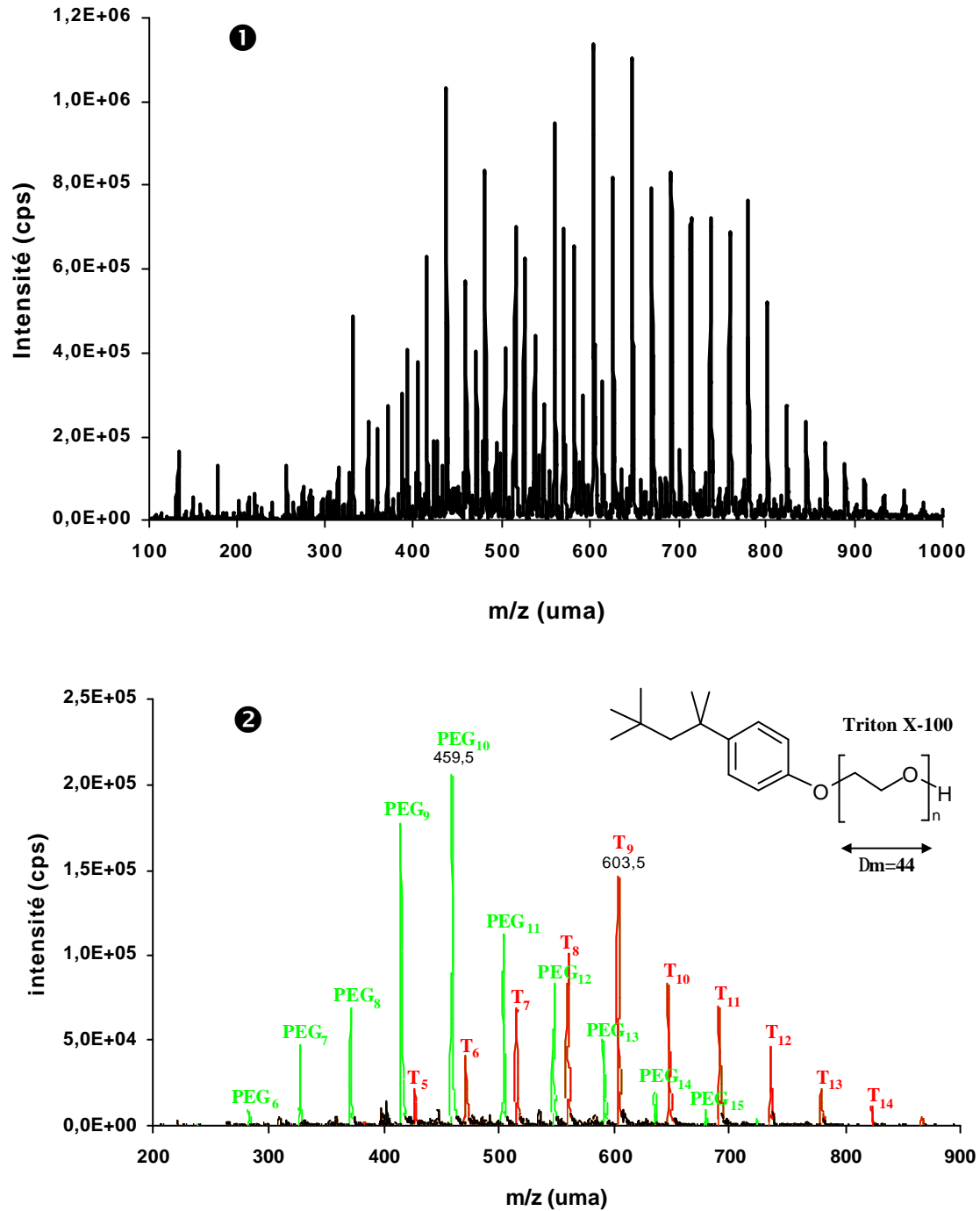


Figure I19: Utilisation des spectres d'ions précurseurs. Le spectre de masse ① montre l'analyse d'un mélange complexe de polyglycérols et d'ester de polyglycérols dopé avec du TritonX-100 (de degré moyen $n=9$) et du PEG 400 (n voisin de 8-9). Le spectre d'ions précurseurs ② à $m/z=133$ $[CH_2=CH-OH^+-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-OH]$ permet de visualiser spécifiquement les enchaînements polyéthoxylés de degré de polymérisation supérieurs à 3 au sein du mélange et de retrouver la série des polyéthylène glycols (PEG_n) et Triton (T_n). Le spectre est effectué avec une énergie de collision de 25eV et est le résultat de 30 accumulations, source : IonSpray (+5,7 kV).

étant issus de la chaîne polyéthoxylée $[(n \times 44)+1]^+$ (avec $n=3, 4$ et 5 . Les degrés $n>5$ sont peu intenses). Cette même série d'ions analogues a déjà été observée et identifiée en CPL-SM tandem pour les alcools polyéthoxylés par H. Fr. Schröder [29] mais le pic le plus intense était alors à $m/z = 89$ ($n=2$). Récemment (août 1999), Plomley et coll. ont montré l'utilisation de spectres d'ions précurseurs dans la caractérisation de phénols polyéthoxylés dans les rejets d'eaux usées agricoles [30]. La figure I19-2 montre le spectre d'ions précurseurs de l'ion fragment $m/z=133$ au sein du mélange de tensioactifs. Il permet aisément de détecter spécifiquement par une simple analyse la présence de tout composé possédant un enchaînement polyéthoxylé de degré de polymérisation supérieur ou égal à 3. Nous montrons ici que cette méthode s'applique donc non seulement aux tensioactifs polyéthoxylés mais permet aussi de révéler les polyéthylènes glycols.

▪ **Le spectre de perte de neutre :**

Le principe du spectre de perte de neutre est analogue à celui des ions précurseurs mais permettra de caractériser au sein d'un mélange l'ensemble des composés perdant un même fragment, cette fois, non chargé. En maintenant un écart de rapport m/z constant entre le balayage en Q_1 et Q_3 , il est possible de déterminer au sein d'un mélange de composés tous les composés possédant une perte caractéristique non ionique (perte d'eau, d'ammoniac, etc.).

▪ **Le mode MRM:**

Ce mode de travail ne fournit pas un spectre mais permet de se focaliser à la fois sur un ion et son fragment. Ce mode de travail ne servira quasiment qu'en couplage avec une méthode séparative pour gagner en spécificité de détection (hormis certains cas d'isomérisation, il est plus rare que deux composés distincts mais de même masse fragmentent de la même manière). Nous utiliserons ce mode de travail au chapitre IV de ce mémoire dans le cadre de l'analyse des acides aminés par CPL-SM tandem.

L'énergie de collision sur un appareil quadripolaire est très faible (quelques dizaines à une centaine d'eV) comparée à celle obtenue sur les appareils électromagnétiques (plusieurs keV). Les spectres de masse obtenus à partir de

collisions à basse énergie possèdent quelques désavantages, notamment de ne pas être toujours reproductibles d'un appareil à l'autre [26-28, 31, 32]. En conséquence, il n'existe pas de bibliothèques de spectres informatisées même si des recherches en ce sens commencent à aboutir [33] pour les spectres en masse simple. Le manque de reproductibilité peut aussi être un handicap dans le cas d'analyses interlaboratoires.

En revanche, à basse énergie, il est possible de jouer sur l'énergie de collision pour favoriser un mécanisme de dissociation plutôt qu'un autre (ceci est impossible avec les appareils permettant les collisions à haute énergie). De ce fait, on pourra choisir un fragment plutôt qu'un autre et optimiser sa réponse pour obtenir une bonne sensibilité de détection lors des couplages avec des méthodes séparatives.

B] Le COUPLAGE avec les METHODES SEPARATIVES ---

Avec l'essor des techniques API, la spectrométrie de masse est devenue compatible avec l'introduction d'échantillon en continu sous forme de solution, à des débits relativement élevés. Pour cette raison et bien d'autres qui seront développées dans cette partie, elle est ainsi en train de devenir le détecteur privilégié de toutes les méthodes analytiques réalisant une séparation en phase liquide (CPL, CPS, EC, ...).

Un bon détecteur chromatographique devrait posséder les qualités suivantes [1]:

1. être universel ou du moins être capable de détecter l'ensemble des composés élués en sortie du système séparatif.
2. être sensible, donner une réponse proportionnelle à la concentration (si possible linéaire et sur un grand domaine de concentration) et posséder une stabilité de signal dans le temps.
3. ne pas induire d'artefacts.

Les détecteurs utilisés en chromatographie répondent avec plus ou moins de facilité à ces 3 premiers critères (l'universalité de détection est en effet une condition difficile à remplir). Il faut supposer jusqu'à présent que le système séparatif est assez résolutif pour que les différentes substances contenues dans un mélange soient clairement identifiées pour être quantifiées. Un bon détecteur chromatographique devrait donc en plus:

4. apporter des informations structurales.
5. pouvoir distinguer des composés coélués et être capable de déconvoluer leurs signaux en vue de les quantifier spécifiquement.
6. être sélectif pour permettre de n'observer que le(s) composé(s) d'intérêt au sein de matrices complexes.

Mais, en plus de ces qualités principales, le détecteur idéal doit:

7. présenter un rapport coût/performance le plus bas possible.
8. être simple d'emploi.
9. être si possible non destructif.

La spectrométrie de masse plus que tout autre système de détection devrait permettre de satisfaire les points 4, 5 et 6.

1) UNIVERSALITE DE DETECTION

La première question à laquelle il faut répondre est: "La spectrométrie de masse va-t-elle être capable de détecter tous les composés d'un mélange complexe ou du moins va-t-elle détecter ceux qui présentent un intérêt et ceci quelque soit le système chromatographique choisi ?

1-3) Ionisation des solutés

La détection d'un signal chromatographique pour une méthode séparative couplée à la spectrométrie de masse est bien sûr liée à l'ionisation des composés par cette technique. Si aucune ionisation n'intervient, le courant ionique sera nul pour le composé et par conséquent, sa détection sera impossible. La première partie de ce chapitre a montré que l'IonSpray était plutôt dévolu aux composés ioniques et très polaires tandis que le nébuliseur chauffé permettait l'ionisation de composés moins polaires mais non ioniques (figure I-10). Avec ces deux sources, l'ionisation a lieu le plus souvent par transfert de proton ce qui signifie que la molécule doit posséder au moins un site acido-basique sur sa structure et de surcroît l'affinité protonique ou l'acidité en phase vapeur de ce site devra être supérieure à celle de l'éluant ou des additifs de l'éluant pour que ce transfert se réalise. Un certain nombre de composés peuvent s'ioniser directement par IS ou APCI comme les sucres (figure I-20), les carotènes et xanthophylles [13, 34]. Cependant il existe toute une catégorie de molécules ne possédant pas ce genre de site comme les alcanes, les alcènes, mais aussi tout un ensemble d'éthers et d'alcools. Certains alcools ou éthers ne sont pas assez basiques pour accepter facilement un proton. Pour ces raisons,

E. Bayer et ses collaborateurs ont développé toute une chimie de coordination (complexes Ag^+ , Pd^{2+} avec les alcènes et aromatiques, chimie du bore pour les alcools) pour détecter par spectrométrie de masse (couplée à la CPL ou non) la plupart des composés récalcitrants à l'ionisation par IonSpray [35, 36] et améliorer la sensibilité.

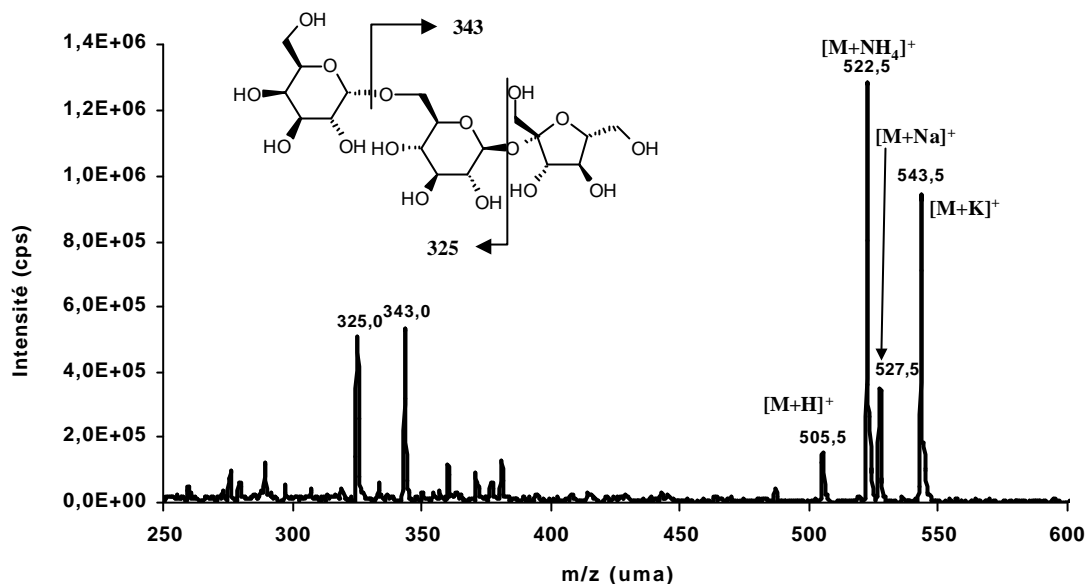


Figure I20: Spectre de la raffinose obtenu par IonSpray (+5,7kV). Infusion à $5\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ dans MeOH-tampon acétate d'ammonium 10mM (90-10). Concentration 1000mg/l.

Comme pour beaucoup d'autres détecteurs (U.V, fluorescence,...), lorsque le mode de détection n'est pas compatible, il est possible de dériver les solutés (avec tous les inconvénients que cela peut comporter en terme de reproductibilité de la réaction, rendement de dérivation, stabilité des dérivés...) [37]. Malgré tout, les techniques API peuvent donc être considérées comme quasi universelles (avec une nuance entre IonSpray et nébuliseur chauffé) puisque hormis les molécules apolaires, elles couvrent le reste de la gamme de polarité.

1-4) Systèmes chromatographiques utilisables avec les techniques API

Quel que soit le système chromatographique retenu pour une analyse, la phase mobile (solvants et additifs) utilisée doit être impérativement volatile pour ne pas contaminer l'intérieur du spectromètre. Ceci sera d'autant plus important que le débit de la phase

mobile sera élevé. Si cette exigence est respectée, le couplage d'une méthode séparative avec un détecteur API-SM ne pose aucun problème.

Mode*	ES	APCI	Commentaires
Phase Inverse	+++	++	Ionisation en solution aisée
Phase Normale	+	+++	Ionisation difficile dans les phases riches en alcanes et cycloalcanes
Exclusion	+++	+	Certains tampons utilisés peuvent poser problème
Appariement d'ions	++	++	L'agent d'appariement peut être responsable de neutralisations, de problèmes d'évaporation...
Echange d'ions	+	+	Tampons concentrés en général et peu volatils.

*Le nombre de signe "+" renseigne sur le degré de compatibilité.

Tableau I3: *Compatibilité de différents modes de séparation en CPL avec la détection par spectrométrie de masse utilisant un mode d'ionisation par électronébulisation (désigné par ES pour électrospray) ou par APCI. D'après [10]*

En ce qui concerne la CPL, à peu près tous les modes de séparation peuvent être envisagés comme le montre le tableau I3 mais avec des fortunes diverses quant à la sensibilité de détection.

2) SENSIBILITE DE DETECTION

La sensibilité d'une analyse se caractérise par son aptitude à dégager un signal produit par un composé par rapport au bruit de fond continu engendré par le système seul. Pour augmenter le rapport signal/bruit de fond (S/B), il faut chercher à augmenter le signal et/ou diminuer le bruit.

2-1) Sensibilité liée à l'ionisation

2-1-a) choix de la source

Ce point a déjà été plus ou moins discuté. Pour une meilleure sensibilité, il faut choisir la source où le rendement d'ionisation du composé à analyser est le plus élevé pour un éluant chromatographique donné.

2-1-b) influence de la composition de la phase mobile

Le milieu dans lequel se trouve les substances à analyser va fortement influencer leur rendement d'ionisation. La figure I-21 montre l'influence de la nature du solvant sur la réponse de l'hexaéthylenglycol monododécylether. Si la plupart des solvants sont compatibles avec l'APCI, un certain nombre sont incompatibles avec l'ionisation par électro-ébulisaison (tableau I-4) parce que ceux-ci ne sont pas dissociants (ils ne favorisent pas l'apparition de charge dans le milieu) et ne permettent pas les échanges de charges. Pour améliorer le rendement d'ionisation dans un solvant donné, on peut aussi avoir recours à des additifs (tableau I-4) acides pour favoriser la protonation (HCOOH dans le cas de la figure I-21) ou basiques pour favoriser la déprotonation. Cependant, cet ajout ne doit pas altérer les performances du système séparatif (efficacité, résolution, temps d'analyse...).

Bien qu'un certain nombre de publications [8, 10, 12, 38, 39] traitent des effets bénéfiques de certains solvants ou additifs par rapport aux autres, il semble bien difficile de dégager une règle absolue quant à un choix raisonné de l'éluant qui apportera la meilleure sensibilité pour un composé donné. Si les éluants à base de méthanol ont donné les meilleurs résultats pour Temesi et Law [39], la figure I-21 montre que ce ne sera pas toujours le cas. En ce qui concerne les additifs, en général, les résultats sont meilleurs avec de faibles concentrations (à cause du terme $K_B[B^+]$ de l'équation (2) exprimant le courant en fonction du courant de spray). Une forte proportion d'eau est moins favorable à la bonne désolvation des ions qu'une forte proportion de solvant organique. Cependant la présence de l'eau, grâce à son pouvoir dissociant, peut conduire à une meilleure ionisation que dans le cas où elle est totalement absente, comme le montre aussi la figure I-21. La phase mobile étant

imposée par le système chromatographique requis pour une bonne séparation, c'est donc ce dernier qui imposera les limites de détection.

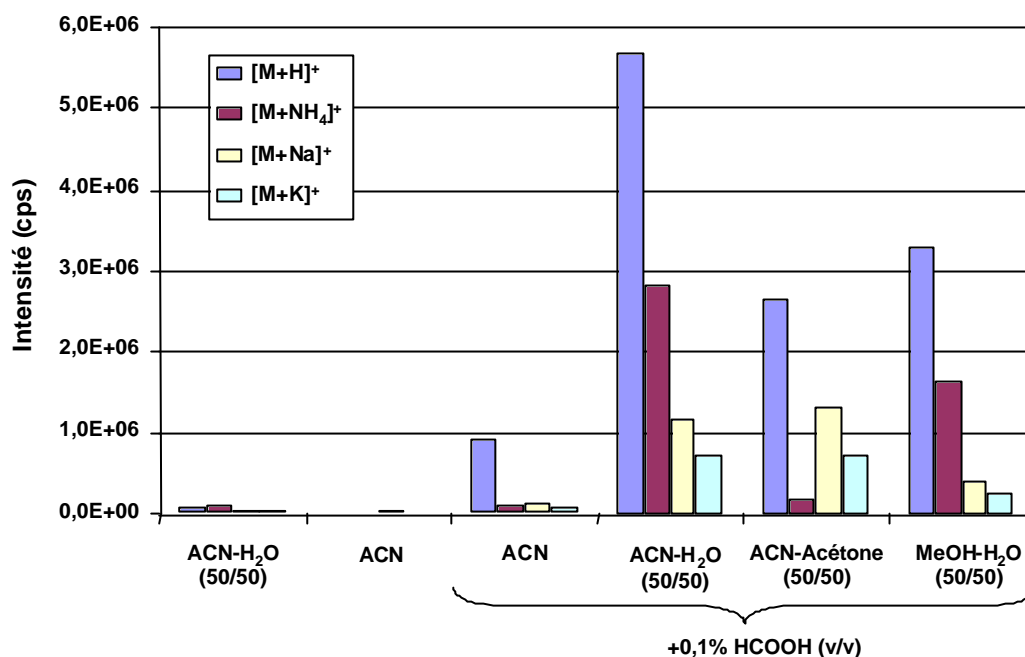


Figure I21: Influence de la composition du solvant sur l'ionisation et la répartition des espèces ioniques de l'hexaéthylèneglycol monododécylether. L'ajout d'acide formique favorise une meilleure ionisation et la réponse est plus élevée dans les solvants hydroorganiques. Source: IonSpray (+5,7kV).

Au regard du tableau I-4, il est facile de comprendre pourquoi la chromatographie à polarité de phases normale est moins adaptée à une détection par électronébulisation (tableau I-3) même si des travaux où l'éluant est riche en solvants défavorables (>85%, hexane ou toluène) sont possibles. Cela nécessite alors un contournement de la difficulté par ajout d'un liquide additionnel (contenant des solvants et additifs favorables) post-colonne [40] ou par une jonction de type coaxiale [41] analogue à celle utilisée en électrophorèse capillaire [42].

Les chromatographies ionique et de paire d'ions devraient être intéressantes puisque les composés à analyser sont déjà ioniques. Cependant, la chromatographie ionique suppose une élution en milieu salin. Une concentration en sels trop importante peut engendrer une chute de signal du courant de spray pour le composé à

analyser. En chromatographie de paire d'ions, une affinité trop grande entre le soluté et l'agent d'appariement risque d'engendrer une neutralisation de celui-ci [44, 45].

Solvants recommandés	ACN, MeOH, Eau
Solvants appropriés ou pouvant convenir	EtOH, nPrOH, iPrOH, BuOH, Acétone, CH ₂ Cl ₂ , CHCl ₃ , THF ¹
Additifs utilisables	En général, tout additif volatil <ul style="list-style-type: none"> ▪ pH: acide acétique, formique et trifluoroacétique. Ammoniaque, triéthylamine. Tampons composés d'un sel d'acides et base volatiles (acétate d'ammonium,...). ▪ Agent d'appariement d'ions: acide heptafluorobutyrique (HFBA)...
Solvants non appropriés à l'électronébulisation	DMF ² , DMSO ² , toluène, benzène, alcanes (pentane, hexane, heptane) et cycloalcanes, CCl ₄ , CS ₂ .
A proscrire ou éviter	Tout sel ou additif non volatil : sels de sodium, potassium, phosphates, sulfates, borates...
<ol style="list-style-type: none"> 1. A éviter en APCI en concentration élevée à cause de l'inflammabilité. 2. Peut être utilisé à hauteur de 10%. 	

Tableau I4: *Compatibilité de différents solvants vis à vis de l'ionisation API. D'après [10] et PE Sciex API 100/300 Training Operator Course 1/6/97.*

2-1-c) influence de la qualité de la phase mobile

La qualité en terme de pureté est d'autant plus importante en spectrométrie de masse que ce sont les impuretés, qui éluées en flux continu, vont déterminer un bruit de fond d'origine chimique. En général celui-ci est plus élevé pour les faibles masses moléculaires. Comme le montre la figure I22, les solvants contiennent un certain nombre de contaminants de faible masse (en général inférieure à 250 Th). Ils nuisent à la sensibilité de détection des composés ayant la même masse que ces contaminants en augmentant considérablement le bruit de fond global au rapport m/z concerné (le rapport S/B diminue).

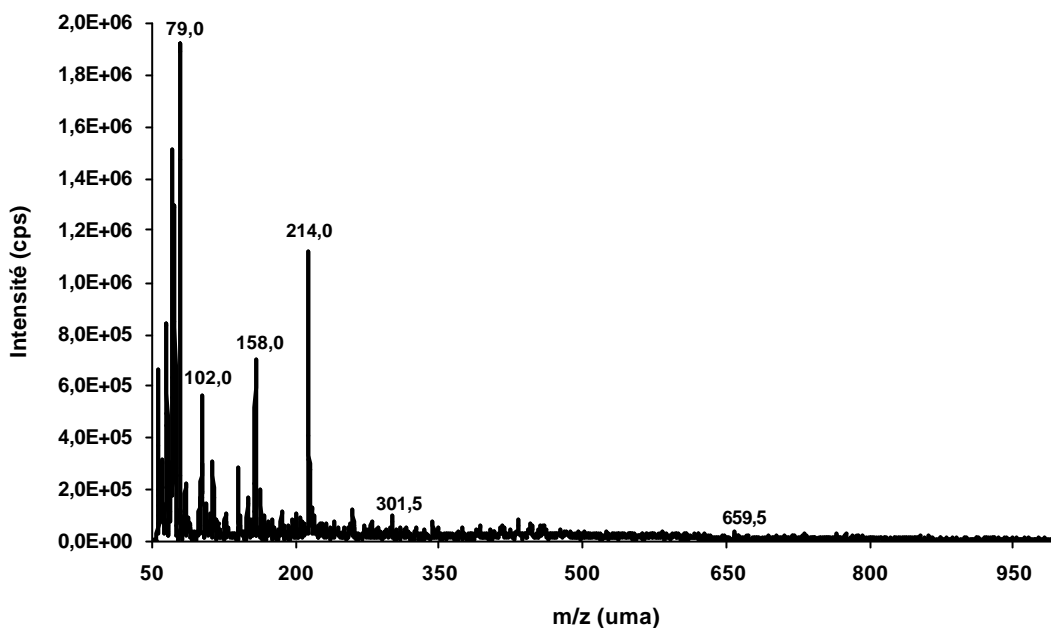


Figure I22: Spectre de masse d'un éluant composé de méthanol-eau (95-5) additionné de 0.5% d'acide formique. Tous les ingrédients de cette phase mobile sont de qualité HPLC, cependant il apparaît des pics "parasites" aux faibles masses moléculaires (<250 Th) qui sont à l'origine d'une moins bonne sensibilité de détection aux rapports m/z considérés (exemples: 79, 214). Source: IonSpray (+5,7 kV).

Il existe un moyen de réduire ce bruit de fond d'origine chimique en fragmentant ces composés parasites par CID-MS dans le rideau de gaz de l'interface (en augmentant celui-ci ainsi que le voltage de l'orifice). Ceci n'est valable que dans le cas où les solutés ne sont pas ou sont peu sensibles à la fragmentation.

2-1-d) influence des débits

Les débits de liquide et de gaz sont des paramètres cruciaux pour plusieurs raisons. Un débit de liquide ou de gaz non adapté dans la source risque de déstabiliser la production du spray et augmenter le bruit de fond (d'origine physique cette fois) pour la production d'un même signal. En APCI, la thermodégradation du soluté est évitée par sa vaporisation immédiate [25], ce qui suppose des débits de fluide adaptés (pas trop faibles).

Les débits d'éluants optimaux sont compris entre 5 et 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ pour l'IonSpray et compris entre 0,5 et 2 ml/min pour le nébuliseur chauffé. Dans le domaine de débit

liquide spécifié, l'IonSpray se comporte comme un détecteur de concentration [25, 45], c'est à dire que l'augmentation ou la diminution de débit n'engendre pas de variation de la hauteur du signal pour une concentration donnée. En revanche, le nébuliseur chauffé se comporte comme un détecteur massique [25]. L'augmentation du débit induira une augmentation de la réponse du composé.

2-2) Fréquence d'acquisition d'un signal

La sensibilité est bien évidemment liée à la quantité d'ions produits, mais aussi comme nous allons le voir au temps qui est consacré à réaliser une mesure donnée, c'est à dire à la fréquence d'acquisition d'un signal. Un cycle d'acquisition complet C est fonction de G qui représente la gamme de rapport m/z à étudier, de I qui est la valeur de l'incrément entre chaque rapport m/z et d_w qui est le temps de résidence sur la mesure du courant à un rapport m/z donné selon:

$$C = \frac{G \times d_w}{I} \quad (3)$$

Par exemple, si on balaye 500 unités de masse (G), toutes les 0,5 unités de masse (I) et que le temps de résidence (d_w) sur la mesure est de 2 millisecondes, le cycle d'acquisition C durera 2 secondes.

Si le temps de résidence sur la mesure chute dramatiquement, la sensibilité en fait autant car une mesure précise du courant ionique (intensité en coups par seconde, d'où l'unité "cps" de l'échelle des intensités) n'aura pas le temps de s'établir avant de passer à l'autre mesure et la contribution du bruit de fond d'origine physique (stabilité du spray) se fait plus importante. Plus d_w sera élevé, plus le rapport S/B sera élevé [46].

Lors de l'acquisition de spectre de masse par infusion de l'échantillon, on dispose en règle générale d'un temps suffisant ; le cycle d'acquisition peut être élevé. Il n'en va pas de même en chromatographie car la largeur des pics détermine une fenêtre d'acquisition plus étroite. Le cycle devra comporter un nombre suffisant de points d'acquisition par pic chromatographique. Si un pic chromatographique (figure I-23) possède une largeur de T

minutes et que l'on souhaite avoir son tracé avec un minimum de x mesures, le cycle d'acquisition aura une largeur de $C=T/x$ minute(s). Si pendant ce cycle il faut mesurer le courant ionique pour n ($n = G / I$) rapports m/z , la mesure du courant pour un rapport m/z donné pour chaque cycle s'effectue pendant un temps $d_w = T / n.x$ minute(s). Ceci signifie que plus on voudra suivre de rapports m/z au cours d'une expérience, plus d_w devra être faible et moins l'analyse sera sensible.

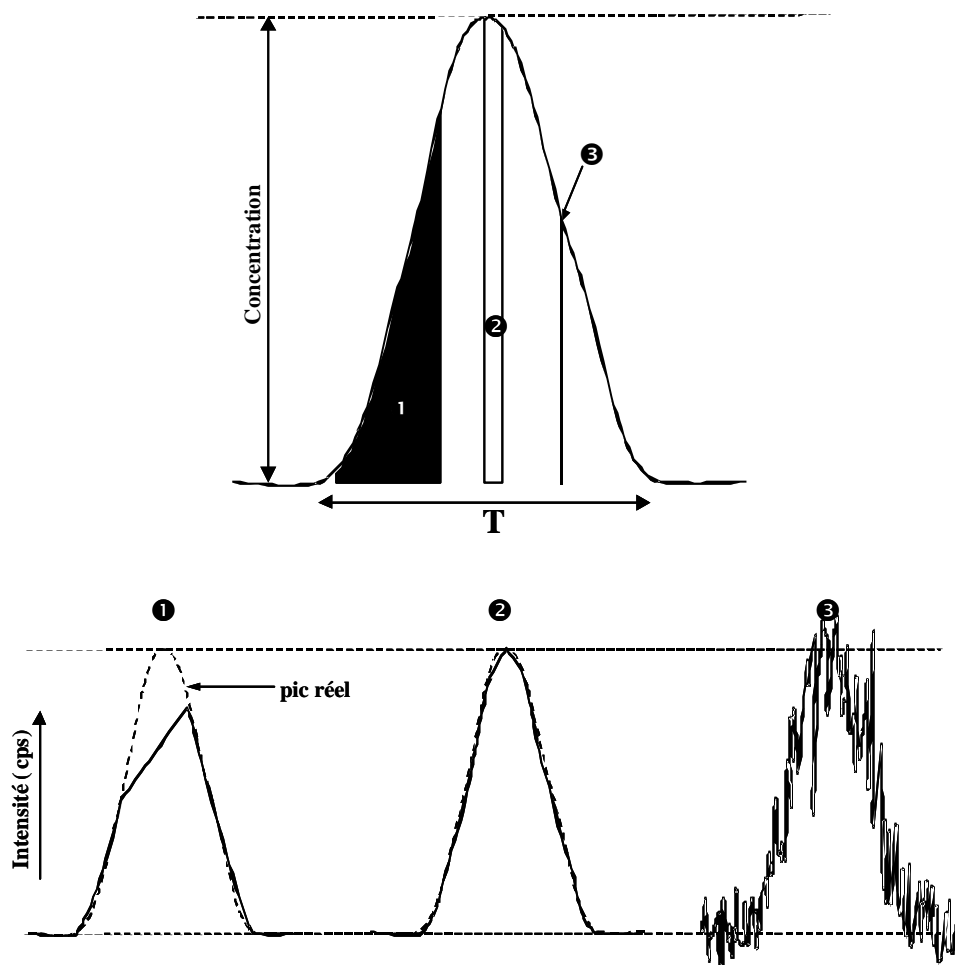


Figure I-23: Graphique montrant l'influence du temps de résidence de la mesure (d_w) sur l'enregistrement d'un pic chromatographique de largeur à la base de T (unité de temps). Supposons que $T=30s$ et que l'expérience suive 5 rapports m/z différents et que le temps de résidence (d_w) sur la mesure soit ❶: 1500ms, ❷: 400ms et ❸: 40ms. Ceci correspond à une cycle d'acquisition C de respectivement 7,5s, 2s et 200ms. Le tracé ❶ correspond à une mesure du courant avec un temps de résidence trop long . Compte tenu de ce temps, le pic ❶ n'est tracé qu'avec 4 points d'acquisition. et en conséquence est tronqué à son sommet. Le temps de résidence ❷ permet l'acquisition du même pic avec 15 points avec une précision de mesure conservée, tandis que le temps de résidence très court ❸ permet une acquisition de ce pic avec 150 points mais le bruit de fond est augmenté (le rapport S/B est plus faible).

Sur la figure I-23, le même pic chromatographique a été tracé avec des temps de résidence sur la mesure différents. Le temps de résidence correspondant à l'aire hachurée est long par rapport à la largeur du pic (T) chromatographique. Dans le cas d'un temps de résidence trop long (❶), l'amplitude du bruit de fond est très faible mais le nombre de mesures est restreint si bien que le pic se trouve tronqué (la mesure en sommet de pic n'est pas effectuée). Dans le cas où le temps de résidence est trop court (❷), le nombre de mesures est très important. L'amplitude du bruit de fond est important et la mesure du pic est perturbée par la stabilité du spray (S/B sera donc petit). Le temps de résidence ❸ est adéquat: Le bruit de fond est minimisé et le nombre de mesures est suffisant pour ne pas manquer le sommet du pic.

2-2-a) Le balayage pleine échelle

Le balayage pleine échelle est l'analyse qui perd le moins d'informations. Aucun rapport m/z n'est omis entre les bornes de la gamme de masse étudiée. Un grand nombre de masse sont suivis, le temps de résidence sur les mesures est court. Ce genre d'expérience est peu sensible sauf dans le cas où les composés répondent bien au mode d'ionisation (figure I-24-❶). Chaque pic chromatographique est tracé en prenant en compte l'ensemble des ions générés au temps chromatographique donné, c'est à dire en mesurant le courant ionique total (couramment nommé TIC pour "Total Ion Current"). On retrouvera le spectre de masse (figure I-24-❷) associé au pic en déconvoluant le signal obtenu. Ce dernier point concerne la spécificité de détection développée ultérieurement dans la partie B-3.

2-2-b) La détection d'ions sélectionnés

Lorsque les composés à détecter sont connus, il vaut mieux se focaliser sur les rapports m/z auxquels apparaissent les ions de nos composés. A partir de ce moment le nombre d'ions à suivre étant réduit, le temps de résidence sur les mesures pourra considérablement être augmenté. Les expériences en ions sélectionnés (SIM pour "Selected Ion Monitoring") sont donc parmi les plus sensibles. Le maximum de sensibilité est obtenu en SM/SM (mode MRM pour "Multiple Reaction Monitoring") puisqu'en augmentant à la fois la sélectivité de détection et le temps de résidence sur

la mesure, on diminue le bruit de fond à la fois sur sa composante chimique (solvant, mais aussi matrices) et sur sa composante physique (variation du spray entre autre).

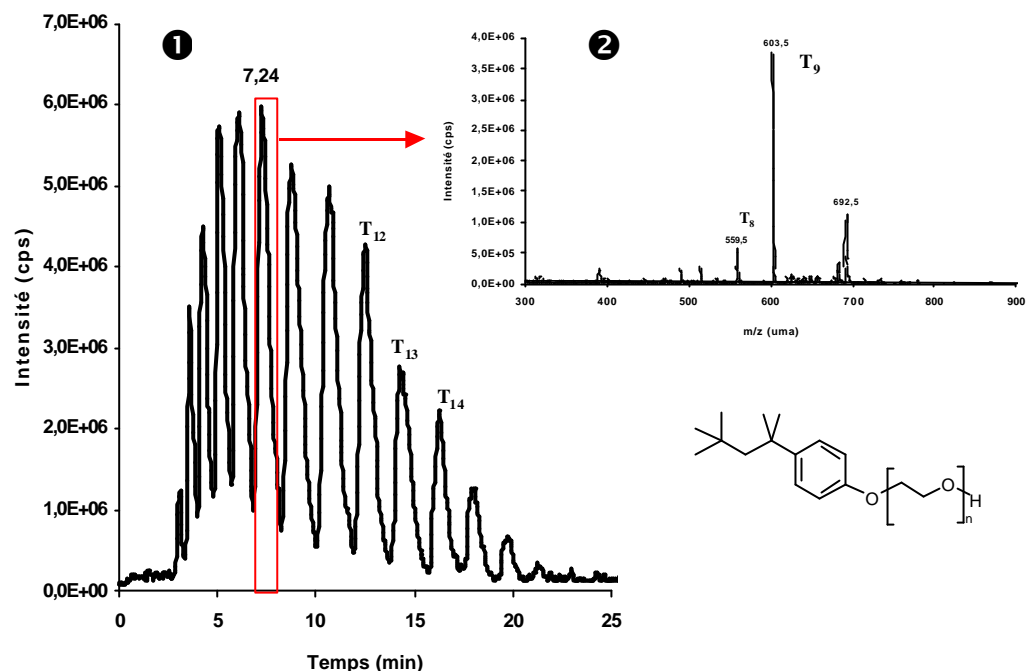


Figure I24: Exemple d'une expérience CPL-SM (❶) avec détection en mode pleine échelle (de 300 à 1000 uma incrementée tous les 0,5 uma). L'échantillon analysé est le Triton X-100. La CPL est réalisée sur Hypercarb 7 μ m (100 x 4,6 mm D.I) en gradient d'élution: ACN-CH₂Cl₂ (80-20) pendant 5 minutes puis passage à ACN-CH₂Cl₂ (20-80) en 25 minutes. Source: nébuliseur chauffé (Température = 300°C, courant de décharge = 3 μ A, pression de nébulisation = 4 bars). En analysant la nature du courant ionique qui a créé le pic à 7,24 minute, il est possible d'accéder au spectre de masse correspondant ❷ et d'identifier le composé élué. Il s'agit là du degré de polymérisation 9 en oxyde d'éthylène (noté T₉). En étudiant les spectres des pics successifs, il est possible d'indexer tous les pics chromatographiques.[P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse, communication affichée, Congrès SEP97, Mai 1997 Paris].

2-3) Résolution

L'action sur la résolution (en jouant sur la rapport U/V de balayage des quadripôles) n'est valable qu'en CPL-SM-SM car la spécificité de détection est grande. En abaissant la résolution d'une unité de masse, il est facile de filtrer l'ensemble des molécules isotopes d'un composé (¹³C en général) et l'ensemble de ses fragments isotopes. Il y a donc gain de signal sans que l'augmentation du bruit de fond soit affectée.

3) SPECIFICITE DE DETECTION

Nous avons évoqué l'idée que le détecteur idéal puisse apporter des informations structurales sur les composés élués, d'être capable de mettre en évidence les coélutions et de pouvoir détecter et quantifier sélectivement certains composés dans une matrice complexe. Ce genre de détecteur est plus rare en chromatographie liquide (chromatographie sous entend ici aussi électrophorèse). La détection UV à barrette de diodes reste limitée quant aux apports structuraux et la RMN reste en générale peu sensible et chère.

La figure I-24 a donné déjà un aperçu des performances de détection par spectrométrie de masse dans l'analyse du Triton X-100 où à chaque pic chromatographique peut être associé un spectre de masse correspondant. Chaque pic montre la quasi seule présence d'un composé et le degré de polymérisation de celui-ci est déduit du spectre de masse qui lui est associé.

Nous allons voir maintenant d'autres exemples pour illustrer divers aspects de la spécificité de détection par spectrométrie de masse.

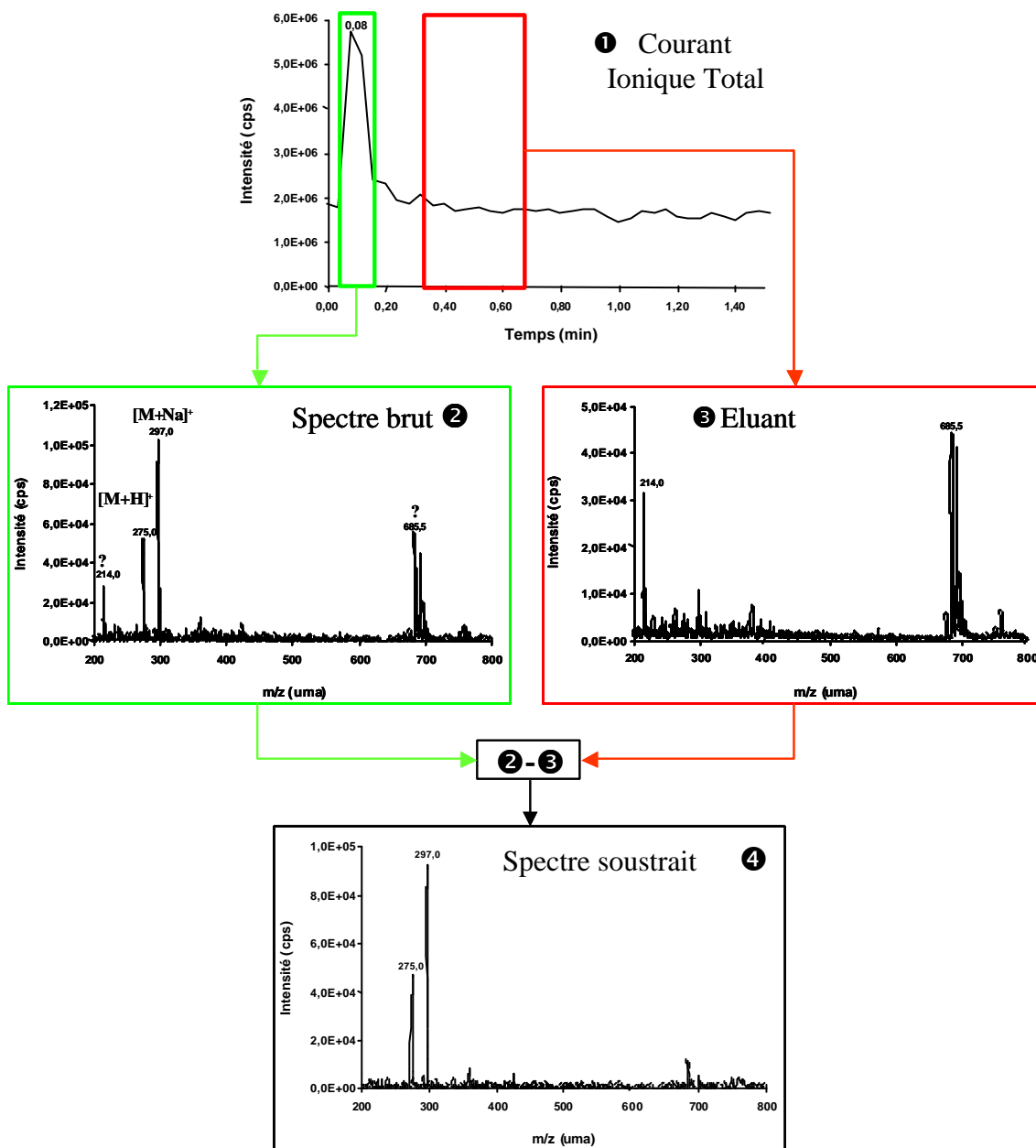
3-1) Mélanges simples

On considérera comme mélange simple tout mélange dont chaque constituant possède une masse moléculaire bien distincte (au moins 1 uma de différence pour des quadripôles et par conséquent pas d'isomères ou isobares) des autres composés du mélange et dont les fragments potentiellement produits par CID (dans le rideau de gaz) ne recouvrent pas la masse moléculaire d'un autre composé du mélange. A cette condition, on peut même espérer réaliser une expérience sans colonne chromatographique.

3-1-a) Analyses sans colonne

L'appareillage chromatographique couplé à la SM est ici utilisé sans colonne. Cette méthode est désignée par le terme FIA (pour Flow Injection Analysis). Ces analyses (figure I-25) sont très rapides (moins d'une minute, injection, analyse et rinçage compris) car il n'y a pas de rétention chromatographique. En analyse pleine échelle, cela permet de tracer le spectre de masse donnant un profil de l'échantillon. L'avantage de cette technique par rapport à l'infusion réside dans le fait qu'il est possible de soustraire le bruit de fond chimique apporté en continu par l'éluant. Il faut bien entendu solubiliser

l'échantillon dans l'éluant pour que la soustraction du fond chimique soit correcte. Les pics induits par le solvant seul (figure I25-③) disparaissent pour ne laisser sur le spectre que les pics des composés constituant l'échantillon. Les différents points de



cette méthode sont illustrés dans la figure I-25 pour un composé pur.

La même technique peut s'avérer très intéressante lorsque l'échantillon est un mélange de composés de masses différentes. C'est le cas du mélange de tensioactifs BC-10TX constitué principalement de deux séries oligomériques C₁₆EOn et C₁₈EO_m (Figure I-26). On distingue aisément sur cette empreinte les pics séparés de 44 uma (motif de base O-CH₂-CH₂) et les pics séparés de 28 uma (motif de base de 2 fois CH₂)

Ainsi il est possible de réaliser, si l'on possède l'un des constituants de ce mélange, un étalonnage quantitatif et de doser ce composé dans le mélange par FIA. Par contre l'extension de cette courbe d'étalonnage aux autres constituants reste réservée car chaque composé peut avoir un rendement d'ionisation propre.

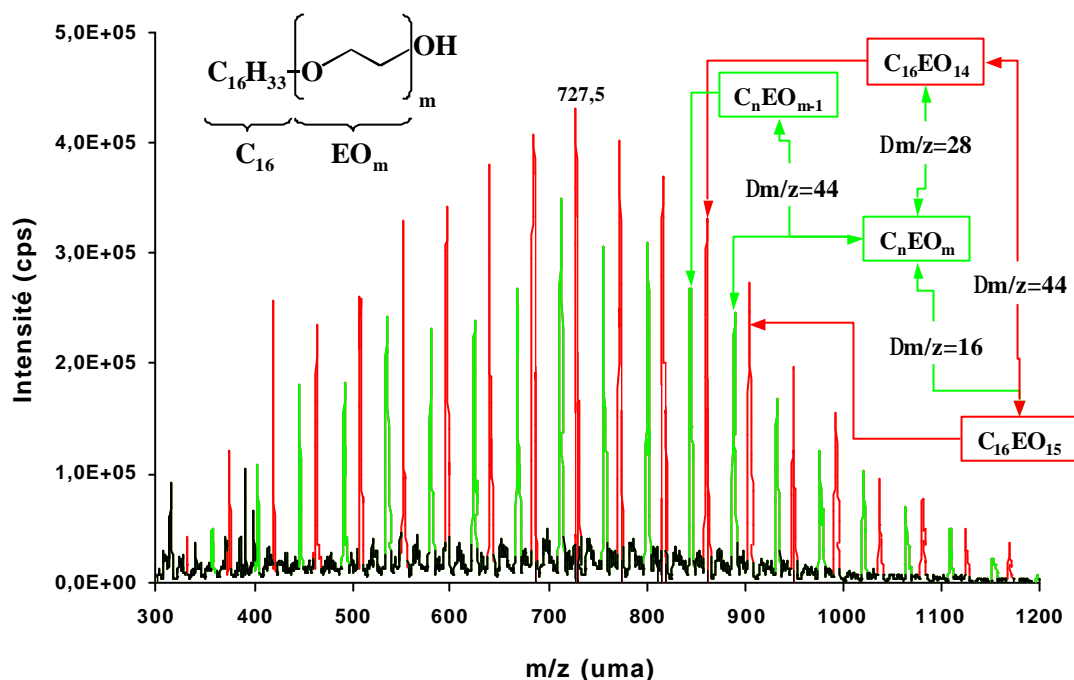


Figure I26: Spectre du BC-10TX (C₁₆EO_m) obtenu par analyse FIA (1 ml/min) en APCI (+3μA, 400°C, 4bars) en mode positif (ions observés: [M+H]⁺). Eluant: Acétonitrile. Tous les composés principaux du mélange sont identifiables. La série en rouge signifie que la chaîne hydrophobe comporte 16 carbones. Il existe une série supplémentaire indiquée en vert. Il s'agit aussi d'une série de composés polyéthoxylés (Dm/z=44) dont la différence de masse (vraisemblablement 28Th) pourrait provenir de la nature de la chaîne hydrophobe.

Les analyses en mode FIA semblent très intéressantes puisque très rapides et automatisables (injecteur automatique). Cependant, il faut particulièrement faire attention à plusieurs problèmes :

- Le phénomène de suppression ionique et de saturation de spray [8] est maximal car tous les composés sont élués en même temps. Il faut donc essayer de travailler dans les milieux les plus dilués possibles.
- En IonSpray, la présence de Na^+ ou K^+ dans l'échantillon entraîne la présence d'adduits qui dilue le signal pour une même espèce (au lieu d'être réparti sous un seul rapport m/z , le composé se retrouve sous 2 ou trois voir 4 espèces ioniques de rapport m/z différent). Ce phénomène tend à disparaître avec la chromatographie car le sodium et/ou potassium injectés ne sont en général plus élués en même temps.
- La largeur des pics de FIA étant en général de l'ordre de quelques secondes (5 à 10 s en fonction du volume injecté et du débit liquide), le temps de résidence (d) sur une mesure est donc souvent faible. Donc, bien que le phénomène de diffusion chromatographique soit négligeable, le rapport S/B ne sera donc pas forcément meilleur qu'avec le système séparatif.
- L'absence de colonne peut infliger au pic une forme légèrement différente d'une injection à l'autre avec des variations plus importantes sur les aires des pics pour une même quantité injectée que sur un pic chromatographique. Il est possible pour remédier à cela d'utiliser des colonnes très courtes (ex: 3 mm de longueur) pour corriger ce défaut sans affecter de trop la durée de l'analyse.

3-1-b) Couplage Chromatographique

L'analyse de ce même mélange BC-10TX a été réalisée en CPL avec un détecteur quasi universel (le Détecteur Évaporatif à Diffusion de Lumière (DEDL)) dont nous rappellerons le principe ultérieurement. Ce travail développé sur phase de carbone graphitique poreux (nommé PGC pour « Porous Graphitic Carbon ») a montré le

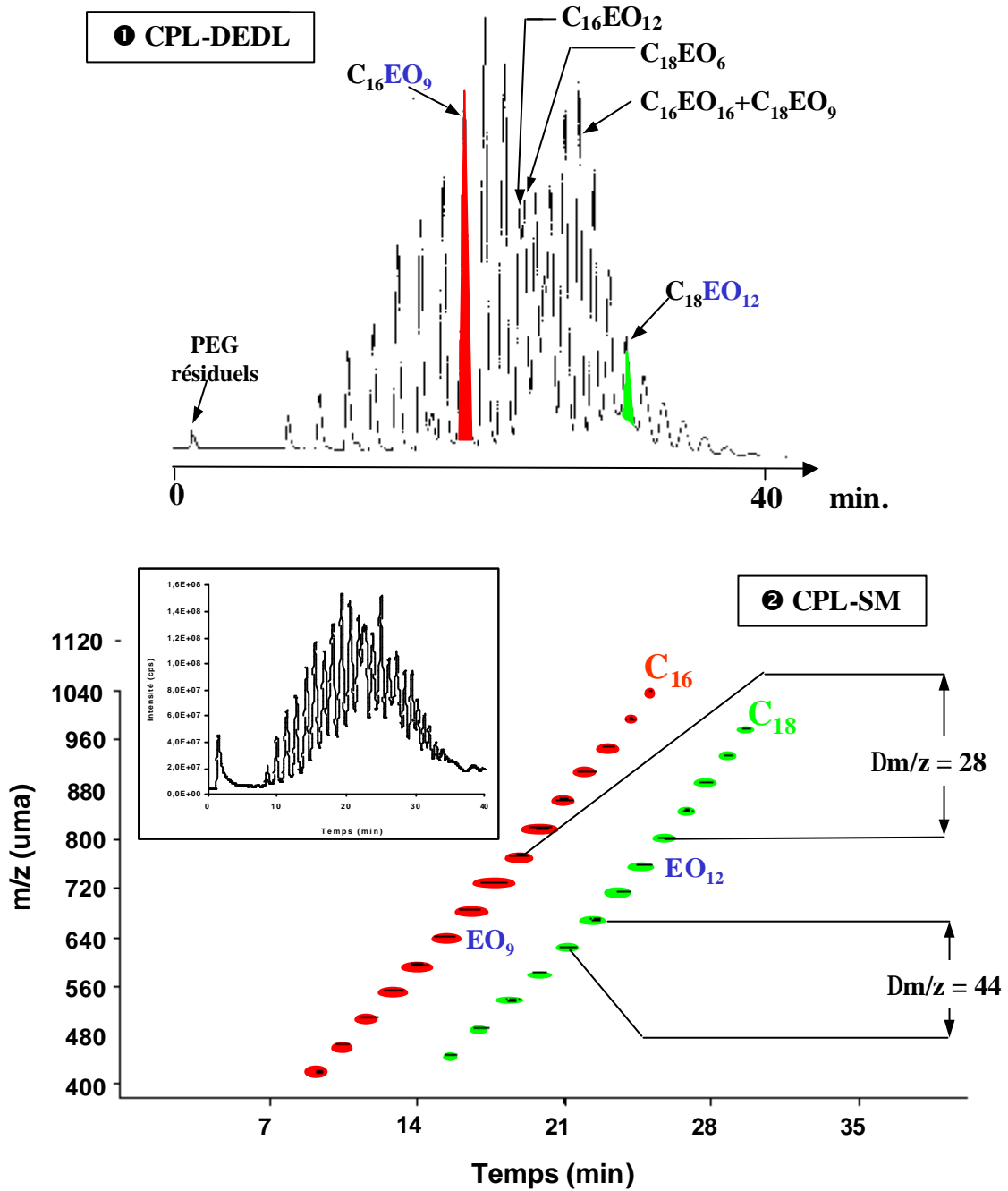


Figure I27: ① Analyse CPL-DEDL du BC-10TX sur Hypercarb (100x4.6mm D.I.) en gradient d'éluion (A: ACN, B: CH_2Cl_2 , de 20% de B à 80% de B en 30 minutes, débit: 1ml/min). L'indexation des pics est réalisée à partir de l'analyse CPL-SM ② (courant ionique total). Source: APCI (+3 μ A, 400°C, 4bars) en mode positif. L'encadré montre le profil chromatographique CPL-SM. En analysant (avec un logiciel informatique) les intensités des courants pour chaque rapport m/z , il est possible de tracer une carte bidimensionnelle de l'analyse faisant apparaître clairement chaque famille d'alcools polyéthoxylés. Les coélutions sont résolues. PEG: Polyéthylène glycol. [P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse., Communication affichée, HPLC'97, Juin 1997, Birmingham (GB)].

comportement original de ce support comparé aux phases octadécyles. Nous montrerons également l'intérêt de ce support dans les chapitres suivants pour l'analyse des acides aminés.

L'analyse CPL-DEDL, montrée figure I-27-❶, souligne le recouvrement partiel des deux familles oligomériques précédemment mises en évidence figure I-26 en FIA et qu'en l'absence de standards il est difficile d'identifier l'ordre d'élution et de résoudre la coélution.

En effet, il a été montré [47] que sur ce type de support, utilisé avec des mélanges hydro-organiques, l'ordre d'élution ne suit pas les règles classiques observées sur phases octadécyles : non seulement la rétention s'accroît comme la longueur de la chaîne hydrocarbonée apolaire mais aussi en fonction de l'augmentation de la tête polaire (OCH₂CH₂)_n.

La même analyse effectuée par couplage CPL-SM (figure I-27-❷) a permis :

- D'indexer chaque pic chromatographique et d'en déduire les coélutions en l'absence de standards

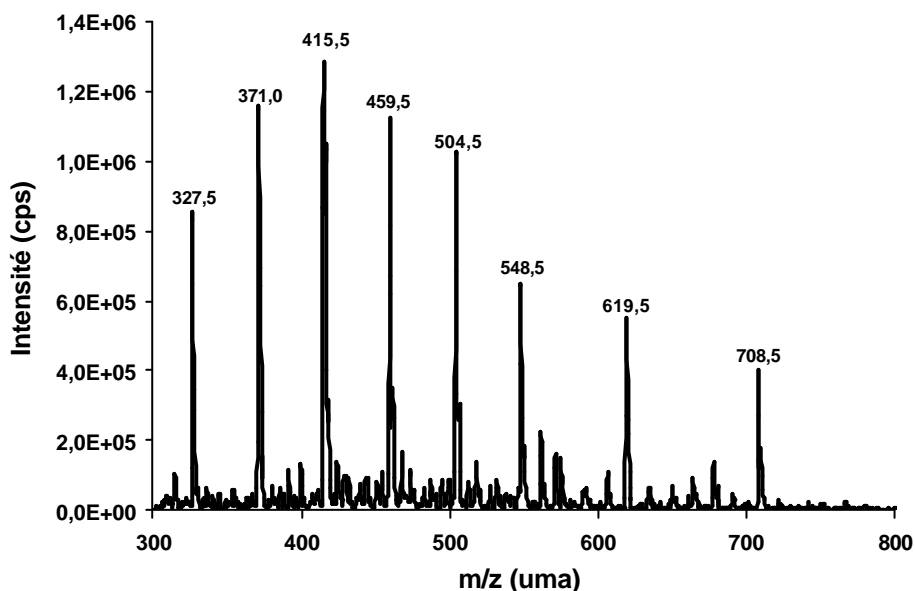


Figure I-28: Spectre de masse correspondant au pic chromatographique en volume mort de la colonne Hypercarb lors de l'analyse du BC-10TX (conditions et profil chromatographique donnés à la figure I-27). Les masses observées correspondent à celles de polyéthylène glycols. L'ion à 415,5 Th correspond à un degré de polymérisation de 9. Les deux ions à 619,5 et 708,5 Th sont d'une autre nature [P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse., *J. Chromatogr. A*, 797 (1998) 83].

- De vérifier l'ordre d'éluion par nombre d'oxyde d'éthylène croissant sur PGC comme on peut l'observer sur la figure I-24 pour le Triton X100
- D'identifier la nature des composés élués proches du volume mort. Il s'agit de polyéthylène glycols (PEG) résiduels (Figure I-28) qui, parce qu'ils ne sont pas en grande quantité dans le mélange, n'apparaissent quasiment pas sur le spectre réalisé en FIA (figure I-26).

Ainsi, le couplage CPL-SM a apporté une dimension supplémentaire au travail réalisé en FIA.

3-2) Mélanges complexes

La comparaison FIA-SM et CPL-SM a été étendue à l'analyse d'un échantillon plus complexe que précédemment : un mélange de polyglycérols estérifiés par une base

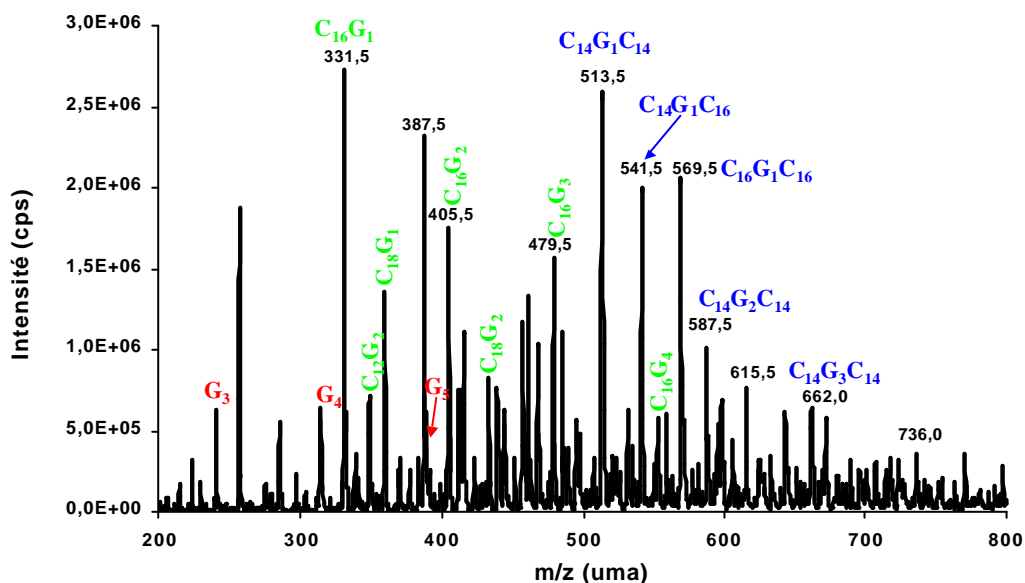


Figure I29: Analyse FIA du mélange industriel de polyglycérols estérifié par une base d'huile de coprah. Nébuliseur chauffé (+3μA, 400°C, 4 bars). MeOH-eau-HCOOH (95-5-0.5 v/v). Le spectre montre la complexité d'un tel mélange. Un grand nombre de pics peuvent être cependant indexés mais la proportion en chaque isomère ne peut être donnée. G_n correspond aux polyglycérols de degré de polymérisation n, CmGn correspond à un monoester de chaîne grasse à m atomes de carbone dont la partie polaire comprend n motifs glycérols. CmGnCp correspond aux diesters (m et p peuvent être égaux ou différents)[Projet européen FAIR DGXII, n° 97-1829].

d'huile de coprah. La difficulté réside à la fois dans les isomères rencontrés dans les di, tri, tétra... polyglycérols de départ, dans le mélange de chaînes alkyles (majoritairement C₁₄ et C₁₆) et de l'estérification pouvant avoir lieu sur les nombreux groupes hydroxyles du polyglycérol.

L'analyse par FIA-SM (Figure I-29) permet de dégager rapidement les espèces majoritaires dans le mélange. On remarque aisément les monoesters C₁₆G₁, C₁₈G₁, C₁₆G₂, C₁₆G₃ (G₁ correspond au glycérol, G₂ le diglycérol, G₃ le triglycérol) et les diesters C₁₄G₁C₁₄, C₁₄G₁C₁₆ et C₁₆G₁C₁₆. Mais les nombreux autres esters ainsi que les polyglycérols résiduels se répartissent dans les autres petits pics plus difficilement exploitables.

Si l'on utilise la CPL avec phase octadécyle (Zorbax ODS) et un gradient acétonitrile-eau avant SM, l'analyse est plus longue mais comme la rétention suit le caractère hydrophobe des composés, on peut dégager les massifs suivants : en tête d'élution sortent les polyglycérols, puis les monoesters selon la longueur de la chaîne alkyle ou de la tête polaire, puis ensuite les diesters (Figure I-30). Par contre cette séparation ne permet pas de distinguer les isomères des esters de polyglycérols.

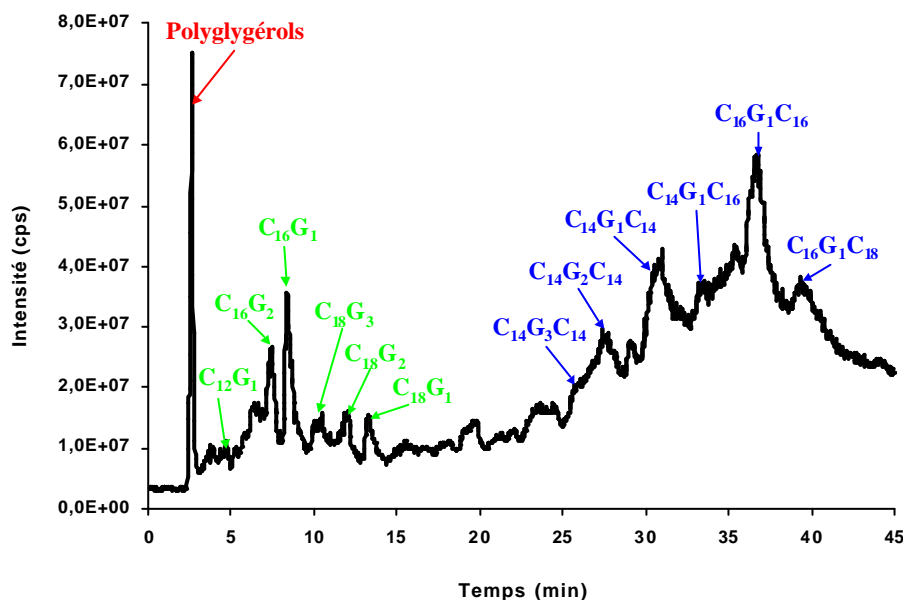


Figure I-30: Analyse CPL-SM (TIC) en gradient d'élution du mélange proposé figure I29 sur colonne Zorbax ODS (150x4,6 mm DI). Certains pics ont été indexés. Elution: De MeOH-Eau (75/25) à MeOH pur en 20 min. 1ml/min [projet européen FAIR DGXII, n°97-1829].

Ces exemples montrent bien l'apport de la détection par spectrométrie de masse par rapport aux autres détections classiques. L'apport d'une dimension supplémentaire (m/z) accroît la puissance de résolution de l'analyse. Nous n'avons plus ici forcément besoin de standards pour identifier les composés d'un mélange, les coélutions sont identifiées.

Comme le montre la figure I-31, la déconvolution des signaux permet aussi de retracer spécifiquement le signal apporté par un composé alors qu'il se trouve en mélange avec un autre. Le système chromatographique n'a donc plus besoin d'être aussi résolutif qu'avec les autres modes de détection (exemple du DEDL, figure I-27) pour que l'analyse soit complète.

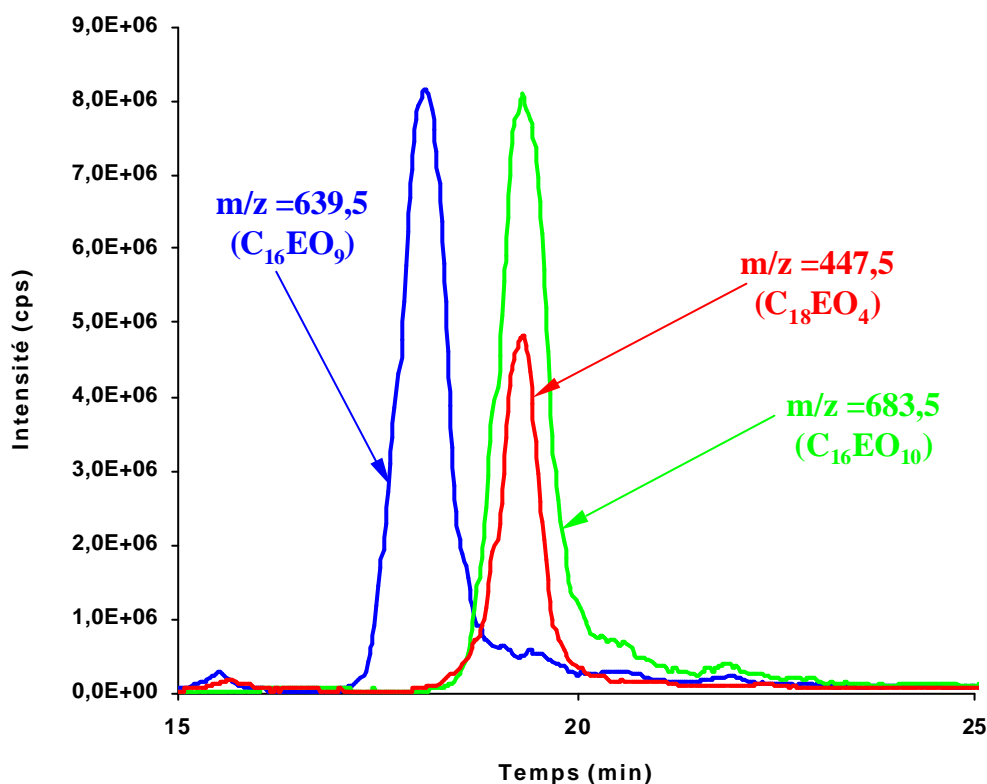


Figure I31: Chromatogrammes réalisés à partir de l'extraction des signaux correspondant aux rapport $m/z = 447,5$; $639,5$ et $683,5$ lors de l'analyse de l'analyse du BC-10TX sur la colonne Hypercarb (conditions données à la figure I-27). Les masses sélectionnées ici correspondent respectivement à celles des ions $[M+H]^+$ du $C_{18}EO_4$, $C_{16}EO_9$ et $C_{16}EO_{10}$. Malgré les coélutions, il est possible de retracer sélectivement les pics pour chaque composé.

C] ANALOGIE ENTRE LA DETECTION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET LA DETECTION PAR DIFFUSION DE LUMIERE =====

Dans les précédentes analyses chromatographiques de tensioactifs, nous avons souligné l'intérêt du détecteur évaporatif à diffusion de lumière employé comme détecteur universel. Ce détecteur, mis au point pour résoudre la détection de molécules sans chromophores, est largement employé en CPL [47-51] qu'en CPS [49, 52], mais aussi en chromatographie en contre-courant [53]. En CPL il est associé aussi bien la chromatographie à polarité de phases inversée [48, 54] ou normale [48, 50] qu'à celle de paire d'ions [51] ou d'échange d'ions [55]. Pour établir un parallélisme entre cette détection et la spectrométrie de masse et dégager leur aspect complémentaire, il convient de rappeler le principe du DEDL.

1) FONCTIONNEMENT DU DEDL

1-3) Principe de fonctionnement

Un détecteur évaporatif à diffusion de lumière (figure I-34) peut être considéré comme étant composé de trois étages où ont lieu successivement la nébulisation de la phase mobile, son évaporation et la détection des solutés. Le premier étage transforme la phase mobile en un aérosol grâce à un courant de gaz. Puis cet aérosol est évaporé dans un tube chauffé. En sortie du tube se situe (figure I-35) le système de détection. Si l'évaporation du nébulisât conduit à la formation exclusive de molécules en phase gazeuse, il n'y a pas de phénomène de diffusion de lumière. Les rayons lumineux de la source ne sont pas diffusés (flèche hachurée), n'arrivent pas jusqu'au photomultiplicateur et aucun signal n'est produit. En revanche, si l'évaporation du nébulisât conduit à la production de fines particules solides en suspension, la lumière est diffusée. La lumière déviée (flèche pleine) constitue le signal de détection.

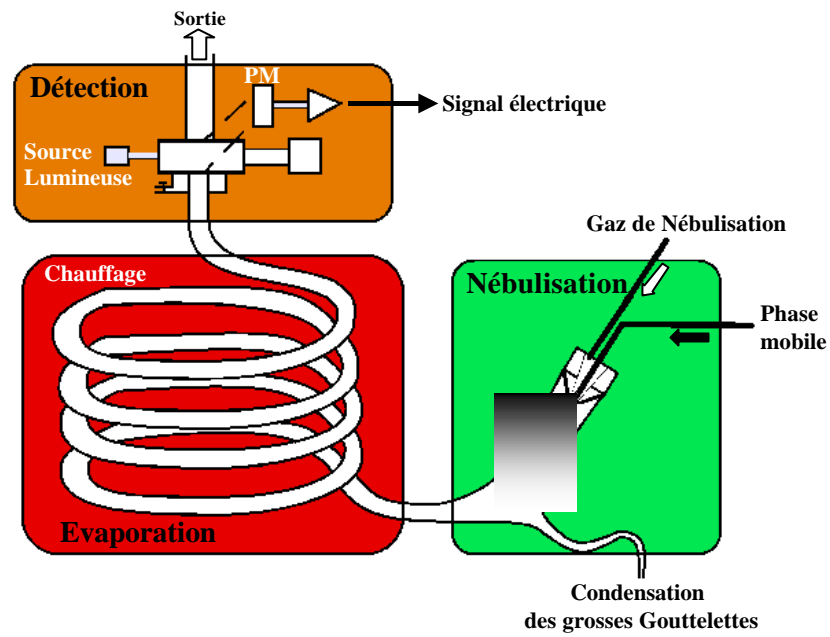


Figure I-34: Schéma de principe du DEDL (Sedex55). Le détecteur est composé de trois étages. Les étages de nébulisation et de chauffage (serpentin) ont pour but de volatiliser la phase mobile. Le dernier étage est le système de détection proprement dit. Celui-ci fonctionne sur la principe de la diffusion de lumière (voir figure I-35).

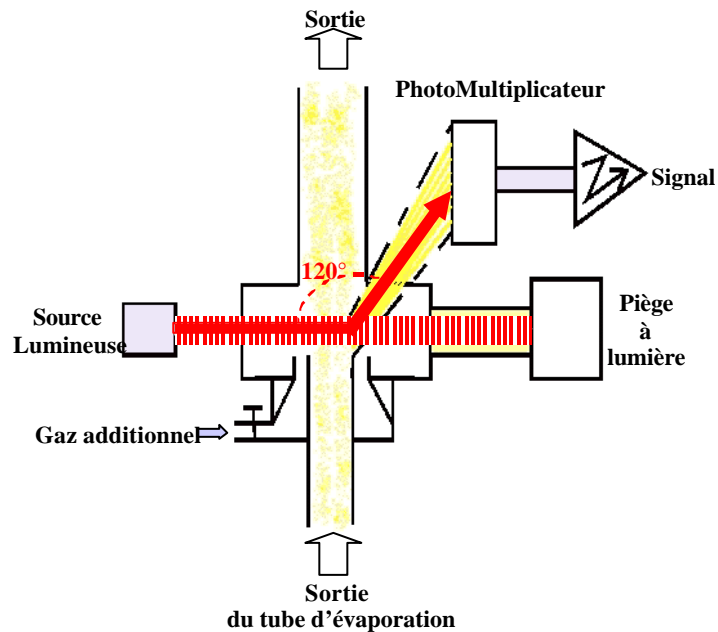


Figure I-35: Schéma de la cellule de détection du DEDL (Sedex55).

1-4) Utilisation, domaine d'application

Compte tenu de son mode de fonctionnement, il est facile de comprendre que le DEDL fonctionnera idéalement lorsque la phase mobile du système chromatographique sera évaporable. Le signal engendré par celle-ci est alors quasiment nulle (bien entendu il existe toujours un bruit de fond pouvant avoir des origines diverses: qualité des solvants, qualité de la production de l'aérosol de départ...). Les solutés analysés devront être idéalement non volatils pour que lors de la phase d'évaporation, la formation de particules susceptibles de diffuser la lumière soit assurée.

Le domaine d'utilisation du DEDL est donc bien plus vaste que celui du détecteur UV-Visible ou fluorescent puisque la présence d'un groupe chromophore n'est pas requis.

Le DEDL supplante même l'utilisation du réfractomètre car contrairement à lui il reste très peu sensible aux variations de température et surtout n'est pas sujet aux dérives de ligne de base lors d'analyse en gradient d'élution (tant que l'éluant reste volatil). Il est aussi généralement beaucoup plus sensible (30 ng injecté).

2) ANALOGIE AVEC LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Maintenant que le DEDL a été présenté dans son principe de fonctionnement, il est aisé de voir un certain parallélisme dans son mode de fonctionnement avec celui de la spectrométrie de masse. Pour ces deux détecteurs, la première phase du processus de détection consiste à la production d'un aérosol. Certes dans le cas du DEDL celui-ci restera neutre tandis qu'il sera de nature ionique dans le cas de la spectrométrie de masse. Mais dans les deux cas, la phase mobile devra être entièrement volatile pour que la détection ait lieu dans des conditions idéales. En conséquence, les éluants compatibles pour le DEDL doivent l'être aussi avec la spectrométrie de masse.

Ceci signifie un développement possible selon trois axes:

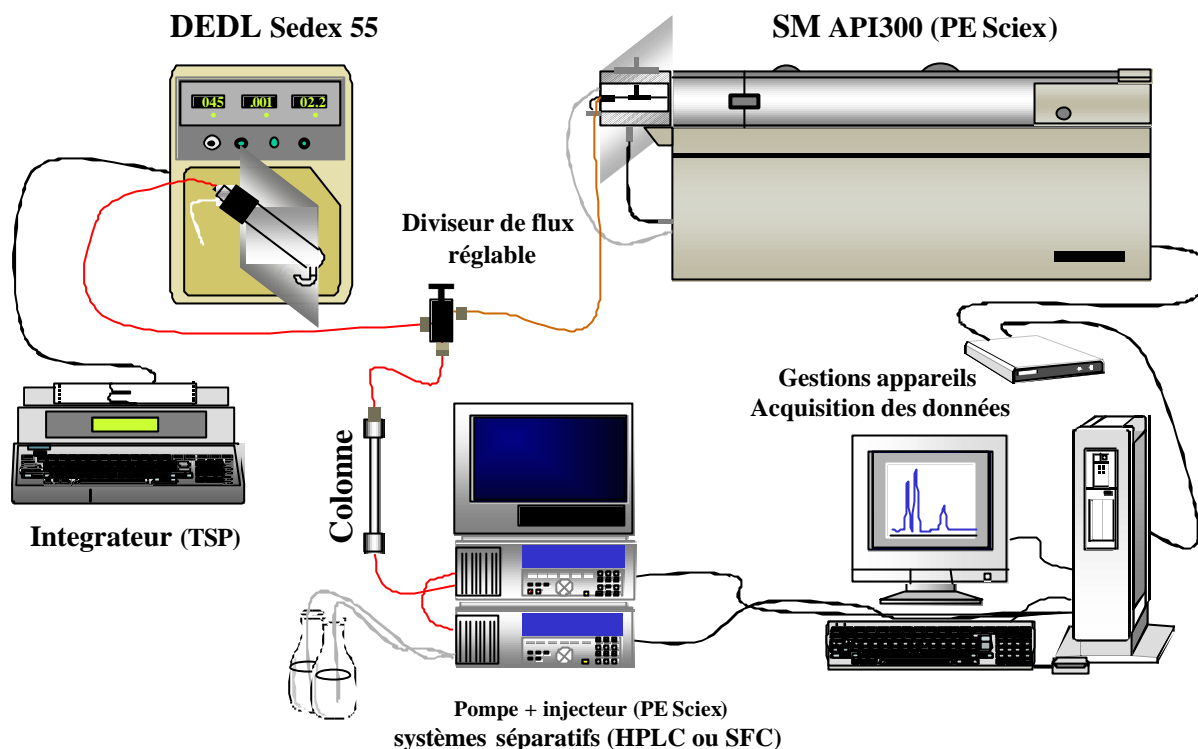


Figure I-36: Montage en double détection. Le montage avec un système à division de flux variable permet d'ajuster le rapport de division en fonction du débit de l'éluant en sortie de colonne.[P. Chaimbault, J.P. Mercier, A. Salvador, M. Dreux, Communications affichées à la 46th AS-MS conference, Orlando (USA) et HPLC'98, Mai 1998 St Louis (USA)]

- La spectrométrie de masse est un système de détection fort coûteux, sophistiqué surtout quand celui-ci est un spectromètre de masse tandem. De plus, posséder plusieurs spectromètres de masse dans une même unité de recherche n'est pas encore très répandu. Il vaut alors mieux réserver la phase d'optimisation de la méthode séparative, coûteuse en temps (donc financièrement) sur un appareil plus simple d'emploi comme le DEDL dont on est sûr que la détection se fera plus simplement. La méthode séparative ainsi mise au point, il suffira de la transposer directement en spectrométrie de masse.
- Un deuxième axe à envisager est un système de double détection (figure I-36) en parallèle (les deux détecteur sont destructifs) et ce pour plusieurs emplois:
 - 1) Lors du transfert de méthodologie CPL-DEDL à CPL-SM, il peut être intéressant de suivre les premières manipulations de réglage.
 - 2) Nous avons pu voir que certains composés répondaient plus difficilement avec la spectrométrie de masse (faiblement acides ou faiblement basiques). La

visualisation (y compris quantification) de ces composés peut être alors effectuée confortablement par le DEDL lors de la même analyse. L'inverse peut être vrai dans le cas de composés volatils non observables au DEDL.

- 3) L'application d'un dosage d'un composé ultra minoritaire d'un mélange par la SM devrait être possible simultanément en présence d'un composé majoritaire par le DEDL. Le spray de la SM est vite saturé par les fortes concentrations, ce qui n'est pas le cas du DEDL dont on peut abaisser la sensibilité du photomultiplicateur. Pour les composés très dilués la SM reste plus sensible que le DEDL (surtout en mode tandem). Ceci devrait éviter une double préparation d'échantillon (une gamme diluée et une gamme concentrée).
- Dans les mélanges complexes comme les tensioactifs déjà présentés, l'absence de standards peut empêcher la caractérisation des pics obtenus par CPL-DEDL. Le couplage CPL-SM permet leur indexation. Dans le cas où la résolution du mélange est suffisante, il est possible et parfois peut-être intéressant de revenir à la méthode CPL-DEDL (moins coûteuse, plus souple d'emploi, plus sensible dans certains cas...).

Une double détection DEDL-SM a été réalisée (figure I-36), mais cette méthode présente quelques difficultés notamment dans sa mise au point notamment à cause de l'effet d'aspiration du DEDL au niveau de la division du flux. Ceci a été réglé par l'emploi d'un diviseur de flux à réglage variable (UpChurch) et nous avons pu ainsi montrer lors de deux communications affichées certains résultats obtenus en CPL et CPS [56, 57].

Le parallélisme entre le DEDL et la SM s'arrête à ce niveau puisque comme nous l'avons vu, le devenir du spray produit par chaque détecteur est traité de façon radicalement différente. Bien entendu, le DEDL est incapable de fournir des informations structurales sur les composés élués ni même de renseigner sur d'éventuelles coélutions. Pour cette raison, et contrairement aux méthodologies CPL-SM, les méthodologies d'analyse par CPL-DEDL doivent posséder une résolution de séparation très poussée et sont largement plus consommatrice en temps d'analyse. Pour illustrer cela, la figure I-37 montre l'analyse du Triton X-100 en présence de PEG résiduels. La résolution complète du mélange par CPL-DEDL réalisée en gradient d'élution sur une colonne Hypercarb prend 40 minutes. La

même analyse en infusion par spectrométrie de masse prendrait environ 1 minute (aucun composé ne possède la même masse moléculaire) avec l'identification de chaque pic inclus.

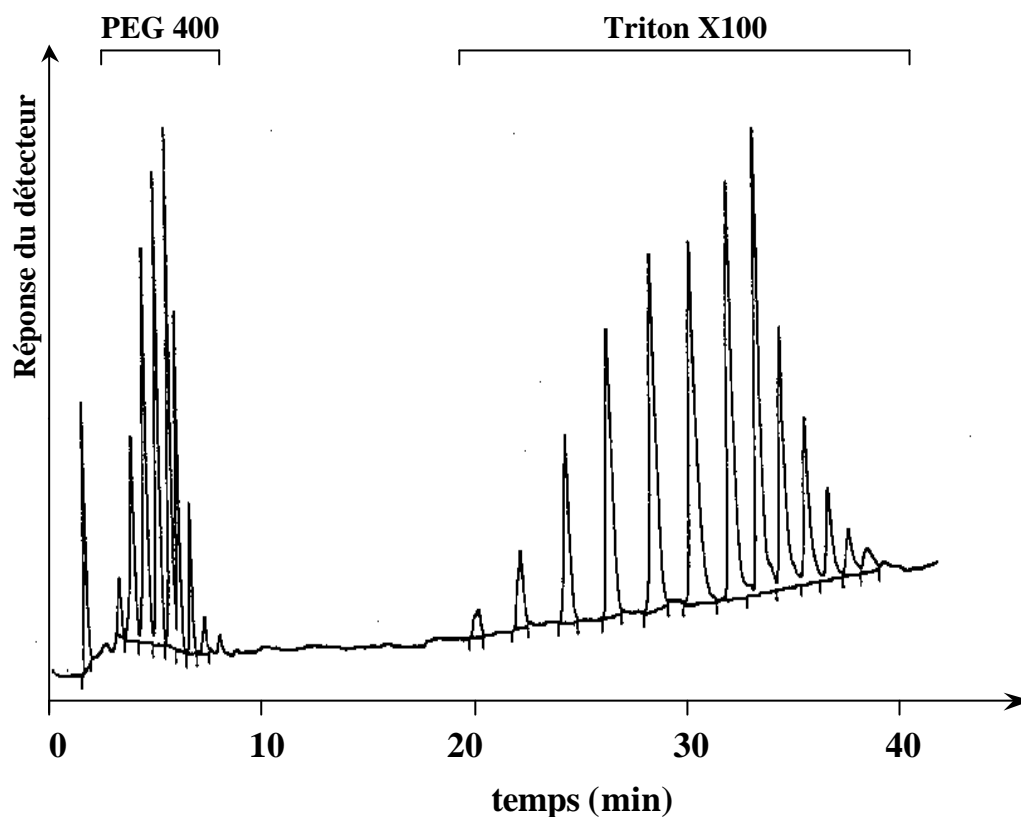


Figure I-37: Analyse CPL-DEDL simultanée du Triton X-100 et de sa partie polaire (PEG-400) sur colonne Hypercarb 7μ (100 x 4,6 mm DI) en gradient déluvion. Phase mobile : A-Eau, B-Acétonitrile, C-dichlorométhane. Profil du gradient: de A/B (80/20) à B (100) pendant 15 minutes puis enchaînement à B/C (20/80) en 25 minutes. 1ml/min.[P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse, J. Chromatogr.A, 797 (1998) 83].

Par contre, l'intérêt de l'analyse par CPL-DEDL réside dans le fait que les proportions de chaque composé peuvent être déduites directement du chromatogramme avec une assez bonne approximation en raison de la réponse quasi-massique du DEDL ce qui n'est pas le cas en SM en raison du rendement d'ionisation qui peut varier selon les composés.

D] CONCLUSIONS

Nous avons maintenant fait le point sur un certain nombre d'exigence requise par spectrométrie de masse utilisant les méthodes d'ionisation atmosphérique, ainsi que les paramètres qui pouvaient influencer la sensibilité de détection pour une expérience donnée. Ces paramètres sont liés à la nature des solutés, à la nature des phases mobiles utilisés, aux débits des fluides (phase mobile, gaz de nébulisation, gaz rideau de l'interface...) mais aussi au genre d'expérience menée (balayage pleine échelle ou balayage d'ions sélectionnés, détection par SM simple ou détection par SM tandem)... Nous ne reviendrons plus sur un certain nombre de ces paramètres par la suite, sauf lorsque cela sera nécessaire. Ils seront alors considérés alors comme optimisés.

Ce premier chapitre nous a permis de faire le point sur les avantages d'une détection par spectrométrie de masse et a montré par certains exemples comment il peut être fait l'économie d'une méthode séparative puissante et consommatrice en temps d'analyse. L'intérêt des techniques couplées à la spectrométrie de masse n'est donc plus à démontrer.

Nous avons pu voir que la mise au point d'un système séparatif CPL-SM pouvait se faire à partir d'un système CPL-DEDL.

La conclusion de ce chapitre de présentation sera donc en forme d'ouverture sur le sujet qui nous à le plus préoccupé durant ces travaux à savoir la mise au point de méthode analytique pour l'analyse des 20 acides aminés protéiques non dérivés. En effet, malgré la présence de détecteurs comme le DEDL ou la SM capables de détecter ces molécules sans chromophore, on trouve encore chaque année de nouvelles publications concernant leur analyse par dérivation.

Nous avons vu que le DEDL devrait bien être adapté à résoudre le problème de détection des acides aminés non dérivés puisque ces composés sont tous cristallins mais ce mode de détection requiert une puissance de séparation importante. Les analyses seront donc à priori longues. Cependant, Le DEDL possède l'avantage d'être bien meilleur marché que la spectrométrie de masse et bien plus facile à mettre en œuvre. Nous chercherons à obtenir la séparation totale des 20 acides aminés protéiques pour donner la possibilité aux groupes

d'études ne possédant pas de spectrométrie de masse d'utiliser un détecteur moins onéreux et plus simple d'emploi.

La spectrométrie de masse, grâce à sa spécificité de détection, devrait permettre d'atteindre notre but sans pour autant avoir à mettre en œuvre des méthodes séparatives très résolutive, y compris lors de l'analyse de matrices complexes. Nous ne devrions pas avoir de problèmes d'ionisation puisque ces composés sont naturellement ioniques donc adaptées à une ionisation par IonSpray. Nous devrions alors avoir une méthode extrêmement sensible, spécifique et rapide (sans préparation particulière de l'échantillon).

De tels détecteurs devraient permettre d'en finir avec les méthodes d'analyses faisant appel à la dérivation.

Les chapitres suivants seront donc consacrés à la mise au point de systèmes CPL-DEDL et CPL-SM (SM et SM tandem) permettant l'analyses d'acides aminés non dérivés. Ces systèmes concerneront d'ailleurs plus particulièrement l'analyse simultanée des 20 acides aminés protéiques non dérivés. Nous essaierons de mettre en valeurs ces méthodes à travers quelques exemples d'applications.

Références bibliographiques

- [1] E. De Hoffman, J. Charrette, V. Stroobant, "Spectrométrie de masse", Masson, Paris, 1994.
- [2] J. R. Chapman, "Practical Organic Mass Spectrometry", 2nd edition, Wiley, Chichester, 1993.
- [3] S. Bouchonnet, Y. Hoppilliard, T. Kargar-Grisel, Spectra Analyse 207 (1999) 11.
- [4] J. Zeleny, Phys. Rev. 10 (1917) 1.
- [5] P. Kebarle, L. Tang, Anal. Chem. 65 (1993) 972A.
- [6] S. J. Gaskell, J. Mass Spectrom 32 (1997) 677.
- [7] S. Bourcier, Y. Hoppilliard, T. Kargar, Spectra Analyse 197 (1997) 27.
- [8] A. P. Bruins, J. Chromatogr. A 794 (1998) 345.
- [9] M. W. A. Niessen, J. Chromatogr. A 794 (1998) 407.
- [10] R. B. Cole, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry", Wiley-Interscience, NY, 1997.
- [11] M. Yamashita, J. B. Fenn, J. Phys. Chem. 88 (1988) 4671.
- [12] S. Zhou, M. Hamburger, J. Chromatogr. A. 755 (1996) 189.
- [13] R. B. Van Breemen, Anal. Chem. 65 (1995) 2004.
- [14] G. J. Van Berkel, F. Zhou, Anal. Chem. 66 (1994) 3408.
- [15] T. Li, Y. Ohashi, Y. Nagai, Org. Mass Spectrom. 28 (1993) 927.
- [16] J. Zhu, R.B. Cole, 46th AS-MS Conference Proceeding, Mai 1998 Orlando (USA), 427.
- [17] D. P. H. Smith, I.E.E.E Trans. Ind. Appl. IA-22 (1986) 527.

- [18] L. Tang, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3654.
- [19] R. K. Mitchum, W. A. Korfmacher. *Anal. Chem.* 55 (1983) 1485A.
- [20] J. Sunner, G. Nicol, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1300.
- [21] J. Sunner, M.G. Ikonomou, P. Kebarle, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1308.
- [22] Hewlett-Packard, note technique MS/MS TN 97-1.
- [23] PE-Sciex, "Heated Nebulizer Inlet for the APCI source API100/300", Operator manuel, Version A, 1995.
- [24] PE-Sciex, "The API book", Part 2&3, 1990, 15.
- [25] D. Barcelo, "Application of LC-MS in environmental chemistry", *J. Chromatogr. Library*, vol.59, chapitre 1, Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas, 1996.
- [26] P. H. Dawson, J.B. French, J.A. Buckley, D.J. Douglas, D. Simmons, *Org. Mass Spectrom.* 17 (1982) 205.
- [27] S. C. Davis, B. Wright, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 4 (1990) 186.
- [28] V. H. Wysoki, H. I. Kentämaa, R. Graham Cooks, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 75 (1987) 181.
- [29] H. Fr. Schröder, *J. Chromatogr.* 647 (1993) 219.
- [30] J. B. Plomley, P. W. Crozier, V. Y. Taguchi, *J. Chromatogr. A* 854 (1999) 245.
- [31] P. H. Dawson, J.B. French, J.A. Buckley, D..J. Douglas, D. Simmons, *Org. Mass Spectrom.* 17 (1982) 212.
- [32] P. H. Dawson, Wing-Fung Sun, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 55 (1983/1984) 155.
- [33] P. Kienhuis, R. Geerdink, I. Freriks, communication orale, 15^{eme} "Montreux Symposium on LC-MS", 11-13 novembre 1998, Montreux, Suisse.

- [34] R. B. Van Breemen, C-R. Huang, Y. Tan, L.C. Sander, A. B. Schilling, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 975.
- [35] C. Rentel, A. Bayer, communication orale et affichée ISC'98 Rome (Italie)
- [36] A. Bayer, communication orale, HPLC'99 Grenade (Espagne).
- [37] J. M. E. Quirke, C. L. Adams, G. J. Van Berkel, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1302.
- [38] K. Hiraoka, K. Murata, I. Kudaka, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 43 (3) (1995) 127.
- [39] D. Temesi, B. Law, *LC-GC Int.* 12 (3) (1999) 179.
- [40] D. Shang, M.G. Ikonou, R. MacDonald, 46th AS-MS Conference Proceeding, Mai 1998 Orlando (USA), 365.
- [41] I. Caron, P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Dreux, Communication affichée au "9th International Symposium on Cyclodextrins", 31 mai-3 Juin 1998 St Jacques de Compostelle, Espagne.
- [42] J. Cai, J. Henion, *J. Chromatogr. A.* 703 (1995) 667.
- [43] T. R. Covey, A. P. Bruins, J. D. Henion, *Org. Mass. Spectrom.* 23 (1988) 178.
- [44] K. W. M. Siu, R. Guevremont, J. C. Y. Leblanc, G. J. Gardner, S. S Berman, *J. Chromatogr.* 554 (1991) 27.
- [45] G. Hopfgartner, K. Bean, J. Henion, R. Henry, *J. Chromatogr.* 647 (1993) 51.
- [46] PE-Sciex, API 100/300 High Sensitivity SIM and/or MRM Operation Procedure – Operator Manual – Adendum, March 1996.
- [47] P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 83.
- [48] S. Brossard, M. Lafosse, M. Dreux, *J. Chromatogr.* 591 (1992) 149.
- [49] M. Dreux, M. Lafosse, L. Morin-Allory, *LC-GC Int.* 9 (1996) 148.
- [50] B. Herbreteau, V. Villette, M. Lafosse, M. Dreux, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 246.

- [51] J-P. Mercier, Ph. Morin, C. Elfakir, M. Dreux, A. Tambuté, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 22 (1999) 267.
- [52] M. Dreux, M. Lafosse , *LC-GC Int.* 10 (1997) 382.
- [53] C. Viron, Mémoire de thèse, Université d'Orléans,1999.
- [54] M. Lafosse, P. Marinier, B. Joseph, M. Dreux, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 277.
- [55] S. Lazar, B. Herbreteau, M. Lafosse, G. Guillaumet, *Analusis* 21 (1993) 415.
- [56] J. P. Mercier, P. Chaimbault, A. Salvador, M. Dreux, communication affichée, HPLC'98, Mai 1998, St Louis (USA).
- [57] A. Salvador, JP. Mercier, P. Chaimbault, M. Dreux, communication affichée, 46th AS-MS Conference, Mai 1998, Orlando (USA).

Chapitre II

LES ACIDES AMINES ET LEURS METHODES D'ANALYSE

Ce deuxième chapitre établit la stratégie de recherche et de mise au point de méthodes analytiques des acides aminés (protéiques et analogues) sans passer par une étape de dérivation.

Dans un premier temps nous allons voir quelques généralités sur les acides aminés protéiques, notamment certaines propriétés physico-chimiques sur lesquelles devra s'appuyer toute méthode séparative. Nous ferons ensuite le point sur les méthodes d'analyse actuelles pour définir et positionner notre futur travail. Enfin, nous discuterons des voies envisagées pour la création de ces nouvelles méthodes en fonction des exigences des deux détecteurs retenus pour ce travail : le DEDL et la SM.

A] GENERALITES

Quelle que soit l'origine des acides aminés sur Terre [1], ils forment sans aucun doute l'une des plus importantes classes de molécules d'intérêt biologique en tant que molécules libres comme en tant que maillons élémentaires des protéines [2]. Leur analyse est donc un sujet d'étude permanent et bâtir une méthode analytique suppose une bonne connaissance de leur structure et surtout de leurs propriétés physico-chimiques.

1) STRUCTURE DES ACIDES AMINES PROTEIQUES

Les acides aminés protéiques sont nommés ainsi parce qu'ils constituent les "briques" permettant d'élaborer les protéines. Le "jeu de construction" est le même des bactéries aux organismes supérieurs [2], seule la construction diffère (séquences, modifications post-traductionnelles). Ces acides aminés sont au nombre de 20 et possèdent une structure de base identique: la fonction acide est une fonction acide carboxylique portée par le même carbone que la fonction amine comme le montre la figure II-1. La fonction amine est donc en α de la fonction acide d'où leur nom: acides α -aminés ou encore α -amino acides.

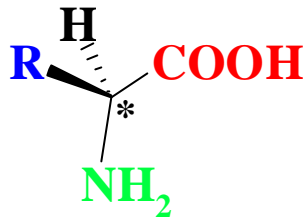


Figure II-1: Structure de base des acides aminés protéiques. Pour R¹H, le carbone marqué d'un astérisque est asymétrique.

La fonction amine est primaire pour ces composés à l'exception de la proline (Tableau II-1). Les deux dernières substitutions sur le carbone central sont occupées d'une part par un hydrogène, d'autre part par une chaîne latérale appelée résidu (R) qui fait la spécificité de chaque acide aminé protéique. Ces acides aminés possèdent tous un carbone asymétrique à l'exception de la glycine pour laquelle R=H. Les autres acides aminés protéiques naturels appartiennent tous à la série L. Le terme "naturel" ne signifie pas ici que les acides aminés de la série D n'existent pas naturellement mais ils sont souvent en très faible quantité et d'origine bactérienne [3].

Comme il a été mentionné précédemment, chaque acide aminé se distingue de l'autre par son résidu. Ces 20 groupements peuvent être classés en plusieurs catégories (Tableau II-1) et chaque acide aminé est repéré par un code officiel à 1 ou 3 lettres :

- Les **5 aliphatiques** sont composés de la glycine (Gly/G), de l'alanine (Ala/A), de la valine (Val/V), de la leucine (Leu/L) et de l'isoleucine (Ile/I). Ils constituent souvent les poches hydrophobes des protéines.
- La **Proline** (Pro/P), dont la fonction amine est secondaire, permet les changements de direction dans les protéines (coudes β).
- Les **3 aromatiques** sont composés de la phénylalanine (Phe/F), de la tyrosine (Tyr/Y) et du tryptophane (Trp/W).
- Les **2 hydroxylés** sont composés de la serine (Ser/S) et de la thréonine (Thr/T).
- Les **2 soufrés** sont composés de la cystéine (Cys/C) et de la méthionine (Met/M).
- Les **3 basiques** sont composés de la lysine (Lys/K), de l'histidine (His/H) et de l'arginine (Arg/R).

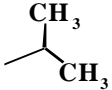
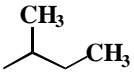
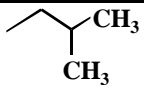

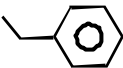
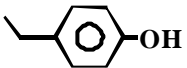
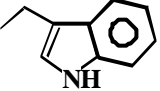

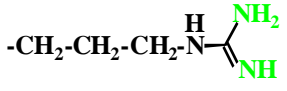
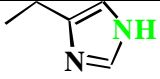
Catégorie	Acide Aminé	Chaîne latérale	Code [3/1 lettre(s)]
Aliphatiques	Glycine	-H	Gly / G
	Alanine	-CH ₃	Ala / A
	Valine		Val / V
	Leucine		Leu / L
	Isoleucine		Ile / I
Amine II ^{aire}	Proline	 (formule complète)	Pro / P
Aromatiques	Phénylalanine		Phe / F
	Tyrosine		Tyr / Y
	Tryptophane		Trp / W
Hydroxylés	Serine	-CH ₂ -OH	Ser / S
	Thréonine		Thr / T
Soufrés	Cystéine	-CH ₂ -SH	Cys / C
	Méthionine	-CH ₂ -CH ₂ -S-CH ₃	Met / M
Basiques	Lysine	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂	Lys / K
	Arginine		Arg / R
	Histidine		His / H
Acides Carboxyliques	Acide aspartique	-CH ₂ -COOH	Asp / D
	Acide glutamique	-CH ₂ -CH ₂ -COOH	Glu / E
Amides	Asparagine	-CH ₂ -CONH ₂	Asn / N
	Glutamine	-CH ₂ -CH ₂ -CONH ₂	Gln / Q

Tableau II-1: les 20 acides aminés protéiques, leur chaîne latérale (résidu R) et leurs codifications internationales.

- Les **2 acides carboxyliques** sont composés de l'acide aspartique (Asp/D) et de l'acide glutamique (Glu/E).
- Les **2 amides** sont composés de l'asparagine (Asn/N) et de la glutamine (Gln/Q).

2) QUELQUES FONCTIONS DES ACIDES AMINES PROTEIQUES

En s'associant entre eux pour former peptides et protéines ou en restant sous forme libre, les acides aminés assurent une grande partie du maintien de la vie, d'où les nombreuses études à leur sujet. Certaines carences peuvent avoir des conséquences dramatiques sur la santé d'autant plus que l'organisme ne les synthétise pas tous [2]. Les acides aminés non synthétisés (His, Leu, Ile, Met, Lys, Phe, Thr, Trp, Val) sont dits "essentiels" et doivent être ingérés par l'organisme. Les autres (Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gln, Gly, Pro, Ser, Tyr) sont dits "non essentiels".

2-1) Fonctions des protéines et peptides

Les protéines et les peptides sont des enchaînements d'acides aminés dont les séquences sont mémorisées dans l'ADN. Leurs fonctions sont nombreuses [2]:

- Enzymatiques : Polymérase, DNAase, Lipase, ...
- Structurales: Collagène...
- Hormonales.
- Transport, stockage : Hémoglobine...
- Immunologiques: Anticorps...

2-2) Fonctions des acides aminés libres

Sont présentés ici certaines fonctions de quelques acides aminés libres essentiels et non essentiels.

2-2-a) Acides aminés essentiels:

Les fonctions des acides aminés essentiels sont nombreuses. Ils peuvent donner naissance à d'autres catégories de molécules. Le tryptophane est le précurseur de la sérotonine (neurotransmetteur) et du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH, coenzyme intervenant dans les échanges de protons lors de réactions enzymatiques d'oxydoréduction). La décarboxylation de l'histidine a pour produit l'histamine, un puissant vasodilatateur.

De plus, ils peuvent servir de précurseurs à la biosynthèse d'acides aminés non essentiels. Par exemple, l'histidine peut être convertie en acide glutamique, la phénylalanine peut être oxydée pour donner la tyrosine. Le défaut de conversion de Phe en Tyr chez le nouveau né se traduit d'ailleurs par un retard important du développement mental. Cette maladie grave s'appelle la phénylcétonurie.

2-2-b) Acides aminés non essentiels

Les acides aminés non essentiels peuvent aussi être convertis en d'autres acides aminés non essentiels. L'acide glutamique peut être ainsi transformé en glutamine, proline ou arginine.

De même, ils sont à l'origine de nombreuses autres molécules. La serine intervient dans la biosynthèse de la sphingosine, un intermédiaire de synthèse des sphingolipides. L'acide aspartique intervient dans la biosynthèse des bases pyrimidiques et puriques des nucléotides. La tyrosine est à l'origine de la tyroxine, hormone thyroïdienne, ou de neurotransmetteurs comme la dopamine et l'épinéphrine. La glycine possède un rôle dans l'inhibition de la transmission de l'influx nerveux du système nerveux central et est utilisée pour la biosynthèse des porphyrines constituant le groupe hème de l'hémoglobine.

L'ensemble des acides aminés joue encore bien d'autres rôles dans le corps humain en intervenant indirectement dans plusieurs cycles vitaux comme le cycle de Krebs ou comme montré sur la figure II-2 sur la synthèse de bien d'autres composés intervenant dans la production d'acétyl coenzyme A (intervenant plus ou moins directement dans un

certain nombre de métabolismes primaires), la glucogénèse (à partir de pyruvate, oxaloacétate), l'excrétion (fumarate, oxaloacétate)...

Les acides aminés jouent aussi un rôle important dans le phénomène photosynthétique [2]. En agro-alimentaire, ils peuvent exercer un effet sur l'oxydation de composés polyphénoliques [4] responsables de l'apparition d'une couleur brune dans les aliments. En œnologie, la détermination des acides aminés libres [5, 6] est importante car ils ont un rôle sur la fermentation des vins et leur composition est caractéristique d'un terroir, d'un cépage.

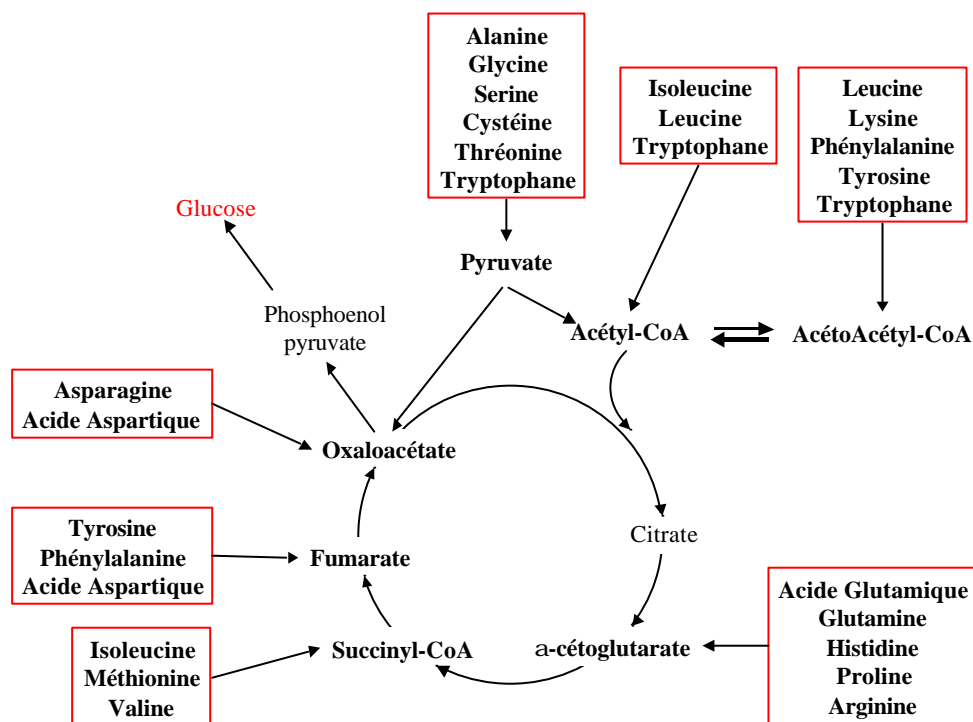


Figure II-2: Devenir des acides aminés libres dans l'organisme. D'après [2].

3) PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

Nous avons pu voir dans les généralités que les acides aminés avaient une structure commune acido-basique sur laquelle étaient branchés des résidus plus ou moins acides (acides carboxyliques, thiol, phénol), basiques (amine, guanidine) ou hydrophobes. Ces différences contribuent à faire des acides aminés un ensemble de molécules polaires aux propriétés cependant très différentes quant à leur charge en solution, leur hydrophobie et leur polarité. L'analyse chromatographique s'appuiera sur ces différentes propriétés pour séparer les différents acides aminés en mélange.

3-1) Ionisation

3-1-a) Fonctions primaires

Nous appellerons fonctions primaires la fonction acide carboxylique et la fonction amine portées par le carbone chiral.

La structure présentée figure II-1 n'est pas tout à fait exacte lorsque l'acide aminé est dans un milieu dissociant comme l'eau puisqu'elle ne tient pas compte des équilibres acido-basiques qui s'établissent en solution [2,7] comme le montre la figure II-3.

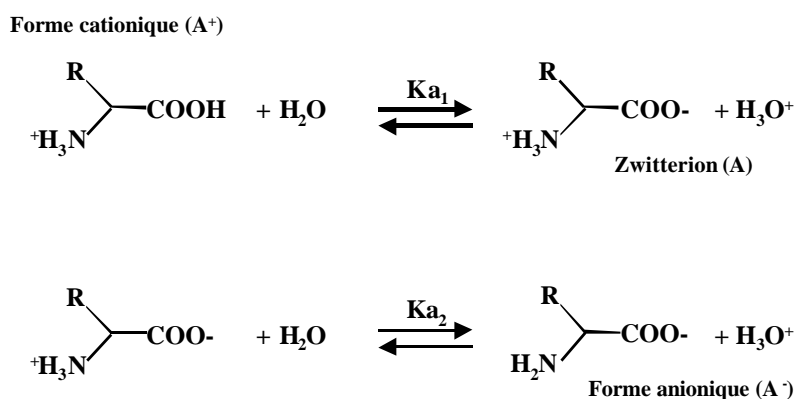


Figure II-3: Equilibres acido-basiques entre les fonctions primaires.

Les concentrations en chacune des formes sont régies par 2 constantes d'acidité selon les équilibres (1) et (2):

$$K_{a1} = \frac{[A] \cdot [H_3O^+]}{[A^+]} \quad (1)$$

$$K_{a2} = \frac{[A^-] \cdot [H_3O^+]}{[A]} \quad (2)$$

La concentration totale en acide aminé considéré $[A_0]$ peut s'écrire :

$$[A_0] = [A^+] + [A] + [A^-] \quad (3)$$

où A^+ représente la forme cationique, A la forme zwitterionique et A^- la forme anionique. La concentration en solution de chaque forme peut donc s'écrire:

$$[A^+] = \frac{[A_0]}{1 + Ka_1/[H_3O^+] + Ka_1Ka_2/[H_3O^+]^2} \quad (4)$$

$$[A] = \frac{[A_0]}{1 + [H_3O^+]/Ka_1 + Ka_2/[H_3O^+]} \quad (5)$$

$$[A^-] = \frac{[A_0]}{1 + [H_3O^+]/Ka_1 + [H_3O^+]^2/Ka_1Ka_2} \quad (6)$$

La concentration en chaque espèce est donc fonction du pH des solutions et peut être représentée sous forme de courbe où il est alors facile de visualiser quelle espèce est majoritaire pour un pH donné (Figure II-4).

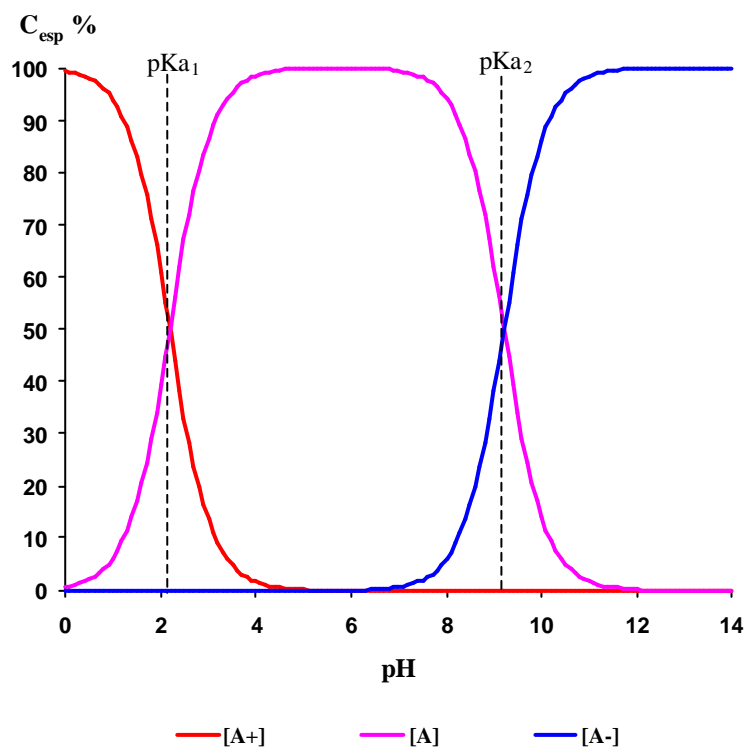


Figure II-4: Répartition (C_{esp} en %) des formes ioniques (A^+ = cationique, A = zwitterionique, A^- =anionique) de la serine en fonction du pH de la solution (pKa de la serine, annexe I).

3-1-b) Chaînes latérales ionisables

Sept acides aminés, présentés dans le tableau II-2, ont une chaîne latérale capable de s'ioniser (les pKa des équilibres concernés sont consignés dans l'annexe I). Ainsi certains acides aminés pourront posséder deux charges négatives (Asp, Glu, Tyr et Cys) ou deux charges positives (Lys, Arg et His).

Acide aminé	Dissociation
Asp, Glu	$\text{-COOH} \rightleftharpoons \text{-COO}^- + \text{H}^+$
His	
Cys	$\text{-CH}_2\text{-SH} \rightleftharpoons \text{-CH}_2\text{-S}^- + \text{H}^+$
Tyr	
Lys	$\text{-[CH}_2\text{]}_4\text{-NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{-[CH}_2\text{]}_4\text{-NH}_2 + \text{H}^+$
Arg	

Tableau II-2: Acides aminés à résidu ionisable. Pour les constantes d'équilibres, se référer à l'annexe I.

Pour ces 7 acides aminés, une troisième constante d'équilibre intervient. Par exemple, on aura pour l'acide aspartique les équilibres suivants :

$$Ka_1 = \frac{[A] \cdot [H^+]}{[A^+]} \quad (1')$$

$$Ka_2 = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[A]} \quad (2')$$

$$Ka_3 = \frac{[A^{2-}] \cdot [H^+]}{[A^-]} \quad (2'')$$

où $[A^{2-}]$ représente la concentration de la forme possédant une charge apparente -2 . La concentration totale en acide aminé se décompose comme suit:

$$[A_0] = [A^+] + [A] + [A^-] + [A^{2-}] \quad (3')$$

Les concentrations en différentes espèces peuvent se calculer à partir des équations suivantes:

$$[A^+] = \frac{[A_0]}{1 + Ka_1/[H^+] + Ka_1Ka_2/[H^+]^2 + Ka_1Ka_2Ka_3/[H^+]^3} \quad (4')$$

$$[A] = \frac{[A_0]}{1 + [H^+]/Ka_1 + Ka_2/[H^+] + Ka_2Ka_3/[H^+]^2} \quad (5')$$

$$[A^-] = \frac{[A_0]}{1 + [H^+]^2/Ka_1Ka_2 + [H^+]/Ka_2 + Ka_3/[H^+]} \quad (6')$$

$$[A^{2-}] = \frac{[A_0]}{1 + [H^+]/Ka_3 + [H^+]^2/Ka_2Ka_3 + [H^+]^3/Ka_1Ka_2Ka_3} \quad (7)$$

De même que pour les acides aminés ne possédant que 2 fonctions dissociables, on pourra visualiser la répartition de chaque espèce en fonction du pH sur des graphiques équivalents à celui de la figure II-4.

3-1-c) Point isoélectrique

La concentration en chaque forme ionisée est régie par un équilibre qui dépend du pH. Pour un pH donné, on peut donc calculer une charge globale moyenne qu'on appellera charge apparente " z_i " et qui peut être calculée à partir de l'équation (8) [7].

Cette charge apparente qui n'a pas forcément une valeur entière renseigne mieux sur l'état ionique que la répartition en chaque espèce ionique.

$$z_i = \frac{\sum n[A^n]}{[A_0]} \quad (8) \quad (n = \text{charge de l'espèce; } n = 0 \text{ pour un zwitterion})$$

L'équation (8) permet de tracer cet état de charge en fonction du pH (figure II-5)

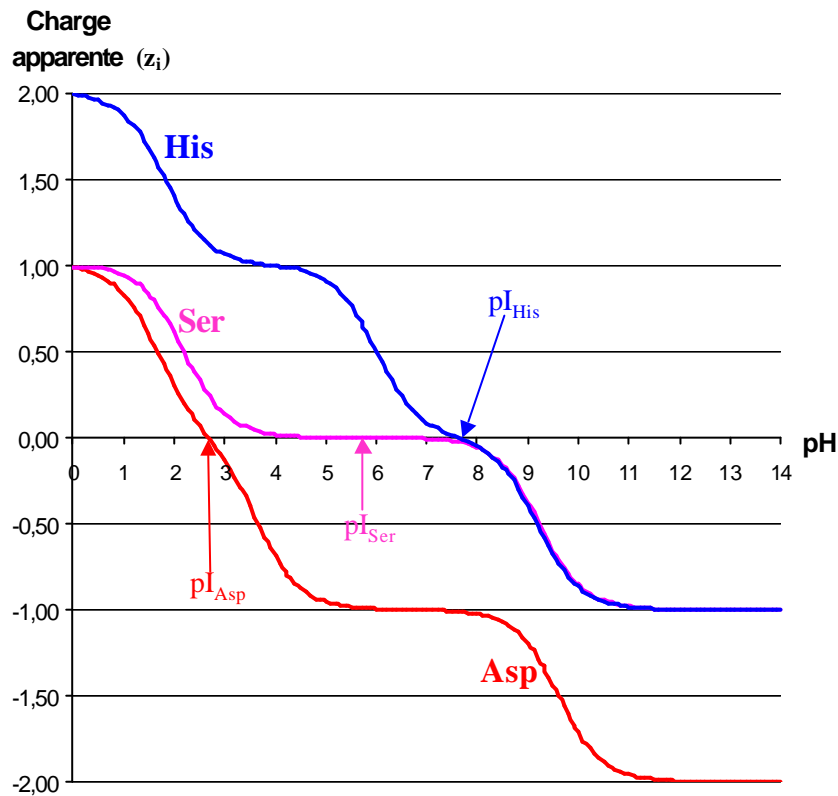


Figure II-5: Charge apparente " z_i " de Asp, Ser et His en fonction du pH. (pKa: se référer à l'annexe I).

Sur ces courbes, on peut repérer le point particulier appelé "point isoélectrique" (pI), correspondant à une charge apparente nulle de l'acide aminé. De part et d'autre du point isoélectrique, l'acide aminé est chargé. On peut aussi noter que dans le cas où les valeurs de 2 pKa successifs sont suffisamment différentes, il peut exister des plages de pH où la charge apparente ne varie presque pas. C'est le cas de la Sérine pour laquelle la charge reste voisine de 0 sur une gamme de pH allant de 4 à 7 ou de

l'acide aspartique où la charge reste -1 sur une gamme de pH allant de 5,5 à 7,5. Chaque acide aminé possède un point isoélectrique qui lui est propre puisque dépendant des valeurs de ses différentes constantes de dissociation. Les acides aminés possédant un résidu neutre ont des points isoélectriques voisins car il existe peu de différence entre les valeurs de pKa de la fonction acide carboxylique primaire et peu de différence entre les pKa de la fonction amine primaire (annexe I). Le tableau II-3 donne les valeurs des points isoélectriques pour les 20 acides aminés protéiques [7].

Acides Aminés	pI
Acide aspartique	2,7
Acide glutamique	3,2
Cystéine	5,0
Glutamine	5,2
Asparagine	5,4
Phénylalanine	5,5
Thréonine	5,6
Tyrosine, Serine	5,7
Méthionine	5,8
Tryptophane	5,9
Glycine, Valine, Leucine	6,0
Alanine, Isoleucine	6,1
Proline	6,3
Histidine	7,6
Lysine	9,8
Arginine	10,8

Tableau II-3: Classement des 20 acides aminés protéiques par point isoélectrique croissant (pI). Les pI ont été obtenus en traçant la charge apparente en fonction du pH (cf. figure II-5).

3-2) Lipophilie

Une deuxième propriété physico-chimique importante est la "lipophilie" des acides aminés. L'estimation ou la mesure de l'hydrophobie de composés est en effet un

paramètre important dans le choix d'une méthodologie séparative mettant en jeu des interactions hydrophobes.

Il y a deux manières de l'appréhender: soit on ne s'intéressera qu'au résidu R, en considérant que le reste de la structure est commune à tous, soit on s'intéressera à la structure globale.

3-2-a) Lipophilie de la chaîne latérale

Le tableau II-4 illustre la lipophilie des résidus calculés selon Recker [7].

Acides Aminés	Lipophilie
Glutamine	-1,09
Asparagine	-1,05
Serine	-0,56
Thréonine	-0,26
Histidine	-0,23
Acide glutamique	-0,07
Acide aspartique	-0,02
Glycine	0
Lysine	0,52
Alanine	0,53
Cystéine	0,93
Proline	1,01
Méthionine	1,08
Valine	1,46
Tyrosine	1,70
Leucine, Isoleucine	1,99
Phénylalanine	2,24
Tryptophane	2,31

Tableau II-4: Classement de 19 acides aminés protéiques par lipophilie croissante de leur résidu (calculée selon Recker [7]). La lipophilie du résidu de l'arginine n'est pas indiquée dans cette référence.

La glycine ne comportant qu'un seul hydrogène comme résidu est prise comme référence.

3-2-b) Lipophilie des acides aminés

La lipophilie des acides aminés a été estimée par le coefficient de distribution $\log D$ mesuré à $\text{pH} = 7$ [8].

Acides Aminés	$\log D$
Arginine	-3,79
Lysine	-3,77
Acide Aspartique	-3,61
Acide Glutamique	-3,51
Asparagine	-3,48
Glutamine	-3,11
Serine, Glycine	-3,00
Histidine	-2,85
Thréonine	-2,83
Alanine	-2,77
Proline	-2,62
Cystéine	-2,55
Valine	-2,29
Tyrosine	-2,11
Méthionine	-2,10
Isoleucine	-1,80
Leucine	-1,72
Phénylalanine	-1,44
Tryptophane	-1,15

Tableau II-5: Classement des acides aminés par lipophilie croissante. La lipophilie est estimée par le $\log D$ à $\text{pH} = 7$. D'après [8].

log D correspond au rapport de la concentration d'une espèce donnée (A) dans l'octanol ($[A]_{Oct}$) sur sa concentration dans la phase aqueuse $[A]_{Eau}$ à pH donné :

$$\log D = \log \frac{[A]_{Oct}}{[A]_{Eau}} \quad (9)$$

La valeur du log D pour chacun des 20 acides aminés à pH=7 est consignée dans le tableau II-5.

Ce classement par lipophilie croissante fait apparaître quelques différences avec le classement de Recker qui ne tient compte que du résidu. On retrouve cependant certaines tendances notamment pour les plus lipophiles. De plus, les valeurs, toutes négatives, du log D montrent bien que les amino acides sont avant tout des composés hydrophiles.

3-3) Polarité

La polarité (L) des acides aminés peut être estimée par calcul [8].

Elle s'exprime par la différence entre le log P d'un alcane ($\log P_{alcane}$) ayant le même volume moléculaire (V) que l'acide aminé considéré et le log P ($\log P_{aa}$) de l'acide aminé (équation 10).

$$L = \log P_{alcane} - \log P_{aa} \quad (10)$$

Le log P_{alcane} est relié à son volume moléculaire (V) par l'équation (11).

$$\text{Log}P_{alcane} = 3,087 \cdot 10^{-2} V + 0,386 \quad (11)$$

Le tableau 6 donne les valeurs de polarité L obtenues par calcul pour chacun des 20 acides aminés.

Acides Aminés	<i>L</i>
Glycine	5,1
Alanine	5,7
Cystéine	6,0
Serine	6,1
Valine, Leucine, Proline	6,2
Isoleucine	6,3
Thréonine	6,4
Méthionine	6,6
Phénylalanine	6,7
Acide aspartique	7,2
Tryptophane, Asparagine	7,3
Glutamine, Histidine	7,4
Tyrosine	7,5
Acide glutamique	7,6
Lysine	8,7
Arginine	9,1

Tableau II-6: Classement des 20 acides aminés protéiques par polarité croissante. D'après [8].

Nous pouvons conclure des différentes propriétés physico-chimiques évoquées que ces 20 molécules seront d'autant plus difficiles à séparer que la différence entre leurs points isoélectriques ou/et leurs valeurs de lipophilie peut être parfois infime.

Lorsque leur état de charge sera voisin, seule la nature du résidu permettra leur séparation. Au contraire, il faudra jouer sur l'effet de pH pour séparer les acides aminés dont la différence de lipophilie est faible.

B] METHODES D'ANALYSE ACTUELLES DES ACIDES AMINES══

Si dans la première partie de ce chapitre, nous avons dégagé les différences existant entre les 20 acides aminés protéiques afin de recenser un certain nombre de propriétés sur lesquelles pouvait s'appuyer la méthode séparative, il se pose en plus le problème du mode de détection, car, 17 des 20 acides aminés protéiques ne possèdent pas de chromophore et ne sont donc pas aisément détectables par absorption UV.

La plupart des méthodes chromatographiques actuellement utilisées pour la détermination des acides aminés ont été de ce fait dictées par le mode de détection. Ainsi, de 1980 à nos jours, plus de 4000 publications ont concerné des méthodes utilisant une dérivation pré- ou post- colonne pour réaliser une détection spectrophotométrique (UV, Visible) ou spectrofluorométrique alors que moins d'une quarantaine d'articles seulement concerne des méthodes (CPL, CPS, EC) avec détection sans dérivation.

1) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES UTILISANT UNE ETAPE DE DERIVATION. AVANTAGES ET INCONVENIENTS.

Les méthodes CPL faisant appel à des dérivations pré ou post colonne pour la détection des acides aminés sont sans aucun doute les plus répandues. Les nombreux catalogues d'applications des revendeurs de matériels et produits chimiques en témoignent.

Ces méthodes consistent à greffer chimiquement sur l'acide aminé un groupement chromophore (quelques exemples sont indiqués dans le tableau II-7) pour qu'ils deviennent aisément détectables par absorption UV, visible ou encore par fluorimétrie.

La séparation peut avoir lieu sur phase stationnaire échangeuse d'ions [9, 10] ou par chromatographie d'appariement d'ions [10-13] dans le cas dans de méthodologies faisant appel à une post-dérivation.

En ce qui concerne les méthodes faisant appel à la dérivation précolonne, la partie fixée sur l'acide aminé en vue de sa détection lui confère un caractère hydrophobe qu'il ne possédait pas avant. Les systèmes utilisant la chromatographie à polarité de phases inversée peuvent alors être utilisés pour l'analyse. Ces méthodes sont très prisées

compte tenu de la stabilité des systèmes chromatographiques, de leur fiabilité et de la reproductibilité lot à lot des phases stationnaires.

Le succès de ces méthodes tient aussi également à la sensibilité de détection (concentrations injectées de l'ordre de la micromole/l en UV de la nanomole/l en fluorescence [10, 14]) qui peut aussi s'accompagner de la résolution complète des 20 acides aminés protéiques [14] comme le montre la figure II-6.

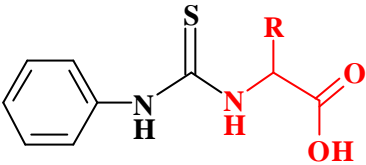
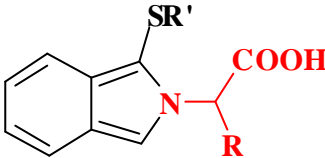
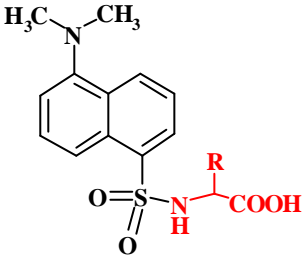
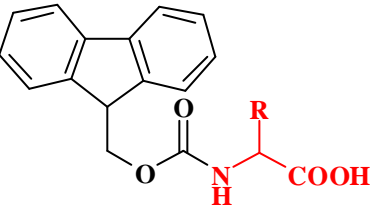
Dérivés	Formule de la molécule détectée	Délect.	Utilisation
Phényl thiocyanate (PTC)		UV	Pré-colonne
Ortho-phthalaldéhyde (OPA)	 R': -CH ₂ CH ₂ -OH	UV/fluor.	Pré-colonne et/ou post-colonne
Diméthylamino-1-naphtaleneSulfonyl (DANSYL)		visible	Pré-colonne
9-fluorenylméthoxy carbonyl (FMOC)		fluor.	Pré-colonne

Tableau II-7 : *Quelques méthodes courantes de dérivation pré- ou post colonne; formules des molécules détectées (en rouge, la partie concernant l'acide aminé), mode de détection et dérivation pré- ou post colonne. D'après [7,10,14]. (Fluor. = fluorescence).*

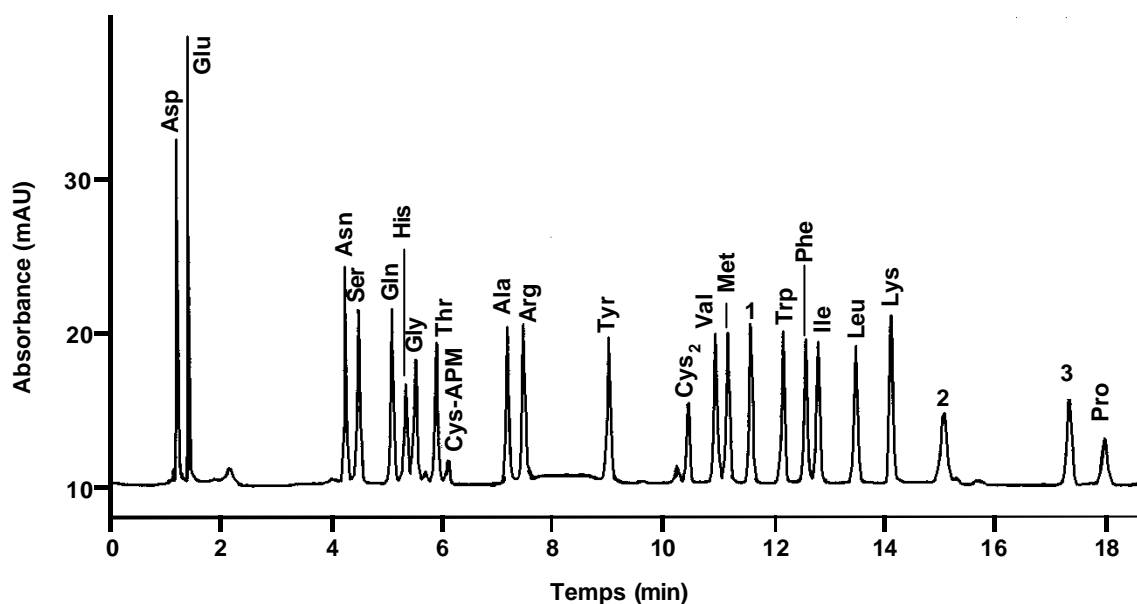


Figure II-6: Analyse des 20 acides aminés protéiques dérivés par CPL-UV à barrette de diodes. D'après [14]. La dérivation précolonne s'effectue en deux étapes. Les acides aminés primaires sont d'abord dérivés par l'OPA et l'acide mercaptopropionique (AMP), les acides aminés secondaires par le FMOC. La cystéine est détectée sous forme oxydée avec l'AMP. Autres composés: 1=acide 2 amino pentanoïque, 2= hydroxyproline, 3=sarcosine. Colonne: Hewlett Packard Amino Acid Analysis (200 x 2,1 mm D.I). Phase mobile: A= Tampon acétate de sodium 20 mM contenant 0,018% de triéthylamine ajusté à pH= 7,2 avec de l'acide acétique additionné de 0,3% de THF. B= Tampon acétate de sodium ajusté à pH 7,2 avec de l'acide acétique/acétonitrile/méthanol (20/40/40). De 0% à 60% de B en 17 minutes, puis 100% de B en 1 minute. Détection à 338 et 262 nm.

En revanche, ces méthodes font appel à une étape de dérivation chimique qui n'est pas sans poser des problèmes:

- de stabilité des dérivés finaux.
- d'universalité de l'étape de dérivation (les acides aminés sont-ils tous dérivés ?).
- de rendements de dérivation lorsque la réaction a lieu dans des matrices biologiques
- de la facilité de mise en œuvre (automatisation).

Le tableau II-8 donne quelques caractéristiques (avantages et inconvénients) des méthodes de dérivation présentées dans le tableau II-7. La dérivation par l'orthophtaldéhyde (OPA) qui est pourtant une des méthodes de dérivation les plus

utilisées n'est pas du tout adaptée à la détection d'amine secondaire, ce qui la rend inopérante pour les échantillons contenant de la proline. Elle offre de plus peu de sensibilité pour la cystéine.

	DERIVATION			
Caractéristiques	DANSYL	PTH	OPA	FMOC
Dérivation des fonctions amines secondaire	Oui	Oui	Non	Oui
Temps de réaction (min)	35	20	<1	5
Détection	UV	UV	Fluor/UV	Fluor.
Sensibilité	pmol	pmol	pmol (UV) fmol (fluor.)	fmol
Stabilité du dérivé	Bonne	Raisonnable	faible	Bonne
Interférence avec le réactif	Oui	Oui	Non	Oui
Effets de matrice	Faibles	Forts	Faibles	Moyens
Automatisation	Difficile	Difficile	Facile	Raisonnable

Tableau II-8: Caractéristiques de 4 méthodes de dérivation (en rouge, les désavantages). D'après [7,10, 14].

Enfin, d'une façon générale, l'étape de dérivation peut alourdir considérablement la méthode et/ou allonger de façon importante le temps d'analyse pour un échantillon. Certains dérivés (FMOC) ont besoin d'être extraits du milieu réactionnel après leur formation... On retrouvera la plupart de ces informations détaillées dans la revue de D. Fekkes datant de 1996 [10].

2) METHODES CHROMATOGRAPHIQUES D'ANALYSE D'ACIDES AMINES NON DERIVES.

Les nombreux problèmes induits par la dérivation des acides aminés conduisent naturellement à la recherche de méthodologies d'analyse évitant cette étape.

Les quelques méthodes existantes d'analyses d'acides aminés non dérivés s'appuient sur une séparation soit par chromatographie liquide [15-29], soit par électrophorèse capillaire [30-33], soit par chromatographie supercritique [34-35] ou subcritique [36].

Quatre systèmes de détection sont impliqués couramment dans ces méthodes.

2-1) Détection spectrophotométrique

Le plus répandu des modes de détection pour l'analyse des acides aminés non dérivés reste la détection UV. Bien que ces molécules (à l'exception des 3 acides aminés aromatiques) ne se prête pas réellement à cette détection, on retrouve une majorité d'analyses par UV direct en CPL [13, 15, 26] ou en électrophorèse capillaire [32, 33]. La longueur d'onde UV utilisée doit être au maximum voisine de 210 nm. En conséquence, les méthodologies CPL sont sensibles aux dérives de ligne de base lorsqu'elles font appel à des gradients d'élution utilisant des modificateurs organiques et elles demeurent peu sensibles. La méthode la plus performante fait appel à l'appariement d'ions et résout 18 des 20 acides aminés protéiques (Asn et Gln non présents) en 55 minutes environ [26].

Il existe aussi des méthodes utilisant la détection UV et fluorimétrique en mode indirect [17, 19, 22] mais les séparations sont insuffisantes pour les acides aminés les plus hydrophiles et on peut observer des pics induits qui interfèrent.

2-2) Détections électrochimiques

De nature ionique, les acides aminés non dérivés ont donné lieu à quelques méthodes d'analyse utilisant une détection directe ou indirecte, de type soit coulométrique [18], soit conductométrique [18, 29], soit ampérométrique [19-21, 31], soit voltamétrique [24]. Les méthodes CPL mises au point s'effectuent sur phase échangeuse d'ions. Elles ne concernent que quelques acides aminés car elles ne sont pas assez résolutive vis à

vis des acides aminés les plus hydrophiles. L'adjonction de modificateur organique peut induire aussi une dérive importante de ligne base [18].

Le principal intérêt de ces méthodologies est leur bonne sensibilité de détection (concentration de l'ordre de la micromole/l).

2-3) Détection par diffusion de la lumière

Les acides aminés libres sont des solides cristallins. Il était naturel de penser au DEDL comme système de détection pour ces composés en respectant bien entendu les exigences de volatilité de la phase mobile. Les premiers travaux de notre laboratoire sur ce sujet datent de 1996 [25] avec l'utilisation en CPL d'acides carboxyliques perfluorés comme agents d'appariement d'ions hydrophobes

En 1997, Chaves das Neves et coll [27, 28] présentent l'analyse de 16 des acides aminés protéiques par CPL-DEDL (Figure II-7) en utilisant une phase stationnaire mixte composée d'un support de silice greffée octadécyle et d'un support de silice greffée de type échangeur fort de cations. Les auteurs utilisent ainsi à la fois la différence d'hydrophobie et la différence d'état de charge des composés pour obtenir leur séparation. Cependant, les acides aminés les plus hydrophiles (Glu, Thr, Gly) sont encore très mal résolus et de plus, ce système est incapable de séparer ni la leucine de l'isoleucine, ni la méthionine de la tyrosine. Comme le DEDL est un des deux détecteurs retenus pour notre travail nous reviendrons un peu plus loin dans l'analyse de ces travaux qui nous serviront de point de comparaison avec notre propre travail.

Quelques années auparavant, des essais d'analyse par CPS couplée au DEDL [34, 35] n'avaient donné lieu qu'à la séparation de quelques acides aminés polaires (Arg, Asp, Glu, Cys).

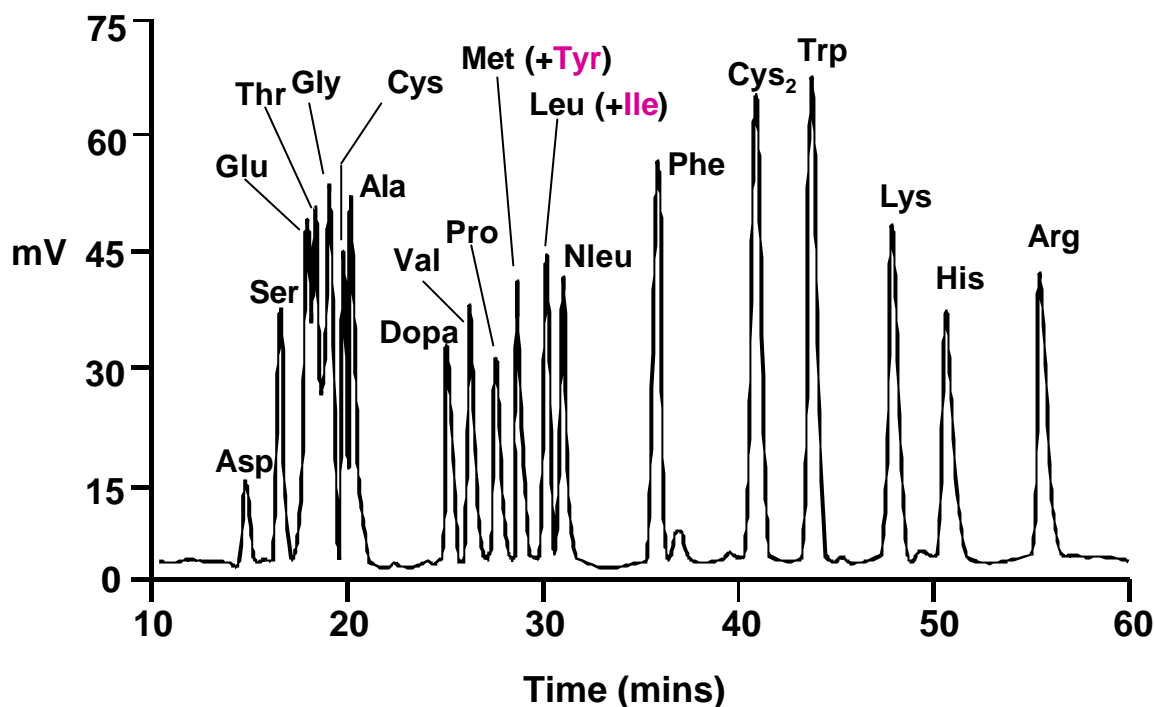


Figure II-7: Analyse d'acides aminés non dérivés sur Hypersil SCX Duet (250x4,6 mm DI) en gradient d'éluion utilisant la détection à diffusion de la lumière. Phase mobile: A: eau, B: acide tritfluoroacétique à 5% en solution aqueuse -ACN (80-20). De 0% à 10% de B en 20 min puis passage à 70% de B en 20 minutes puis 90% de B en 16 minutes. Le débit est de 0,8 ml/min pendant les 40 premières minutes puis il augmente à 1,6 ml/min en 16 minutes. Dopa: Dopamine, Nleu: norleucine, Cys₂: cystine. D'après [28].

2-4) Détection par Spectrométrie de Masse (SM)

L'étude des acides aminés non dérivés par spectrométrie de masse a donné lieu à de nombreux travaux [36-48]. Compte tenu des vertus de ce mode de détection (universalité, spécificité, sensibilité...), il est curieux qu'il n'ait donné lieu qu'à peu de publications pour l'analyse des acides aminés non dérivés par des méthodes séparatives couplées avec la SM. Seuls quelques mélanges simples d'acides aminés ont été jusqu'à présent analysés par CPL-SM (Ala, Val, Leu) [23] ou par EC-SM (His, Trp, Phe, Asp) [30].

Il existe des explications à ce faible nombre de travaux en couplage. Il y a parmi les acides aminés protéiques deux isomères (Leu et Ile, M=131) et deux composés isobares (Gln et Lys, M=146) mais il ressort surtout de certains travaux [40, 44] que les acides aminés peuvent donner facilement naissance à de nombreux interférents. La détection par SM

devient alors beaucoup moins intéressante et nécessite l'emploi préalable d'une méthode séparative puissante.

L'analyse des 20 acides aminés protéiques non dérivés par SM reste donc un champ d'investigation d'importance et d'intérêt.

3) CONCLUSIONS.

Les méthodologies faisant appel à la dérivation sont en règle générale très sensibles mais l'opération de dérivation peut entraîner une certaine lourdeur dans leur mise en œuvre ainsi que des sources d'erreurs.

Aucune des méthodologies d'analyse des acides aminés non dérivés ne s'est révélée idéale jusqu'à présent car le système séparatif utilisé n'est souvent pas assez résolutif (nombreuses coélutions) en ce qui concerne les acides aminés les plus hydrophiles de la série. En règle générale, l'analyse des acides aminés à résidu hydrophobe (aliphatique, aromatique,...) ne pose pas de problèmes sauf pour le couple Leu-Ile dont la résolution est parfois limitée voire inexistante.

La détection apparaît peu sensible avec l'UV direct et pour certaines méthodologies l'analyse dans les milieux naturels pourra poser des problèmes d'interférences.

Quant aux méthodes utilisant la SM, le défi analytique semble moins grand puisque la détection elle-même peut apporter sa contribution à la distinction des acides aminés de masses différentes. Cependant aucune d'entre elles ne propose actuellement l'analyse des 20 acides aminés protéiques.

La recherche de méthodes d'analyses pour les acides aminés protéiques non dérivés reste donc bien un problème d'actualité. C'est pourquoi nous avons choisi de mettre au point de nouvelles méthodes d'analyse CPL sans dérivation utilisant le DEDL comme détecteur universel avec un double objectif:

- Pour être accessible à n'importe quel laboratoire, la détection doit rester d'un prix abordable. Le DEDL apparaît donc comme un détecteur de choix. Les analyses que nous développerons devront donc résoudre la totalité des 20 acides aminés.

- Pour les laboratoires disposant de la spectrométrie de masse, les méthodes CPL mises en œuvre pourront être moins résolutive donc à priori plus rapides. De plus, ces analyses devraient être d'une sensibilité supérieure au DEDL et être plus facilement applicables aux milieux biologiques. Cependant, parce qu'il existe des acides aminés isomères et isobares, parce qu'il existe une fragmentation de certains acides aminés pouvant conduire à des indéterminations, il apparaît clair que le développement d'une séparation maximale reste d'un grand intérêt même si des simplifications pourront être envisagées par la suite.

■

C] CHOIX DES SYSTEMES CHROMATOGRAPHIQUES

Il convient maintenant de préciser quelles sont les possibilités de développement des systèmes séparatifs par CPL. La figure II-8 met en évidence les systèmes chromatographiques qui découlent de la bibliographie.

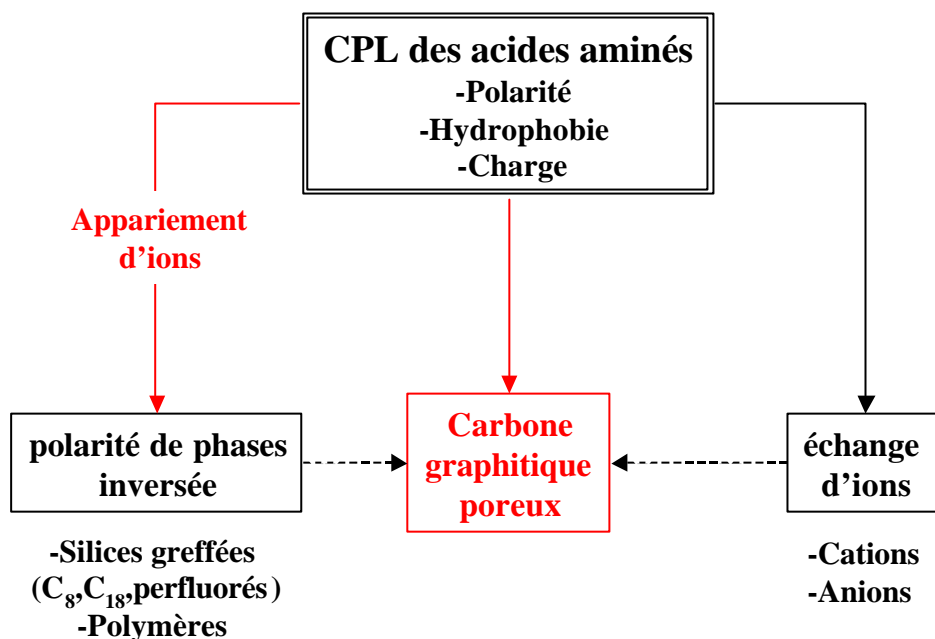


Figure II-8: Voies de développement d'une méthode séparative par CPL.

Nous avons fait quelques essais dans chacune des 2 voies proposées pour appréhender les potentialités de chacune vis à vis de la détection par diffusion de la lumière en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Ces essais consistent à adapter les phases mobiles pour les rendre volatiles, c'est à dire compatibles avec les deux détecteurs (DEDL et SM) et en estimer la faisabilité.

1) ADAPTATION DE SYSTEMES EXISTANTS.

L'adaptation de systèmes chromatographiques existants est une source potentielle de systèmes séparatifs. Elle nécessite le remplacement de tous les agents (sels, agents

d'appariement d'ions...) non volatils par des homologues volatils pour que la compatibilité avec le DEDL et la SM soit assurée. Nous avons fait quelques essais dans cette voie.

1-1) Chromatographie d'échange d'ions

1-1-a) Echangeurs faibles

En 1980, Schuster [15] a proposé l'utilisation d'une silice greffée aminopropyl (Lichrosorb-NH₂, 200x4,6 mm D.I.) comme échangeur de cation faible avec une détection UV directe à 200nm. Il arrive ainsi à séparer 17 des 20 acides aminés protéiques. Asn, Gln et Gly demeurent coélués et la résolution entre Met et Tyr est faible. L'élution en gradient est réalisée en utilisant une phase mobile aqueuse contenant 10mM de KH₂PO₄ à pH=4,3 et de l'acétonitrile.

Nous avons essayé de transposer cette méthode pour la rendre compatible avec une détection par DEDL pour l'analyse d'un mélange industriel de 8 acides aminés (respectivement dans l'ordre d'élution: Trp, Phe, Leu, Ile, Met, Val, Thr, Lys) normalement séparés en moins de 25 minutes par la méthode proposée par Schuster. Nous avons apporté alors quelques adaptations:

Il a été montré que les silices aminopropyl sont sujettes à l'hydrolyse en milieu aqueux ce qui génère un bruit de fond important avec le DEDL [49]. De plus, la phase mobile utilise des phosphates (10 mM) non volatils. C'est pourquoi nous avons à la fois changé le support et le tampon (le profil du gradient sera conservé) pour adapter au DEDL le système de Schuster. La figure II-9 montre un essai de séparation du mélange industriel sur un support polymérique aminopropyl (Astec-NH₂, Advance Separation Technology, Whippany, NJ, USA) avec l'acétate d'ammonium (10 mM) volatil ajusté à pH 4,3 par de l'acide acétique.

Le DEDL remplace avantageusement le détecteur UV (à 200 nm) au cours du gradient car il évite une dérive de la ligne de base. Quant à l'ordre d'élution, il est différent et la séparation est ici bien moins performante que celle de Schuster. Nous n'avons pas poursuivi plus loin les investigations car une optimisation de la séparation risque d'être longue.

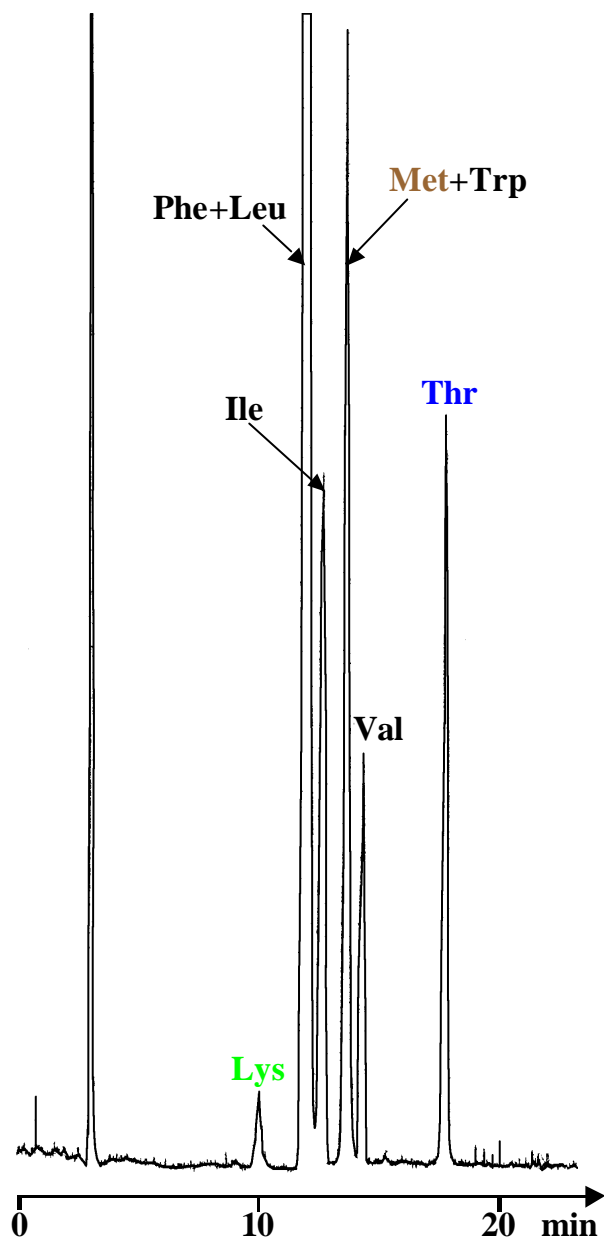


Figure -II-9: Chromatographie sur colonne greffée amino d'un mélange industriel de 8 acides aminés non dérivés. Colonne Astec-NH₂ (250x4.6 mm DI). Gradient d'élution: Phase mobile: A: Tampon AcONH₄ 10 mM (ajusté à pH 4,3 par de l'acide acétique), B: Acétonitrile - Eau (88/12). 95% de B pendant les 5 premières minutes puis passage à 70% de B en 15 minutes. Débit: 1 ml/min.

1-2-b) Echangeurs forts

Pour que la chromatographie ionique soit compatible avec une détection par diffusion de la lumière ou avec la spectrométrie de masse, il suffit finalement d'avoir recours à des ions développeurs et des contre-ions volatils. Le sel formé possède alors en général une volatilité suffisante pour être utilisé avec le DEDL ou la SM. Il peut s'agir dans le cadre d'un échange de cations des ions H⁺, NH₄⁺, triéthylammonium, pyridinium [50]... La figure II-10 montre un exemple de

séparation CPL-DEDL réalisée sur une silice échangeuse de cation et le formiate (contre-ion volatil) de triéthylammonium (Et_3NH^+) en gradient de concentration.

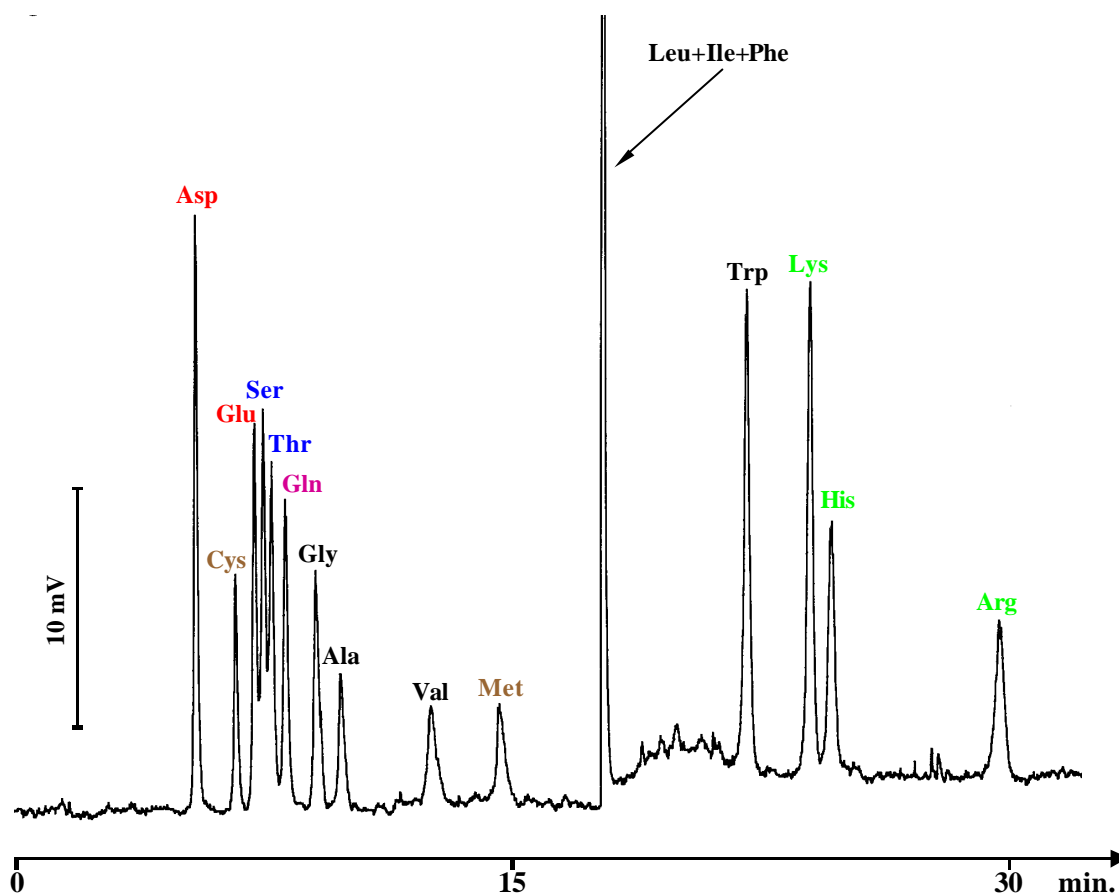


Figure II-10: Chromatographie sur phase échangeuse de cations d'un mélange standard d'acides aminés non dérivés (50mg/l chacun). Colonne Hypersil-SCX (250x4.6 mm DI). Gradient d'élution: solvant A= Eau; B= Tampon formiate de triéthylammonium 4 mM (ajusté à pH 3 avec de l'acide formique); C= Tampon formiate de triéthylammonium 20 mM (ajusté à pH 4 avec de l'acide formique); de 0 à 8 minutes 50/50/0, puis 0/0/100 en 16 minutes et maintenu dans ces conditions jusqu'à la fin de l'analyse. Débit: 1 ml/min.. Volume injecté: 10 μ l. Détection DEDL Sedex 55.

Le début d'analyse s'effectue à pH 3. Presque tous les acides aminés sont en dessous de leur pI, donc cationiques. La concentration en ion développeur (Et_3NH^+) est faible (2mM). Au fur et à mesure, le pH augmente jusqu'à pH 4 pour réduire la charge positive (certains amino acides deviennent presque neutres) et réduire leur affinité pour la phase stationnaire. Parallèlement, nous augmentons aussi la concentration d'ion développeur pour augmenter la force éluante de la phase mobile et éluer ainsi les acides aminés dont le résidu est basique (dications).

Malgré tout, il reste quelques coélutions importantes telles que Leu, Ile et Phe. et la résolution entre certains acides aminés polaires est faible (Glu, Ser, Thr et Gln).

Dans ce seul domaine de l'échange d'ions, le travail à réaliser est très important à cause de la nature variée des échangeurs qui peuvent être:

- cationique / anionique.
- faible / fort.
- silices greffées / polymères, nature du greffon, nature du polymère.

Toutes ces différences influencent la séparation des acides aminés protéiques qui possèdent à la fois une charge variable avec le pH et une hydrophobie distincte.

Une récente publication (juin 1999) est venue confirmer l'intérêt de l'échange de cation puisque les auteurs [51] ont réussi l'analyse de 18 des 20 acides aminés protéiques en environ 50 minutes par CPL-DEDL avec un support échangeur fort et une phase mobile contenant de l'acide trifluoroacétique et de l'acétate d'ammonium. Seuls les deux acides aminés à résidu de type amide manquent et certains pics ont une faible efficacité ce qui nuit considérablement à l'obtention de bonnes limites de détection avec cette méthodologie.

Pour notre part, en dépit des essais prometteurs, nous n'avons pas privilégié l'échange d'ions comme axe de recherche car ces silices ont en général une durée de vie limitée.

2-2) Chromatographie de paire d'ions sur silices greffées apolaires

La chromatographie de paire d'ions sur phase stationnaire apolaire a, comme l'échange d'ions, été largement utilisée pour l'analyse de acides aminés dérivés [10-12] et non dérivés [16, 17, 21-23, 26]. Son principe consiste à transformer ces solutés, hydrophiles et ioniques, en des entités hydrophobes capables d'interagir avec la phase stationnaire apolaire.

Les agents d'appariement d'ions les plus communément utilisés dans l'analyse des acides aminés sous forme cationique sont les acides n -alkylsulfoniques sous forme de

sels de sodium. Les phase mobiles sont alors non évaporables et sont donc incompatibles avec le DEDL comme avec la SM.

Dès 1996, notre laboratoire a proposé l'emploi des acides carboxyliques perfluorés (acide nonafluoropentanoïque) comme agents d'appariement d'ions volatils pour l'analyse CPL-DEDL des acides aminés protéiques les plus hydrophiles [25].

La figure II-11 montre les travaux de Chaves das Neves et Braga-Morais [27] concernant une analyse d'acides aminés par CPL-DEDL sur une phase stationnaire silice greffée C8 utilisant une phase mobile contenant jusqu'à 5% d'acide trifluoroacétique

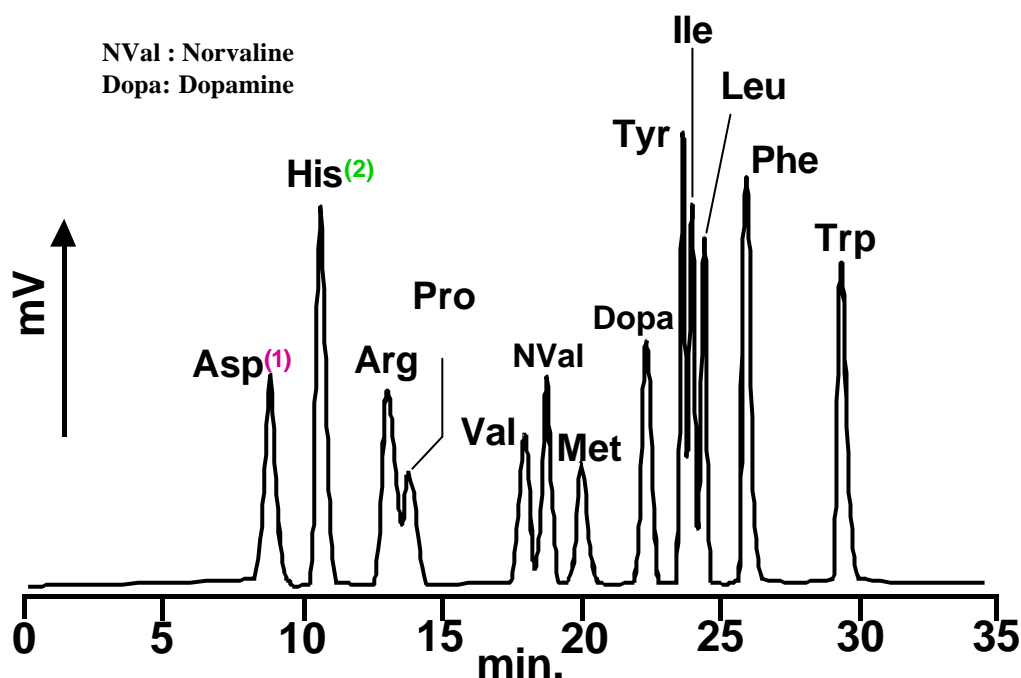


Figure II-11: Analyse CPL-DEDL d'acides aminés non dérivés sur RP8 Spherisorb (100x4,6mm D.I.) en gradient d'élution. Phase mobile: A= solution aqueuse d'acide trifluoroacétique (pH=1,97), B= mélange de 50% de A avec 50% d'acétonitrile. Profil du gradient d'élution: Les 12 premières minutes s'effectuent avec 0% de B à un débit de 0,3 ml/min puis passage à 35% de B et du débit à 1ml/min en 12 minutes suivi d'une augmentation du débit à 1,2 ml/min en 5 minutes et enfin augmentation de B à 40% et du débit à 1,5 ml/min en 3 minutes. Le pic de Asp (annoté 1) correspond aussi à la coélution de Ala, Cys, Gly, Ser, Thr; le pic de His (annoté 2) à la coélution de Asn, Lys, Glu. D'après [27].

(TFA). L'analyse des acides aminés possédant un résidu hydrophobe ne pose alors quasiment aucun problème. En revanche, la rétention d'une paire d'ions formée entre le

TFA et un acide aminé dont le résidu est hydrophile reste faible car le groupement $-CF_3$ du TFA est beaucoup trop court pour engendrer une paire d'ion hydrophobe. On observe donc aucune sélectivité entre Asp, Ala, Cys, Ser et Thr, ni entre His, Asn, Lys et Glu. Les auteurs ne précisent pas la durée de vie de leur colonne mais une phase mobile contenant 5% d'acide trifluoroacétique (pH=1,97) est sûrement très agressive envers la phase stationnaire. Cette analyse ne permet la séparation que de 11 des 20 acides aminés protéiques. Les auteurs ont dû alors adjoindre à la phase C8 une phase échangeuse de cations fort pour augmenter la sélectivité de leur système chromatographique (figure II-7).

Les analyses que nous avons réalisées au laboratoire avec des tensioactifs perfluorés beaucoup plus hydrophobes (homologues du TFA mais avec une longueur de chaîne d'au moins 3 carbones) montrent une augmentation de la rétention des acides aminés et une amélioration très nette de la sélectivité envers les acides aminés les plus hydrophiles. La figure II-12 montre une analyse obtenue au cours de ce travail sur colonne Supelcosil ABZ⁺Plus (Supelco, Bellefonte, PA, USA) avec 1mM d'acide tridécafluoroheptanoïque (chaîne perfluorée hydrophobe linéaire à 6 carbones) qui est suffisamment volatil pour être utilisé avec le DEDL. La sélectivité est bien meilleure qu'avec le TFA même s'il existe encore quelques coélutions. On notera cependant la présence d'un pic induit par le système chromatographique qui masque le pic de l'arginine.

La bonne sélectivité obtenue pour les acides aminés les plus hydrophiles ne requiert pas ici l'emploi simultané d'un support échangeur de cations. Le pH de la phase mobile aqueuse est de 3 et correspond à la gamme d'utilisation conseillée par le fabricant.

Nous ne poursuivrons pas l'optimisation de cette séparation car cette démarche requiert l'essai de nombreuses phases stationnaires (C8, C18, polymères...) présentes sur le marché. De plus, ce travail fait l'objet d'une autre thèse, parallèle à celle-ci, dans notre laboratoire [52].

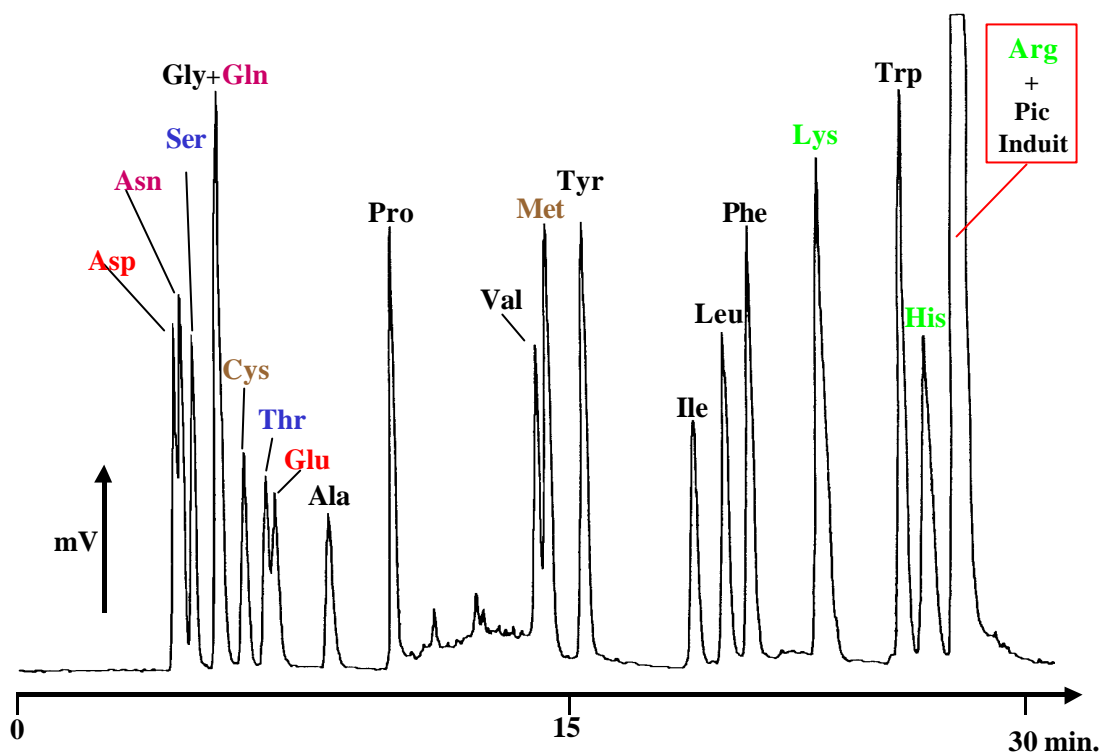


Figure II-12: Analyse des 20 acides aminés protéiques non dérivés sur Supelcosil ABZ⁺ Plus en gradient d'élution. Phase mobile: A= solution aqueuse d'acide tridécafluoroheptanoïque (TDFHA) 1 mM, (pH=3), B= Acétonitrile. 0% de B pendant 6 minutes puis de 0 à 20% de B en 2 minutes, 20% B maintenu pendant 6 minutes puis passage de 20 à 25 % de B en 2 minutes , 25% de B maintenus jusqu'à la fin de l'analyse. Débit: 1 ml/min. DEDL Sedex 55 (Pression de nébulisation 2,2 bars, température du tube d'évaporation: 60°C, photomultiplicateur: 10). Concentration en chaque acide aminé: 100mg/l. Volume injecté: 20µl.

2) DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES SEPARATIFS UTILISANT UNE PHASE STATIONNAIRE EN CARBONE GRAPHITIQUE POREUX.

Cette phase relativement nouvelle sur le marché, souvent nommée par le sigle PGC (Porous Graphitic Carbon), a fait l'objet de nombreuses applications dans notre laboratoire et plusieurs points ont orienté notre choix pour le développement de méthodes chromatographiques la mettant en jeu.

- Contrairement aux phases classiques (échangeuses d'ions ou apolaire), il n'existe qu'une phase PGC commerciale connue sous le nom d'Hypercarb (Hypersil, Runcorn, GB).
- Le PGC est une phase très hydrophobe. Ceci est un avantage car les essais réalisés sur supports hydrophobes classiques ont montré que les phases stationnaires les plus hydrophobes conduisaient aux meilleures performances en terme de sélectivité.
- L'analyse des acides aminés protéiques n'a jamais été tentée sur ce support.
- Le PGC semble posséder des propriétés particulières envers les composés ioniques, et nous espérons qu'elles engendreront des sélectivités intéressantes pour les séparations d'acides aminés.

Remarque: nous conserverons le sigle PGC, bien connu, pour désigner le carbone graphitique poreux pendant la suite de ces travaux.

D] CONCLUSIONS

Ce chapitre a montré que les acides aminés protéiques non dérivés formaient un ensemble de molécules très difficile à analyser. Aucune des méthodologies actuelles ne donne la solution idéale pour leur détermination et quantification.

Les méthodes les plus couramment utilisées font appel à une étape de dérivation pour faciliter la détection de ces composés, mais cette étape n'est pas sans poser un certain nombre de problèmes bien connus. Il reste donc nécessaire de mettre au point des méthodes évitant une étape de dérivation.

Les méthodes actuelles d'analyses n'utilisant pas d'étape de dérivation ne conduisent pas pour le moment à la complète détermination des 20 acides aminés protéiques.

Le DEDL s'est montré comme un détecteur prometteur pour la détection des acides aminés non dérivés mais il est nécessaire que la résolution de l'ensemble de ceux-ci soit assurée totalement par le système séparatif. En revanche, le couplage des méthodes séparatives avec la spectrométrie de masse est quasi inexistant en dépit des avantages de la SM. Malgré une plus grande spécificité de détection et la possibilité de résoudre certaines coélutions, nous avons annoncé que le système séparatif devra rester relativement performant.

Le choix de la méthode séparative reste vaste même en ne s'intéressant qu'au développement des seules méthodes par CPL. Des essais préliminaires ont été menés dans plusieurs voies classiques de séparation et finalement, nous retiendrons l'utilisation d'une phase stationnaire très hydrophobe – le carbone graphitique poreux – encore mal connue mais présentant des potentialités supérieures aux silices greffées apolaires classiques pour assurer la mise au point d'une séparation CPL-DEDL la plus résolutive possible qui fait l'objet du chapitre suivant.

Références bibliographiques

- [1] A. Brack, F. Raulin, "l'évolution chimique et les origines de la vie", Masson, Paris, 1991.
- [2] L. Stryer, "Biochemistry", 3^e édition, chapitre 2, W. H Freeman and company, New York, 1988, p.15.
- [3] M. Friedman, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 3457.
- [4] C. Romero, M. Brenes, P. Garcia, A. Garrido, Food Chemistry. 63 (1998) 319.
- [5] P. H. Orte, A. Guitart, J. Cacho, Am. J. Enol. Vitic. 48 (1997) 229.
- [6] P. Lehtonen, Am. J. Enol. Vitic. 47 (1996) 127.
- [7] R. Rosset, M. Caude, A. Jardey, "Chromatographies en Phases liquide et Supercritique", 3^e édition, Masson, Paris, 1991.
- [8] P. Vallat, P. Gaillard, P. A Carrupt, R. S. Tsai, B. Testa, Helv. Chim. Act. 78 (1995) 471.
- [9] Y. Watanabe, K. Imai, Anal. Chem. 55 (1983) 1786.
- [10] D. Fekkes, J. Chromatogr. B. 682 (1996) 3.
- [11] M. Hirukawa, M. Maeda, A. Tsuji, T. Hanai, J. Chromatogr. 507 (1990) 95.
- [12] J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, J. Chromatogr. A. 676 (1994) 311.
- [13] H. Godel, P. Seitz, M. Verhoef, LC-GC Int. 5 (1992) 44.
- [14] Y. Yokoyama, O. Ozaki, H. Sato, J. Chromatogr. A. 739 (1996) 333.
- [15] R. Schuster, Anal. Chem. 52 (1980) 617.
- [16] L. E. Vera-Avila, M. Caude, R. Rosset, Analisis. 10 (1982) 43.
- [17] J. Crommen, P. Herné, J. Pharm. Biomed. Anal. 2 (1984) 241.
- [18] L. E. Welch, W. R. Lacourse, D. A. Mead, D. C. Johnson, Anal. Chem. 61 (1989) 555.
- [19] L. E. Welch, W. R. Lacourse, D. A. Mead, D. C. Johnson, Talanta. 37 (1990) 377.
- [20] P. Luo, F. Zhang, R. P. Baldwin, Anal. Chem. 63 (1991) 1702.
- [21] P. G. Simmonson, D. J. Pietrzyk, J. Liq. Chromatogr. 16 (1993) 597.

- [22] M. Eslami, P. Hashemi, M. N. Sarbolouki, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 480.
- [23] R. G. J. Van Leukken, G. T. C. Kwakkenbos, A. L. L. Duchateau, *J. Chromatogr.* 647 (1993) 131
- [24] J. M. Marioli, L. E. Sereno, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 19 (1996) 2505.
- [25] D. Thiebaut, M. Dreux, communication orale, "20th Symposium on High Performance Liquid Phase Separation and Related Techniques, HPLC'96, San Francisco, CA, Mai 1996, USA.
- [26] Y. Yokoyama, T. Amaki, S. Horikoshi, H. Sato, *Anal. Sci.* 13 (1997) 963.
- [27] H. J. Chaves das neves, Z. Braga-Morais, *Anal. Quim.* 93 (1997) 98.
- [28] H. J. Chaves das neves, Z. Braga-Morais, *J. High Resol. Chromatogr.* 20 (1997) 115.
- [29] B. R. Kildew, D. A. Young, Pittcon'99, Orlando, Floride, Mars 1999, USA.
- [30] W. Lu, G. Yang, R. B. Cole, *Electrophoresis* 16 (1995) 487.
- [31] Y. Guo, L. A. Colon, R. Dadoo, R. N. Zare, *Electrophoresis* 16 (1995) 493.
- [32] M. J. Thornton, J. S. Fritz, C. W. Klampfl, *J. High Resol. Chromatogr.* 20 (1997) 647.
- [33] C. W. Klampfl, W. Buchberger, M. Turner, J. S. Fritz, *J. Chromatogr. A.* 804 (1998) 349.
- [34] V. Camel, D. Thiebaut, M. Caude, M. Dreux, *J. Chromatogr.* 605 (1992) 95.
- [35] A. J. Berry, E. D. Ramsey, M. Newby, D. E. Games, *J. Chromatogr. Sci.* 34 (1996) 245.
- [36] D. J. Miller, S. B. Hawthorne, *Anal. Chem.* 69 (1997) 623.
- [37] K. Bieman, J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 3192.
- [38] M. Eckersley, J. H. Bowie, R. N. Hayes, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 93 (1989) 199.
- [39] H. U. Winkler, H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 6 (1962) 655.
- [40] S. Bouchonnet, J. P. Denhez, Y. Hoppilliard, C. Mauriac, *Anal. Chem.* 64 (1992) 743.
- [41] L. K. Liu, K. L. Busch, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* 53 (1981) 109.
- [42] W. Kulik, W. Heerma, *Biomed. Mass Spectrom.* 15 (1988) 419.

- [43] N. N. Dookeran, T. Yalcin, A. G. Harrison, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 500.
- [44] C. D. Parker, D. M. Hercules, *Anal. Chem.* 58 (1986) 25.
- [45] H. Kambara, *Anal. Chem.* 54 (1982) 143.
- [46] M. B. Goshe, V. E. Anderson, *Anal. Biochem.* 231 (1995) 387.
- [47] B. A. Mansoori, D. A. Volmer, R. K. Boyd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1120.
- [48] K. Hiraoka, K. Murata, I. Kudaka, *J. Mass. Spectrom. Soc. Jpn.* 43 (1995) 127.
- [49] B. Herbreteau, V. Villette, M. Lafosse, M. Dreux, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 246.
- [50] M. Dreux, M. La fosse, L. Morin-Allory, *LC-GC Int.* 9 (1996) 148.
- [51] J. A. Peterson, L. J. Lorentz, B. J. Sandmann, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 22 (1999) 1009.
- [52] K. Petritis, Thèse de doctorat en cours, Université d'Orléans.

Chapitre III

MISE AU POINT DE SEPARATIONS D'ACIDES AMINES NON DERIVES SUR CARBONE GRAPHITIQUE POREUX PAR CPL-DEDL

Le carbone graphitique poreux est un support chromatographique relativement récent dans sa version commerciale. Bien qu'anciennement connu pour ses propriétés adsorbantes, l'historique du carbone en tant que support chromatographique commence réellement dans les années 70 pour arriver en 1982 au carbone vitreux de Gilbert et Knox dont la synthèse fut modifiée pour aboutir au carbone graphitique poreux connu sous le sigle anglo-saxon de PGC (Porous Graphitic Carbon). La phase est lancée sur le marché en 1988 par Shandon sous le nom d'Hypercarb S [1]. Cependant, cette phase reste encore relativement nouvelle sur le marché. Le nombre des publications à son sujet s'accroît d'année en année démontrant des propriétés insoupçonnées à ses débuts. Elle se révèle alors attractive dans de nombreux domaines.

Peu de travaux ont été réalisés sur PGC dans le cadre de l'analyse d'acides aminés qu'ils soient dérivés ou non. Trois publications concernent des analyses chirales [2-4] nécessitant une modification de la surface du PGC et une dernière montre une séparation du tryptophane et de la tyrosine [5].

A] LE CARBONE GRAPHITIQUE POREUX

Nous allons revoir quelques points importants du PGC qui ont motivé notre choix pour la mise au point d'une méthode séparative concernant les 20 acides aminés protéiques non dérivés sur cette phase particulière.

1) PRESENTATION GENERALE DU PGC

De par sa structure uniquement constituée de plans rigides d'atomes de carbone empilés selon un arrangement bidimensionnel, sans possibilité de présence de silanols résiduels à sa surface (figure III-1) [6], le carbone graphitique poreux a tout d'abord été présenté comme la

phase stationnaire la plus hydrophobe du marché. Des études en ce sens appuient en partie cette thèse [7, 8]. En plus de ses propriétés fortement hydrophobes, la présence d'électrons π libres délocalisés à sa surface vont conférer à cette phase des propriétés particulières. La participation des électrons π à la rétention peut même dominer le mécanisme global de la séparation [9, 10]. Grâce à ses propriétés physico-chimiques particulières (planéité, hydrophobie, possibilité d'interactions électroniques), la phase PGC présente alors des propriétés différentes de celles d'une phase C18 classique [7] et notamment des sélectivités plus grandes envers les isomères de systèmes aromatiques ou conjugués [8, 11], mais aussi plus inattendu envers les composés polaires [12]. La rétention de composés ioniques (organiques et inorganiques) a même été montrée [13-17] sans avoir recours pour autant à l'utilisation d'agents d'appariement d'ions.

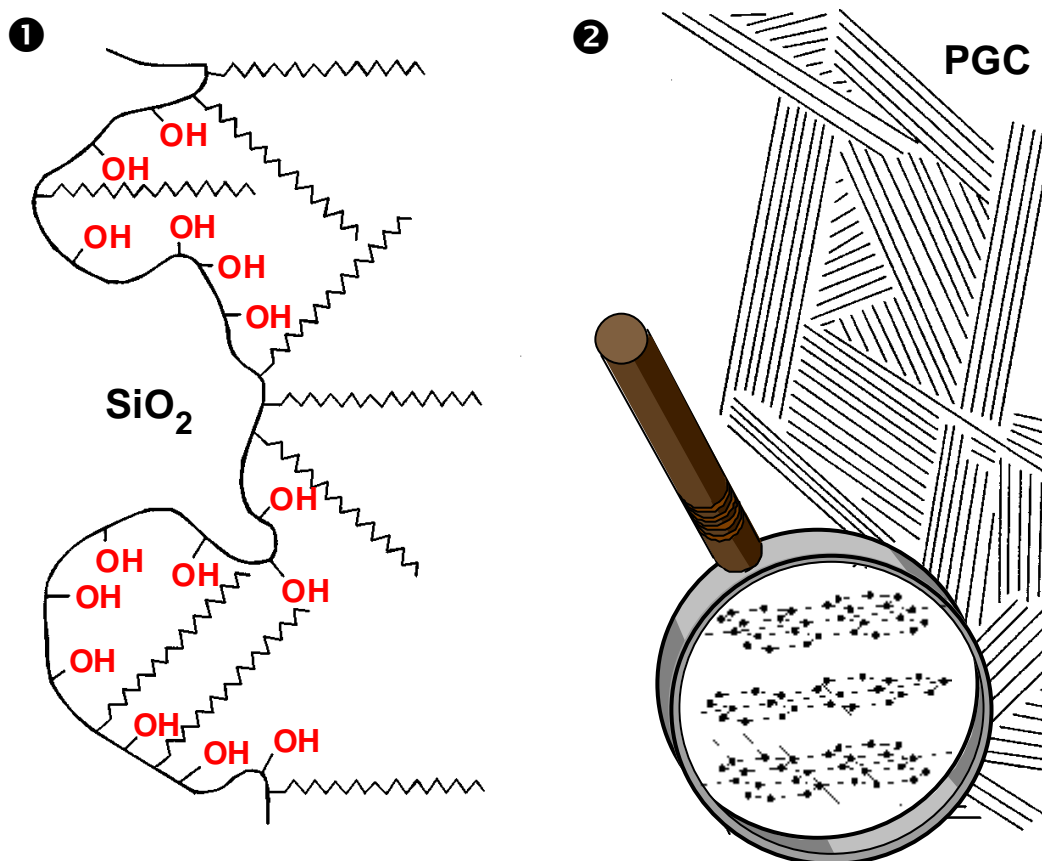


Figure III-1: Structures comparées ❶ d'une silice greffée octadécyl (C18) et ❷ du carbone graphitique poreux (PGC). La structure du PGC bien que constituée de plans de graphite disposés aléatoirement est beaucoup plus organisée que la silice greffée pour laquelle la libre rotation autour des liaisons carbone-carbone des greffons est permise. L'absence de silanols résiduels à sa surface en fait un support idéalement hydrophobe et la présence d'électrons délocalisés lui confère des propriétés électroniques particulières non observées avec un support de silice greffée octadécyl classique [d'après 6].

La phase Hypercarb bien qu'ayant une nature fortement hydrophobe ne se comporte donc pas uniquement comme un support de type apolaire. Le phénomène de rétention doit être considéré comme une balance entre les interactions purement de type hydrophobe et les interactions électroniques avec les groupes fonctionnels polarisés ou polarisables. Si beaucoup de groupes de recherches se sont attaqués au problème de la quantification des effets de ces derniers - baptisés PREG (Polar Retention Effect on Graphite) - sur la rétention, il semble que nul n'ait apporté encore une réponse complètement satisfaisante [1] permettant la prévision des rétentions.

2) COMPORTEMENT ATYPIQUE ENVERS LES COMPOSES IONIQUES

Lorsqu'on souhaite analyser des entités ionisables en utilisant des supports de chromatographie à polarité de phases inversée classiques, la méthodologie à mettre en œuvre, si on ne peut jouer sur le pH pour les rendre neutres (acides ou bases faibles), est d'utiliser dans la phase mobile des additifs permettant de créer ou d'augmenter les interactions solutés – phase stationnaire (cf. chromatographie de paire d'ions). Ces mêmes agents peuvent aussi modifier temporairement l'état de surface de la phase stationnaire (échange d'ion dynamique). Si un certain nombre de travaux ont été réalisés de cette manière sur PGC [18-20], il n'est cependant pas nécessaire d'avoir recours à ces agents pour analyser certains anions [13-18] ou cations [15, 21] (organiques ou inorganiques).

Dans la séparation d'oxoanions, Lim a montré que la chromatographie d'interactions électroniques était possible sur PGC [13]. En ce qui concerne les anions organiques, la charge négative contribue fortement à la rétention. En revanche, pour les cations organiques la rétention semble être plutôt due à la seule partie hydrophobe [15]. Nous avons nous mêmes étudié par CPL-DEDL, la séparation de cations et d'anions inorganiques [17] sur PGC par CPL-DEDL en utilisant des ions compétiteurs volatils. Il nous est apparu qu'en l'absence de compétiteurs ioniques (eau déionisée), les anions sont totalement retenus alors que les cations étudiés (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) au contraire sont élués en volume mort. L'adjonction d'un modificateur électronique anionique (comme le trifluoroacétate, le formiate) est absolument requis pour assurer l'éluion des anions inorganiques. Ces travaux renforcent l'idée d'interactions fortes particulières du PGC envers les anions. La figure III-2 (❶ et ❷) montre deux exemples d'analyse d'anions inorganiques sur PGC par CPL-DEDL où

le formiate joue le rôle de compétiteur électronique (anion compétiteur). Actuellement, des analyses complémentaires sont en cours dans notre laboratoire pour préciser le rôle des compétiteurs et la capacité échangeuse d'anions du PGC.

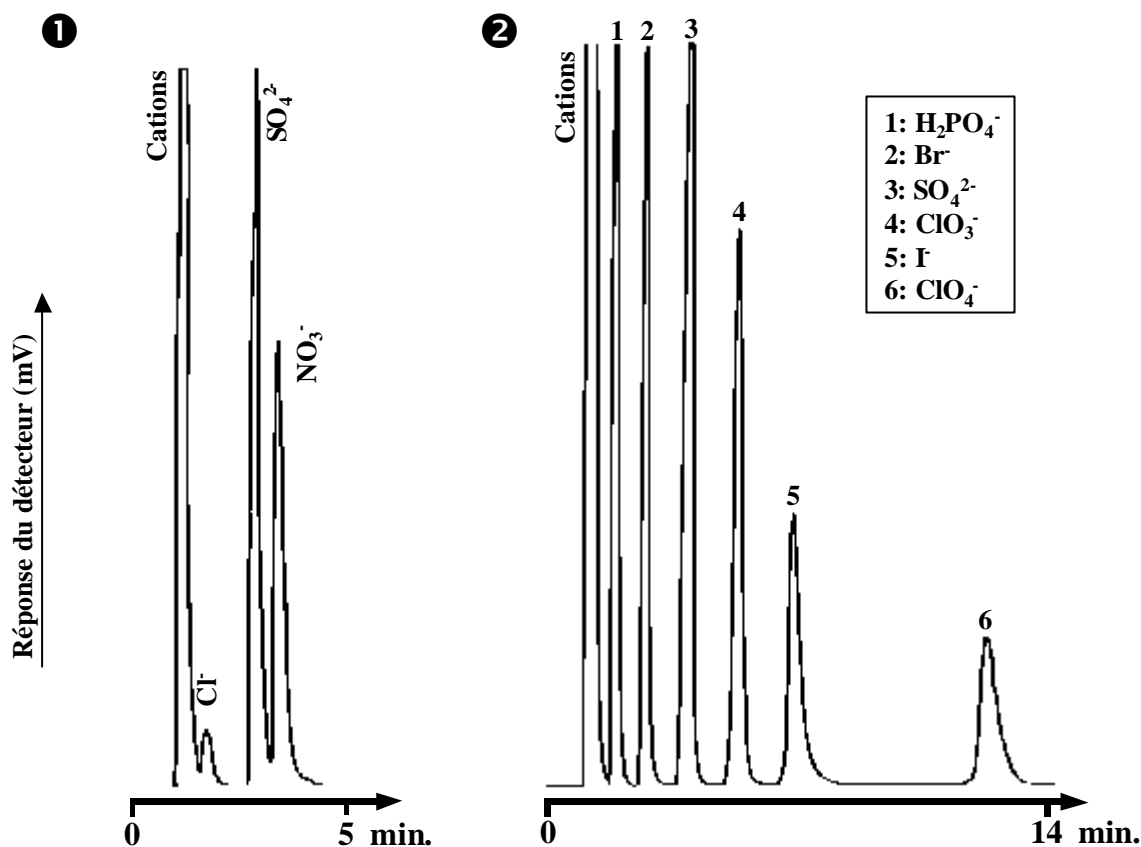


Figure III-2: Analyse isocratique d'anions inorganiques (100mg/l) par CPL-DEDL sur PGC. ❶ Phase mobile: solution aqueuse de formiate de pyridinium (20mM, pH=4,47), ❷ Phase mobile: solution aqueuse de formiate de pyridinium (20mM, ajusté à pH=3,94 avec un excès d'acide formique). Les cations (Na^+ ou/et K^+) sont élués en volume mort. Colonne Hypercarb S 7 μm 100x 4,6 mm DI. Débit: 1ml/min. Volume injecté: 20 μl .

Cette rapide présentation d'ensemble de la phase PGC oriente le développement de séparations CPL compatibles avec le DEDL et la SM dans deux voies possibles:

- Les acides aminés peuvent se comporter en fonction du pH soit comme des cations soit comme des anions organiques (chapitre II-A). Nous pouvons essayer d'utiliser directement les interactions particulières du PGC envers les anions et cations en utilisant des sels volatils (milieux aqueux salins) comme compétiteurs électroniques.

Le mécanisme global devra cependant prendre en compte les propriétés hydrophobes de la phase PGC.

- Nos études sur les phases stationnaires à polarité de phases inversée classiques en appariement d'ions (avec les acides carboxyliques perfluorés) ont montré pour l'instant que les supports les plus hydrophobes amenaient les meilleures séparations pour les acides aminés les plus hydrophiles [22]. Le PGC possède un caractère beaucoup plus hydrophobe que les silices greffées C18 [7]. De ce fait, nous pouvons exploiter cette propriété pour mettre au point une méthode séparative utilisant la chromatographie de paire d'ions avec les acides carboxyliques perfluorés comme agents d'appariement volatils. A cause des interactions particulières entre les anions et la PGC, on peut s'attendre d'ores et déjà à un mécanisme plus compliqué que celui observé avec les silices greffées apolaires car le tensioactif peut interagir avec la phase stationnaire non seulement par sa chaîne hydrophobe mais aussi par sa tête polaire anionique.

B] CHROMATOGRAPHIE PAR COMPETITION D'INTERACTIONS ELECTRONIQUES

Nous venons de mentionner que la chromatographie d'interactions électroniques était possible sur PGC et que des analyses de composés anioniques et cationiques organiques ou inorganiques variés avaient été réalisées. Le compétiteur le plus couramment utilisé est sans aucun doute l'acide trifluoroacétique (TFA) [13, 15-17]. Nous avons pour notre part étudié les potentialités de plusieurs acides carboxyliques (CH_3COO^- , HCOO^- , CF_3COO^- , ...) comme compétiteurs électroniques évaporables pour l'analyse d'anions inorganiques par CPL-DEDL sur PGC [17] et montré que la force éluante du compétiteur est fonction de la concentration en ion carboxylate dans la phase mobile. Nous avons donc cherché à analyser de la même manière les acides aminés sachant, qu'en plus des interactions électroniques, pouvait jouer la différence d'hydrophobie de ces derniers. Pour travailler à des états de charge bien définis pour les acides aminés (annexe II), nous aurons la possibilité d'ajuster le pH des phases mobiles avec des bases (co-ion) telles l'ammoniaque (NH_4OH), la triéthylamine (Et_3N), la pyridine sans avoir de problèmes de volatilité du sel formé.

Nous avons commencé l'étude par une phase mobile constituée simplement d'eau déionisée (station Elgastat UHQ II, Elga, Antony, France). Na^+ n'étant pas retenu avec les phases aqueuses salines [17], le temps d'élution de ce dernier sera pris comme temps mort (t_0) pour les calculs des facteurs de rétention. Le tableau III-1 montre qu'il existe une certaine rétention des acides aminés mais que le système n'est pas très intéressant car très peu sélectif et très peu efficace. 15 acides aminés sur 20 sont élués. Asp et Glu sont totalement retenus à cause de leur charge globalement négative (-1,00) à pH voisin de 7 (ce qui confirme des interactions très fortes envers les anions). Pour des raisons d'hydrophobie, de planéité et d'interaction π avec le PGC, les acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) sont totalement retenus mais contrairement à Asp et Glu, ils peuvent être élués en milieu hydroorganique (50% d'acétonitrile). On retrouvera parmi les acides aminés les plus retenus ceux possédant un résidu hydrophobe (Leu, Ile, Met) mais aussi deux acides aminés basiques (Arg et His) chargés positivement à pH=7. La rétention de ces deux acides aminés basiques peut s'expliquer par les interactions avec la partie hydrocarbonée de leur résidu et par la

délocalisation possible des électrons π du groupe guanidine de l'arginine ou du noyau imidazole de l'histidine.

Acides aminés	Rétention dans l'eau déionisée (k)	Efficacité (N)
Lys	0,2	<300
Gly,Ala,Ser	0,4	500-650
Thr	0,5	
Pro,Val,Asn	0,7	
Gln	1,0	
Leu	1,2	650-1000
Ile, Cys	1,3	
Met	2,1	
Arg	3,6	500-300
His	7,8	<300
Asp,Glu,Phe,Tyr,Trp	Non élués	-

Tableau III-1: Rétention des acides aminés sur PGC avec de l'eau déionisée comme phase mobile.

1) PHASES MOBILES SALINES

De l'étude de ces systèmes, nous avons pu dégager les observations suivantes:

- Les systèmes s'équilibrent très vite lorsque la colonne est préalablement "mouillée" par de l'eau déionisée.
- L'addition de 5mM d'acétate d'ammonium (tableau II-2) à l'eau pure (pH=7) permet l'élution de Asp et Glu alors que ces composés étaient totalement retenus. L'efficacité du système est en général plus que doublée par rapport à celle obtenue sans la présence de sels dans la phase mobile et la rétention des acides aminés dont la charge est quasiment nulle ou positive (Lys) n'est pas affectée. Il faut donc conclure à une participation non négligeable du résidu à la rétention de la molécule.
- Pour contrôler l'effet de la charge sur la rétention, nous avons comparé deux phases mobiles constituées d'acétate d'ammonium à même force ionique (5mM) et à deux pH différents. Les pH 4,6 et 9,3 sont choisis car étant respectivement inférieur et

supérieur aux pI de la plupart de ces acides aminés. De plus, ces phases mobiles possèdent un certain pouvoir tampon. Les résultats sont donnés dans le tableau II-2.

A pH = 4,6 , le système se comporte quasiment de façon identique à l'éluant salin de pH 7. L'accroissement du caractère positif de la charge des acides aminés ne semble pas influencer leur rétention.

Acide aminé	Solutions aqueuses de AcONH ₄ de force ionique I=5 mM								
	pH = 4,6 (excès d'acide acétique)			pH = 7,0			pH = 9,3 (excès d'ammoniaque)		
	k	N	z _i	k	N	z _i	k	N	z _i
Lys	0	650	1,00	0	650	1,00	0,8	550	0,40
Gly	0,3	1300	0,01	0,3	1350	0,00	0,3	1050	-0,25
Ser	0,3	1300	0,00	0,3	1300	-0,01	0,5	1400	-0,56
Thr	0,4	1350	0,00	0,4	1450	-0,01	0,7	1800	-0,61
Pro	0,5	1650	0,00	0,6	1700	0,00	0,5	1200	-0,04
Asn	0,7	1800	0,00	0,7	1750	-0,01	1,9	1550	-0,76
Asp	1,9	2550	-0,88	1,9	2600	-0,99	1,1	1450	-1,33
Gln	1,1	2050	0,00	1,1	2200	-0,02	3,7	2150	-0,60
Glu	2,5	2550	-0,64	2,5	2800	-0,99	1,7	1200	-1,30
Val	0,6	1500	0,01	0,6	1700	0,00	1,5	2100	-0,32
Leu	1,0	1750	0,01	1,0	2050	0,00	2,2	2100	-0,29
Ile	1,2	2000	0,01	1,3	2300	0,00	2,5	2250	-0,33

Tableau III-2: Rétention (k) et efficacité (N) de quelques acides aminés élués avec le système constitué de la phase stationnaire Hypercarb et de phases mobiles composées de solution aqueuse d'acétate d'ammonium (AcONH₄) à une force ionique de 5mM à 3 pH. Les calculs d'ajustement de pH à force ionique constante (5mM) sont faits par le logiciel Phoebus (version 1.00, 1996-97, Centre Analyse, France). z_i représente l'état de charge de l'acide aminé.

A pH = 9,3 , la quasi totalité des acides aminés est sous forme anionique, ce qui entraîne une rétention plus élevée montrant ainsi un comportement échangeur d'anion pour le PGC. Il faut toutefois noter les exceptions de Gly, Pro dont la rétention n'est pas modifiée et celle de Asp et Glu dont les rétentions sont diminuées. A pH = 9,3 , la proline n'est encore que

faiblement négative mais concernant les 3 autres amino acides cités, ces comportements n'ont pas pour l'instant été clairement expliqués.

Le mécanisme d'interaction des acides aminés sous forme anionique avec le PGC s'apparente à de l'échange d'ions. Ceci est confirmé en faisant varier la rétention en fonction de la concentration en contre-ion ou ion développeur acétate à pH=9,3. La figure III-3 montre que cette variation est linéaire en coordonnées logarithmiques et que la loi s'apparente à celle de l'échange d'ions [23].

$$\log k = Cte - \frac{x}{y} \log[E]$$

où "x" représente la charge apparente du soluté et "y" celle du contre ion E.

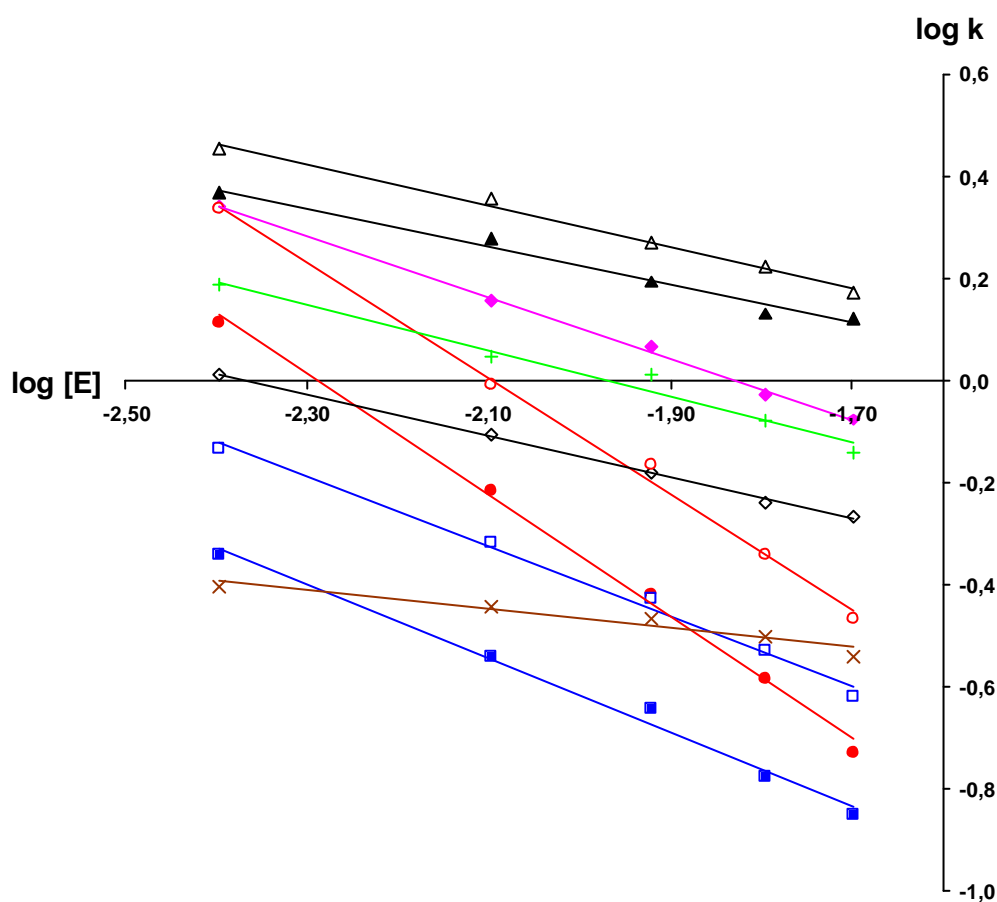


Figure III-3. Influence de la concentration en contre ion acétate (E) sur la rétention (k) de 10 acides aminés protéiques non dérivés sur PGC. Phase mobile: solution aqueuse d'acétate d'ammonium tamponnée à pH=9,3 par l'ammoniaque. Asp (●), Glu (○), Ser (■), Thr (□), Asn (◆), Lys (+), Ile (?), Val (◇), Leu (Δ), Pro (X).

Le tableau III-3 donne les coefficients de l'équation précédente et montre que si "y" est égal à -1 pour le contre ion acétate, la valeur des pentes observées est proche des valeurs théoriques. Il est curieux de noter que la lysine qui est encore cationique à ce pH suit cette variation linéaire décroissante due vraisemblablement à l'acide carboxylique totalement dissocié. Ceci confirme que si le PGC a un comportement d'échangeur d'anions, il convient de ne pas oublier, sur ce support, les autres contributions à la rétention.

Acide aminé	log k = a.log[E] + b			Charge (z _i) à pH=9,3
	a	b	r	
Asp	-1,19	-2,72	0,998	-1,33
Glu	-1,13	-2,37	0,998	-1,30
Ser	-0,72	-2,07	0,994	-0,55
Thr	-0,68	-1,76	0,996	-0,60
Asn	-0,60	-1,09	0,999	-0,76
Lys	-0,45	-0,89	0,988	+0,40
Ile	-0,41	-0,52	0,996	-0,33
Val	-0,40	-0,95	0,999	-0,32
Leu	-0,37	-0,51	0,991	-0,29
Pro	-0,18	-0,84	0,987	-0,04

Tableau III-3: Coefficient de corrélation (r), pente (a) et ordonnées à l'origine (b) des droites de régression ($\text{Log } k = a \cdot \text{Log } [E] + b$) obtenus à partir des données de la figure III-3. L'état de charge est calculé à partir de l'équation (8) chapitre II (p87).

L'observation des droites de la figure III-3 montre que certaines concentrations de contre ion ne permettent pas la séparation de certains mélanges d'acides aminés. Il est donc illusoire de vouloir séparer tous les acides aminés protéiques non dérivés en utilisant le PGC par ce phénomène prépondérant d'échange d'anions.

De plus, les trois acides aminés aromatiques (Phe, Tyr, Trp) sont totalement retenus en milieux aqueux. Leur élution requiert l'apport d'un modificateur organique comme l'acétonitrile. Dans ce cas, on note que le rééquilibrage du système après une élution graduée devient très long (2 à 3 heures).

Malgré tout, le PGC associé à un éluant salin aqueux permet des analyses rapides de certains mélanges d'acides aminés en milieu neutre et basique comme le montre la figure III-4.

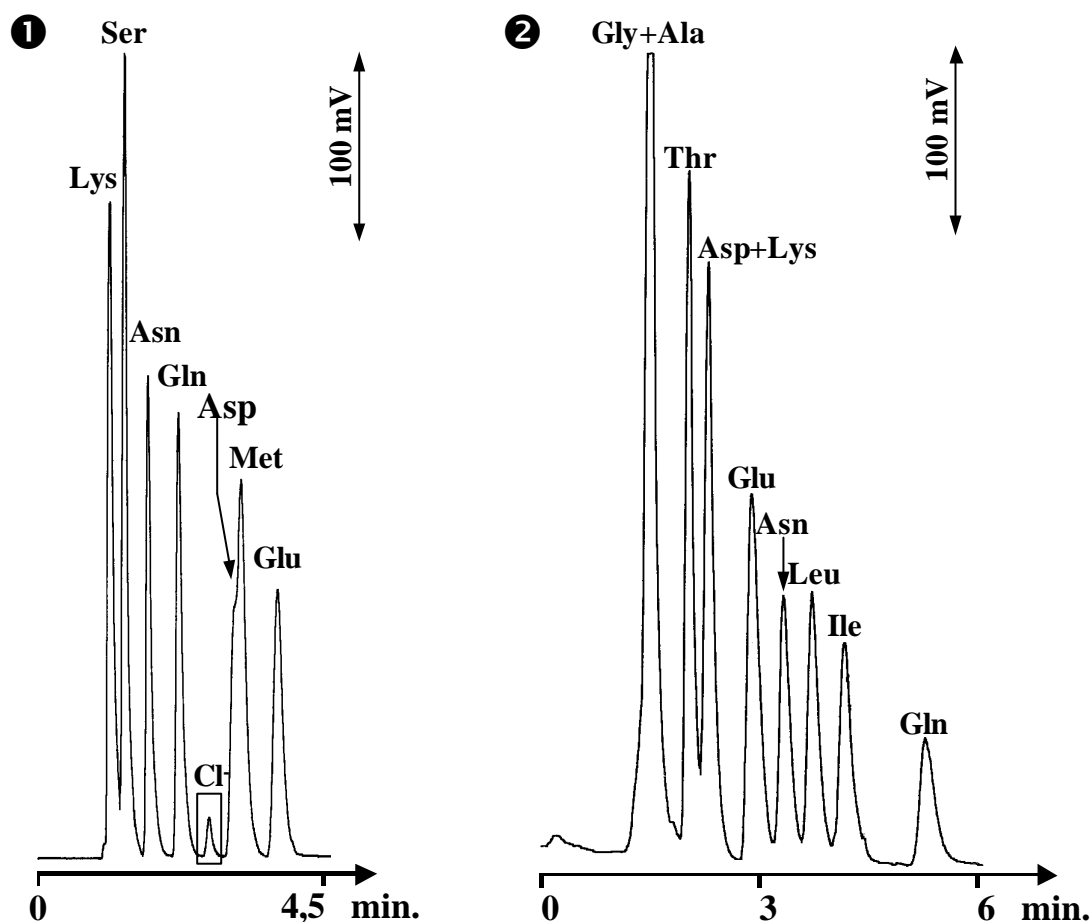


Figure III-4: Analyses CPL-DEDL de solutions standards (150mg/l) d'acides aminés protéiques non dérivés sur PGC. Phase mobile: tampon acétate d'ammonium de force ionique $I= 5\text{mM}$ ❶ à $\text{pH}=7,0$, ❷ à $\text{pH}=9,3$ (ajustement avec de l'ammoniaque). Débit: $200\ \mu\text{l}/\text{min.}$. Volume injecté: $10\ \mu\text{l}$. La présence d'anion chlorure est due à la lysine sous forme de chlorhydrate.

Ce système a été étendu à l'analyse directe d'un mélange d'acides aminés soufrés pour lequel toutes les autres méthodes testées avaient échoué (échange d'ions, chromatographie de paire d'ions sur support classique). Le PGC avec une phase mobile aqueuse d'acétate d'ammonium $10\ \text{mM}$ ajusté à $\text{pH}\ 9,3$ par l'ammoniaque s'est révélé un système idéal pour la séparation d'acides aminés analogues de la taurine (figure III-5).

L'ordre d'éluion semble assez logique compte tenu de l'augmentation progressive en doublets d'électrons et en atomes de soufre. Le soufre plus volumineux que l'oxygène est considéré comme plus hydrophobe.

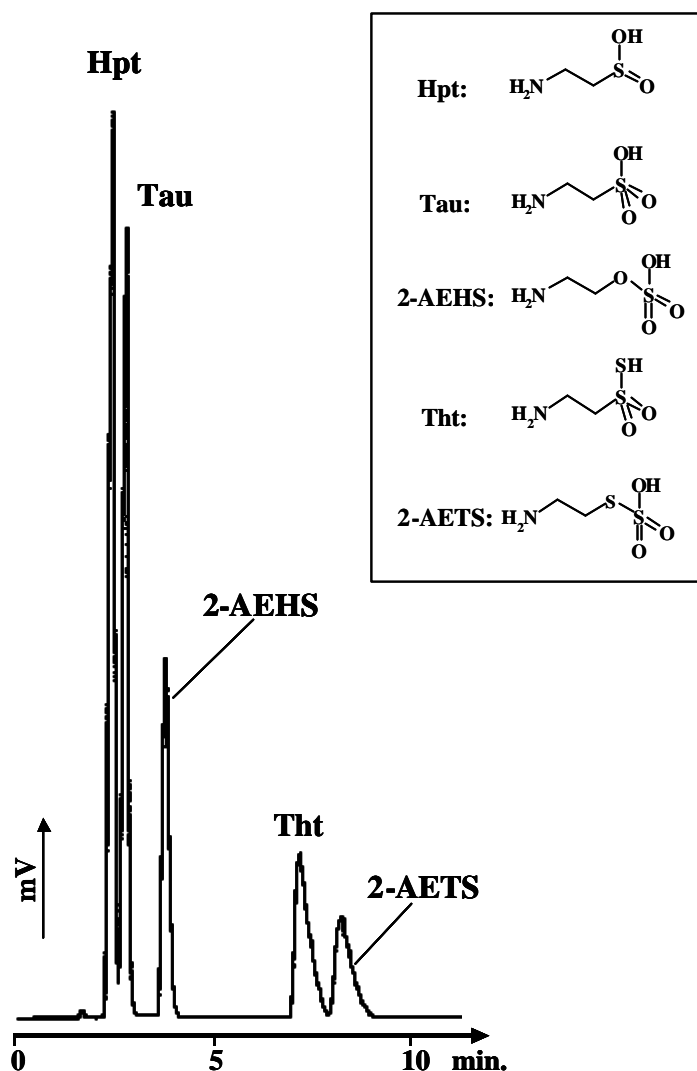


Figure III-5: analyse CPL-DEDL d'une solution standard (100mg/l) d'acides aminés soufrés non dérivés (potentiellement contenus dans des organismes marins des grandes profondeurs) sur PGC. Phase mobile: tampon acétate d'ammonium de force ionique $I = 10\text{mM}$ ajusté à $\text{pH} = 9,3$ avec de l'ammoniaque. Débit: $200 \mu\text{l}/\text{min.}$. Volume injecté: $10 \mu\text{l}$. Hpt: Hypotaurine, Tau: Taurine, 2-AEHS: acide 2-aminoEthylHydrogenoSulfonique, Tht: Thiotaurine, 2-AETS: acide 2-AminoEthylThioSulfonique.

Nous reviendrons dans le chapitre IV à ces acides aminés dans le cadre de leur dosage dans des organismes marins grâce au couplage de ce système séparatif avec la spectrométrie de masse.

2) CONCLUSIONS

La chromatographie d'interactions électroniques utilisant des phases aqueuses salines sur PGC serait intéressante à étudier d'un point de vue mécanisme de rétention mais apparaît limitée en ce qui concerne l'analyse des 20 acides aminés protéiques pour deux raisons:

1. Il n'est pas possible d'analyser avec une sélectivité suffisante les acides aminés élués qu'ils possèdent un résidu hydrophile ou hydrophobe. Les acides aminés aromatiques ne peuvent être élués dans ces conditions.
2. L'éluion des acides aminés aromatiques requiert l'addition d'un modificateur organique mais les systèmes deviennent longs à rééquilibrer après le gradient d'éluion.

Bien que relativement peu performants, ces systèmes permettent dans certains cas des séparations rapides pour des mélanges d'acides aminés bien particuliers. Nous avons aussi démontré l'intérêt du PGC avec l'acétate d'ammonium dans l'étude d'un mélange d'acides aminés soufrés contenus dans des organismes marins.

Les interactions mises en jeu s'apparentent à l'échange d'anions mais elles ne sont pas les seules et le mécanisme global est complexe. Ces systèmes ne sont apparemment pas capables d'induire assez de sélectivité entre les acides aminés les plus hydrophiles et nous avons, pour cette raison, arrêté nos recherches dans ce domaine pour envisager la chromatographie de paire d'ions à priori plus prometteuse.

C] CHROMATOGRAPHIE DE PAIRE D'IONS AVEC LES ACIDES CARBOXYLIQUES PERFLUORES COMME AGENTS D'APPARIEMENT D'IONS VOLATILS

A la suite des études réalisées au laboratoire sur des supports classiques de type silice greffée apolaire, nous avons pu nous rendre compte que les acides carboxyliques perfluorés étaient de très bons agents d'appariement d'ions pour l'analyse des acides aminés protéiques non dérivés par CPL-DEDL [22]. Nous ne manquerons d'ailleurs pas de comparer les performances de ces systèmes avec ceux que nous allons mettre au point sur PGC.

1) PERFORMANCES COMPAREES DES DIFFERENTS AGENTS D'APPARIEMENT D'IONS TESTES

Avant de commencer à développer l'étude des potentiels de chaque acide carboxylique perfluoré (tableau III-4) pour la séparation des acides aminés protéiques non dérivés, il faut mentionner que ceux-ci sont des acides forts c'est à dire qu'ils se dissocient totalement dans le milieu et sont suffisamment volatils. Dès qu'on cherche à tamponner les phases

Nom	Abréviation	Chaîne hydrophobe (C_nF_{2n+1})	
Acide trifluoroacétique	TFA	C_1	Courte
Acide heptafluorobutyrique	HFBA	C_3	Moyenne
Acide nonafluoropentanoïque	NFPA	C_4	
Acide tridécafluoroheptanoïque	TDFHA	C_6	Longue
Acide pentadécafluorooctanoïque	PDFOA	C_7	

Tableau III-4: Liste des acides carboxyliques perfluorés commerciaux volatils utilisés pour la mise au point de la séparation des 20 acides aminés protéiques par CPL-DEDL. C_n représente la longueur de la chaîne carbonée perfluorée (C_nF_{2n+1}). Le tensioactif en C_5 n'est pas commercial et le tensioactif en C_8 n'est plus assez volatil.

mobiles contenant ces tensioactifs - même par l'ammoniaque- les solutions salines ne sont plus assez volatiles pour être utilisables en CPL-DEDL (et CPL-SM).

En conséquence, chaque variation de concentration de tensioactif entraînera une variation de pH et donc une variation de l'état de charge de l'acide aminé dont il faudra tenir compte dans nos interprétations, même si le but de ce chapitre n'est pas d'établir avec certitude les mécanismes de rétention, mais d'établir les potentiels de tels systèmes séparatifs avec les deux détecteurs DEDL et SM.

Mentionnons que l'utilisation de la SM comme mode de détection possible nous a conduits à mener cette étude directement sur une colonne de 2,1 mm de diamètre interne pour laquelle les faibles débits sont compatibles avec l'utilisation de l'IonSpray.

1-1) Quantités de tensioactif adsorbées et temps d'équilibrage

Comme lors de travaux menés sur support classique [22], nous avons étudié l'équilibrage du système chromatographique avant d'engager toute analyse.

L'équilibrage du système a été suivi et enregistré par conductométrie. La colonne initialement régénérée (nous indiquerons les détails de cette procédure peu après) et sous eau déionisée est percolée par la nouvelle phase mobile (eau déionisée contenant le tensioactif à la concentration désirée) jusqu'à l'obtention de la conductivité totale correspondant à la conductivité de la solution de tensioactif. Un enregistrement type est donné figure III-6. Ce dernier montre deux comportements selon la longueur de chaîne carbonée de l'agent perfluoré. Les tensioactifs dont la chaîne hydrophobe possède 3 ou 4 carbones montrent un équilibrage extrêmement rapide puisque environ 90% de la conductivité est recouverte dès $2t_0$ (t_0 : temps mort) et que 9 minutes (HFBA) à 15 minutes (NFPA) suffisent à obtenir un système en équilibre (figure III-6-a). Par comparaison, avec l'acide trifluoroacétique (TFA), l'équilibrage est quasi instantané. En revanche, les systèmes contenant les agents d'appariement dont la chaîne hydrophobe possède 6 ou 7 carbones, présentés figure III-6-b, mettent un temps beaucoup plus important à s'équilibrer (35 minutes pour TDFHA et 105 minutes pour PDFOA). On notera un temps d'équilibrage constant pour un tensioactif donné qui ne varie pas avec sa concentration dans la phase mobile même si les quantités adsorbées par la phase stationnaire restent proportionnelles

aux concentrations de surfactant dans la phase mobile. Le tableau III-5 donne à titre indicatif les quantités adsorbées sur une colonne PGC 100 x 2,1 mm D.I de granulométrie 5 μ m pour différentes concentrations en tensioactif perfluoré.

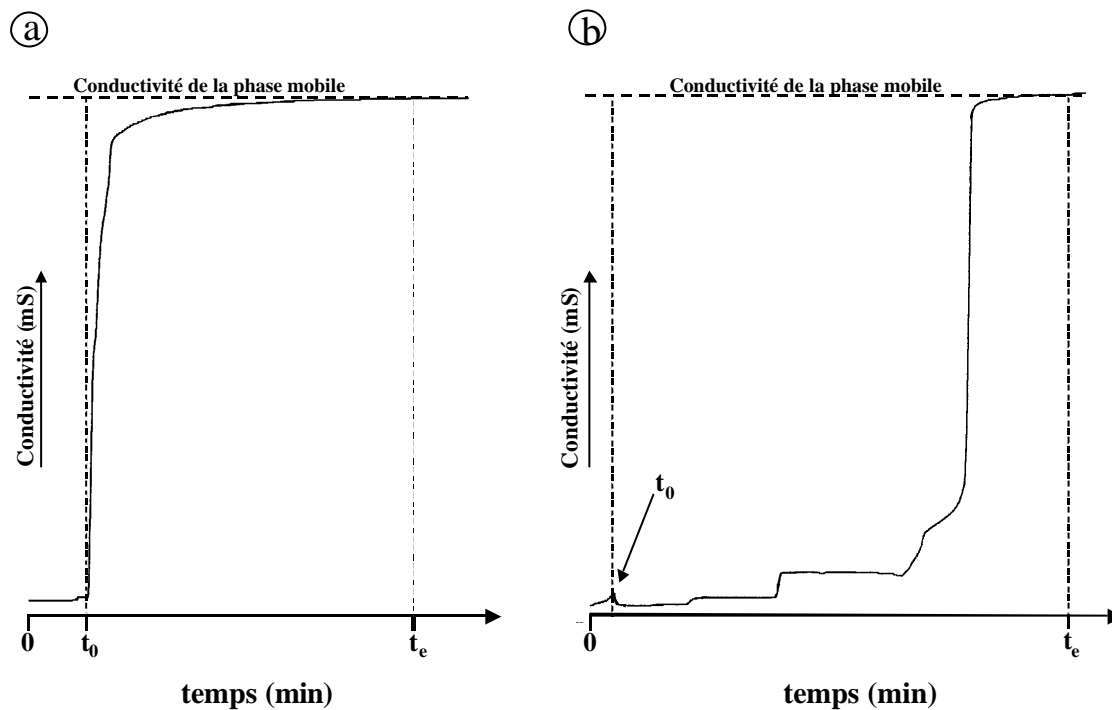


Figure III-6: Profils type des courbes d'équilibrages obtenues avec (a) l'acide heptafluorobutyrique (HFBA) ou l'acide nonafluoropentanoïque (NFPA), (b) l'acide tridécafluoroheptanoïque (TDFHA) ou l'acide pentadécafluorooctanoïque (PDFOA). t_0 correspond au temps mort. t_e correspond au temps mis pour récupérer 100% de la conductivité de la phase mobile à la sortie de la colonne. Cette valeur de t_e est constante pour un tensioactif donné : 9 minutes pour HFBA, 15 minutes pour NFPA, 35 minutes pour TDFHA et 105 minutes pour PDFOA. Colonne Hypercarb 5 μ , 100x 2,1 mm DI. Débit 200 μ l/min.

Un comportement analogue est observé avec les supports de chromatographie à polarité de phases inversée classiques [22]. Comme le traduisent ces courbes, l'adsorption du TFA peut être considérée comme quasi nulle, très faible pour les tensioactifs moyens, mais en revanche, très importante pour les tensioactifs longs.

Pour repartir d'un état de surface du PGC comparable avant chaque équilibrage, nous avons suivi un protocole de régénération utilisant le tétrahydrofuranne (THF) reconnu comme l'un des solvants possédant la force éluante la plus grande sur PGC [24].

Concentration dans la phase mobile (mM)	Quantités adsorbées d'acide perfluoré (μM)				
	PDFOA (C ₇)	TDFHA (C ₆)	NFPA (C ₄)	HFBA (C ₃)	TFA (C ₁)
0,5	6,5	2,3	<0,1	<0,1	≈ 0
1	13	4,8	0,2	<0,1	≈ 0
5	n.d	26	1,0	0,4	≈ 0
15	n.d	n.d	3,0	1,0	≈ 0

Tableau III-5: Influence de la concentration et de la longueur de la chaîne perfluorée (C_n) sur les quantités adsorbées de tensioactif. n.d: non déterminée à cause d'une solubilisation incomplète du tensioactif.

Le protocole est le suivant :

- 12 ml d'une phase mobile Eau-THF (50-50 v/v) contenant 0,5% de TFA.
- 12 ml de THF pur.
- 60 ml d'eau pure (au minimum).

1-2) Cas particulier de l'acide trifluoroacétique

Comme sur silice greffée octyle ou octadécyle, il nous est apparu que le TFA ne s'adsorbait pas, et que même à concentration élevée, il était inefficace pour assurer la séparation totale des acides aminés les plus polaires (Asp, Glu, Asn, Gln, Ser, Thr, Gly, Ala, Cys, Pro, Lys, His, Arg). A faible concentration, il n'assure même qu'une faible rétention pour des acides aminés dont le résidu est pourtant hydrophobe (ex: Val, Leu) comme le montre la figure III-7.

Quels que soient les acides aminés étudiés, ceux-ci sont cationiques dans la gamme de pH étudié à l'exception de Asp et Glu. Ceci explique la forte rétention de ces derniers lorsque la quantité de TFA est très faible. Lorsque la concentration en TFA devient plus importante, la rétention s'accroît pour tous les acides aminés (tous sont cationiques sans exception et la fonction α -carboxylique n'est même plus dissociée) comme observé dans un mécanisme d'appariement d'ions classique [23]. Il faut atteindre des concentrations

élevées pour avoir une forte rétention. Finalement nous retombons ici sur les conclusions de Gu et Lim [16] qui ont affirmé que le TFA était un compétiteur électronique fort sur PGC mais un agent d'appariement d'ions faible.

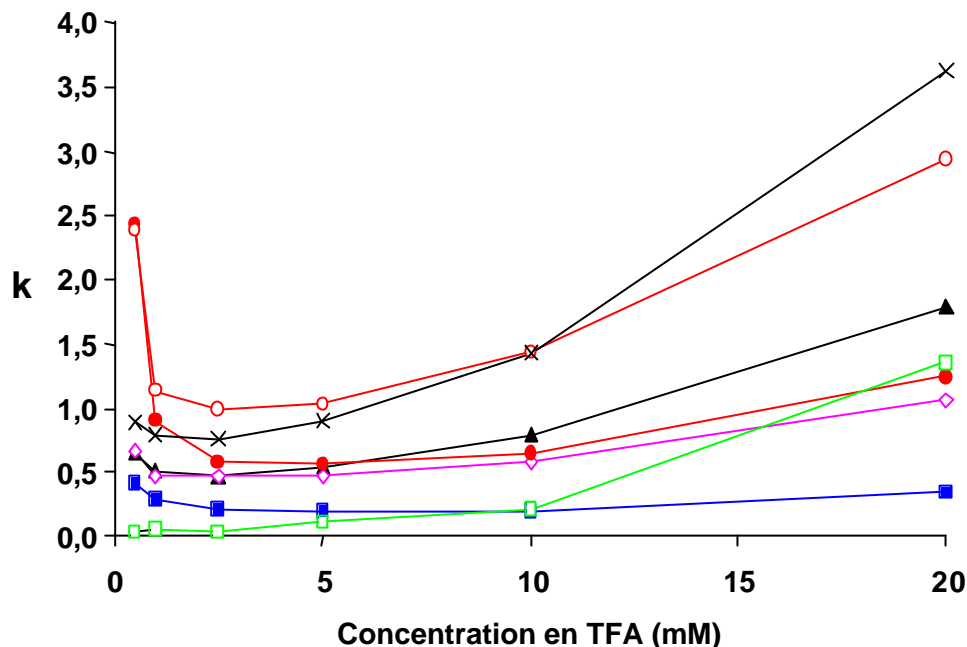


Figure III-7: Influence de la concentration en TFA de la phase mobile aqueuse sur la rétention (k) de quelques acides aminés protéiques non dérivés. Asn (◇), Ser (■), Lys (□), Val (?), Asp (●), Glu (○), Leu (X).

Les courbes indiquant les variations de rétention en fonction de la concentration en TFA ont une tendance à s'entrecroiser si bien qu'il n'est pas possible d'avoir une concentration pour laquelle la sélectivité est intéressante pour l'ensemble des 20 acides aminés (tous les acides aminés ne sont pas montrés sur la figure III-7 afin de ne pas compliquer celle-ci). De plus, l'efficacité de systèmes utilisant le TFA dans la phase mobile aqueuse, quelle que soit la concentration, n'est pas très élevée (entre 500 et 2000 plateaux théoriques au maximum). Si l'intérêt des systèmes contenant du TFA reste faible (pas assez d'interactions soluté - phase stationnaire pour créer de la sélectivité), la figure III-8 montre qu'ils permettent cependant la séparation de certains mélanges d'acides aminés.

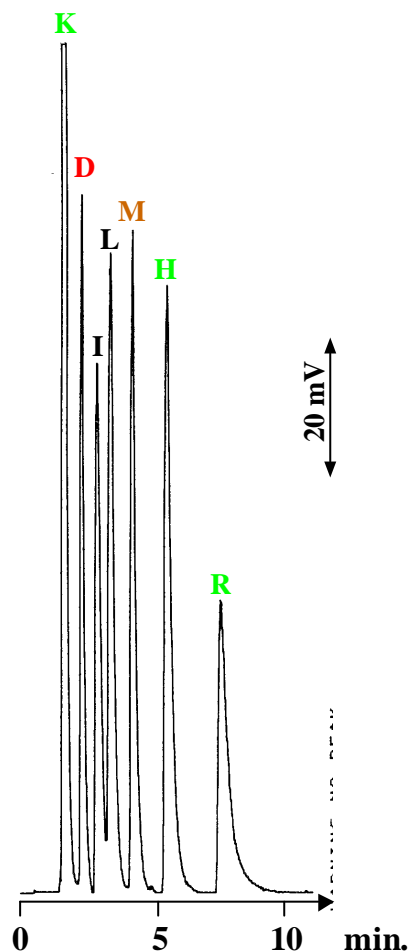


Figure III-8: Exemple de séparation d'acides aminés (100 mg/l) non dérivés par CPL-DEDL sur PGC utilisant une phase mobile aqueuse contenant 5 mM d'acide trifluoroacétique. Débit : 200 μ l/min. Volume injecté: 10 μ l.

K: Lysine.

D: Acide aspartique.

I: Isoleucine.

L: Leucine.

H: Histidine.

R: Arginine.

On notera la bonne sélectivité entre les deux isomères (Leucine-Isoleucine) en un temps particulièrement court.

1-3) Influence de la longueur de chaîne de l'agent d'appariement d'ions sur la rétention

En chromatographie d'appariement d'ions, la rétention augmente avec la longueur de la chaîne carbonée du tensioactif. La figure III-9 montre que pour une concentration donnée de 1mM, alors que la rétention reste faible avec les tensioactifs à chaîne moyenne (HFBA, NFPA), elle s'accroît de façon très importante avec une longue chaîne perfluorée (TDFHA, PDFOA).

Nous allons maintenant étudier les différents acides carboxyliques perfluorés en ne nous occupant plus dans un premier temps que du groupe des acides aminés les plus polaires formé de Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Pro, Asp, Asn, Glu, Gln. Ces 10 acides aminés sont élués les premiers sur les silices greffées apolaires utilisant les acides carboxyliques perfluorés

comme agent d'appariement d'ions. Ils constituent le groupe des acides aminés les moins lipophiles (tableau II-4) ou encore les plus hydrophiles à l'exclusion des acides aminés basiques (Lys, His, Arg) conduisant à la formation possible de deux appariements c'est à dire de paires d'ions très hydrophobes.

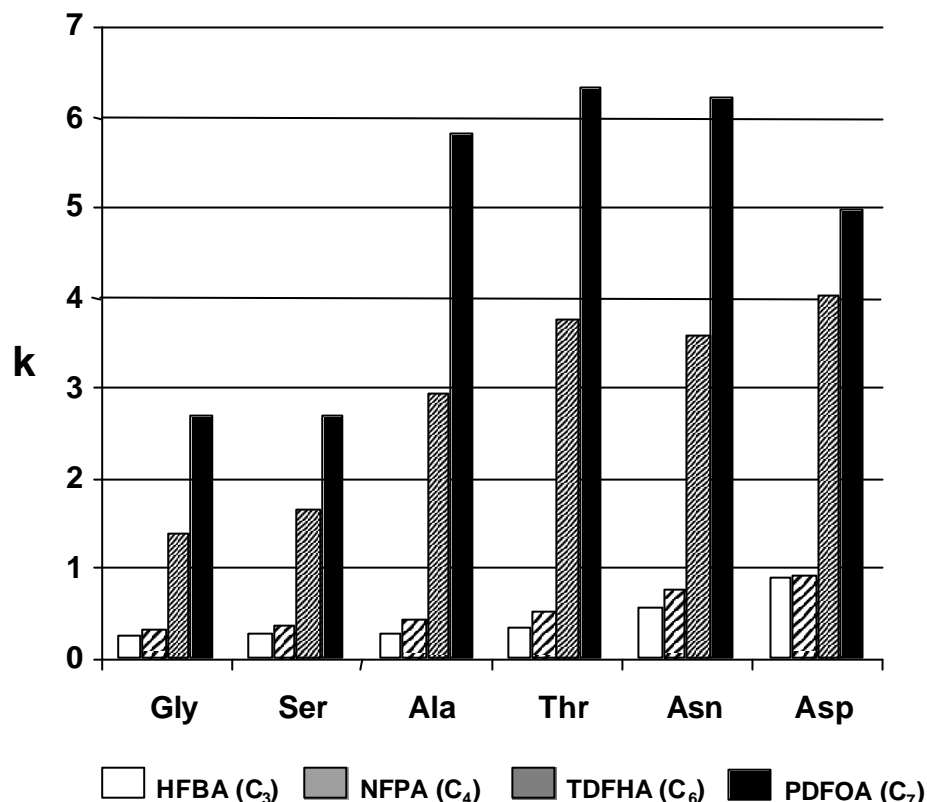


Figure III-9: Influence de la longueur de chaîne du tensioactif perfluoré sur la rétention de 6 acides aminés protéiques non dérivés élués les premiers sur PGC. Concentration en tensioactif: 1 mM.

2) ANALYSE ISOCRATIQUE DES 10 ACIDES AMINES LES PLUS HYDROPHILES

2-1) Avec les acides carboxyliques à longue chaîne (C₆ et C₇)

Sur les supports classiques de type phase inverse, les acides carboxyliques perfluorés à longue chaîne (6 et 7 carbones) se sont révélés être les agents d'appariement d'ions les plus rétentifs et les plus sélectifs pour assurer la séparation des acides aminés les plus

hydrophiles [22]. Pour ces supports, ces systèmes se sont montrés comme étant de type échangeur d'ions dynamique compte tenu des fortes concentrations de tensioactif adsorbées [25].

En se référant aux isothermes d'adsorption des acides tridécafluorohexanoïque (TDFHA) et pentadécafluorooctanoïque (PDFOA) (figure III-6-b) sur PGC, on peut penser aussi être en présence de systèmes échangeur d'ions dynamique. Ces systèmes confèrent maintenant une rétention très importante (PDFOA, figure III-9) pour les acides aminés les plus hydrophiles. Le comportement avec le support PGC est le même que celui observé avec les silices greffées apolaires.

La figure III-10 montre l'influence de la concentration du tensioactif (ici PDFOA) sur la rétention. La rétention augmente avec la concentration de tensioactif. On retrouve là encore une des lois de la chromatographie d'appariement d'ions. De plus, la diminution du pH augmente le caractère positif des acides aminés ce qui ne peut que renforcer les interactions avec l'agent d'appariement.

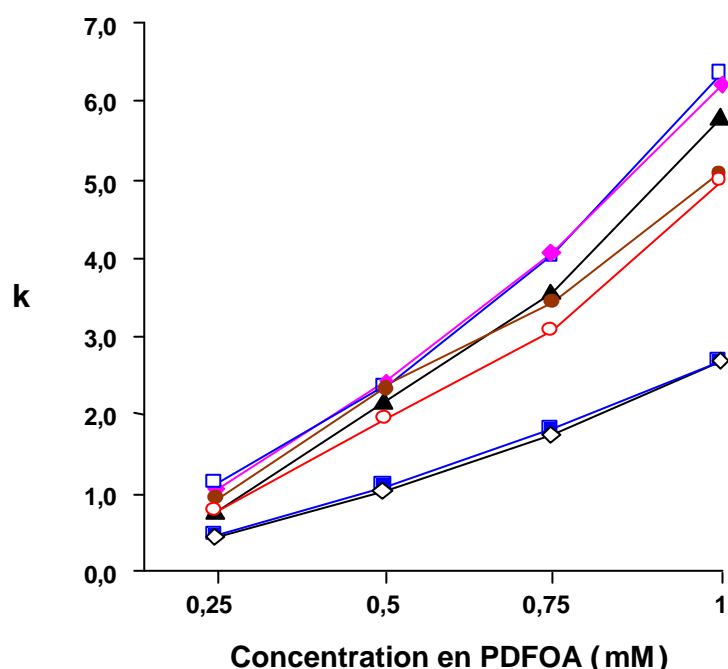


Figure III-10: Influence de la concentration en acide pentadécafluorooctanoïque (PDFOA) sur la rétention de 6 des 10 acides aminés protéiques non dérivés élués les premiers sur PGC. Gly (◇), Ser (■), Ala (?), Cys (●), Asp (○), Asn (◆), Thr (□).

Si TDFHA et PDFOA se sont révélés comme les plus intéressants sur les supports C8 et C18 classiques en ce qui concerne la résolution des acides aminés les plus polaires, il n'en va pas de même sur le PGC. Comme le montre la figure III-10 pour PDFOA, plusieurs groupes d'acides aminés parmi les premiers élués dans ces conditions, ne peuvent être résolus quelle que soit la concentration en PDFOA. En ce qui concerne TDFHA, les sélectivités seront légèrement différentes mais certains acides aminés restent inséparables. Les acides aminés à résidu hydrophobe sont eux totalement retenus et leur élution nécessite même l'ajout d'un cosolvant organique dans la phase mobile.

Les temps d'équilibrage sont relativement longs. Les temps de rétention des premiers acides aminés élués les premiers (Gly, acide aminé le premier élué a un t_r de 6 minutes et Thr de plus de 10 minutes avec 1mM de PDFOA) sont longs pour finalement n'obtenir que des séparations partielles. La marge d'évolution de ces deux systèmes est trop limitée pour continuer leur développement.

2-2) Avec les acides carboxyliques à chaîne moyenne (C₃ et C₄)

La figure III-9 a montré que les acides carboxyliques perfluorés à chaîne moyenne (HFBA et NFPA) n'offrent qu'une rétention limitée des acides aminés les plus hydrophiles. Beaucoup d'acides aminés sont coélus lorsqu'on emploie 1 mM d'un tensioactif à chaîne hydrophobe moyenne. Deux points nous ont fait cependant continuer l'étude de ces tensioactifs:

- 1mM de tensioactif (pH=3) correspond en général au pH limite utilisé avec les silices greffées apolaires. Contrairement aux silices greffées, la phase Hypercarb est résistante sur tout le domaine de pH (0-14) [24], ce qui va nous permettre d'explorer un domaine de concentration plus élevée plus délicat à utiliser avec des supports de silice greffée.
- Dans le paragraphe consacré à l'étude de l'équilibrage des systèmes (figure III-6), nous avons pu observer une différence de comportement pour NFPA et HFBA par rapport au tensioactif possédant une longue chaîne perfluorée. Ces deux systèmes sont rapidement équilibrés. La quantité de NFPA ou HFBA adsorbée est très faible. Les interactions entre la phase stationnaire PGC et ces tensioactifs semblent

donc faibles. Si paire d'ions il existe, celle-ci doit se former alors plutôt dans la phase mobile avant d'interagir avec la phase stationnaire. Ce changement de mécanisme peut-être plus favorable à la séparation que ne l'est le mécanisme d'échange d'ions dynamique évoqué précédemment avec les autres acides perfluorés.

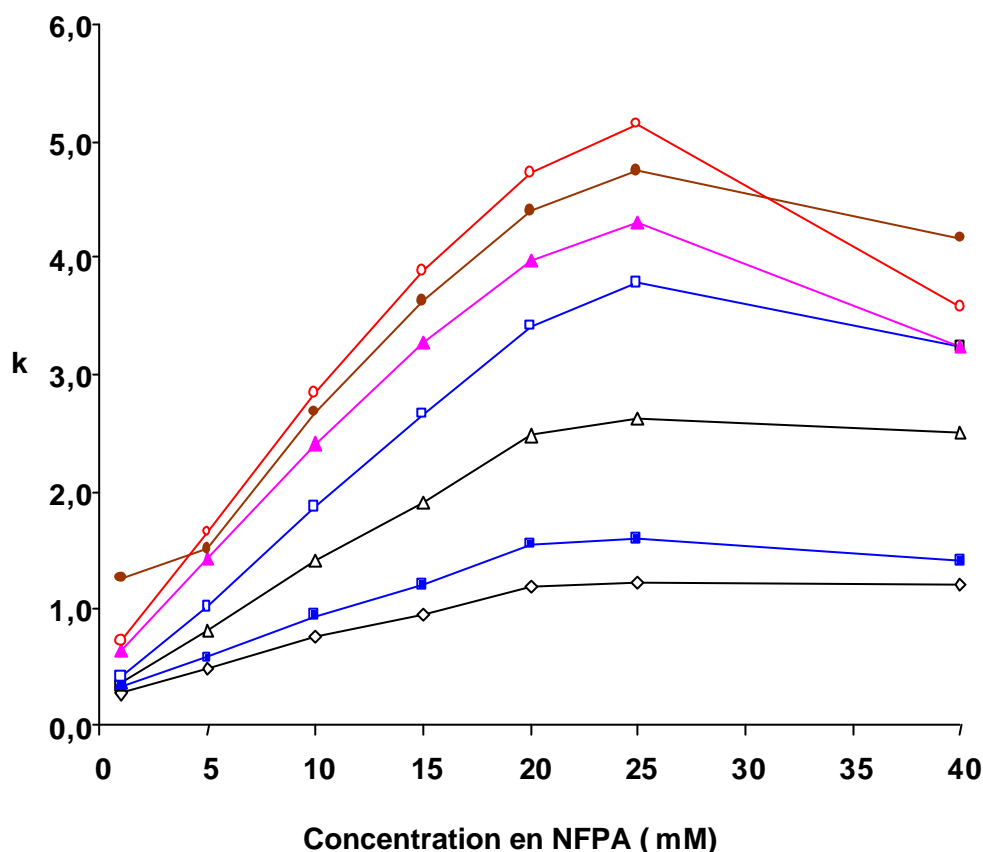


Figure III-11: Influence de la concentration en acide nonafluoropentanoïque (NFPA) sur la rétention des 7 acides aminés protéiques non dérivés élués les premiers sur PGC. Gly (\diamond), Ser (\blacksquare), Ala (Δ), Thr (\square), Asn (\blacktriangle), Cys (\bullet), Asp (\circ).

La figure III-11 montre la variation du facteur de rétention des 7 acides aminés les moins retenus sur Hypercarb en fonction de la concentration en NFPA dans la phase mobile aqueuse. Comme attendu en chromatographie de paire d'ions, cette rétention augmente avec la concentration en tensioactif. Cette figure suggère encore que les sélectivités les meilleures seront obtenues pour des concentrations voisines de 20 mM en NFPA. A cette concentration, l'efficacité de la colonne est excellente puisqu'on peut calculer des nombres de plateaux théoriques variant de 2500 pour la glycine (le moins

retenu) à 6000 pour la proline ($k=10,7$ avec 20 mM de NFPA). Au delà de cette concentration, la rétention reste constante ou diminue. En chromatographie d'appariement d'ions, une telle variation de la rétention s'observe généralement lorsqu'on atteint la concentration micellaire critique (CMC) du tensioactif [26].

HFBA se comporte de la même manière mais comme on peut s'y attendre la rétention des solutés est plus faible pour une même concentration en agent d'appariement d'ions. Malheureusement, HFBA ne permet pas de générer assez de sélectivité entre Asp-Asn et Cys.

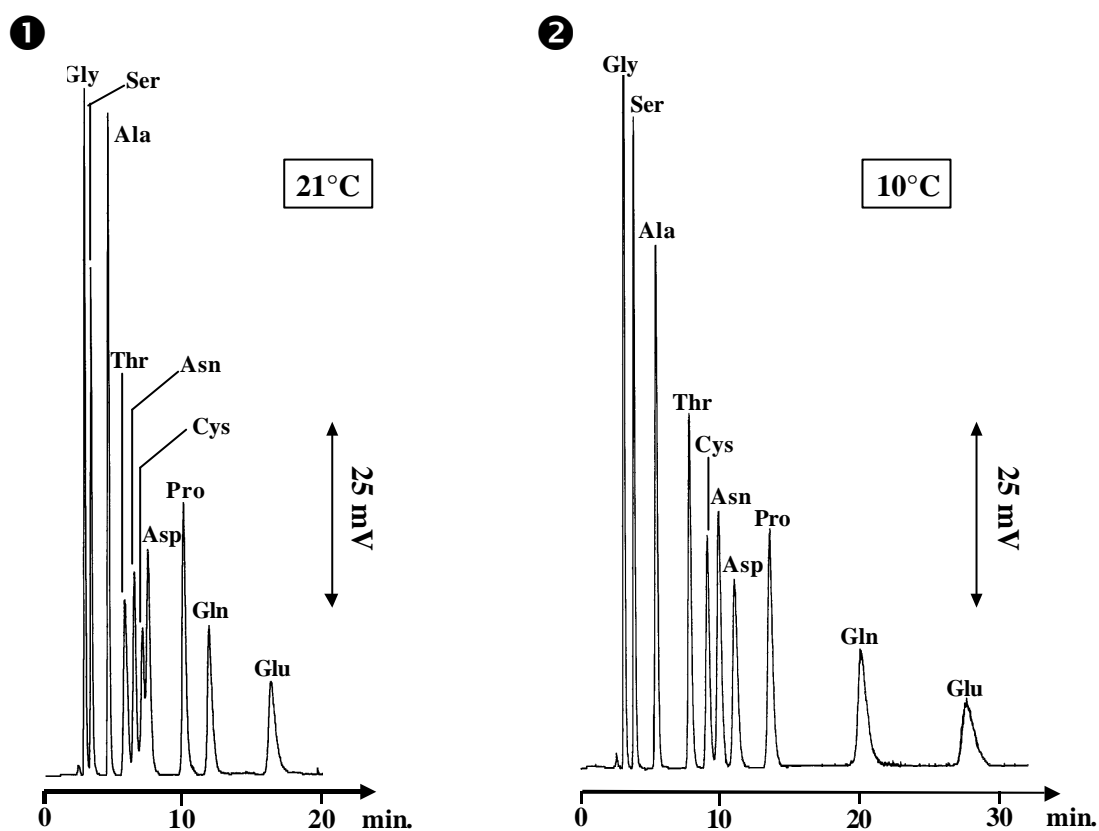


Figure III-12: Analyse isocratique CPL-DEDL des 10 acides aminés élus les premiers sur PGC. Phase mobile: solution aqueuse de NFPA (20mM). Colonne Hypercarb 5µm (100x2,1 D.I), Débit:200µl/min. Température de la colonne : ① 21°C ② 10°C. Standards à 100 mg/l. Volume injecté: 3µl.

La figure III-12-① montre le meilleur profil chromatographique isocratique (20 mM NFPA en solution aqueuse) obtenu pour la séparation des 10 acides aminés élus les premiers sur Hypercarb à une température de 21 °C. Les résolutions Asn-Cys ($R_s=0,8$) et Cys-Asp ($R_s=1,0$) restent malheureusement insuffisantes.

2-3) Influence de la température

La figure III-12 montre clairement que la température est un paramètre important de la séparation.

Seules quelques publications ont montré l'influence sur PGC de la température sur les séparations. Okamoto et coll. [20] ont montré que la température optimale pour une

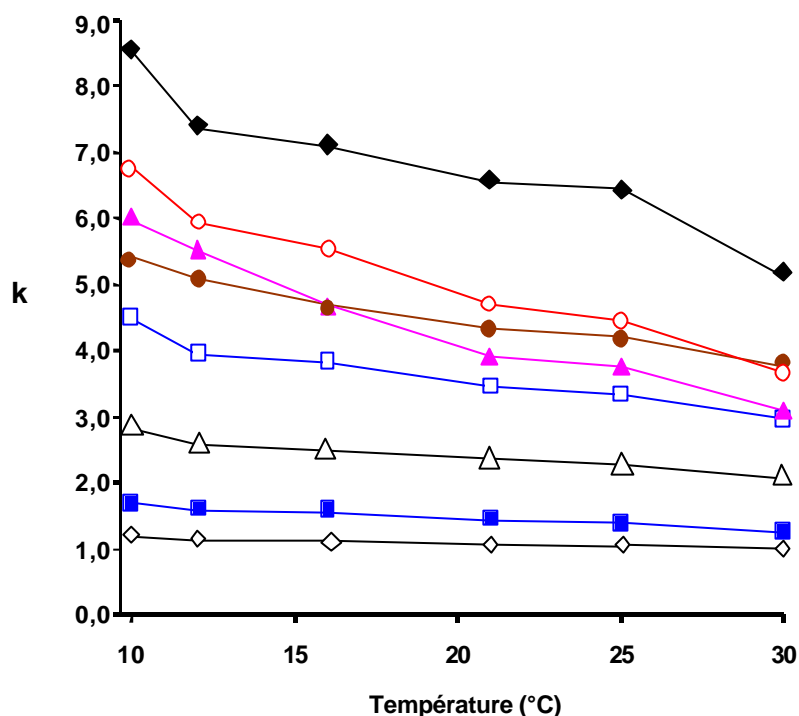


Figure III-13: Influence de la température sur la rétention des 8 acides aminés élus les premiers sur PGC avec une phase mobile aqueuse contenant 20 mM de NFPA.. Gly (◇), Ser (■), Ala (Δ), Thr (□), Cys (●), Asn (?), Asp (○), Pro (◆).

séparation d'anions inorganiques était de 40°C tandis que Karlson et Charron [27] ont trouvé que la résolution de certains énantiomères était meilleure à basse température (en dessous de 0°C). Pour notre part, en ce qui concerne les alcools polyéthoxylés (mentionnés au chapitre I), nous n'avons vu aucune influence significative de la température sur la rétention et la sélectivité [28]. Il est donc difficile de prédire s'il y aura un effet température. Nous avons donc étudié l'influence de la température à partir des conditions conduisant à l'obtention du meilleur profil chromatographique à température ambiante (phase mobile aqueuse contenant 20 mM de NFPA).

Comme le montre la figure III-13, la rétention décroît avec l'augmentation de température mais il apparaît que tous les acides aminés n'ont pas la même loi de variation (la rétention de Asp et Asn décroît plus vite) si bien qu'on pourra observer des inversions d'ordre d'élution et des sélectivités différentes. Les températures élevées semblent défavorables à la sélectivité au contraire de ce qui est observé aux basses températures. A 16 °C, Asn et Cys sont coélucées mais lorsqu'on atteint 10°C, la résolution des 10 acides aminés devient totale (figure III-12-②) avec une inversion d'ordre de rétention entre Cys et Asn par rapport à 21 °C. L'efficacité de la colonne reste quasiment constante sur le domaine de températures étudié. A 10°C, les résolutions observées entre tous les couples d'acides aminés sont toutes supérieures à 1,32.

La séparation des acides aminés les plus polaires de la série étant résolue, il reste à éluer les acides aminés dont les résidus sont plus hydrophobes ainsi que les acides aminés basiques (Lys, His, Arg) qui ont la possibilité de former par molécule d'acide aminé deux paires d'ions avec les deux fonctions aminés (tableau II-1).

3) SEPARATION DES 20 ACIDES AMINES PROTEIQUES EN GRADIENT D'ELUTION

Pour obtenir une analyse complète des 20 acides aminés protéiques, il va falloir modifier au cours du temps la force éluante de la phase mobile. Pour cela il peut y avoir deux approches différentes.

3-1) Gradient de concentration de l'agent d'appariement d'ions

La première approche est la décroissance progressive de la concentration de l'agent d'appariement dans la phase mobile. Cette méthode s'appuie sur 2 points:

- NPFA n'est, apparemment, pratiquement pas adsorbé donc il est aisé de diminuer sa concentration pour diminuer la rétention.
- Parallèlement, le pH va augmenter et les acides aminés vont tendre vers leur forme neutre réduisant ainsi leur interaction possible avec l'agent d'appariement et leurs interactions avec la phase PGC.

Cette approche reste limitée puisque l'eau déionisée ne permet que l'éluion d'acides aminés à résidu hydrophobe comme Val, Leu, Ile, Met mais pas celle des acides aminés à résidu aromatique. Nous avons donc essayé cette méthode en vue d'analyser des mélanges d'acides aminés ne contenant pas ces trois acides aminés aromatiques.

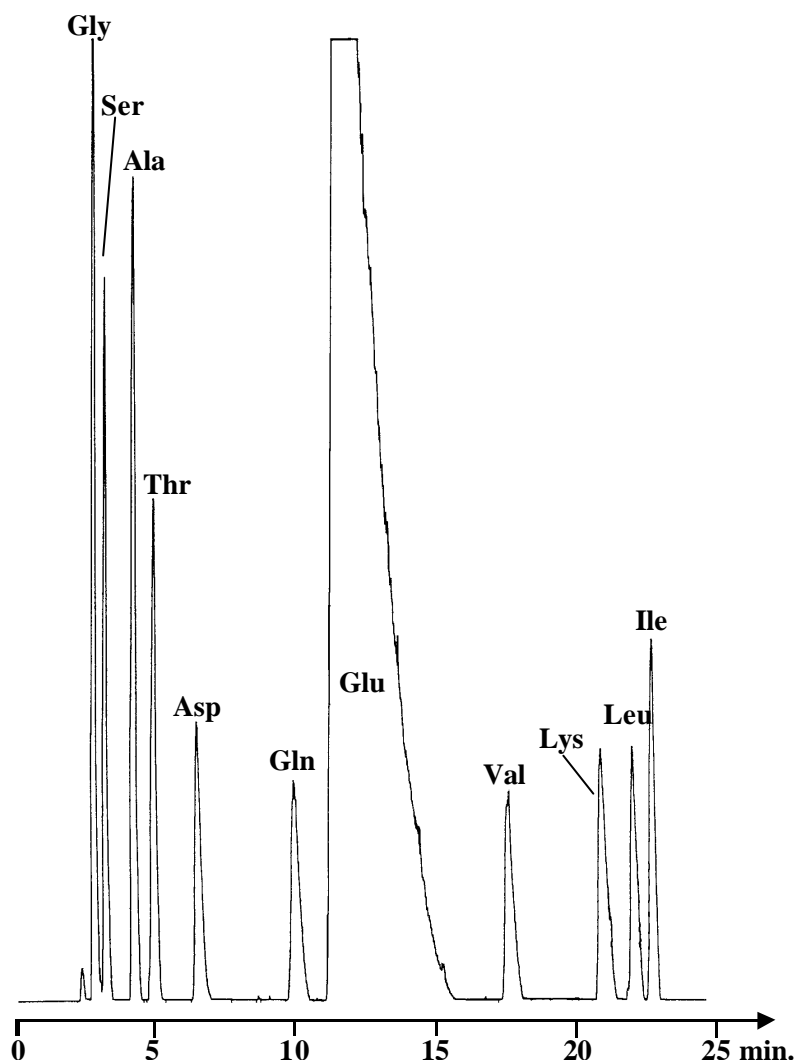


Figure III-14: Analyse CPL-DEDL sur PGC en gradient d'éluion d'un moût de fermentation reconstitué et riche en acide glutamique (Glu). Phase mobile: A= solution aqueuse de NFPA (20mM), B= eau déionisée. De 0 à 100% de B en 10 minutes puis maintient de 100% de B jusqu'à la fin de l'analyse. Détection: DEDL. Colonne: Hypercarb 5 μ m (100x2,1 mm DI). Débit: 200 μ l/min. Volume injecté: 10 μ l

La figure III-14 montre la mise au point, à partir de solutés standards, d'une séparation d'acides aminés d'un moût de fermentation reconstitué riche en acide glutamique. L'éluion de 3 acides aminés à résidu hydrophobe (Val, Leu, Ile) ainsi que celle de la lysine est observée en moins de 25 minutes.

3-2) Gradient d'éluion utilisant un modificateur organique

La voie la plus classique lorsqu'on souhaite diminuer les forces d'interactions entre une paire d'ions et la phase stationnaire hydrophobe est l'introduction ou l'augmentation dans la phase mobile du pourcentage de solvant organique.

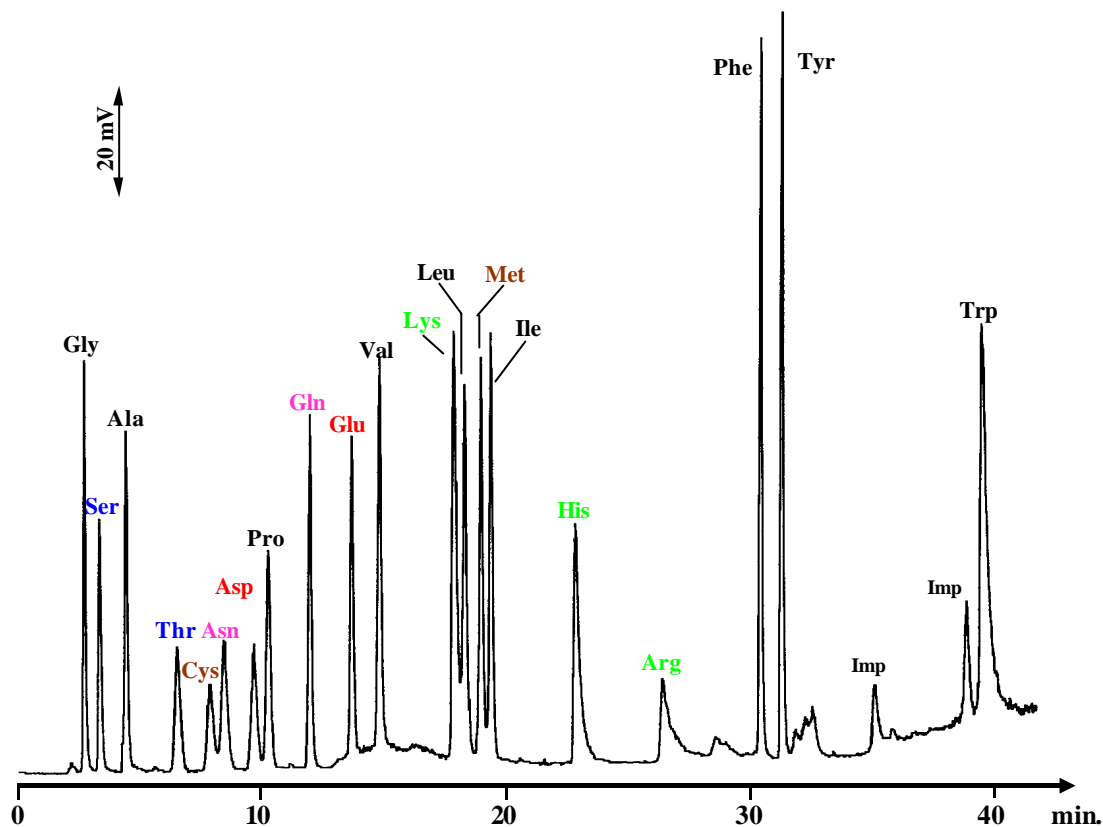


Figure III-15: Analyse CPL-DEDL sur PGC en gradient d'élution des 20 acides aminés protéiques non dérivés. Phase mobile: A= solution aqueuse de NFPA (20mM), B= Acétonitrile. De 0 à 15% de B en 10 minutes puis de 10 à 26% de B en 10 minutes enfin 26 à 50 % de B en 10 minutes. 50% B sont maintenus jusqu'à la fin de l'analyse. Colonne: Hypercarb 5 μ m(100x2,1 mm D.I.) thermostatée à 10°C. Débit: 200 μ l/min. Concentration injectée: 50mg/l. Volume injecté: 3 μ l. Imp: impuretés.

Les deux modificateurs organiques ayant la plus faible force éluante en chromatographie à polarité de phases inversée sur PGC sont le méthanol (MeOH) et l'acétonitrile [1,28]. Ces deux modificateurs sont suffisants pour assurer l'élution des acides aminés les plus hydrophobes. Nous avons vérifié une plus faible force éluante pour le méthanol. Une phase mobile contenant 40% (v/v) de méthanol possède une force éluante équivalente à celle contenant 15% d'acétonitrile (v/v). Aucune différence notable de sélectivité n'est observée entre le méthanol et l'acétonitrile pour une force d'élution comparable. Nous avons conservé l'acétonitrile pour la réalisation du gradient d'élution car

le tryptophane nécessite au minimum 50% d'acétonitrile (ACN) pour une élution dans des temps raisonnables.

L'analyse finale CPL-DEDL des 20 acides aminés après optimisation du gradient d'élution à 10 °C est présentée à la figure III-15. La séparation des 20 acides aminés protéiques non dérivés est quasi totale. La séparation la plus difficile à réaliser avec cette méthodologie est celle du couple Leu-Met qui est très sensible à la pente du gradient. L'analyse complète dure 40 minutes et n'est donc pas plus longue que d'autres méthodes utilisant ou non la technique de dérivation [30-33].

4) COMPARAISON DES ANALYSES REALISEES SUR PGC ET SILICES GREFFEES C8 OU C18

Bien que les études sur les supports classiques C8 et C18 soient encore en cours dans notre laboratoire [34], quelques résultats publiés [22, 35] permettent déjà d'établir un certain nombre de points de comparaison avec la PGC. Ils sont consignés dans le tableau III-6.

Points comparés	PGC	Silice greffée
Phase stationnaire	Hypercarb (Hypersil)	Purospher RP-18e (Merck)
Nature du tensioactif (concentration en phase aqueuse)	NFPA (20mM)	PDFOA (0,5mM)
Temps d'équilibrage	15 minutes	3 heures
Température d'analyse	10°C	Ambiante
Durée du gradient	40 minutes	45 minutes
Modificateur organique (pourcentage en fin de gradient)	ACN (50%)	ACN (28%)
Interprétation gênée par des pics induits par le système	non	oui
Nombre d'acides aminés protéiques résolus par CPL-DEDL	20	17

tableau III-6: Points de comparaison des séparations des acides aminés non dérivés obtenues sur support silice greffée C18 et sur PGC.

Les points forts du PGC sont, sans nul doute, le faible temps d'équilibrage (ou de rééquilibrage) du système, la totale résolution des 20 acides aminés protéiques et l'absence de pic(s) induit(s) coéluant avec des acides aminés.

Les figures III-15 et III-16 illustrent les meilleurs profils chromatographiques obtenus avec chacune des 2 phases- PGC et C18. Les dix premiers acides aminés élués sont les mêmes sur les deux systèmes mais l'ordre des rétentions diffère radicalement. L'ordre est Gly, Ser, Ala, Thr, Cys, Asn, Asp, Pro, Gln, Glu sur PGC; il devient Asp, Asn, Ser, Gly, Gln, Cys, Glu, Thr, Ala, Pro sur le support C18.

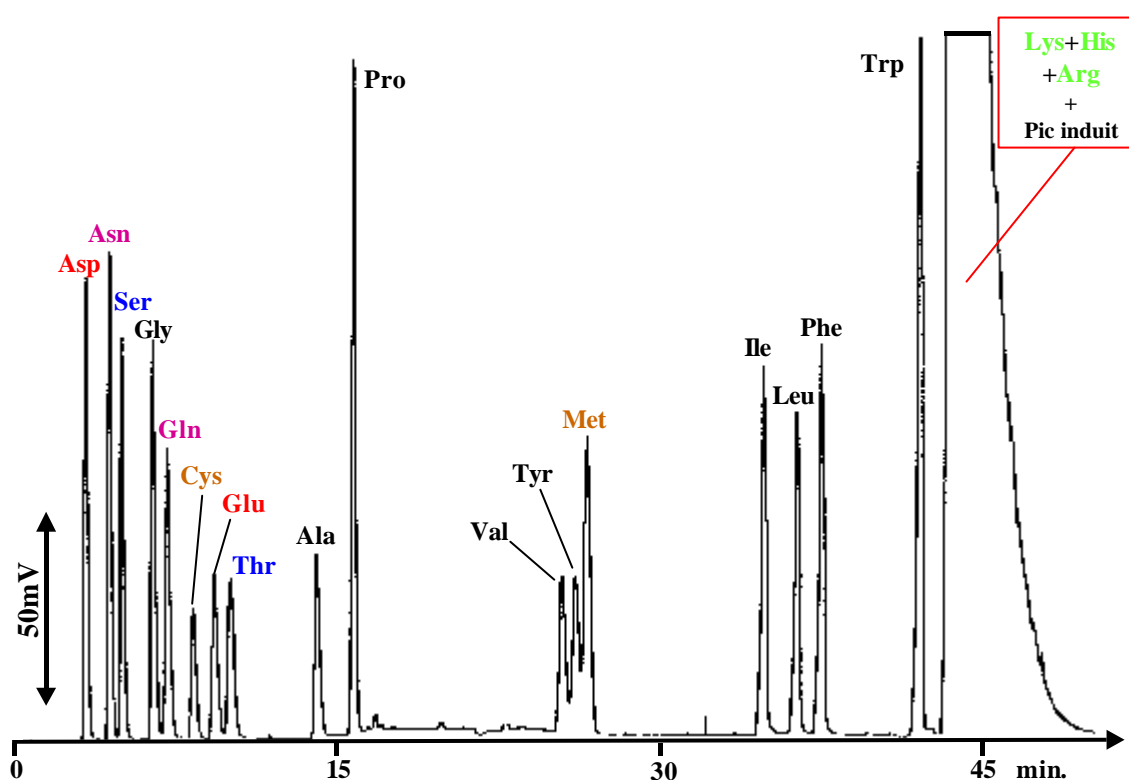


Figure III-16: Analyse CPL-DEDL sur silice greffée C18 en gradient d'éluion des 20 acides aminés protéiques non dérivés. Phase mobile: A= solution aqueuse de PDFOA (0,5 mM), B= Acétonitrile. 0 de B pendant 8 minutes puis de 0 à 19% de B en 5, 19% B sont maintenus pendant 10 minutes, puis 28% de B sont atteints en 10 minutes et maintenus jusqu'à la fin de l'analyse. Colonne: Purospher RP-18e 5 μ m (125 x 4 mm D.I.) à température ambiante. Débit: 1ml/min. Concentration injectée: 100mg/l. Volume injecté: 20 μ l.

Cette différence est bien évidemment imputable aux propriétés particulières du PGC car même en utilisant le PGC dans les conditions d'éluion isocratique de la Purospher RP-18e (0,5 mM de PDFOA en solution aqueuse), l'ordre de rétention sur PGC reste

différent (Gly, Ser, Asp, Ala, Thr, Asn, Cys, Pro, Gln, Glu) de celui observé sur C18. Ceci signifie d'ailleurs vraisemblablement que, même dans le cas où le tensioactif s'adsorbe, une partie de la surface du PGC reste disponible pour des interactions spécifiques où qu'il s'adsorbe avec un mécanisme différent de celui observé avec les silices greffées (la charge négative peut aussi "s'adsorber" sur PGC).

Des différences d'ordre d'élution sont notées également dans la seconde partie du chromatogramme.

S'il est difficile de trouver une logique simple à l'ordre d'élution obtenu sur PGC comme sur C18, il semblerait que, sur PGC, les premiers acides aminés élués soient ceux qui possèdent les plus petits volumes moléculaires [36], ce qui n'est pas non plus surprenant puisque les interactions avec la surface plane du PGC augmentent avec la surface que la molécule peut lui présenter [6]. L'ordre d'élution ne suit pas exactement l'ordre croissant des volumes moléculaires (tableau III-7) car il est influencé quelque peu par les effets de l'hydrophobie et de la nature du groupe polaire sans qu'on puisse leur attribuer un poids particulier.

Acide aminé	Volume moléculaire (Å ³)	Ordre d'élution
Gly	65,4	1
Ala	82,1	3
Ser	89,1	2
Cys	99,2	5
Asp	103,5	7
Thr	105,4	4
Pro	106,1	8
Asn	111,2	6
Glu	119,9	10
Gln	127,9	9

tableau III-7: Comparaison entre le volume moléculaire [35] et l'ordre d'élution des 10 acides aminés les plus hydrophiles sur PGC dans les conditions de la figure III-15.

Les derniers acides aminés élués sont bien évidemment ceux possédant un résidu aromatique en relation avec leur planéité et la présence d'électrons π délocalisés sur ces noyaux aromatiques. Contrairement aux silices greffées hydrophobes, la tyrosine pourtant plus hydrophile que la phénylalanine est éluee après celle-ci sur PGC. La tyrosine possédant une forme mésomère supplémentaire par rapport à la phénylalanine peut expliquer une interaction π - π plus forte avec le PGC.

Les acides aminés basiques (2 paires d'ions possibles par molécule d'acide aminé) sont élués juste avant les premiers aromatiques, la lysine en tête puisqu'elle ne possède pas d'électrons délocalisables sur son résidu. On notera au passage la grande sélectivité entre les deux isomères (Leu-Ile) et l'ordre d'élution opposé à celui obtenu sur les silices greffées hydrophobes (Ile-Leu).

5) CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous disposons désormais d'une méthode de séparation totale des 20 acides aminés protéiques non dérivés et ainsi nous avons atteint notre premier objectif. Sans optimisation particulière des conditions de détection du DEDL (pression de nébulisation : 2,2 bars, température d'évaporation 60°C, photomultiplicateur: 10) et avec un détecteur d'ancienne génération (Sedex 55) -les nouveaux Sedex 75 sont annoncés avec une amélioration de leur sensibilité de détection- les limites de sensibilité obtenues (rapport signal/bruit S/B>3) varient entre 1,25 mg/l (correspondant ici à environ 30 pmol injectées) à 2,5 mg/l. On note une sensibilité voisine de celle observée pour certaines méthodes utilisant la post-dérivation [37, 38] mais cependant plus de 10 fois moins sensibilité qu'avec les méthodes courantes de dérivation pré-colonne avec une détection UV [33].

Il reste à valider cette méthodologie CPL-DEDL pour les dosages d'acides aminés dans différentes matrices. Ce travail a débuté notamment dans les laboratoires d'analyse des Parfums Christian DIOR. Les tests de réponse en linéarité du DEDL en doubles coordonnées logarithmiques [39] semblent convenables. Répétabilité et reproductibilité sont correctes sauf pour les acides aminés facilement oxydables (Met et Cys) [40].

Les analyses d'acides aminés utilisant cette méthode séparative sont également possibles lorsqu'un laboratoire ne dispose pas du DEDL. En effet, il est possible de remplacer ce

dernier par une détection utilisant la dérivation post-colonne à l'OPA. Nous avons testé cette possibilité sur le mélange présenté à la figure III-10 et obtenu un profil similaire où seules les intensités de pics diffèrent.

L'exploitation de la chromatographie de paire d'ions sur PGC n'est pas terminée puisqu'il pourrait par la suite, en effet, être envisagé des analyses en milieu basique (la gamme de pH intéressant débute à 9) avec des tensioactifs cationiques évaporables.

D] CONCLUSIONS

Ce chapitre a montré les possibilités analytiques du carbone graphitique poreux en tant que phase stationnaire pour l'analyse des acides aminés non dérivés par CPL-DEDL. Bien que les mécanismes d'interaction exacts entre cette phase stationnaire et les solutés ne soient pas bien définis, deux systèmes d'analyse différents ont pu cependant être mis en œuvre:

Le premier fait appel à des phases mobiles aqueuses salines reste limité à cause de faibles sélectivités et de faibles efficacités. Il permet cependant l'analyse rapide de certains mélanges d'acides aminés

Le deuxième système fait appel aux acides carboxyliques perfluorés en tant qu'agents d'appariement d'ions. L'acide nonafluoropentanoïque s'est révélé comme étant le plus efficace de ces agents à une concentration maximale de 20 mM en solution aqueuse. Le maintien de la phase stationnaire à une température de 10 °C permet d'obtenir la résolution des 10 acides aminés les plus hydrophiles en mode isocratique. Un gradient d'élution adapté utilisant l'acétonitrile comme modificateur organique permet la complète résolution du mélange constitué des 20 acides aminés protéiques en une quarantaine de minutes.

Notre premier objectif est donc atteint et c'est à notre connaissance la première séparation totale de 20 acides aminés protéiques non dérivés proposée. Il reste à présent à étudier la compatibilité de ces systèmes avec une détection par spectrométrie de masse et les améliorations que devrait permettre cette détection plus spécifique, notamment en mode tandem.

Références bibliographiques

- [1] P. Ross, J. H. Knox, "Advances in Chromatography", 37 (1997) 74.
- [2] J. H. Knox, Q-H. Wan, *Chromatographia* 38 (1995) 1.
- [3] W. C. Chan, R. Mickelwright, D. A. Barrett, *J. Chromatogr. A.* 697 (1995) 213.
- [4] Q-H. Wan, P. N. Shaw, M. C. Davies, D. A. Barrett, *J. Chromatogr. A.* 697 (1997) 187.
- [5] J. E. Mama, A. F. Fell, B. J. Clark, *Roy. Soc. Chem. Anal. Proc.* 26 (1989) 71.
- [6] E. Roycroft, P. Ross, R. McNeill, *LC-GC Int.* 4 (1998) 32.
- [7] N. Tanaka, T. Tanigawa, K. Kimata, K. Hosota, T. Haraki *J. Chromatogr.* 549 (1991) 29.
- [8] J. Kriz, E. Adamkova, J. H. Knox, J. Hora, *J. Chromatogr. A.* 663 (1994) 51.
- [9] B. J. Bassler, R. Kaliszan, R. Hartwick, *J. Chromatogr.* 461 (1989) 139.
- [10] E. Forgacs, T. Cserhati, *Chromatographia* 33 (1992) 356.
- [11] B. J. Fish, *J. Pharm. & Biomed. Anal.* 11 (1993) 517.
- [12] M. C. Hennion, V. Coquart, S. Guenu, C. Sella, *J. Chromatogr A* 712 (1995) 287.
- [13] C. K. Lim, *Biomed. Chromatogr.* 3 (1989) 92.
- [14] H. C. Ehrsson, I. B. Wallin, A. S. Andersson, P. O. Edlund, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3608.
- [15] G. Gu, C. K. Lim, *J. Chromatogr.* 515 (1990) 183.
- [16] C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A.* 727 (1996) 71.
- [17] C. Elfakir, P. Chaimbault, M. Dreux, *J. Chromatogr. A.* 833 (1999) 147.
- [18] M. Josefsson, B. Carlsson, B. Norlander, *J. Chromatogr. A.* 684 (1994) 23.
- [19] J. H. Knox, Q.-H. Wan, *Chromatographia* 42 (1996) 83.
- [20] T. Okamoto, A. Isozaki, H. Nagashima, *J. Chromatogr. A.* 800 (1998) 239.
- [21] C. Merly, B. Lynch, P. Ross, J. D. Glennon, *J. Chromatogr. A.* 804 (1998) 187.
- [22] K. Petrits, P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A.* 833 (1999) 147.

- [23] R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, "Chromatographies en Phases liquide et Supercritique", 3^e édition, Masson, Paris, 1991.
- [24] E. Forgacs, T. Cserhati, Trends in Anal. Chem. 14 (1995) 23.
- [25] B. A. Bidlingmeyer, J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 525.
- [26] M. T. W. Hearn, "Ion-Pair Chromatography", Chromatographic Science series vol.31, chapitre 2, pp 48-49, 1985, New York.
- [27] A. Karlsson, C. Charron, J. Chromatogr. A. 732 (1996) 253.
- [28] P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse, J. Chromatogr. A. 797 (1998) 83.
- [29] B. Kaur, LC-GC Int. 3 (1990) 41.
- [30] Y. Yokoyama, O. Ozaki, H. Sato, J. Chromatogr. A. 739 (1996) 333.
- [31] H. J. Chaves das Neves, Z. Braga Morais, J. High Resol. Chromatogr. 20 (1997) 115.
- [32] H. J. Chaves das Neves, Z. Braga Morais, Anal. Quim. 93 (1997) 98.
- [33] D. Fekkes, J. Chromatogr. B. 682 (1996) 3.
- [34] K. Petritis, Thèse de doctorat en cours à l'Université d'Orléans.
- [35] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, J. Chromatogr. A. 855 (1999) 191.
- [36] P. Vallat, P. Gaillard, P. A. Carrupt, R. S. Tsai, B. Testa, Helv. Chim. Act. 78 (1995) 471.
- [37] Y. Watanabe, K. Imai, Anal. Chem. 55 (1983) 1786.
- [38] J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, J. Chromatogr. A. 676 (1994) 311.
- [39] M. Dreux, M. Lafosse, L. Morin-Allory, LC-GC Int. 9 (1996) 48.
- [40] C. Euzenat, Parfums Christian Dior, rapport d'activité de stage I.U.P d'Orléans, 1999.

Chapitre IV

ANALYSES D'ACIDES AMINES NON DERIVES PAR CPL-SM ET CPL-SM TANDEM. DOSAGES DANS DES MATRICES BIOLOGIQUES.

Les systèmes séparatifs mis au point avec le DEDL peuvent être directement utilisés avec une détection par spectrométrie de masse comme nous l'avons vu lors du chapitre I. Cependant, il reste à déterminer le degré de compatibilité des méthodologies avec la détection SM.

Avant même d'aborder l'analyse en couplage entre la CPL et la SM, nous allons étudier la détection des acides aminés en précisant les réglages des différents composants du spectromètre (source d'ionisation, interface à gaz rideau, simple ou double filtrage par des quadripôles). Nous verrons ensuite quelles adaptations peuvent être apportées en couplage pour obtenir la détection la plus sensible et l'analyse la plus courte.

A] ANALYSE des 20 ACIDES AMINES PROTEIQUES

1) DETECTION DES ACIDES AMINES PROTEIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE UTILISANT L'IONISATION A PRESSION ATMOSPHERIQUE

Un grand nombre de travaux ont été publiés sur l'étude des acides aminés par spectrométrie de masse. A peu près toutes les sources ioniques ont été testées que ce soit l'impact électronique (IE) [1], l'ionisation chimique (IC) [2], la désorption de champ [3], la désorption par plasma (PDMS) [4], la spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) [5], le bombardement par atomes rapides (FAB) [6,7], la désorption laser (LMS) [8] et bien entendu fort logiquement compte tenu de leur nature ionique, les méthodes d'ionisation à pression atmosphérique (API) [9-12].

Nous allons maintenant examiner les réglages vis à vis des composants utilisés sur un appareil triple quadripôle (QqQ) possédant une interface à rideau de gaz sur la détection des acides aminés non dérivés.

1-1) Spectrométrie de masse simple

1-1-a) Choix de la source et du mode d'ionisation

L'IonSpray est la source la mieux adaptée à la détection d'acides aminés car ils sont naturellement ioniques.

Les acides aminés peuvent se comporter en fonction du pH comme des cations (milieu acide) ou comme des anions (milieu basique). Généralement, un milieu basique favorise la déprotonation de la molécule, donc le mode de détection négatif. Le contraire prévaut pour les cations. Cependant, il semble que ce ne soit pas une règle toujours applicable en électronebulisation pour les composés naturellement ioniques puisque certains travaux ont montré que l'intensité d'un signal en SM ne chutait pas dramatiquement lorsqu'on se trouve du "mauvais coté" du pKa [11,13]. Cette observation s'applique bien aux acides aminés protéiques [11].

Comme Hiraoka et coll. [12], nous avons trouvé que le mode d'ionisation positif donnait en électronebulisation de meilleures réponses que le mode négatif pour les acides aminés protéiques. Pour cette raison, le mode positif sera conservé pour la détection par SM lors des couplages avec la CPL.

1-1-b) Ions observés

En dépit d'un mode d'ionisation doux, nous avons pu observer la formation d'un certain nombre de fragments lors de l'optimisation des conditions de détection des acides aminés. Ces fragments sont connus puisque l'emploi de méthodes moins douces comme la désorption par plasma [4] a permis d'en recenser un grand nombre (Annexe IV). Pour notre part, nous avons déjà précisé que ce n'était pas l'IonSpray (dont le voltage optimum a été déterminé à +5kV) qui était le responsable de la fragmentation mais les collisions

plus ou moins violentes dans le rideau de gaz de l'interface. Cependant, on ne pourra supprimer ce gaz à cause du rôle protecteur qu'il joue lors du couplage avec les systèmes chromatographiques. Il nous a donc fallu déterminer quelles étaient les conditions de tension à appliquer (orifice et anneau de focalisation) pour obtenir une bonne sensibilité de détection.

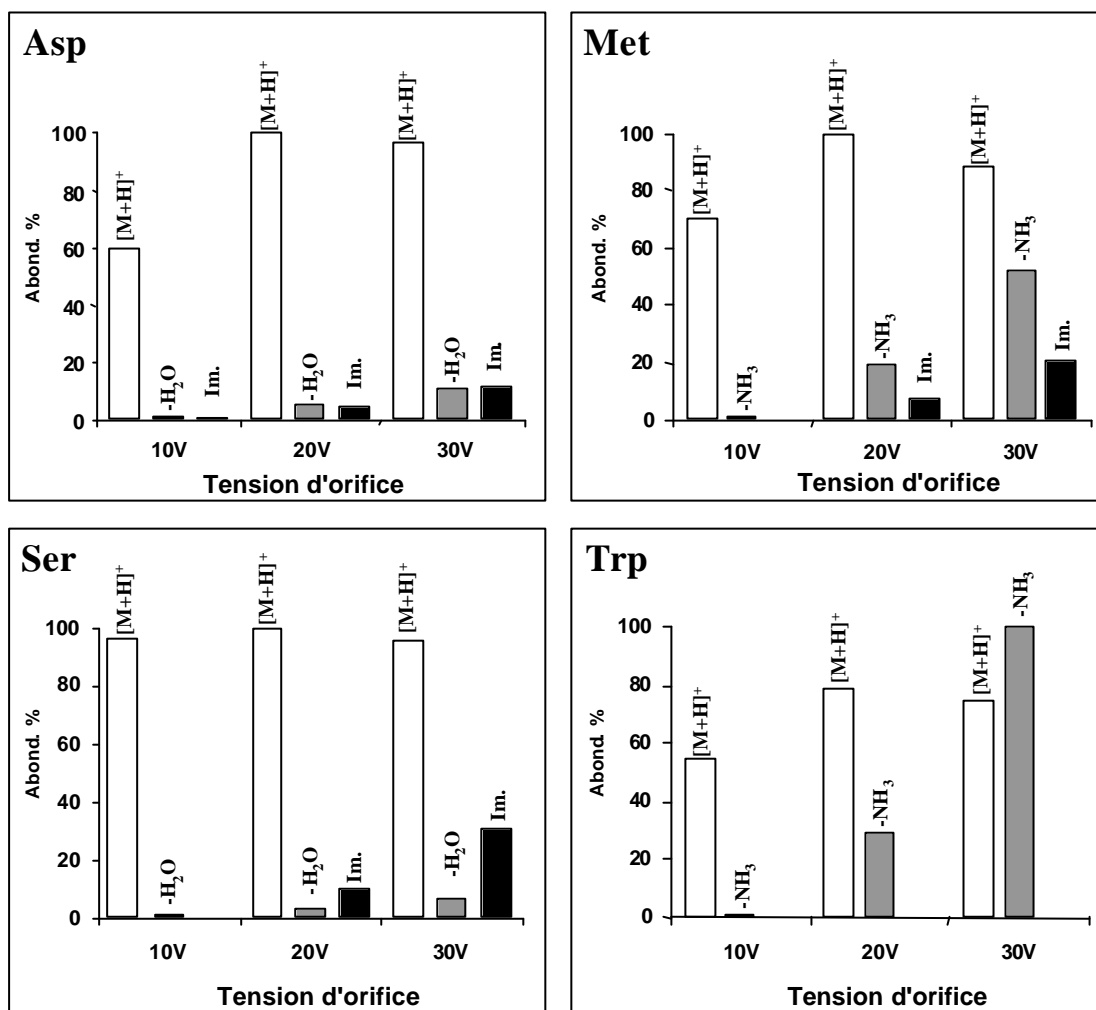


Figure IV-1: Influence de la tension de l'orifice (OR) sur les intensités des ions $[M+H]^+$ et des fragments obtenus en CID-MS pour 4 acides aminés. Le voltage de l'anneau de focalisation est 10 fois supérieur à celui de l'orifice. Source: IonSpray (+5,0 kV). Les abondances inférieures à 1% n'apparaissent pas sur le graphique. Im.: immonium $[H_2N=CH-R]^+$

La figure IV-1 montre l'influence de la tension d'orifice sur cette fragmentation pour 4 acides aminés protéiques. A faible tension d'orifice (10V), la fragmentation est peu importante mais la quantité totale d'ions pénétrant à l'intérieur du spectromètre est inférieure à celle obtenue dans des conditions de voltage plus élevé (30V). En revanche,

dans ces dernières conditions, la fragmentation devient beaucoup plus importante voire majoritaire dans le cas du tryptophane.

Même pour de faibles tensions d'orifice, la fragmentation ne peut être totalement évitée. Une tension de 20V est un bon compromis pour assurer une bonne sensibilité de détection de l'ion $[M+H]^+$ et elle sera conservée pour les analyses futures. La plupart du temps, nous avons observé que les ions produits en CID-MS sont des pertes d' H_2O , de NH_3 ou la production d'ions immonium (perte de la fonction α -acide carboxylique).

Acides aminés	Ions observés (m/z)			
	$[M+H]^+$	$[M+H-NH_3]^+$	$[M+H-H_2O]^+$	Im.
Gly	76			
Ala	90			44
Ser	106		88	60
Pro	116			70
Val	118			72
Thr	120		102	
Cys	122	105		76
Ile/Leu	132			86
Asn	133	116		87
Asp	134		116	88
Lys/Gln	147	130		
Glu	148		130	102
Met	150	133		104
His	156			110
Phe	166			120
Arg	175			
Tyr	182	165		136
Trp	205	188		

Tableau IV-1: Ions observés par infusion des acides aminés protéiques non dérivés en mode positif par IonSpray (+5,0kV), Orifice 20V. Im.: immonium $[H_2N=CH-R]^+$. Les ions dont l'abondance relative est inférieure à 1% ne sont pas indiqués.

Le tableau IV-1 précise les valeurs des différents rapport m/z des ions observés en SM simple lors de l'infusion de chacun des acides aminés protéiques en mode positif à une tension d'orifice de 20V. Bien évidemment, l'ion moléculaire $[M+H]^+$ est majoritaire. Aucun adduit alcalin n'est observé.

1-1-c) Mélanges d'acides aminés

La détection par spectrométrie de masse peut apporter sa contribution à la détermination des acides aminés d'un mélange dès lors que les molécules qui le composent diffèrent d'au moins une unité de masse chacune (pour des appareils dont la résolution est unitaire), et qu'aucun ion fragment d'un composé ne correspond à la masse moléculaire d'un autre composé.

Au regard du tableau IV-1, nous voyons aisément que nous ne serons pas capables d'analyser en infusion n'importe quel mélange d'acides aminés et notamment ceux constitués simultanément de composés isomères tels la leucine et l'isoleucine ou de composés isobares comme la lysine et la glutamine. De plus, on note qu'un certain nombre de fragments observés correspondent à des ions $[M+H]^+$ d'autres acides aminés (ex: m/z= 116 correspond à $[M+H]^+$ de Pro, à $[M+H-NH_3]^+$ de Asn et à $[M+H-H_2O]^+$ de Asp).

Ce bilan d'indéterminations est encore incomplet car il faut évoquer un dernier problème qui est du à la présence d'isotopes. En effet, les rapports m/z dans le tableau IV-1 indiquent les masses moléculaires des ions ne contenant que du ^{12}C . Compte tenu de la présence naturelle statistique de ^{13}C à hauteur de 1,1%, une certaine quantité de molécules d'un même composé possèdent donc une masse M+1. De par ce fait, par exemple, le rapport m/z=133 correspond à $[M+H]^+$ de Asn, à la perte d'ammoniac de Met mais aussi à Leu et Ile lorsqu'un des atomes de carbone est un ^{13}C (ion $[M+1+H]^+$). Ces 4 acides aminés ne doivent pas se retrouver en mélange lors d'une quantification de Asn à partir d'une simple infusion. La proportion de molécules possédant un ^{13}C est faible mais ne doit pas être négligée pour deux raisons:

- La figure IV-2 montre que les acides aminés n'ont pas tous le même facteur de réponse relativement à un 100% fait sur la phénylalanine. Pour une concentration

donnée, hormis l'arginine, les acides aminés hydrophobes (Leu, Ile, Phe...) possèdent une bien meilleure réponse que les acides aminés les plus hydrophiles de la série (Gly, Ser, Asn). La leucine possède par exemple une réponse environ 4 fois supérieure à celle de l'asparagine. Pour la leucine, l'abondance du pic isotopique $[M+1+H]^+$ correspond à 8,3% [10]. Ainsi, à concentration égale, le pic isotopique $[M+1+H]^+$ de la leucine aura une intensité correspondant à $4 \times 8,3$ soit 33% de celui du pic $[M+H]^+$ de l'asparagine. La présence de rapports m/z prenant en compte les molécules et fragments contenant l'isotope ^{13}C n'est donc pas du tout négligeable.

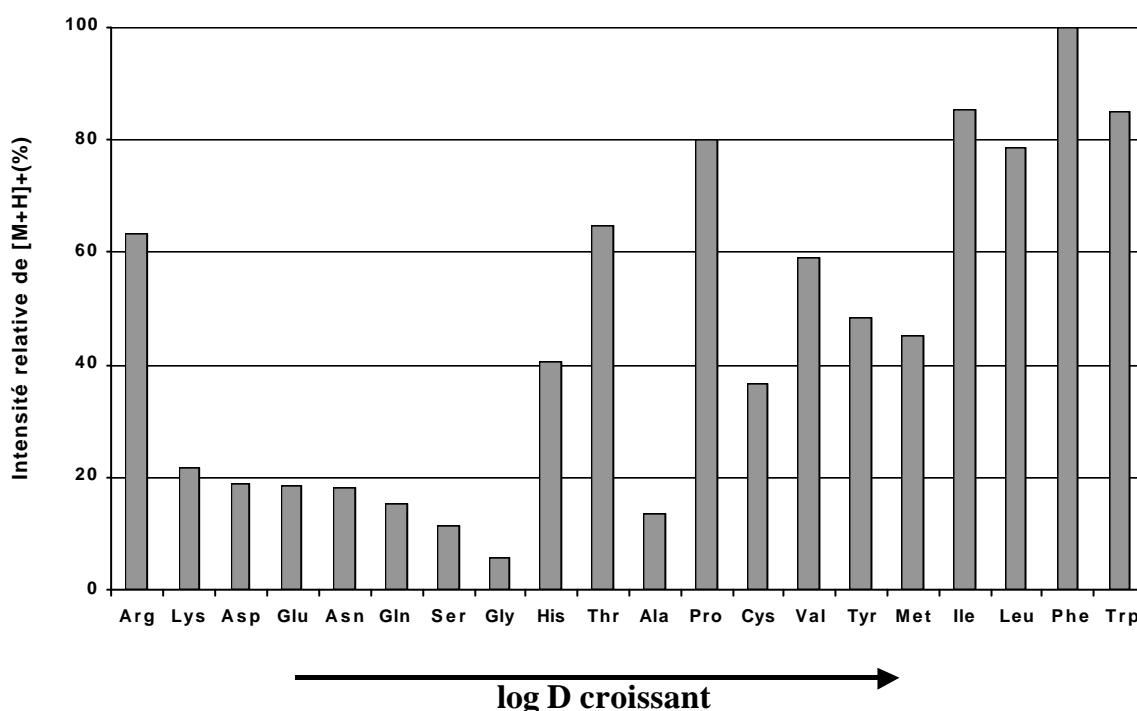


Figure IV-2: Réponse comparée des différents acides aminés en solution aqueuse contenant 1 mM de TFA. La réponse a été ramenée à une concentration infusée constante et est exprimée en pourcentage de l'acide aminé ayant la plus forte réponse, c'est à dire la phénylalanine.

- Les acides aminés dans un mélange peuvent être dans des rapports de concentration différents pouvant accentuer encore cet effet.

Le seul moyen de résoudre tous ces problèmes conduisant à une indétermination est le couplage de la spectrométrie de masse avec une méthode séparative différenciant ces acides aminés par leur rétention.

Mélange d'ac. aminés	m/z ($[M+H]^+$)	Raisons
Leu-Ile	132	❶ isomères donc isobares
Lys-Gln	147	❶ isobares
Pro-Asn-Asp	116-133-134	❷ 116=perte d'eau de Asp 116 = perte d'ammoniac de Asn.
Gly-Cys	76-122	❷ 76 = Immonium de Cys.
Thr-Phe	120-166	❷ 120 = Immonium de Phe
Asn-Met-Ile-Leu	133-150-132	❷ 133 = perte d'ammoniac de Met. ❸ 133 = Isotope ^{13}C de Ile, Leu
Glu-Lys-Gln	148-147	❸ 147 = Isotope ^{13}C de Lys, Gln
Asp-Asn	134-133	❸ 134 = Isotope ^{13}C de Asn.
Asp-Met	134-150	❷+❸ 134 = 133 + 1 (perte d'ammoniac de Met + ^{13}C)
Ser-Cys	106-122	❷+❸ 106 = 105 + 1 (perte d'ammoniac de Cys + ^{13}C)
Phe-Tyr	166-182	❷+❸ 166 = 165 + 1 (perte d'ammoniac de Tyr + ^{13}C)
<p>❶ : masses moléculaires identiques.</p> <p>❷ : fragment correspondant à la masse moléculaire d'un autre acide aminé.</p> <p>❸ : recouvrement de masse à cause d'un ^{13}C sur l'ion considéré.</p>		

Tableau IV-2 : Mélanges d'acides aminés ne pouvant être déterminés par la détection SM simple dans les conditions optimales de détection.

Le tableau IV-2 résume l'ensemble des exigences de séparation lorsque la SM simple sera employée comme détection. Le système chromatographique doit rester presque aussi performant qu'avec le DEDL. La séparation de la quasi totalité des acides aminés est requise, car un grand nombre de coélutions, concernant un total de 16 acides aminés, restent interdites.

1-2) Spectrométrie de masse tandem

Avec la détection par spectrométrie de masse simple le problème de résolution des mélanges d'acides aminés reste compliqué parce qu'on ne peut trier les ions moléculaires des ions fragments à la sortie de l'interface qu'avec un seul filtre de masse. En spectrométrie de masse tandem, un premier filtre de masse (Q_1) sélectionne seulement les ions de masse moléculaire d'intérêt avant leur fragmentation dans la cellule de collision. Les ions fragments seront analysés par le deuxième filtre de masse (Q_3). En se focalisant à la fois sur la masse moléculaire en Q_1 et sur un de ses fragments en Q_3 , on gagne en sélectivité de détection puisqu'il est plus rare que deux molécules possédant la même masse moléculaire fragmentent de la même manière (sauf pour certains isomères).

La fragmentation des acides α -aminés en fonction de leur énergie de collision a déjà été étudiée par Dookeran et coll. [7]. Cette étude concernant une dizaine d'acides aminés a été menée à basse énergie de collision sur un appareil utilisant une source FAB et de géométrie (EBqQ) différente du notre (QqQ). A cause des différences de performances des spectromètre travaillant à basse énergie de collision, nous avons déterminé l'énergie de collision optimale à utiliser avec notre appareil pour chaque acide aminé. Les courbes d'intensité des ions fragments en fonction de l'énergie de collision (annexe III et IV) ont été tracées. Nous avons observé les mêmes tendances que Dookeran mais avec un décalage d'une dizaine d'eV environ.

Les plus fortes intensités pour les fragments sont obtenues pour une plage d'énergie de collision allant de 12 à 20 eV. Nous prendrons une énergie de collision moyenne de 15 eV pour la suite de l'étude. Les ions retenus pour de futures analyses en spectrométrie de masse tandem sont consignés dans le tableau IV-3. L'arginine étant plus difficile à fragmenter que les autres, l'ion le plus intense enregistré à 15eV en Q_3 reste l'ion $[M+H]^+$.

L'emploi de deux filtres de masses pour la détection accroît considérablement la sélectivité de détection ce qui réduit considérablement les exigences quant à la résolution de la méthode chromatographique. 8 acides aminés au lieu de 16 sont concernés cette fois par une indétermination de détection par SM tandem.

Acide aminés	Q ₁ (m/z)	Q ₃ (m/z)	Nature de l'ion en Q ₃
Gly	76	30	Immonium
Ala	90	44	Immonium
Ser	106	60	Immonium
Pro	116	70	Immonium
Val	118	72	Immonium
Thr	120	74	Immonium
Cys	122	105	Perte d'ammoniac
Ile/Leu	132	86	Immonium
Asn	133	87	Immonium
Asp	134	88	Immonium
Lys/Gln	147	130	Perte d'ammoniac
Glu	148	130	Perte d'eau
Met	150	104	Immonium
His	156	110	Immonium
Phe	166	120	Immonium
Arg	175	175	[M+H] ⁺
Tyr	182	165	Perte d'ammoniac
Trp	205	188	Perte d'ammoniac

Tableau IV-3: Rapports m/z suivis en Q₁ et Q₃ pour l'analyse des acides aminés en spectrométrie de masse tandem (mode MRM). Les ions retenus ont été choisis selon deux critères: le gain de sélectivité qu'ils apportent et la sensibilité de détection.

Les 8 acides aminés à séparer obligatoirement en vue de leur dosage sont Asp, Asn, Glu, Gln, Ile, Leu, Lys et Met et correspondent aux trois situations suivantes:

1. Isomères et isobares:

Le tableau IV-3 montre la nécessité de séparer les deux acides aminés isomères - Leu et Ile - ainsi que les deux composés isobares - Gln et Lys - à cause d'une fragmentation identique à basse énergie. Des ions plus spécifiques pour Leu et Ile peuvent exister pour des énergies de collision plus élevées mais leurs intensités sont 20 à 50 fois plus faibles.

2. Présence de l'isotope ^{13}C dans la molécule et/ou les fragments:

Asn contenant un atome de ^{13}C possède la même masse moléculaire que Asp. Il en va de même pour leur fragment. Le problème est similaire pour Lys et Gln vis à vis de Glu comme pour Leu et Ile vis à vis de Asn.

3. Fragmentation importante de la méthionine dès Q1:

La méthionine ($m/z=150$) génère un ion fragment à $m/z=133$ par perte d'ammoniac lors du passage à travers le rideau de gaz de l'interface (CID-MS). Cet ion a la même masse que l'ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ de Asn. L'ion fragment de Met fragmente dans la cellule de collision pour donner des fragments de deuxième génération (en Q3). Malheureusement un de ces ions de deuxième génération possède le rapport $m/z=87$ correspondant à l'immonium de l'asparagine suivi en Q3. En conséquence la séparation chromatographique entre Asn et Met devra être maintenue.

1-3) Conclusions

L'analyse de mélanges d'acides aminés protéiques par SM simple ou en tandem se heurte à des problèmes d'indétermination. La détermination des 20 acides aminés protéiques passe donc par un couplage CPL-SM.

Avant de passer au couplage avec les systèmes chromatographiques, nous allons préciser la compatibilité et les contraintes de la méthode séparative avec la détection SM.

6) COMPATIBILITE DE LA DETECTION SM AVEC LES AGENTS D'APPARIEMENT D'IONS (ACIDES CARBOXYLIQUES PERFLUORES)

Bien que les systèmes séparatifs les plus performants sur PGC utilisent des acides carboxyliques perfluorés à longueur de chaîne moyenne, l'étude de leur compatibilité avec la spectrométrie de masse a été étendue à toute la série d'homologues (chaîne de C1 à C7).

Les agents d'appariement d'ions sont connus en spectrométrie de masse pour leur effet possible de neutralisation des ions analytes [14,15]. Souvent aussi, peu volatils, ils peuvent limiter le phénomène d'évaporation ionique [16] et être à l'origine de possibles contaminations. Ces deux phénomènes diminuent les performances de la détection.

Les acides carboxyliques perfluorés comme l'acide trifluoroacétique ou l'acide heptafluorobutyrique sont conseillés lorsqu'on souhaite utiliser une méthodologie faisant appel à l'appariement d'ions [16] ou en recul d'ionisation comme c'est les cas avec certains peptides [17].

En ce qui concerne l'emploi des acides carboxyliques perfluorés possédant une longue chaîne hydrophobe, ceux-ci ont déjà montré une certaine compatibilité avec les spectromètres de masse utilisant le thermospray (TSP) comme interface d'ionisation [18]. Cependant, ces analyses ne sont pas très sensibles (de l'ordre de la centaine de nanogrammes injectée seulement). Dans ce cas, la faible sensibilité est, entre autre, imputable à la présence d'adduits avec le solvant et avec la triéthylamine utilisée pour tamponner le milieu (l'adduit triéthylammonium est d'ailleurs l'ion majoritairement observé). Nous rappellerons que la présence de plusieurs ions caractérisant un même composé est préjudiciable à l'obtention d'une bonne sensibilité en suivi d'ions sélectionnés (mode SIM) si on ne peut les suivre tous. Un plus grand nombre d'ions suivis impose une réduction de temps de résidence sur la mesure et il est de plus nécessaire que le logiciel d'exploitation permette la sommation de signaux de rapport m/z différents.

Pour notre part, nous ne tamponnons pas la phase mobile et avec l'IonSpray comme source d'ionisation, nous n'avons observé ni d'ions agrégats avec le solvant, ni d'adduits avec le tensioactif perfluoré. Ce phénomène reste vrai quel que soit l'acide perfluoré utilisé et comme nous limitons au minimum la fragmentation dans le rideau de gaz de l'interface (10% de l'intensité de l'ion moléculaire au maximum), les ions $[M+H]^+$ sont toujours majoritaires. Les composés se retrouvent donc quasiment sous une seule espèce ionique.

Nos conditions sont donc plus favorables à l'obtention d'une bonne sensibilité que celles précédemment citées.

Il reste à déterminer la réelle influence des différents acides carboxyliques perfluorés et de leur concentration sur la réponse du détecteur vis à vis des acides aminés et sur la stabilité du signal dans le temps. Pour dégager les grandes tendances de l'emploi de ces tensioactifs, nous avons réduit le nombre d'acides aminés étudiés et choisi de travailler avec trois acides aminés porteurs soit d'un résidu neutre (la valine), soit d'un résidu anionique potentiel (l'acide aspartique) soit d'un résidu cationique (la lysine).

2-1) Influence de la nature et de la concentration en phase aqueuse de l'acide carboxylique perfluoré sur la réponse du détecteur

La figure IV-3 montre l'influence de la concentration du NFPA en solution purement aqueuse sur la réponse des 3 acides aminés tests. La réponse du détecteur croît jusqu'à ce que le tensioactif atteigne une concentration de 10 mM (sauf pour Val). A 20 mM (concentration utilisée pour la séparation sur PGC), la réponse ne chute cependant pas dramatiquement. L'étude du bruit de fond montre qu'il reste à peu près constant dans la gamme de concentrations étudiée. Nous conserverons donc là des conditions favorables à une sensibilité de détection correcte puisque le signal augmente alors que le bruit de fond reste constant.

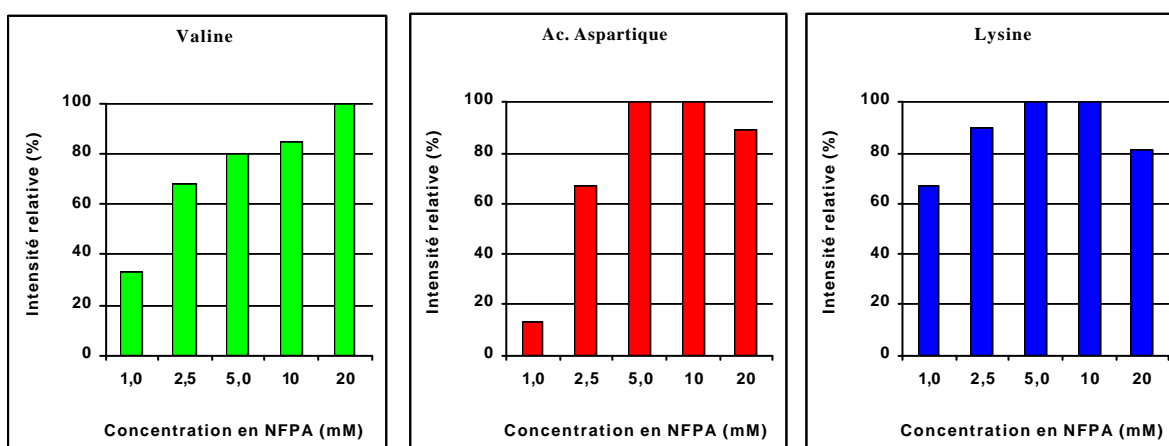


Figure IV-3: Influence de la concentration en solution aqueuse d'un tensioactif (acide nonafluorobutyrique) sur la réponse du spectromètre de masse vis à vis des 3 acides aminés tests. IonSpray: +5,0 kV, orifice : 20V.

Pour les tensioactifs à longue chaîne hydrophobe, la tendance est la même [19], cependant, leur solubilité est restreinte en solution aqueuse et elle dépasse difficilement 5mM (pour PDFOA). Jusqu'à cette valeur, la réponse des acides aminés croît également avec la concentration du tensioactif perfluoré dans la phase aqueuse.

La figure IV-4 montre l'influence de la longueur de la chaîne perfluorée sur la réponse du détecteur vis à vis des 3 acides aminés tests.. Le résultat va à l'encontre de ce qui pourrait être attendu puisque la réponse s'accroît avec la longueur de chaîne alors que ces tensioactifs sont de moins en moins volatils (PDFOA est solide à température ambiante). L'amplitude du bruit de fond reste constante quelle que soit la concentration en tensioactif ou la longueur de chaîne carbonée. Les rapports S/B varient donc comme les intensités relatives de chaque graphique.

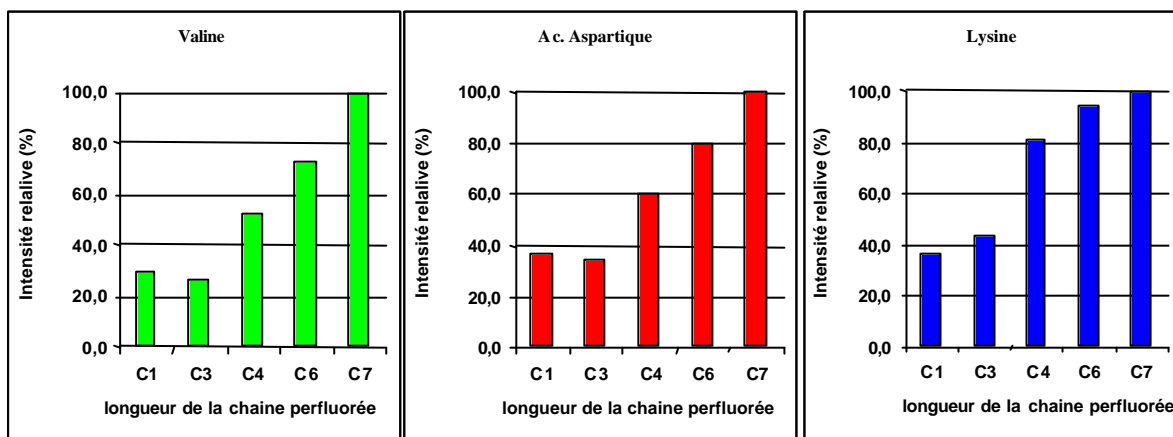


Figure IV-4: Influence de la longueur de la chaîne hydrophobe de l'acide carboxylique perfluoré à concentration constante (5mM) en tensioactif en solution aqueuse sur la réponse du spectromètre de masse vis à vis des 3 acides aminés tests (conditions d'ionisation analogues à la figure IV-3).

2-2) Influence du pourcentage d'acétonitrile sur la réponse du détecteur

Le graphique IV-5 montre un comportement différent de la réponse lorsque 20% d'acétonitrile sont présents dans la solution étudiée (ce pourcentage correspond à une valeur moyenne utilisée lors du gradient d'élution). On remarque que les réponses ont tendance à être plus grandes avec de faibles concentrations en tensioactif et que les acides

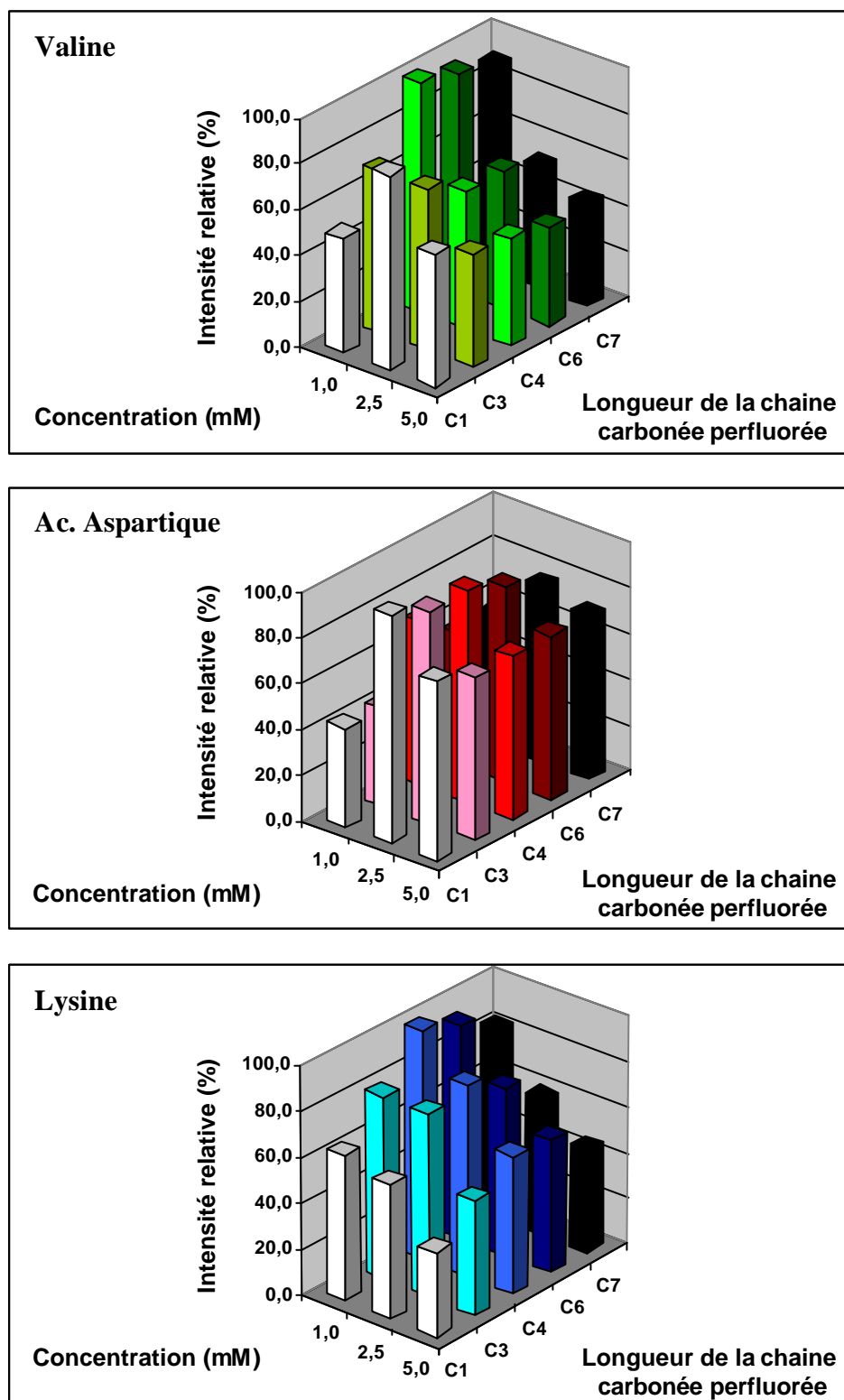


Figure IV-5: Influence de la longueur de la chaîne hydrophobe de l'acide carboxylique perfluoré et de sa concentration en solution hydroorganique [20% d'acétonitrile (v/v)] sur la réponse du spectromètre de masse vis à vis des 3 acides aminés tests (conditions d'ionisation analogues à la figure IV-3).

carboxyliques perfluorés à longue chaîne carbonée ne conduisent plus à l'obtention des meilleures réponses du détecteur.

La présence d'acétonitrile assure une meilleure désolvatation des ions dans les gouttelettes et, globalement, l'effet du modificateur organique augmente le signal par rapport à celui obtenu en milieu aqueux (figure IV-6).

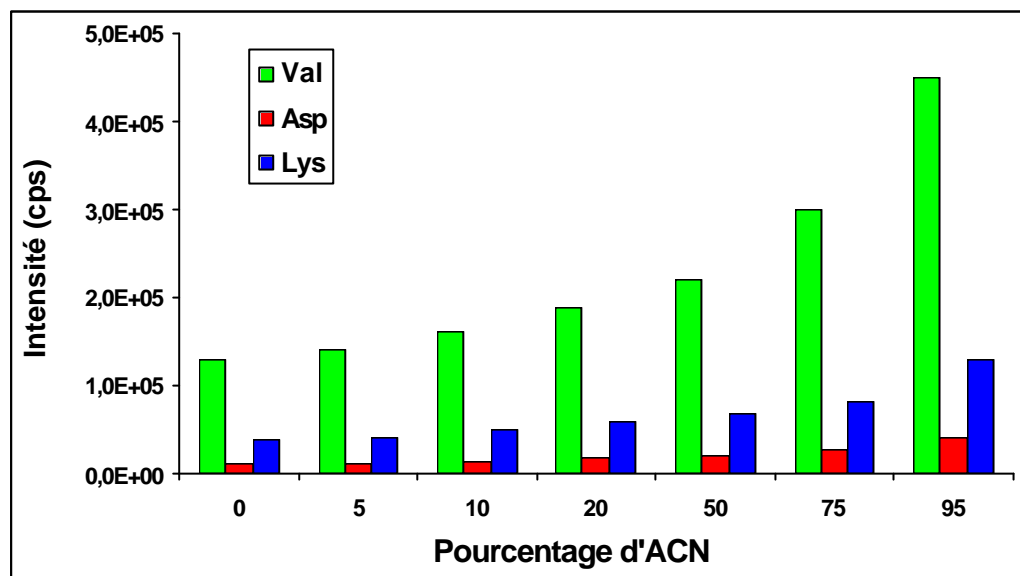


Figure IV-6: Influence du pourcentage d'acétonitrile (v/v) dans la phase mobile hydroorganique contenant 2,5mM de NPFA sur la réponse du spectromètre de masse vis à vis des 3 acides aminés tests (conditions d'ionisation analogues à la figure IV-3). Concentration en acide aminé: 5mg/l.

2-3) Stabilité du signal en fonction du temps

Pour cette étude, nous nous sommes placés dans le cas à priori le plus défavorable, à savoir une introduction en continu pendant une dizaine d'heures d'une concentration élevée de tensioactif correspondant à 18 mM de NPFA. La figure IV-7 montre que le signal des trois acides aminés décroît avec le temps. Une perte de signal de 2% environ par heure est notée pendant les 2 premières heures pour les trois acides aminés étudiés. La décroissance du signal semble moins prononcée à la fin de l'étude (1% de chute par heure) "comme si la source ionique tendait à s'équilibrer".

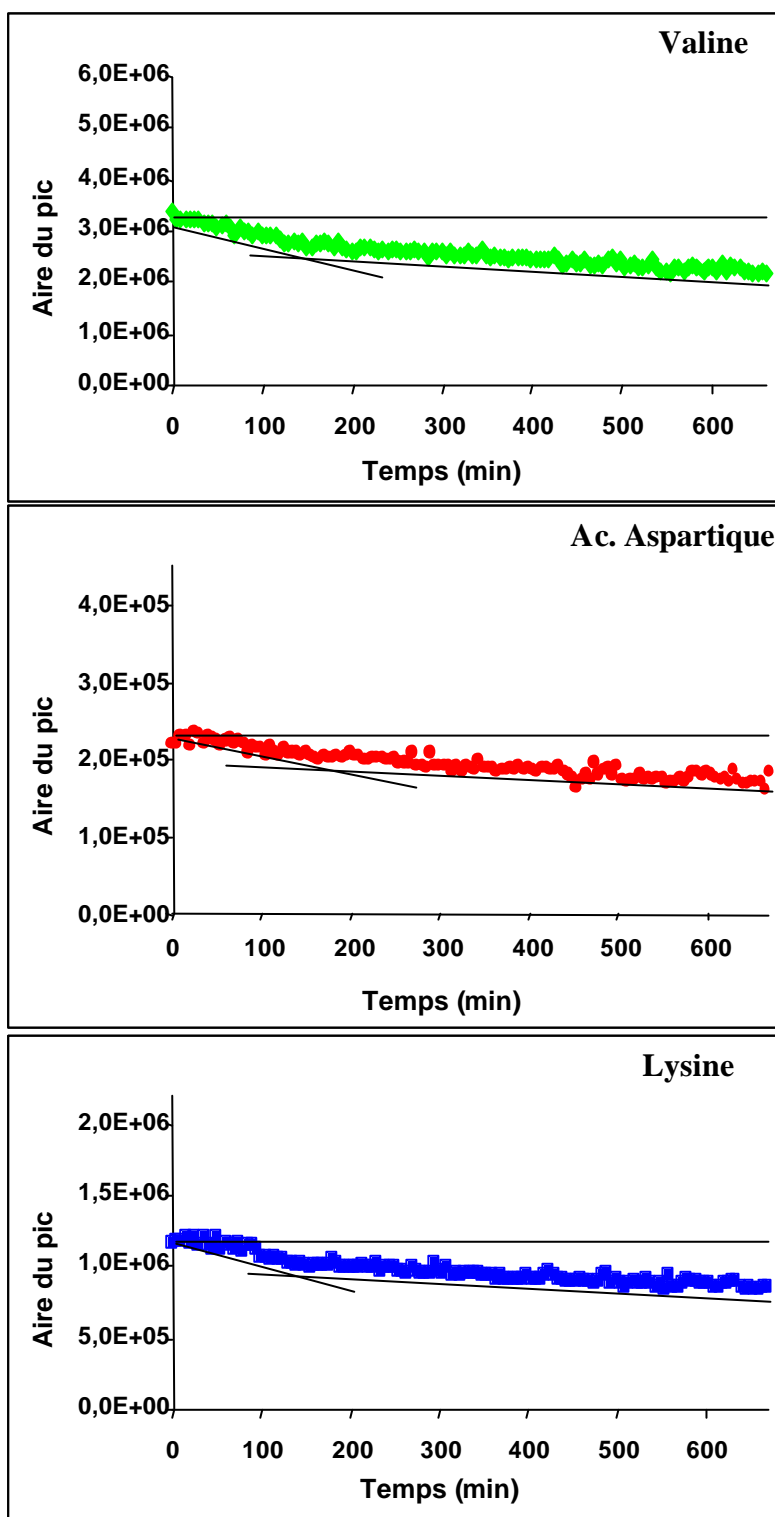


Figure IV-7: Stabilité du signal du détecteur en fonction du temps. Phase mobile: 18 mM de NPFA en solution hydroorganique contenant 10% (v/v) d'acétonitrile (conditions d'ionisation analogues à la figure IV-3).. Chaque point correspond à un intervalle d'injection de 5 minutes.

Cette diminution de l'intensité du signal n'est pas importante au cours du temps puisqu'il faudrait plus de 45 heures de travail en continu pour avoir un chute de 50% du signal. Cette variation de signal au cours du temps pose donc le problème de la justesse des analyses quantitatives. Cependant, nous pouvons remarquer que les trois acides aminés étudiés subissent cette perte de signal de la même manière (bien qu'ils aient un résidu de nature très différente). En utilisant l'un ou l'autre de ces acides aminés comme référence (étalonnage interne), cette variation en fonction du temps est compensée comme le montre la figure IV-8. Dans ce cas, des études quantitatives seront alors envisageables.

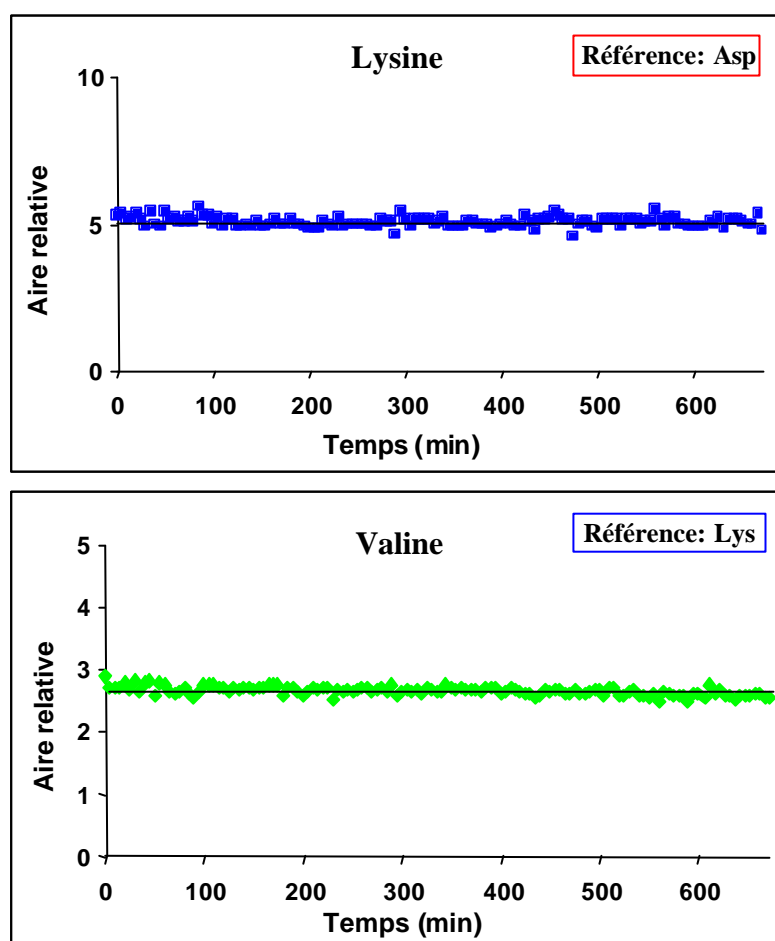


Figure IV -8: Stabilité du signal de Lys et Val en fonction du temps en prenant un autre acide aminé comme référence (étalonnage interne). Dans les cas de l'étude de la stabilité du signal de la lysine, l'acide aspartique est pris comme référence. Dans les cas de l'étude de la stabilité du signal de la valine, la lysine est prise comme référence. Phase mobile: 18 mM de NPFA en solution hydroorganique contenant 10% (v/v) d'acétonitrile (conditions d'ionisation analogues à la figure IV-3). Chaque point correspond à un intervalle d'injection de 5 minutes.

Bien entendu, il faudra étendre l'étude à la totalité des 20 acides aminés protéiques pour confirmation et trouver des acides aminés pouvant servir d'étalon interne, non protéiques et/ou non présents dans les échantillons à analyser.

2-4) Conclusions

Utiliser des acides carboxyliques à longue chaîne perfluorée comme agent d'appariement avec les phases stationnaires classiques (C8, C18) ou à chaîne plus courte mais en forte concentration avec l'Hypercarb ne semble donc pas comme on aurait pu le penser un réel handicap à l'obtention d'une sensibilité de détection des acides aminés correcte par SM et SM tandem.

La lente diminution de signal observée est sans doute imputable à un dépôt progressif de tensioactif sur la contre-électrode et à l'entrée de l'orifice: le champ électrique est perturbé ainsi que le passage des ions dans l'orifice. Cependant, dans la plupart des analyses mises au point nous ne percolerons pas une telle quantité de tensioactif puisque nous travaillerons en gradient d'élution avec des quantités décroissantes de tensioactif au cours du temps ce qui atténuera la perte de signal.

La question d'une possible contamination de l'appareil par ces tensioactifs se pose cependant. Cette contamination reste localisée au niveau de la source, de la contre électrode et au niveau de l'entrée de l'orifice. Les tensioactifs ne traversent pratiquement pas le rideau de gaz protecteur. De plus, de nature anionique, ils n'atteignent pas le premier quadripôle (Q0) dont le potentiel est négatif. Après utilisation prolongée, il suffit alors de nettoyer consciencieusement l'électrode, la contre-électrode et l'entrée de l'orifice. Cette opération est rapide car elle ne nécessite pas l'arrêt de l'appareil et donc aucune rupture du vide.

7) ANALYSE PAR CPL-SM DES 20 ACIDES AMINES PROTEIQUES.

3-1) Couplage direct de la méthode mise au point par CPL-DEDL

Nous appellerons système A, le système mis au point par CPL-DEDL.

3-1-a) Couplage

La figure IV-9 montre le couplage direct CPL-SM dans les mêmes conditions que l'analyse CPL-DEDL sur PGC présentée au chapitre III (figure III-15).

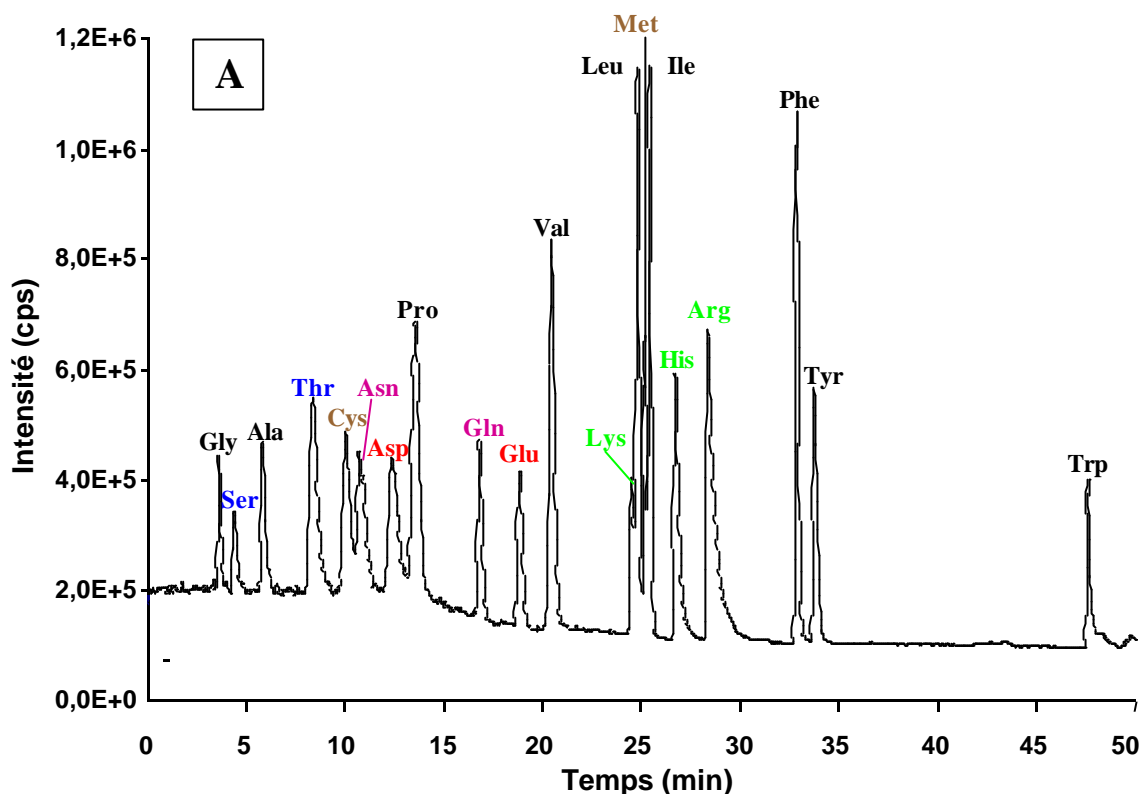
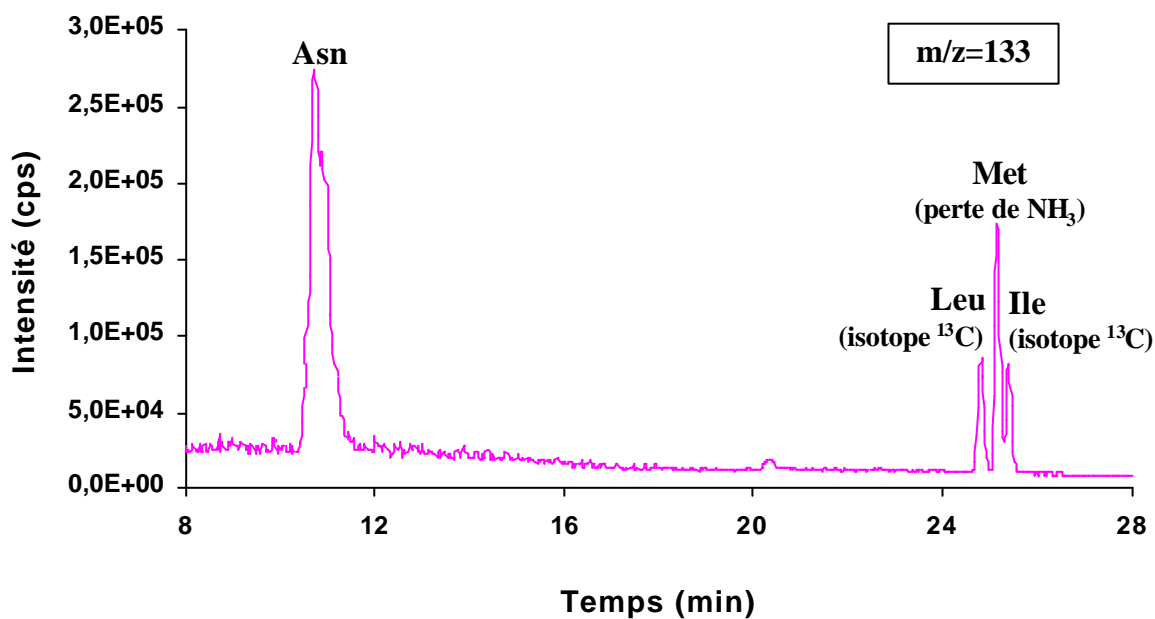
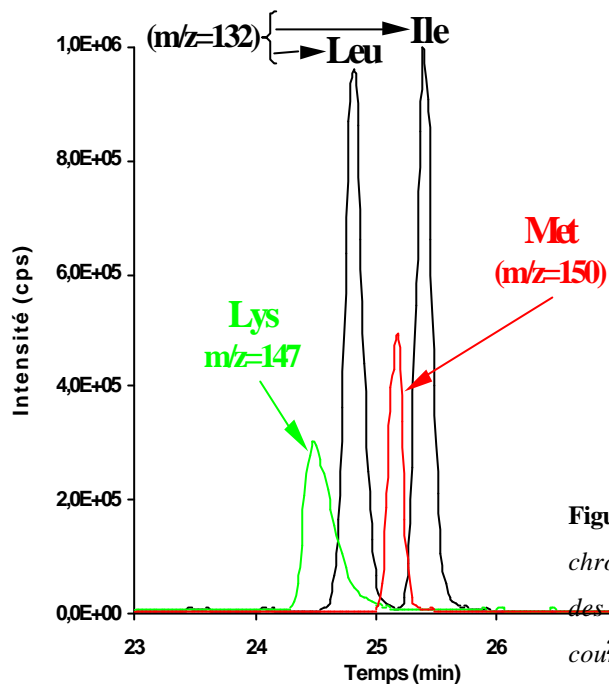


Figure IV -9: Analyse CPL-SM (ions sélectionnés) en gradient d'éluion sur PGC des 20 acides aminés protéiques non dérivés. Phase mobile: A= 20mM de NFPA en solution aqueuse. B= Acétonitrile. De 0% à 5% de B en 10 minutes, puis accroissement à 27% de B en 2 minutes. Ce mélange est maintenu pendant 17 minutes avant de passer à 70% de B en 5 minutes. Les 70% de B sont maintenus jusqu'à la fin de l'analyse. colonne: Hypercarb (100x2,1 mm DI) thermostatée à 10°C. Débit: 200µl/min. 1/10^e de la phase mobile est dirigée vers le spectromètre. Concentration injectée: 50 mg/l pour Pro, Leu, Ile, et 100mg/l pour les autres acides aminés. Volume injecté: 10µl. IonSpray: +5,0 kV, orifice: 20V, Anneau: 200V.

En règle générale, le DEDL conduit à l'obtention de pics plus fins que les autres détecteurs [20], ce qu'on observe par comparaison des figures IV-9 et III-15. On notera



la faible résolution entre les acides aminés du groupe formé de Lys, Leu, Met, et Ile. Leurs coélutions partielles n'entravent ni leur identification ni leur quantification comme le montre le chromatogramme d'ions extraits (figure IV-10). Leu et Ile sont détectés spécifiquement grâce au suivi du rapport $m/z=132$, Lys est suivi à $m/z=147$ et Met à $m/z=150$. Aucun autre ion n'interfère. Par contre, la figure IV-11 illustre l'intérêt de séparer le groupe d'acides aminés formé de Met, Leu et Ile pour une quantification de Asn.

3-1-b) Limites de détection

Le tableau IV-4 donne les limites de détections obtenues avec le système A. Ces limites varient d'un acide aminé à l'autre, pour trois raisons :

- Nous rappellerons dans un premier temps que chaque acide aminé possède son propre facteur de réponse. Les différences de réponse peuvent varier facilement d'un facteur 5 à 10 entre certains acides aminés en milieu aqueux (figure IV-2). Cette observation reste valable lorsque la phase mobile contient un modificateur organique (figure IV-6, exemple avec Val, Lys, Asp).
- Le bruit de fond chimique de la phase mobile varie selon les rapports m/z . Pour les acides aminés concernés, le rapport S/B est plus faible quand B est important. C'est le cas pour le rapport $m/z=133$ et explique la faible sensibilité de détection pour Asn.
- Les acides aminés élués dans la première partie du chromatogramme sont élués avec un fort pourcentage d'eau dans la phase mobile. De plus on note que le spray est moins stable en début d'analyse et qu'ainsi l'amplitude du bruit de fond est plus importante. En conséquence, les premiers acides aminés élués ont de mauvaises limites de détection. En revanche, l'apport d'acétonitrile confère une meilleure stabilité de spray et assure une meilleure désolvatation des ions. Les détections limites en fin de chromatogramme peuvent devenir excellentes (Leu, Ile, Phe).

Système A		
Acide Aminé	Pourcentage d'ACN dans le gradient	Limites de détection ($\mu\text{mol/l}$)
Gly	2%	25
Ser	↓	10
Ala		35
Thr		8
Cys		20
Asn		55
Asp	5%	25
Pro	↓	5
Gln	27%	15
Glu	↓	7
Val		4
Lys		15
Leu		2
Met		5
Ile		1
His		4
Arg	27%	3
Phe	70%	1
Tyr	↓	3
Trp	70%	10

Tableau IV-4: Limites de détection observées en couplage CPL-SM dans les conditions d'élution du système A correspondant à la figure IV-9. Le pourcentage d'acétonitrile est celui délivré par la pompe aux temps de rétentions des acides aminés (volume injecté: $10\mu\text{l}$, à une concentration de $1\mu\text{mol/l}$ injectée correspond une quantité de 10 pmol).

Ces limites de détection correspondent aux ordres de grandeur de celles obtenues avec le DEDL vis à vis des premiers acides aminés élués (voir p 152).

3-2) Réduction du temps d'analyse

La spécificité de la détection par spectrométrie de masse permet d'envisager des analyses plus rapides dès lors que les coélutions ont lieu avec des acides aminés particuliers.. Les coélutions interdites ont été établies au début de ce chapitre.

3-2-a) Mise au point d'une séparation minimale

La réduction du temps d'analyse peut être envisagée en jouant sur plusieurs paramètres:

- **La température:**

Le travail à température ambiante permet une élution plus rapide. La séparation ne dure plus que 40 minutes au lieu de 50 minutes à 10°C. Asn et Cys sont coéluées mais cette coélution ne posera ni de problème d'interprétation ni de dosage.

- **La concentration en tensioactif**

Compte tenu de la concentration élevée en tensioactif, on pourra chercher à réduire celle-ci. Inconvénient: il faudra garder longtemps une phase riche en eau pour maintenir assez de sélectivité entre les couples nécessitant une séparation. C'est le cas du couple Asn-Asp difficilement séparable à faible concentration de tensioactif. Cette concentration doit atteindre au minimum 10mM.

- **Le pourcentage d'acétonitrile**

L'ajout d'acétonitrile accroît la réponse du spectromètre de masse vis à vis des acides aminés et stabilise le spray. Les acides aminés sont élués plus rapidement. En conséquence, un accroissement plus rapide du pourcentage d'acétonitrile lors du gradient d'élution est aussi envisageable pour obtenir une analyse plus rapide et plus sensible.

L'accroissement du pourcentage d'acétonitrile dans les conditions présentées à la figure IV-12 constitue le système B. Le temps d'analyse est réduit à moins de 20

minutes tout en conservant assez de sélectivité entre les acides aminés qui doivent être séparés. Les 10 premiers acides aminés sont élués en 3 minutes environs mais la figure IV-14 montre que les coélutions existantes ne posent pas de problèmes particuliers pour la détection SM. Pour une concentration de 50 mg/l injectée, Leu et Ile sont à peine assez résolus ($R_s=1,0$) mais la résolution devient satisfaisante lorsque la concentration de ces deux composés diminue.

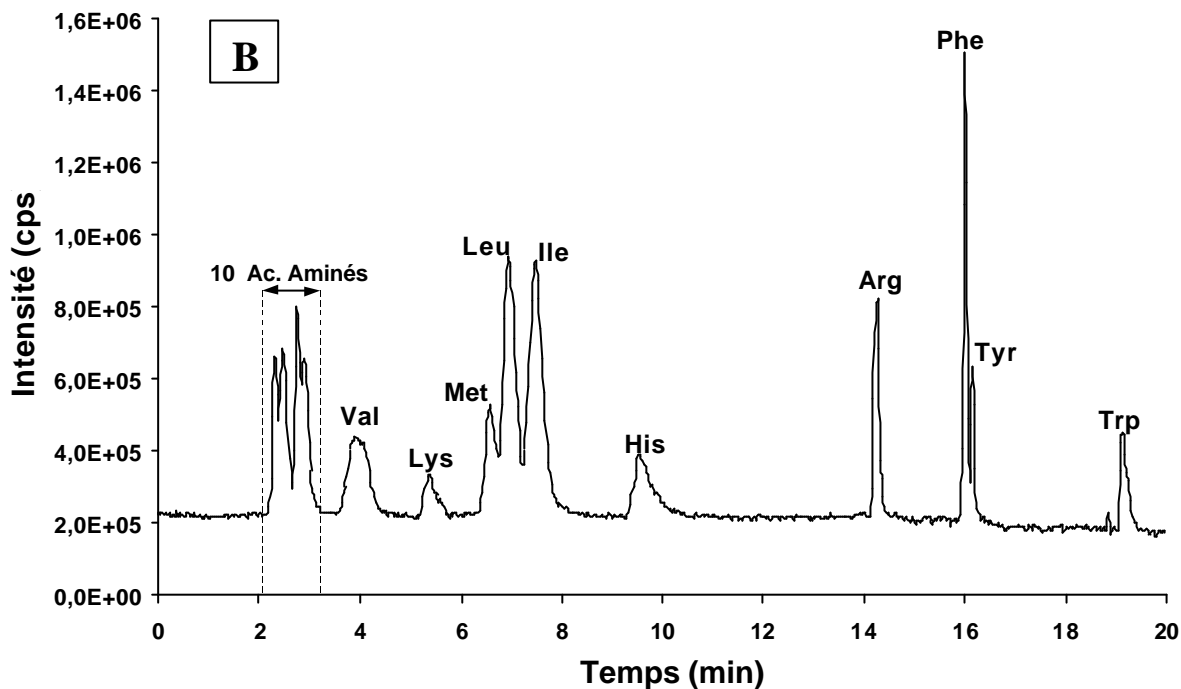


Figure IV-12: Analyse CPL-SM (ions sélectionnés) en gradient d'éluion sur PGC des 20 acides aminés protéiques non dérivés. Phase mobile: A= 20mM de NFPA en solution aqueuse. B= Acétonitrile. De 10% à 20% de B en 1 minute, puis accroissement à 72% de B en 7 minutes puis passage à 90% de B en 1 minute. Les 90% de B sont maintenus jusqu'à la fin de l'analyse. colonne: Hypercarb (100x2,1 mm DI) à température ambiante. Débit: 200 μ l/min. 1/10^e de la phase mobile est dirigé vers le spectromètre. Concentration injectée en chaque acide aminé: 50 mg/l. . Volume injecté: 10 μ l. IonSpray: +5,0 kV, orifice: 20V, Anneau: 200V.

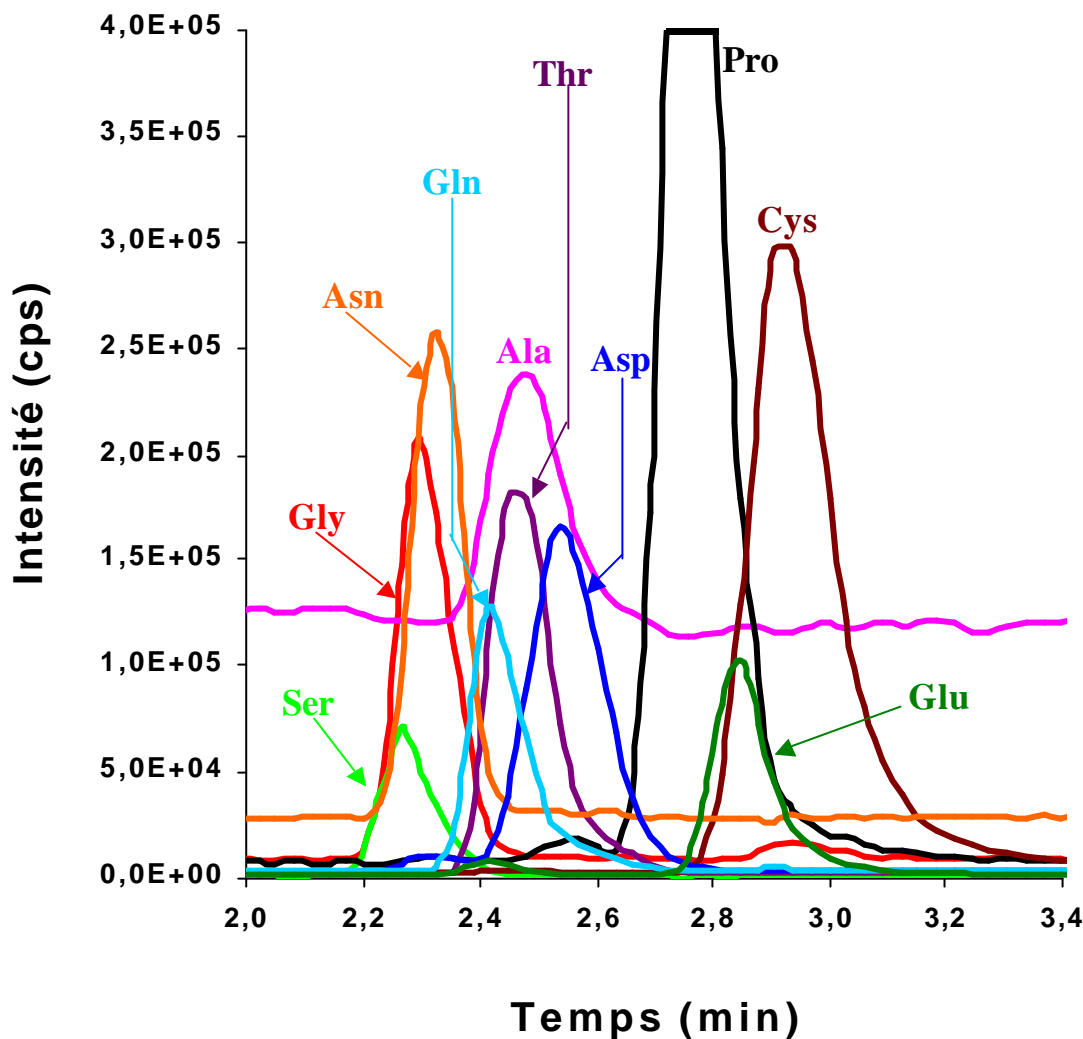


Figure IV-13: Superposition des chromatogrammes d'ions extraits correspondant aux 10 acides aminés les plus rapidement élués sur le système B.

3-2-b) Limites de détection

L'augmentation rapide du pourcentage d'acétonitrile et son introduction dès le début du gradient à une concentration de 10% favorise l'augmentation du rapport S/B des acides aminés élués dans la première partie du chromatogramme.

Les limites de détection avec ce nouveau système (B) sont consignées dans le tableau IV-5 et comparées aux précédentes (A). Elles correspondent à des quantités injectées (10 μ l) de l'ordre de la centaine de picomoles (Gly, Ala) à la dizaine de picomoles (Tyr, Ile, Leu).

Acides aminé	Limites de détection ($\mu\text{mol/l}$)	
	Système A (Analyse CPL-SM en 50 minutes)	Système B (Analyse CPL-SM en 20 minutes)
Gly	25	6
Ser	10	3
Ala	35	10
Thr	8	3
Cys	20	5
Asn	55	8
Asp	25	3
Pro	5	2
Gln	15	4
Glu	7	2
Val	4	4
Lys	15	8
Leu	2	1
Met	5	4
Ile	1	1
His	4	4
Arg	3	2
Phe	1	1
Tyr	3	1
Trp	10	3

Tableau IV-5: Limites de détection comparées pour les deux systèmes d'éluion A (analyse CPL-SM en 50 minutes) et B (analyse CPL-SM en 20 minutes). Volume d'injection: 10 μl .

8) ANALYSE DES 20 ACIDES AMINES EN CPL-SM TANDEM

La séparation présentée au paragraphe précédent constitue la séparation minimale à maintenir pour résoudre les 20 acides aminés protéiques par SM tandem. Une augmentation plus rapide du pourcentage d'acétonitrile nuirait totalement à la séparation de Leu-Ile, mais aussi de Glu-Gln et Asp-Asn. Cependant, si nous ne pouvons pas réduire

plus ce temps d'analyse, nous allons essayer d'utiliser la spécificité de la détection SM tandem pour:

1. améliorer les limites de détection.
2. permettre l'analyse d'échantillons complexes.

4-1) Gain de sélectivité de détection et amélioration du rapport S/B

Le bruit de fond chimique est le plus important et donc le plus défavorable à une bonne détection pour les faibles masses (rapports $m/z < 250$ à 300 selon la phase mobile). Or, les acides aminés protéiques possèdent tous une masse moléculaire inférieure à 205 Th. La spectrométrie de masse tandem permet une fragmentation des ions responsables de ce bruit de fond enregistré sur le premier quadripôle. Le quadripôle Q3 n'est alors réglé que pour la détection de la masse d'un fragment de l'acide aminé et non pas pour la détection des fragments issus d'autres espèces. Le bruit de fond chimique est alors quasiment éliminé et les rapports S/B s'accroissent.

Le tableau IV-6 illustre ces propos. Par rapport à la détection en SM, la détection en SM tandem montre des intensités de signaux plus faibles pour une amplitude du bruit de fond plus faible également. L'amplitude du bruit de fond diminue plus rapidement que celle du signal et on observe alors, pour une même espèce, pour une même concentration injectée, un meilleur rapport S/B, c'est à dire une sensibilité accrue.

Le gain de sensibilité dépendra de l'importance du fragment choisi à une énergie de collision donnée (Annexe IV) mais aussi du bruit de fond résiduel. Ainsi pour certains acides aminés, le gain de sensibilité est faible. C'est le cas de la glycine dont le fragment ($m/z=30$) n'est jamais très intense quelle que soit la gamme d'énergie de collision balayée. La sensibilité de détection pour la glycine est seulement multipliée par 2 environ lorsqu'on passe d'une détection MS à une détection MS tandem. En revanche, pour d'autres acides aminés, la sensibilité peut être multipliée par 5 (Ser), 7 (Gln, Lys), voire beaucoup plus (34 fois pour Phe).

Acide aminé	SM				SM/SM			
	m/z(Q1)	Bruit (B)	Signal (S)	S/B	m/z(Q1/Q3)	Bruit (B)	Signal (S)	S/B
Gly	76	2000	10000	3	76/30	30	230	8
Ser	106	400	3570	9	106/60	40	1920	48
Pro	116	1000	20700	21	116/70	100	6460	65
Gln	147	800	5050	6	147/130	50	2300	46
Lys			2400	3			1070	21
Phe	166	1500	15000	10	166/120	20	6770	339

Tableau IV-6: Comparaison des sensibilités obtenues par détection SM et SM tandem. Conditions chromatographiques de la figure IV-12. Concentration injectée: 1mg/l. Les valeurs des rapports S/B ont été arrondies

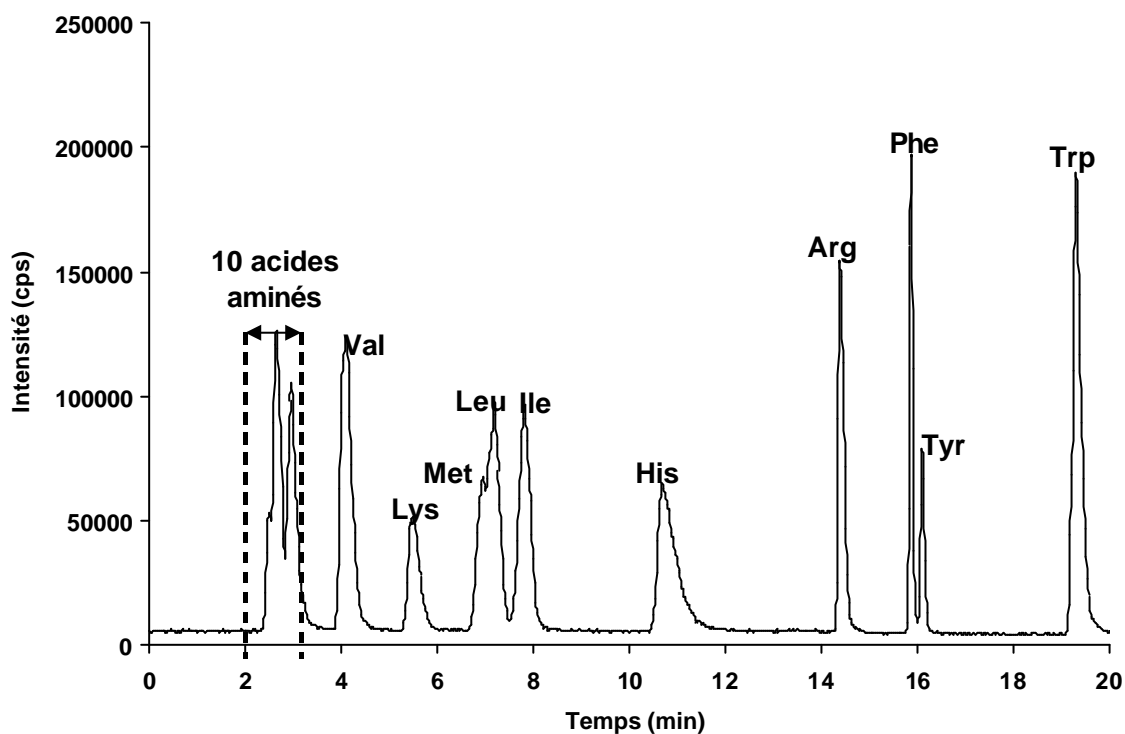


Figure IV-14: Analyse CPL-SM tandem (ions sélectionnés) en gradient d'élution sur PGC des 20 acides aminés protéiques non dérivés. Conditions chromatographiques identiques à celles de la figure IV-12. Energie de collision: 15eV.

4-2) Limites de détection

La figure IV-14 montre le profil obtenu en CPL-SM tandem avec le même gradient d'élution qu'au paragraphe précédent.

Ac. aminé	Limites de détection ($\mu\text{mol/l}$)		
	Système A (Analyse CPL en 50 min)	Système B (Analyse CPL en 20 min)	
	SM	SM	SM tandem
Gly	25	6	3
Ser	10	4	0,9
Ala	35	10	1
Thr	8	3	0,3
Cys	20	5	2
Asn	55	8	4
Asp	25	3	0,8
Pro	5	2	0,4
Gln	15	4	0,5
Glu	7	2	0,4
Val	4	4	0,4
Lys	15	7	1
Leu	2	2	0,4
Met	5	5	2
Ile	1	1	0,4
His	4	4	2
Arg	3	2	0,8
Phe	1	1	0,03
Tyr	3	1	0,05
Trp	10	3	0,05

Tableau IV-7: Limites de détections obtenues en CPL-SM simple ou en tandem pour l'analyse d'un mélange des 20 acides aminés utilisant le système d'élution A ou B. Volume d'injection: 10 μl .

Le gain de sélectivité de détection par rapport au bruit de fond chimique améliore considérablement certaines limites de détection (tableau IV-7) qui pouvaient nous apparaître comme plutôt moyennes avec les systèmes CPL "A et B" utilisant la détection SM simple. Celles-ci deviennent donc très bonnes avec le système CPL "B" utilisant la détection SM tandem et atteignent des limites voisines de celles observées avec des méthodes utilisant les dérivations post-colonne avec une détection UV [21]. Cependant, ces dizaines de picomoles détectées restent encore supérieures aux limites atteintes (fmol) avec les systèmes utilisant une détection fluorométrique.

9) APPLICATION de L'ANALYSE CPL-SM TANDEM à la CARACTERISATION d'un MOÛT DE FERMENTATION

La figure IV-15 montre une application de notre méthode à la détermination des acides aminés protéiques dans un moût de fermentation riche en acide glutamique (concentration supérieure à 8000 mg/l), sucres et ammoniacque. En suivant spécifiquement le courant ionique correspondant à chaque acide aminé, nous avons pu déterminer la présence de 14 d'entre eux sans ambiguïté. Leur quantification peut d'ores et déjà être envisagé. Certains semblent abondants comme Ala et Pro alors que Gly, Ser et Cys ne semblent pas présents dans l'échantillon: leur quantité est peut être inférieure à leur limite de détection. 5 acides aminés (Val, Leu, Ile, Met et Gln) ne peuvent être quantifiés pour l'instant pour trois raisons:

- La matrice est complexe et en dépit de la détection SM tandem, il existe encore certaines interférences avec des composés d'origine inconnue pour la leucine, l'isoleucine et la méthionine.
- La valine interfère avec un composé isomère, la bétaine $[(\text{CH}_3)_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COOH}]$, de fragmentation identique à la valine.
- La détection de la glutamine est perturbée par la présence en quantité très importante d'acide glutamique.

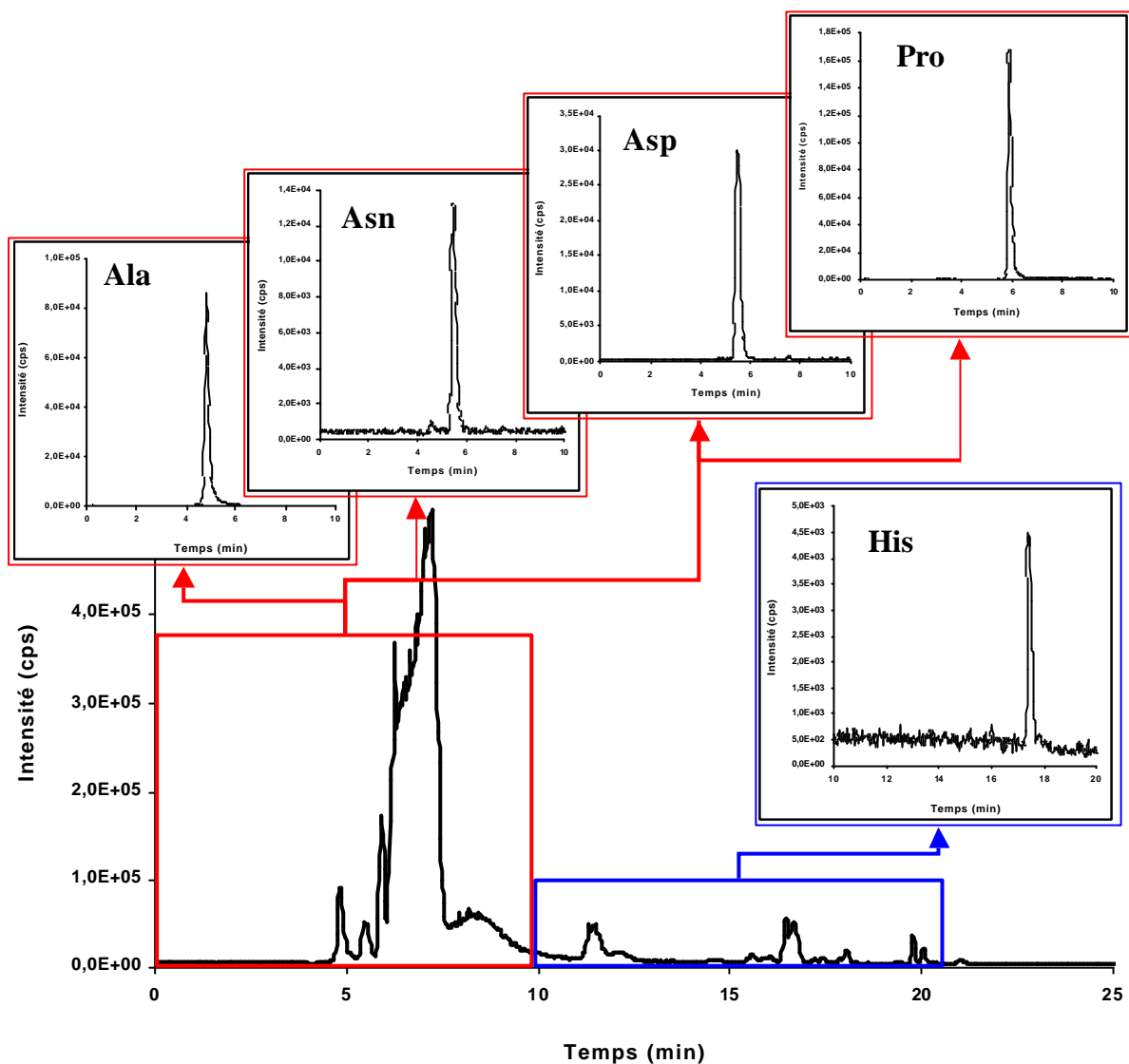


Figure IV-15: Recherche des 20 acides aminés protéiques dans un moût de fermentation riche en acide glutamique par CPL-SM tandem. L'extraction des courants ioniques des seuls acides aminés à partir du courant ionique total (en mode ions sélectionnés), permet l'identification sans ambiguïté de 14 acides aminés. 5 de ces chromatogrammes en courant ionique extrait (Ala, Asn, Asp, Pro, His) sont représentés sur cette figure. Le profil du gradient utilisé est identique à celui de la figure IV-14 mais l'utilisation d'une précolonne Hypercarb pour protéger la colonne analytique allonge le temps d'analyse (25 minutes).

B] ANALYSE CPL-SM d'ACIDES AMINES SOUFRES chez des INVERTEBRES issus de MILIEUX MARINS ---

Cette application permet de tester les potentialités des systèmes séparatifs utilisant l'Hypercarb et des phases mobiles aqueuses contenant des sels volatils avec une détection par spectrométrie de masse, y compris d'un point de vue quantitatif.

1) LA VIE AU VOISINAGE DES DORSALES OCEANIQUES

La vie dans les très grandes profondeurs océaniques est connue depuis les années 50 mais c'est au printemps 1977, avec les plongées du sous-marin américain "alvin" dans le cadre d'étude de la formation des nouvelles croûtes océaniques, que celle-ci est réellement révélée [22]. Ce fourmillement de vie (moules, crabes, poissons...) est localisé à la proximité de sources d'eau chaudes dans des milieux riches en sulfure d'hydrogène et d'oxygène comme les dorsales océaniques. Dans de tels milieux hostiles, dépourvus de lumière, une grande partie des animaux vivants ne doivent leur salut qu'à une vie en symbiose avec des bactéries [23] possédant une activité chimiolithoautotrophe. Ces bactéries symbiotes fabriquent du carbone organique (sous forme de "carbohydrates") à partir de carbone minéral (CO₂) en l'absence de radiation lumineuse (au contraire de la photosynthèse des végétaux). Les bactéries tirent l'énergie nécessaire à la fixation du carbone de l'oxydation des sulfures [24]. Cependant, les sulfures sont toxiques (blocage de l'hémoglobine) et doivent être véhiculés jusqu'aux bactéries et échangés à l'intérieur de l'organisme sous une autre forme [23]. Un grand nombre de composés organiques soufrés se retrouvent donc en quantité inhabituelle dans ces organismes. Parmi eux, nous chercherons plus spécifiquement la taurine et certains de ses analogues (tableau IV-8). Parmi ces 5 acides aminés soufrés, seules la taurine, l'hypotaurine et la thiotaurine ont été caractérisés chez ces animaux. Ces trois composés sont supposés être des molécules clés dans le transport du soufre à l'intérieur de ces organismes et ils représentent un pourcentage important (parfois supérieur à 50%) de la fraction des acides aminés libres [25].

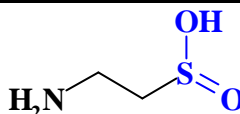
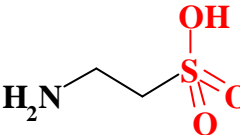
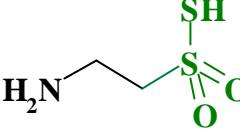
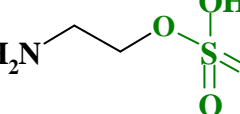
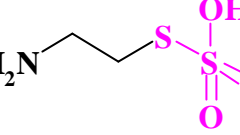
Noms	Symboles	Formules	Masses moléculaires (g/mol)
Hypotaurine (Acide 2-aminoéthyl sulfonique)	Hpt		109
Taurine (Acide 2-aminoéthyl sulfonique)	Tau		125
Thiotaurine (Acide 2-aminoéthyl thiosulfonique)	Tht		141
2-AminoEthyl HydrogenoSulfate	2-AEHS		141
2-AminoEthyl ThioSulfate	2-AETS		157

Tableau IV-8: Noms, symboles utilisés, formules et masses moléculaires des acides aminés soufrés étudiés.

2) METHODES D'ANALYSE

La taurine et ses analogues sont donc des acides aminés dépourvus de chromophores comme la plupart de leurs homologues protéiques. De même que pour ces derniers, la détermination de ces acides aminés soufrés fait appel quasi exclusivement à des méthodes analytiques utilisant la dérivation pré- ou post-colonne [26-31]. Rares sont les protocoles qui échappent à ces processus de détection. On trouvera cependant l'utilisation de la détection électrochimique pour la détermination de l'hypotaurine [32] ou de la taurine [33]. Récemment, la spectrométrie de masse (avec l'électrospray comme source d'ionisation) a été utilisée pour la mise en évidence de la taurine dans des échantillons biologiques (*Aplisia californica*)[34].

L'analyse de la thiotaurine concerne surtout la détermination de ce composé au sein d'invertébrés marins des grandes profondeurs (*Bathymodiolus sp.*, *Calypptogena sp.*)

[35, 37]. Les méthodes utilisées n'échappent pas à la détection par dérivation et requièrent quelques fois un traitement spécial alourdissant l'analyse (réduction par cyanolyse) [35].

En général, les méthodologies CPL utilisées sont longues (40 à 60 minutes) car les matrices analysées contiennent entre autres des acides aminés protéiques libres (et non protéiques) qui sont également dérivés. Ceci implique alors la mise au point de méthodologies séparatives très résolutive, donc longues. A titre d'exemple, le tableau IV-9 fournit la fourchette de concentrations dans laquelle les acides aminés sont observés chez les invertébrés marins que nous désirons analyser. Quelles que soient les espèces analysées, l'alanine et la glycine sont toujours les deux acides aminés les plus abondants. Les concentrations en acides aminés libres varient beaucoup d'un invertébré à l'autre comme au sein d'une même espèce [36]. Dans un même animal, elles varient aussi d'un organe à l'autre.

Concentration de quelques acides aminés protéiques libres dans les tissus de certains invertébrés marins*			
Acide aminé	$\mu\text{mol/g}^{**}$	Acide aminé	$\mu\text{mol/g}^{**}$
Asp	2 à 30	Ile	0 à 7
Thr	1 à 26	Leu	1 à 12
Ser	2 à 41	Tyr	2 à 98
Glu	11 à 128	Phe	0 à 13
Gly	50 à 284	His	1 à 7
Ala	27 à 136	Lys	0 à 14
Val	0 à 13	Arg	7 à 20

Tableau IV-9: Fourchette des concentrations en acides aminés protéiques libres chez les invertébrés marins vivant aux abords de dorsales océaniques. *Ces compositions concernent les genres *Calypptogena*, et *Bathymodiolus*. ** Les concentrations sont rapportées à la masse de matière sèche de l'échantillon. D'après [35,36].

Nous avons vu, au chapitre II-C, la mise au point par CPL-DEDL d'une séparation rapide (moins de 10 minutes) de la taurine et de ses analogues. Cette méthodologie n'est pas applicable directement aux matrices complexes car le DEDL n'est pas spécifique et il ne peut pas ne doser que les acides aminés soufrés au sein des échantillons. En revanche, nous allons essayer d'appliquer cette méthode séparative en combinaison avec la spécificité de

détection apportée par la spectrométrie de masse simple ou en tandem pour essayer de résoudre ce problème de façon rapide et sensible.

3) ANALYSE PAR CPL-SM

3-1) Transposition du système mis au point par CPL-DEDL

Le système séparatif que nous nous proposons de coupler utilise une phase mobile aqueuse contenant 10mM d'acétate d'ammonium ajustée à pH 9,3 par de l'ammoniaque. Même si cette phase est volatile, elle n'est pas idéale pour le couplage avec la SM car elle ne contient pas de modificateur organique et contient une grande quantité de sels qui provoquent des phénomènes de suppression ionique [16]. Néanmoins, comme le

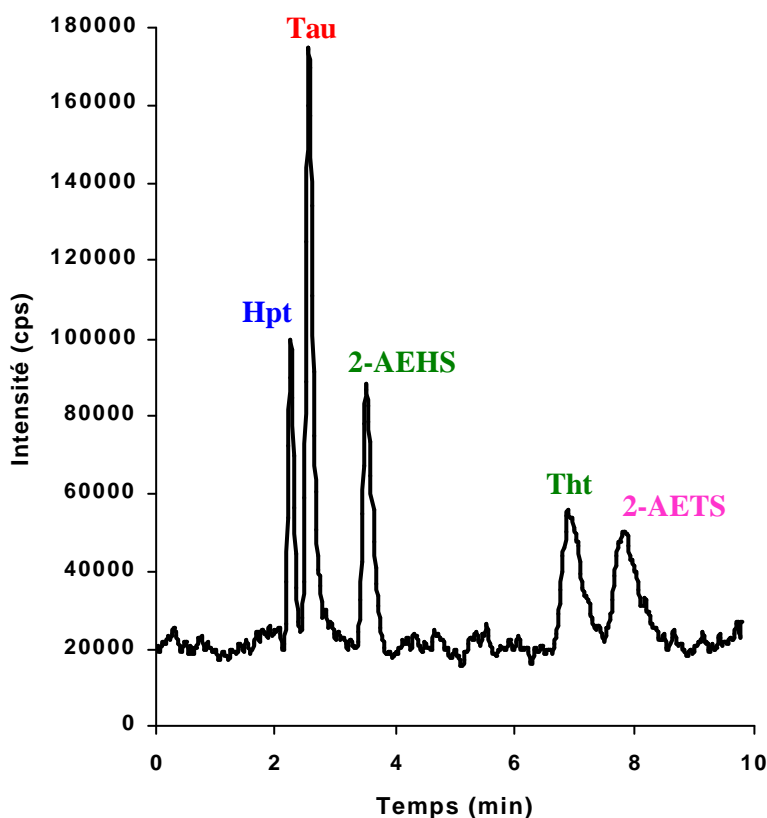


Figure IV-16: Analyse CPL-SM (ions sélectionnés) montrant l'utilisation directe du système séparatif mis au point par CPL-DEDL sur PGC pour l'analyse des acides aminés soufrés sans dérivation.. Colonne Hypercarb (100 x 2,1 mm D.I). Phase mobile: tampon acétate d'ammonium 10mM ajusté à pH=9,3 par de l'ammoniaque. Débit: 200 μ l/min. Division du flux: 1/10. Standards à 20mg/l. Volume injecté: 10 μ l. IonSpray mode négatif: -4,0 kV, Orifice: -15V, Anneau de focalisation: -150V.

montre la figure IV-16, le système est tout à fait transposable directement lorsque des faibles débits sont utilisés. Une colonne de faible diamètre interne (2,1 mm), un débit de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ conjugués à une division par 10 du flux chromatographique arrivant à la source IonSpray convient parfaitement.

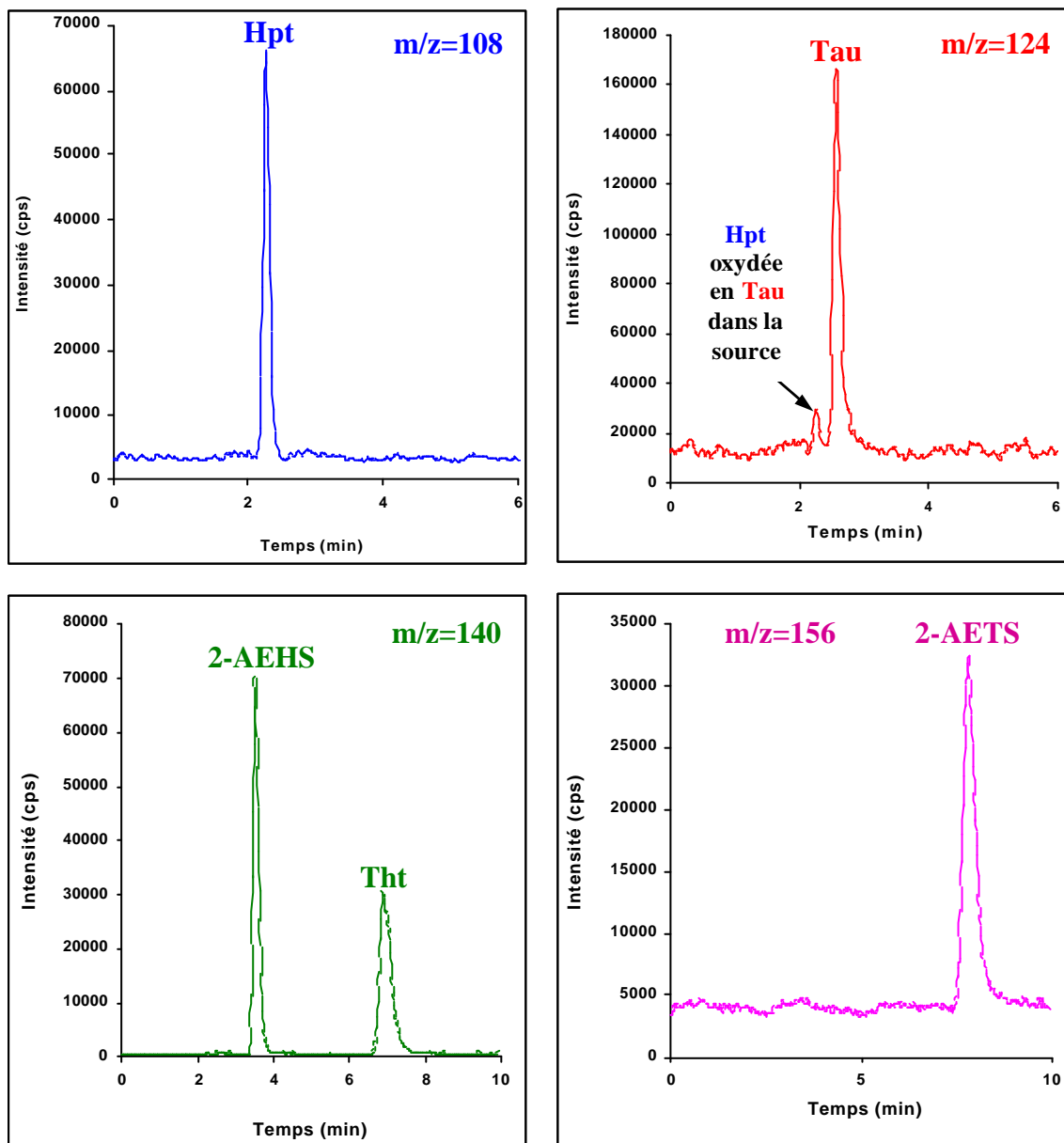
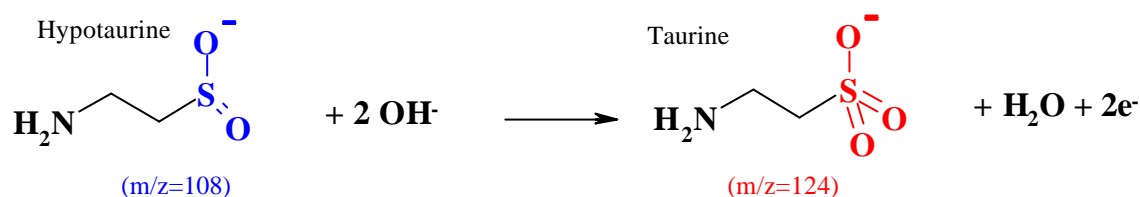


Figure IV-17: Chromatogrammes de courants ioniques extraits de l'analyse CPL-SM sur PGC des acides aminés soufré sans dérivation, présentée à la figure IV-16.

La phase mobile basique constitue un milieu propice à la déprotonation des molécules. C'est pour cette raison que l'ionisation (par IonSpray) aura lieu en mode négatif (-4,0 kV) ce qui apporte ici environ 10 fois plus de sensibilité pour la

thiotaurine, 20 fois pour la taurine et 40 fois pour l'hypotaurine que le mode positif. Cette même tendance avait été observée pour la taurine par Lilliard et coll. [34].

La figure IV-17 montre les chromatogrammes d'ions sélectionnés. La thiotaurine doit être séparée du 2-AEHS car ils possèdent la même masse moléculaire ($m/z=140$ pour l'ion $[M-H]^-$). On note sur le chromatogramme de courant ionique extrait à $m/z=124$, correspondant au rapport m/z de la taurine déprotonée, un petit pic correspondant à la rétention de l'hypotaurine. Ce pic s'explique par une possible oxydation de l'hypotaurine dans la source pour donner de la taurine en milieu basique selon l'équation suivante.



Ce phénomène sera confirmé en détection par SM tandem. Le signal d'oxydation correspond à peu près à 10 % du signal produit par les molécules non oxydées lorsque la phase mobile contient 10mM d'acétate d'ammonium. La totalité de l'hypotaurine s'oxyde en taurine lorsque la phase mobile ne contient plus que 5 mM d'acétate d'ammonium. En conséquence, même si Hpt et Tau n'ont pas la même masse moléculaire, une sélectivité suffisante devra être maintenue. Cette oxydation n'est cependant pas surprenante puisque l'ionisation de certaines molécules par électronebulisation s'effectue sur des principes d'oxydoréduction [16].

3-2) Analyse d'acides aminés soufrés dans une matrice avec une détection SM simple

Les matrices d'invertébrés que nous allons analyser sont des milieux complexes contenant, entre autre, comme nous l'avons déjà vu beaucoup d'acides aminés protéiques dont certains seront quasiment coélusés avec l'hypotaurine (Ala, Pro), la taurine (Ser, Thr) ou la thiotaurine (Leu, Ile). Par chance, aucune masse moléculaire de ces acides aminés déprotonés ne correspond à la masse d'un des acides aminés soufrés. Malheureusement, il peut exister de nombreux interférants dont nous ne connaissons pas la nature.

Des 5 acides aminés soufrés, seules l'hypotaurine, la taurine et la thiotaurine seront présentes dans nos matrices et nous ne nous intéresserons plus qu'à ces trois composés (le 2-AEHS pourra à l'occasion servir d'étalon interne pour les dosages).

La figure IV-18 montre le chromatogramme CPL-MS d'une matrice (*Calyptogena sp.*, île de la Barbade) en suivi d'ions sélectionnés. Le chromatogramme laisse apparaître 3 pics à des temps de rétention correspondant pour A à l'hypotaurine, pour B à la taurine et pour C à la thiotaurine.

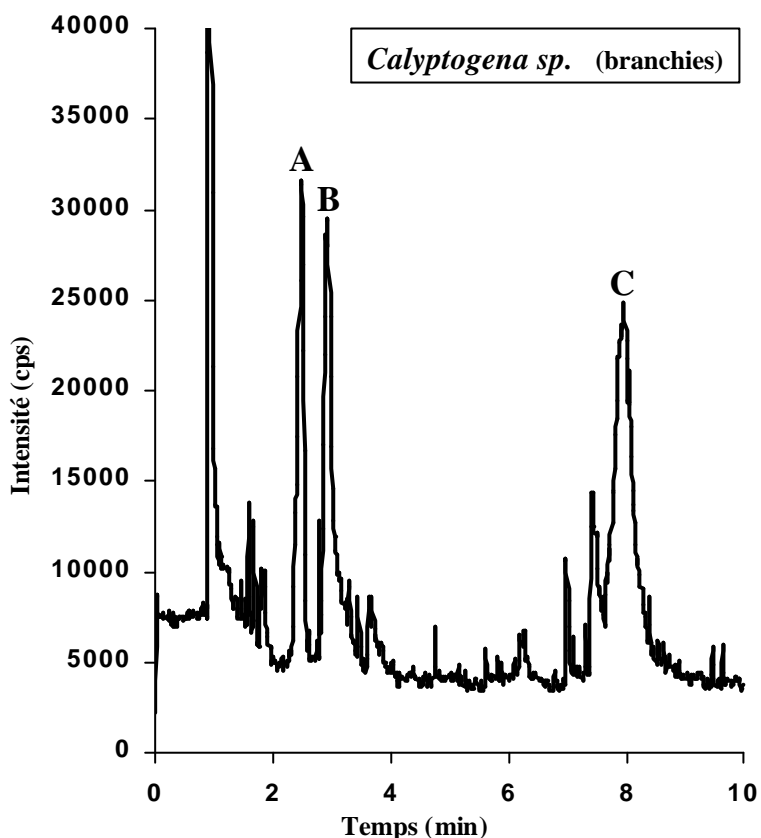


Figure IV-18: CPL-SM (courant ionique total composé des ions sélectionnés $m/z=108$, 124 et 140) sur PGC d'un extrait de branchies de *Calyptogena sp.* de la Barbade. Conditions chromatographiques identiques à celles de la figure IV-16 à l'exception de l'emploi d'une précolonne de protection (Hypercarb). Les pics A, B, C correspondent aux temps de rétention de Hpt, Tau et Tht respectivement

En extrayant chaque signal (figure IV-19), il apparaît que le pic A n'est pas de l'hypotaurine (pas de signal pour le rapport $m/z=108$) mais un autre composé (ou fragment de composé) de rapport $m/z=140$. Grâce à la chromatographie nous séparons ce dernier de la thiotaurine ($t_r=8$ minutes). Au rapport $m/z=124$, on observe la présence de taurine mais le signal est bruité.

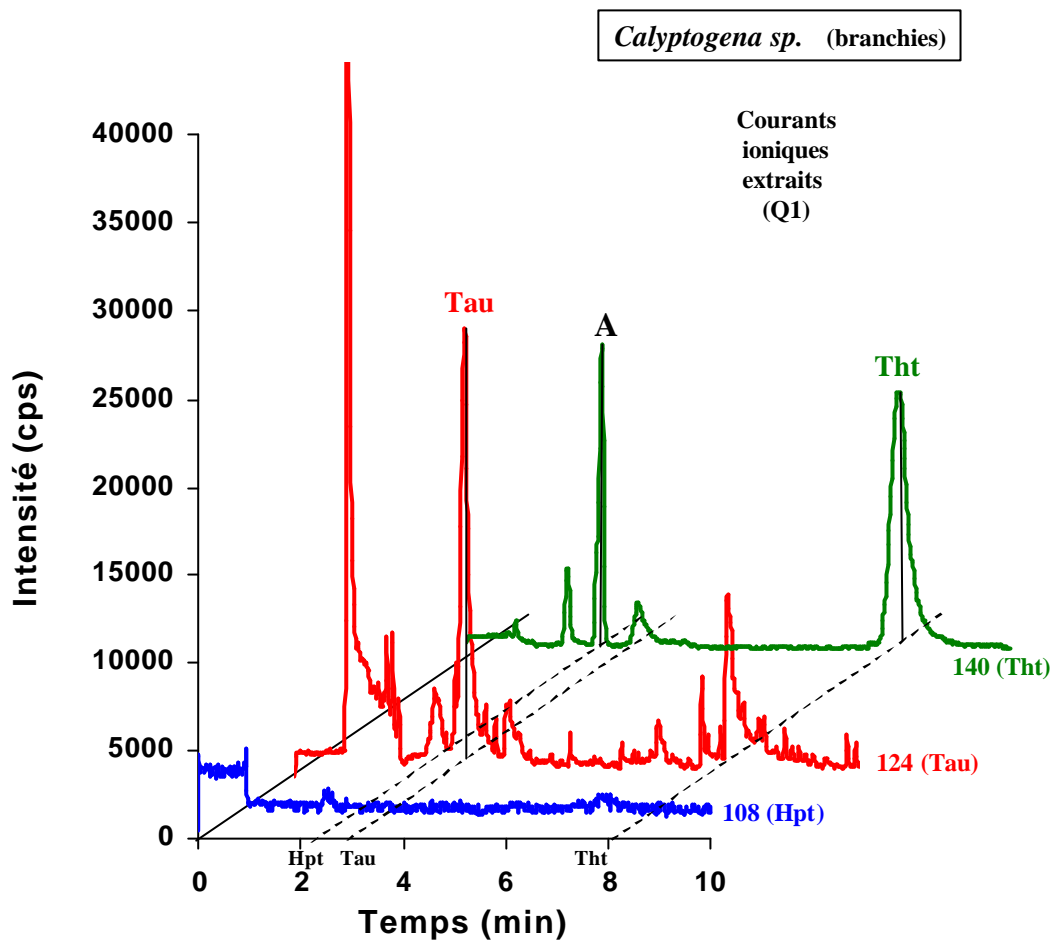


Figure IV-19: Chromatogrammes d'ions sélectionnés (courants ioniques extraits) de l'analyse CPL-SM de l'échantillon présentée à la figure IV-18.

Pour éviter toute erreur dans le dosage de ces 3 composés (présence de composés interférants et non séparés) chez ces invertébrés et pour améliorer les limites de détection (1 à 2 mg/l seulement pour les 3 composés en MS simple), nous allons utiliser la spectrométrie de masse tandem.

4) ANALYSE PAR CPL-SM TANDEM

4-1) Fragmentation de la taurine et de ces analogues

La première étape consiste à déterminer les fragments de chacun des composés

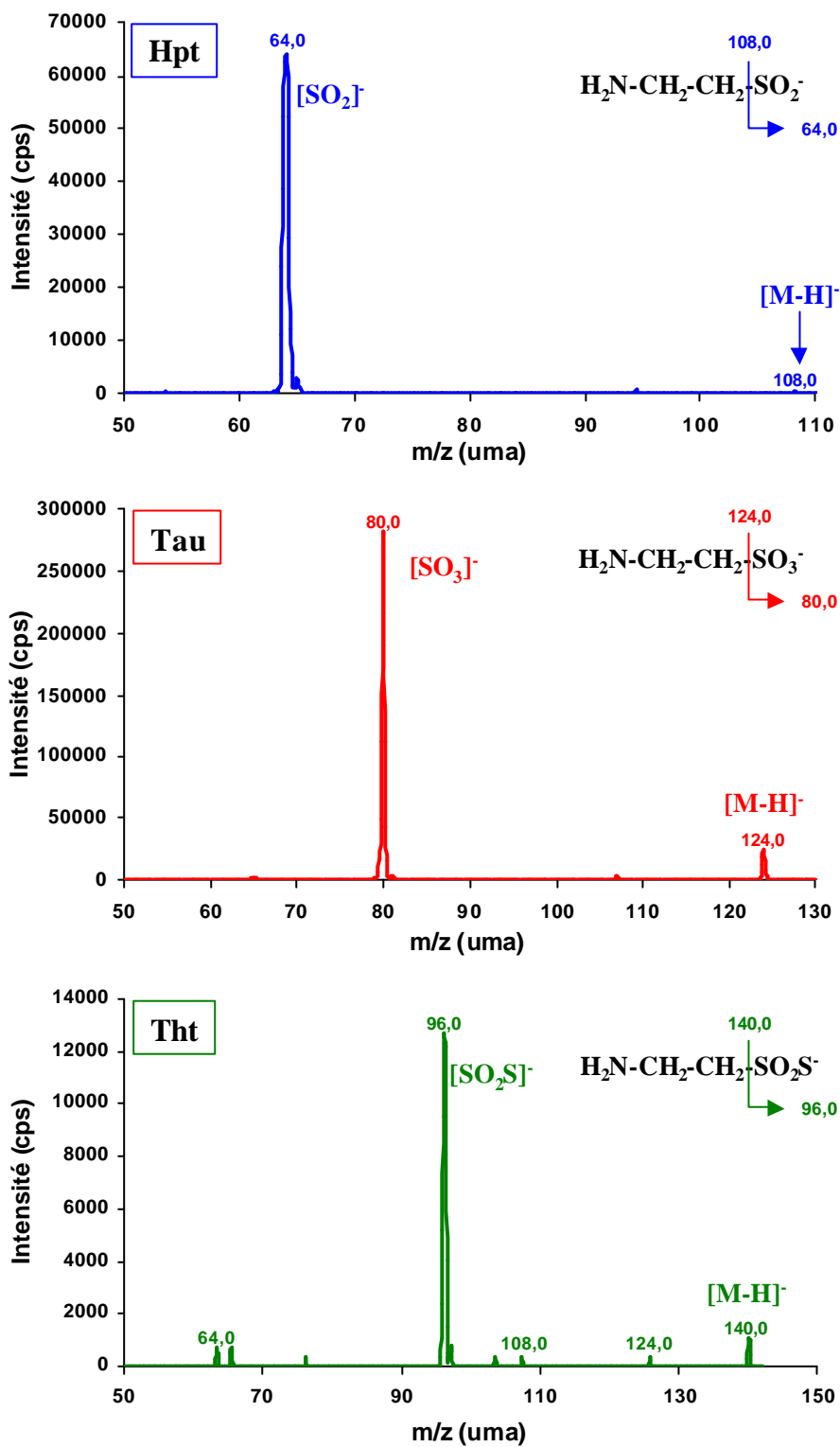


Figure IV-20: Fragmentation en mode négatif (IS: -4kV) de l'hypotaurine, la taurine et la thiotaurine à l'aide d'une énergie de collision de 25eV. Infusion à 5µl/min de solutions à 100 mg/l environ dans un tampon acétate d'ammonium 10mM ajusté à pH=9,3.

(figure IV-20) et à optimiser l'énergie de collision pour avoir la sensibilité maximale (figure IV-21). Nous choisirons de travailler à 26 eV, pour conserver un maximum de sensibilité sur l'hypotaurine (composé à la plus faible réponse)

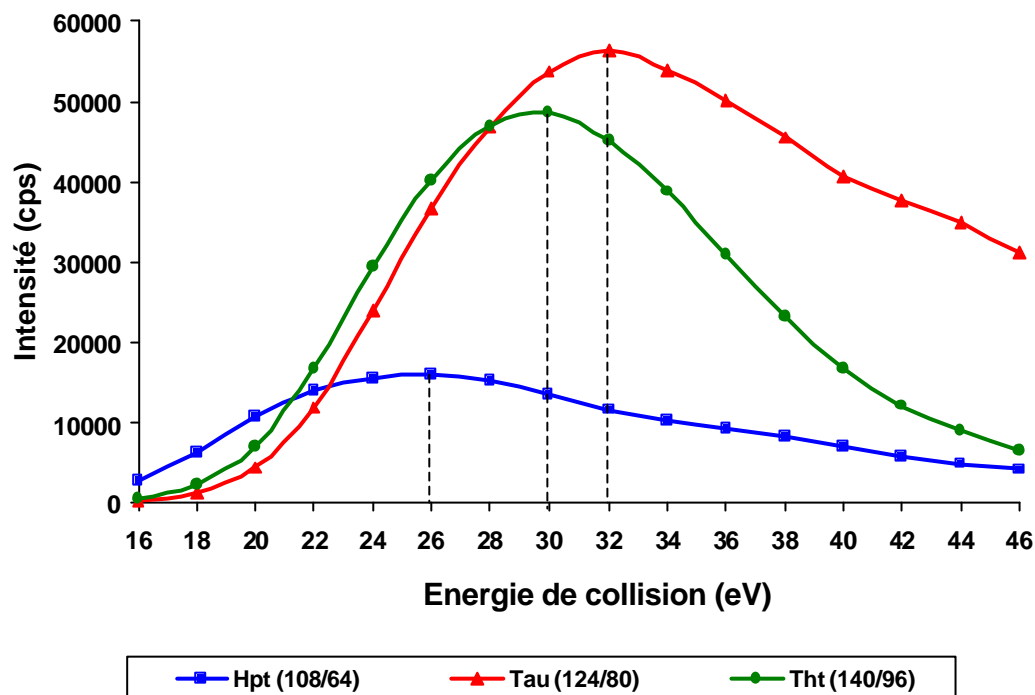


Figure IV-21: Intensité des fragments en fonction de l'énergie de collision pour Hpt, Tau et Tht. IonSpray en mode négatif: -4kV. Infusion à 5 µl/min des acides aminés soufrés à 25 mg/l dans un tampon acétate d'ammonium 10mM ajusté à pH=9,3 par de l'ammoniaque.

La spectrométrie de masse tandem joue son rôle dans l'amélioration des limites de détection lors de l'analyse en couplage et les limites de détections observées sont de l'ordre de 50 µg/l, c'est à dire environ 0,4 µmol/l pour les 3 acides aminés d'intérêt.

4-2) Amélioration de l'intensité du signal et la stabilité du spray

Si les limites de détections observées sont déjà bonnes, celles-ci peuvent encore être améliorées.

En dépit d'une certaine compatibilité, le spray aqueux est plus instable qu'un spray contenant un modificateur organique et la désolvatation des ions y est plus difficile.

Pour améliorer la désolvatation des ions dans le spray, nous pouvons introduire une certaine proportion de solvant organique. Pour ne pas bouleverser la séparation, différents alcools ont été introduits sous forme de liquide additionnel à la seule nébulisation par le montage présenté à la figure IV-22. Ce montage déjà utilisé en électronebulisation de solutions aqueuses [38] n'est en général plus employé en CPL depuis l'apparition de l'assistance pneumatique. Nous conjuguons ici deux effets: assistance pneumatique et réduction de la tension de surface des gouttelettes. L'acétonitrile en tant que liquide additionnel est déconseillé car il dissout la gaine de polyimide qui recouvre le capillaire en silice fondue ce qui risque d'engendrer une pollution dans un premier temps et une fragilité du capillaire dans un deuxième temps.

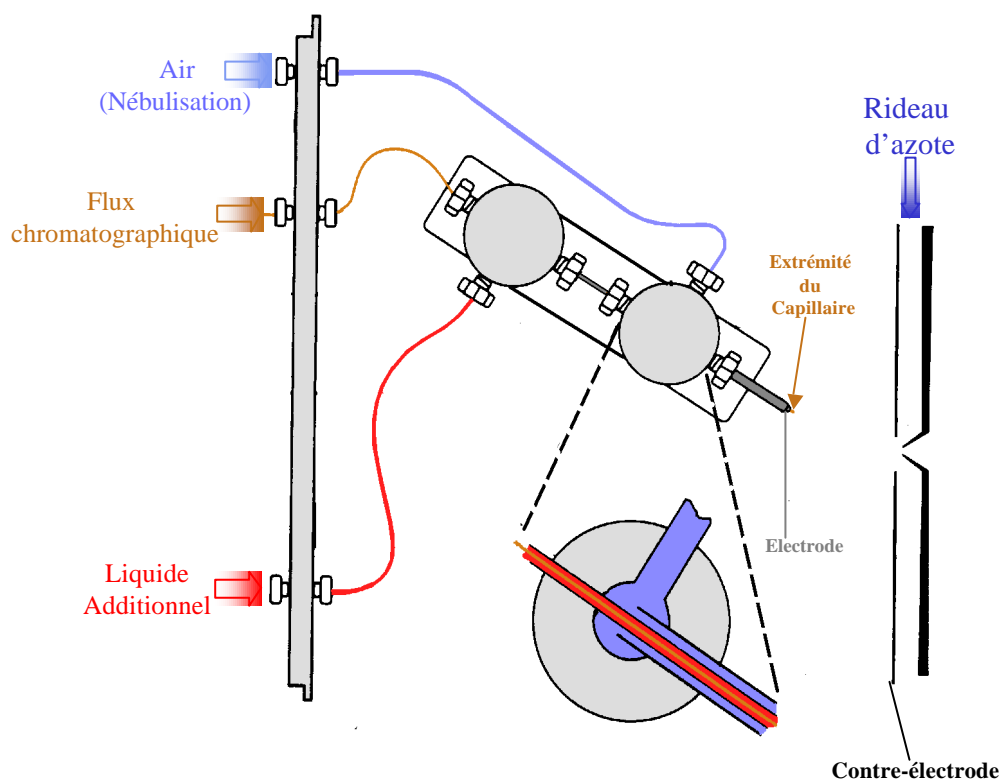


Figure IV -22: Introduction d'un liquide additionnel coaxial dans la source IonSpray. Ce montage est connu sous le nom de "sheath flow" lorsqu'il est utilisé pour stabiliser le spray de l'électrophorèse capillaire [39]. Le liquide additionnel introduit à l'aide d'une pompe seringue (2,5 à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$) passe entre le capillaire de silice fondue et l'électrode. L'électrode est elle-même située au centre du tube de nébulisation par lequel est acheminé le gaz de nébulisation..

La figure IV-23 montre l'influence de la nature de l'alcool sur l'intensité du signal. La stabilisation du spray et l'augmentation du signal est plus efficace avec l'isopropanol et le propanol.

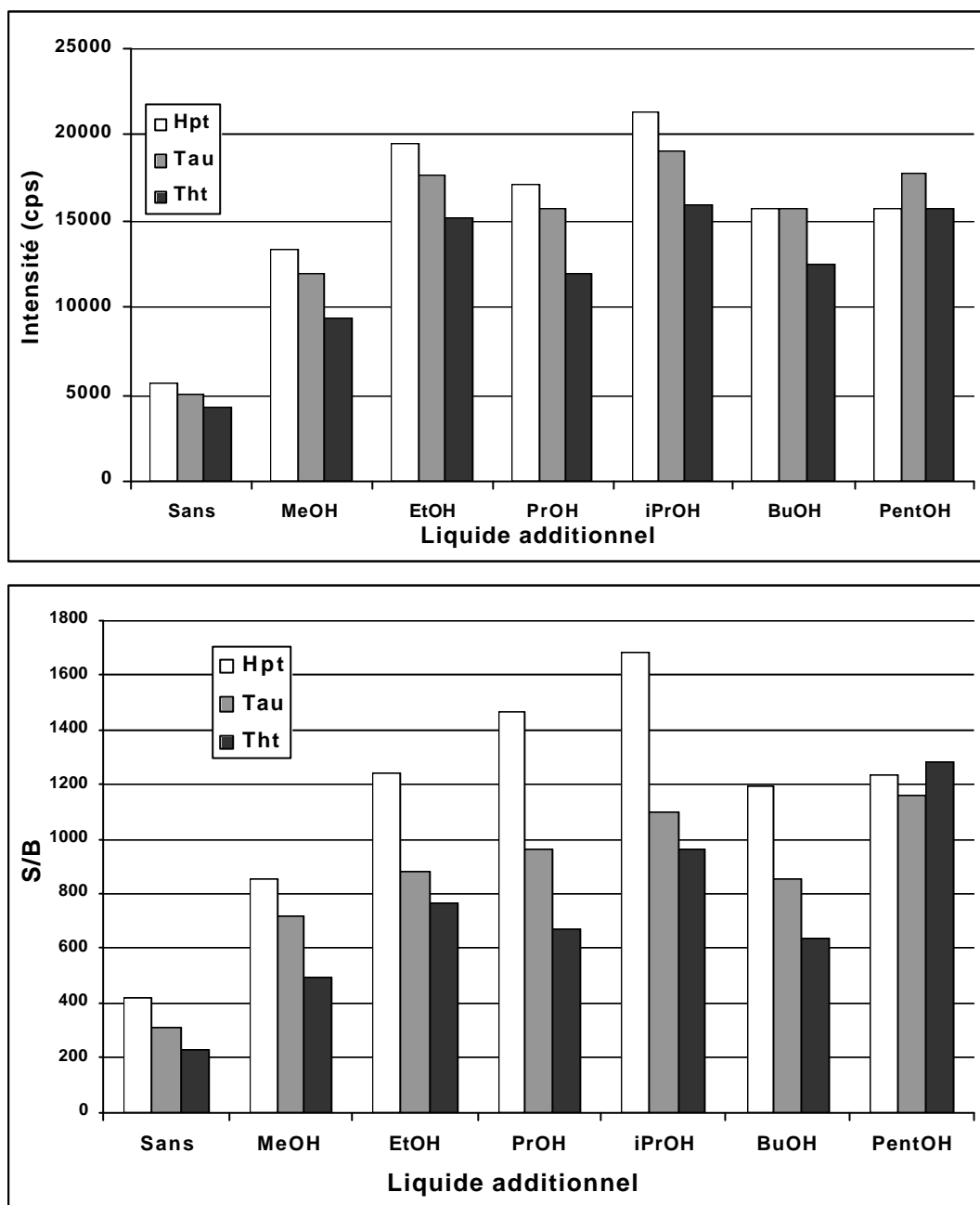


Figure IV-23: Influence de la nature de l'alcool comme liquide additionnel sur l'intensité et le rapport S/B des 3 acides aminés soufrés d'intérêt lors de leur analyse CPL-SM tandem sur PGC. Conditions chromatographiques analogues à celles de la figure IV-16. Concentration de chaque acide aminé: 10mg/l. MeOH : méthanol, EtOH: éthanol, ProOH: n-propanol, iPrOH: isopropanol, BuOH: n-butanol, PentOH, Pentanol. Débit du liquide additionnel: 10µl/min. Débit de la phase mobile nébulisée: 20 µl/min.

La figure IV-24 montre l'influence du débit du liquide additionnel sur le rapport S/B. Un débit de 5 µl/min sera conservé pour l'isopropanol comme liquide additionnel.

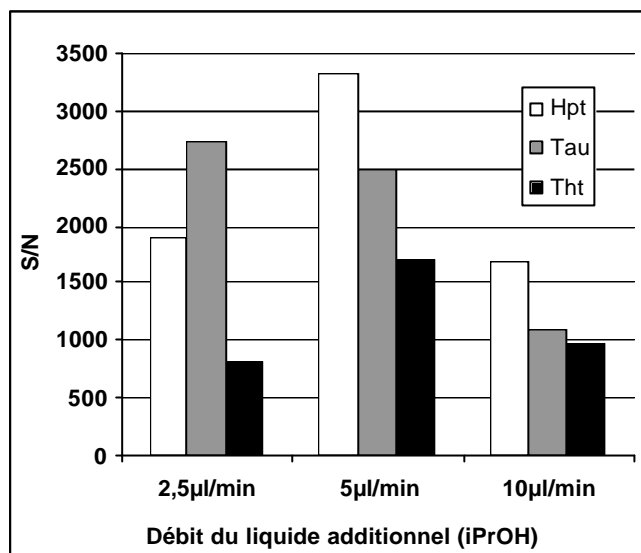


Figure IV-24: Influence du débit du liquide additionnel (iPrOH) sur le rapport S/B des 3 acides aminés soufrés d'intérêt lors de l'analyse CPL-SM tandem sur PGC. Conditions chromato-graphiques analogues à la figure IV-16. Concentrations injectées de chaque acide aminé: 10 mg/l.

Grâce à ce montage, il est possible de gagner environ un facteur 5 en sensibilité et d'abaisser les limites de détection à des concentrations injectées de l'ordre de 10 µg/l, c'est à dire environ 0,01 µmol/l.

4-3) analyse CPL-SM tandem d'acides aminés soufrés dans une matrice

La figure IV-25 montre l'analyse CPL-SM tandem du même extrait de branchies de *Calyptogena* présentée en CPL-SM à la figure IV-16.

L'utilisation des deux filtres de masse (Q1/Q3) rend la détection beaucoup plus spécifique car on caractérise alors les 3 composés avec 3 critères: leur masse moléculaire (ion $[M-H]^-$ filtré en Q1), un fragment spécifique (filtré en Q3) et leur temps de rétention sur le système chromatographique.

Les chromatogrammes d'ions extraits confirment la présence de taurine (concentration déterminée à 56 µmol/l soit 11 µmol/g de matière sèche), de thiotaurine (concentration déterminée à 81 µmol/l soit 16 µmol/g de matière sèche) en quantité importante ainsi que l'absence d'hypotaurine dans cet échantillon.

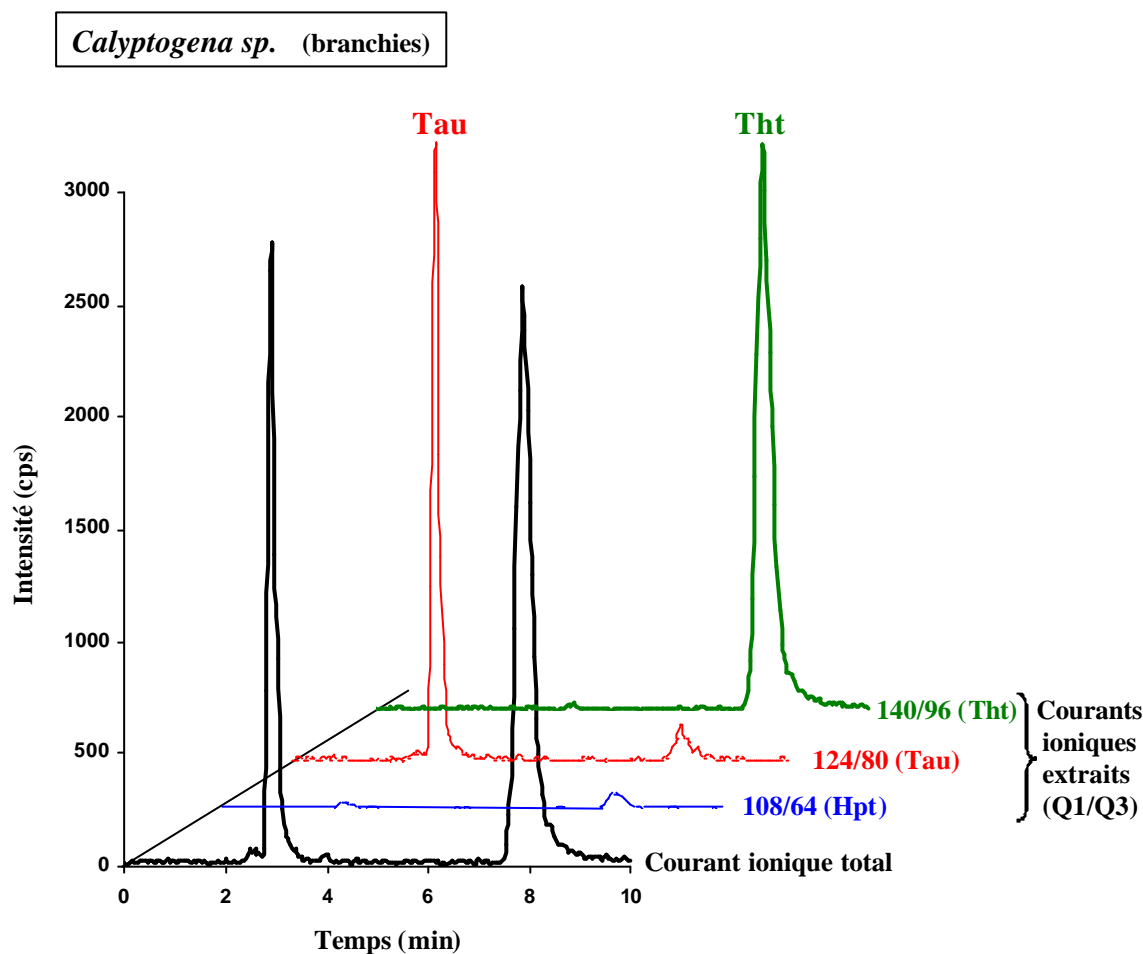


Figure IV-25: Analyse CPL-SM tandem sur PGC d'un extrait de branchies de *Calyptogena sp.* de la Barbade. Conditions chromatographiques identiques à celles de la figure IV-16.

4-4) Dosages d'acides aminés sulfurés dans quelques espèces d'invertébrés

Les dosages d'hypotaurine, de taurine et de thiotaurine ont été effectués chez quelques invertébrés. Compte tenu des quantités importantes, les matrices ont du être diluées par 10 systématiquement avant l'injection et filtrées.

Le tracé des courbes d'étalonnage conduit à une linéarité correcte. Les coefficients de corrélation des droites sont supérieurs à 0,995 dans le cas d'un étalonnage externe et supérieurs à 0,999 dans le cas d'un étalonnage interne avec le 2-AEHS.

Le tableau IV-10 montre quelques résultats de dosages chez des invertébrés marins vivant à proximité de dorsales océaniques.

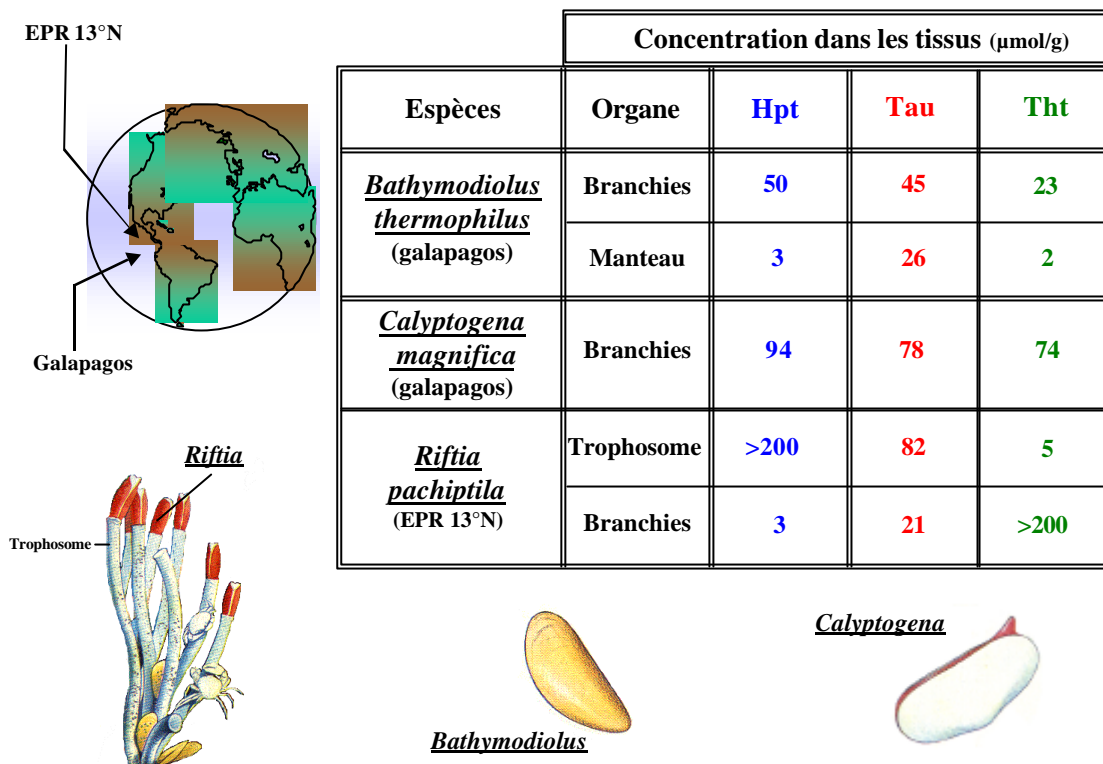


Tableau IV -10: Dosages de l'hyptaurine, de la taurine et de la thiotaurine chez quelques invertébrés marins vivant à proximité des dorsales océaniques (les résultats sont exprimés en $\mu\text{mol/g}$ de matière sèche).

Sans présumer du rôle effectif de la taurine, de l'hyptaurine et de la thiotaurine dans le métabolisme de ces invertébrés, nous confirmons qu'ils peuvent être dans des concentrations très différentes d'un organisme à l'autre et même d'un organe à l'autre chez une même espèce.

C] CONCLUSION

Que ce soit avec des phases mobiles aqueuses salines ou avec des phase mobiles contenant des acides carboxyliques perfluorés jouant le rôle d'agent d'appariement d'ions, les systèmes CPL mis au point avec le DEDL comme détecteur et avec le PGC comme phase stationnaire se sont révélés directement compatibles avec une détection par spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse, grâce à une plus grande spécificité de détection permet une réduction considérable du temps d'analyse ainsi qu'un gain de sensibilité de détection par rapport au DEDL. La détection par spectrométrie de masse tandem permet surtout de caractériser les acides aminés protéiques et/ou leurs analogues au sein de milieux très complexes.

Notre deuxième objectif est donc atteint.

Ce travail de pionnier montre de réelles possibilités dans le domaine de l'analyse des acides aminés non dérivés et il pourra se poursuivre dans de nombreuses directions comme:

- l'amélioration des limites de détection pour atteindre des sensibilités voisines de celles observées avec une détection par fluorescence après dérivation.
- l'application dans de nombreux domaines comme l'agro-alimentaire, la médecine humaine et vétérinaire, les cosmétiques... Ceci passe par la validation (linéarité, robustesse, répétabilité...) des méthodes utilisant les acides carboxyliques comme agents d'appariement d'ions.
- la recherche de nouveaux systèmes séparatifs permettant une analyse CPL-SM encore plus rapide ou permettant l'introduction supplémentaire d'acides aminés naturels non protéiques (ornithine, citruline, hydroxyproline, acide γ -amino butyrique...).

Références bibliographiques

- [1] K. Bieman, J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 3192.
- [2] M. Eckersley, J. H. Bowie, R. N. Hayes, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 93 (1989) 199.
- [3] H. U. Winkler, H. D. Beckey, *Org. Mass Spectrom.* 6 (1962) 655.
- [4] S. Bouchonnet, J. P. Denhez, Y. Hoppilliard, C. Mauriac, *Anal. Chem.* 64 (1992) 743.
- [5] L. K. Liu, K. L. Busch, R. G. Cooks, *Anal. Chem.* 53 (1981) 109.
- [6] W. Kulik, W. Heerma, *Biomed. Mass Spectrom.* 15 (1988) 419.
- [7] N. N. Dookeran, T. Yalcin, A. G. Harrison, *J. Mass Spectrom.* 31 (1996) 500.
- [8] C. D. Parker, D. M. Hercules, *Anal. Chem.* 58 (1986) 25.
- [9] H. Kambara, *Anal. Chem.* 54 (1982) 143.
- [10] M. B. Goshe, V. E. Anderson, *Anal. Biochem.* 231 (1995) 387.
- [11] B. A. Mansoori, D. A. Volmer, R. K. Boyd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1120.
- [12] K. Hiraoka, K. Murata, I. Kudaka, *J. Mass. Spectrom. Soc. Jpn.* 43 (1995) 127.
- [13] N. Lundell, B. H. Forngren, Communication affichée, 15th Montreux Symposium on LC/MS, 11-13 novembre 1998, Montreux, Suisse.
- [14] T. R. Covey, A. P. Bruins, J. D. Henion, *Org. Mass. Spectrom.* 23 (1988) 178.
- [15] K. W. M. Siu, R. Guevremont, J. C. Y. Leblanc, G. J. Gardner, S. S. Berman, *J. Chromatogr. A.* 554 (1991) 27.
- [16] J. R. Chapman, "Practical Organic Mass Spectrometry", 2nd edition, Wiley, Chichester, 1993.
- [17] U.A. Mirza, B.T. Chait, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2898.
- [18] R. G. J Van Leukken, G. T. C. Kwakkenbos, A. L. L. Duchateau, *J. Chromatogr.* 647 (1993) 131.
- [19] P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A.* 855 (1999) 191.

- [20] A. Stolyhwo, H. Colin, M. Martin, G. Guiochon, *J. Chromatogr.* 288 (1984) 253.
- [21] D. Fekkes, *J. Chromatogr. B*, 682 (1996) 3.
- [22] L. Laubier, D. Desbruyères, *La Recherche* 161 (1984) 1506.
- [23] J. Childress, H. Felbeck, G. Somero, *pour la Science* juillet 1987, 57.
- [24] H. W. Janasch, M. J. Mottl, *Science*, 229 (1985) 717.
- [25] P. Alberic, *C.R. Acad. Sc. Paris* 13 (1986) 503.
- [26] L. L. Hirschberger, J. De La Rosa, M. H. Stipanuk, *J. Chromatogr.* 343 (1985) 303.
- [27] T. J. Amiss, K. L. Tyczkowska, D. P. Aucoin, *J. Chromatogr.* 526 (1990) 375.
- [28] T. Sakai, T. Nagasawa, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 576 (1992) 515..
- [29] V. Stocchi, F. Palma, G. Piccoli, B. Biagiarelli, L. Cucchiaraini, M. Magnani, *J. Liq. Chromatogr.* 17 (1994) 347.
- [30] C. J. Waterfield, *J. Chromatogr. B* 657 (1994) 37.
- [31] I. M. P. L. V. O. Feireira, M. V. Nunes, E. Mendes, R. Remiao, M. A. Ferreira, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 17 (1994) 347.
- [32] T. Togawa, A. Oshawa, K. Kawanabe, S. Tanabe, *J. Chromatogr. B* 704 (1997) 83.
- [33] F. Qu, Z-H Qi, K-N. Liu, S-F. Mou, *J. Chromatogr. B*, 730 (1999) 161.
- [34] S. J. Lillard, D. T. Chiu, R. H. Scheller, R. N. Zare, S. E. Rodriguez-Cruz, R. Williams, O. Orwar, M. Sandberg., J. A. Lundqvist, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3517.
- [35] P. Alberic, J. Boulègue, *Prog. Oceanog.* 24 (1990) 89.
- [36] V. Pranal, A. Fiala-Medioni, J-C. Colominnes, *Marine Ecology Progress Series* 119 (1995) 155.
- [37] A. M. Pruski, A. Fiala-Medioni, J-C. Colominnes, *C. R. Acad. Sc. Paris* 320 (1997) 791.
- [38] A. P. Bruins, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 345.
- [39] J. Cai, J. Henion, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 667.

CONCLUSION GENERALE

La SM va devenir un détecteur incontournable pour la CPL dans les années à venir. Même si des progrès dans l'interfaçage permettent l'emploi de sels non volatils, il reste que les méthodologies de séparation utilisant des phases mobiles volatiles sont plus intéressantes pour un couplage avec la SM.

La mise au point de ces méthodes dans le cas de solutés n'ayant pas de chromophores est alors difficile à envisager puisque mobilisant des appareillages très coûteux et de ce fait en nombre restreint, pour des applications particulières. Le DEDL, détecteur universel pour des solutés peu volatils, ou du moins plus faible que la phase mobile qui les véhicule lors de leur séparation par CPL ou CPS est très simple d'emploi et d'un coût très réduit. Ses contraintes d'évaporation de la phase mobile en font un détecteur idéal pour la mise au point de méthodologie directement compatible avec la détection par SM.

La SM (simple ou en tandem) apporte outre la masse moléculaire du composé détecté, une sélectivité, doublée d'une sensibilité de détection en générale supérieure au DEDL. La sélectivité de détection permet ainsi des dosages de mélanges de molécules sans séparation préalable dès lors que les rapports m/z des ions observés pour chaque composé diffèrent. Si certains composés ont une masse moléculaire identique, ou si la fragmentation de certains conduit à la formation d'ions de rapports m/z correspondant à des ions d'autres espèces, l'analyse nécessite une séparation préalable à la détection par SM ou SM tandem.

Nous avons démontré l'intérêt de la spectrométrie de masse lors du premier chapitre consacré à sa présentation et illustré par des analyses de mélange de tensioactifs non ioniques (alcools polyéthoxylés et esters de polyglycérols). Dans bien des cas, l'analyse de mélanges complexes par spectrométrie de masse peut alors se passer totalement d'un système séparatif et les analyses sont très rapides. La spectrométrie de masse utilisant l'ionisation à pression atmosphérique (électronébulisation ou ionisation chimique) est la plus couramment utilisée car l'étape d'ionisation est alors extrêmement peu dénaturante vis à vis des composés à analyser. Cependant, la sensibilité de détection dépend d'un nombre très important de paramètres qu'il convient de connaître pour les maîtriser (nature des solutés, débits et nature

des phases mobiles, débits des gaz de nébulisation et gaz rideau, tensions des lentilles permettant le transfert des ions de la source au spectromètre...). La spectrométrie de masse tandem met en jeu plusieurs filtres de masse en série (quadripôles en ce qui nous concerne) permettant un gain de sensibilité et de spécificité de détection qui a été mis à profit par la suite dans l'analyse d'acides aminés non dérivés dans des milieux complexes.

Nous avons fait le point sur les 20 acides aminés protéiques et leur méthodes d'analyse avec et sans dérivation. Il n'existe que très peu de publications concernant l'analyse des acides aminés non dérivés et aucune n'apporte la solution idéale pour leur détermination. Il nous est apparu que la spectrométrie de masse seule ne pourrait permettre leur analyse en mélange et qu'une méthode séparative devrait être mise en œuvre en amont. L'analyse par CPL a été retenue.

Compte tenu du certain parallélisme qu'il existe entre le DEDL et la SM, nous avons choisi de mettre au point cette méthode d'analyse par CPL-DEDL avant de la transposer et de l'adapter à la CPL-SM. L'analyse par CPL-DEDL permet d'avoir une analyse bon marché et facile à mettre en œuvre mais longue car la séparation des 20 acides aminés est requise. En revanche, la SM est un détecteur cher mais grâce à une détection plus spécifique permet une analyse beaucoup plus courte.

Le choix de la phase stationnaire s'est effectué après avoir expérimenté plusieurs voies (échange d'ions, appariement d'ions sur phase stationnaire hydrophobe). Nous avons finalement retenu le carbone graphitique poreux pour ses propriétés particulièrement hydrophobes et ses interactions particulières vis à vis des composés ioniques.

Le système mis au point par CPL-DEDL sur carbone graphitique poreux a mis en œuvre deux systèmes différents. Le premier consiste à employer des phases mobiles salines volatiles et le second des phases mobiles utilisées en chromatographie à polarité de phases inversée (acétonitrile-eau) additionnées d'agent d'appariement d'ions volatils pour permettre la rétention des acides aminés les plus hydrophiles.

Le premier système reste limité à cause de faibles sélectivités et efficacités vis à vis des acides aminés les plus hydrophiles et un rééquilibrage très lent lorsqu'on veut simultanément analyser les acides aminés dont le résidu est hydrophobe. Cependant, une analyse rapide utilisant une phase mobile eau-acétate d'ammonium a permis l'analyse d'un mélange d'acides aminés soufrés impossible à réaliser avec des supports classiques (échange d'ions, appariement d'ions sur silice greffée C8, C18).

Le deuxième système atteint l'objectif que nous nous étions fixé puisqu'il permet l'analyse en 40 minutes des 20 acides aminés sans aucune coélution – seul la résolution entre la lysine et la leucine est un peu faible – ce qui, d'après notre étude bibliographique n'avait jamais été réalisé. Le système d'élution est constitué d'une solution aqueuse contenant un agent d'appariement d'ions volatil – l'acide nonafluoropentanoïque et un accroissement graduel d'un pourcentage d'acétonitrile. La phase stationnaire doit être maintenue à une température de 10°C pour permettre cette analyse.

Une analyse à température ambiante permet une élution plus rapide des acides aminés mais ne permet pas la séparation du couple asparagine-cystéine. La spectrométrie de masse doit alors être envisagée pour résoudre cette coélution.

La dernière partie de ce mémoire a été à l'analyse par CPL-SM et CPL-SM tandem des acides aminés. La source utilisée est naturellement l'IonSpray. La transposition des systèmes mis au point par CPL-DEDL est immédiat.

Dans le cadre de l'analyse des acides aminés protéique par appariement d'ions, L'analyse a lieu en mode positif. Grâce à la spécificité de détection de la SM, le temps d'analyse a pu être réduit de moitié (20 minutes). Un certain nombre d'acides aminés coéluent mais sont résolus par SM. L'analyse CPL-SM tandem permet d'aboutir à des limites de détection comparables aux analyses CPL-UV utilisant une dérivation précolonne (concentrations détectées de 1 à 10 $\mu\text{mol/l}$) et limite les interférences avec les matrices d'origine biologique.

En ce qui concerne l'analyse des acides aminés soufrés par CPL-SM tandem avec un milieu aqueux salin basique, l'ionisation est en mode négatif. L'ajout d'un liquide additionnel organique coaxial – l'isopropanol - permet améliorer la détection en stabilisant le spray et la désolvatation des ions. Les limites de détection sont meilleures qu'avec les systèmes CPL-UV utilisant la dérivation pré-colonne (concentrations détectées d'environ 10 nmol/l).

Nous pouvons donc affirmer maintenant qu'avec les nouveaux systèmes mis au point par CPL-DEDL et CPL SM, nous nous dirigeons vers la fin des lourdes méthodes utilisant la dérivation pré- ou post-colonne pour l'analyses des acides aminés. La spectrométrie de masse a montré là encore sa supériorité sur les autres détecteurs qu'elle remplace de plus en plus avantageusement.

ANNEXES

ANNEXE I: Liste des pK des acides aminés protéiques

Acides aminés	pK_(a-COOH)	pK_(a-NH₂)	pK [Résidu]
Ala	2,34	9,69	x
Arg	1,82	8,99	12,48
Asn	2,02	8,80	x
Asp	1,88	9,60	3,65
Cys	1,92	10,46	8,35
Gln	2,17	9,13	x
Glu	2,19	9,67	4,25
Gly	2,35	9,78	x
His	1,82	9,17	6,00
Ile	2,36	9,69	x
Leu	2,36	9,60	x
Lys	2,16	9,18	10,69
Met	2,28	9,21	x
Phe	2,16	9,18	x
Pro	1,95	10,64	x
Ser	2,19	9,21	x
Thr	2,09	9,10	x
Trp	2,43	9,44	x
Tyr	2,20	9,11	10,13
Val	2,32	9,62	x

D'après: R. Rosset, M. Caude, A. Jardy, "Chromatographies en phases liquide et supercritique", 3^e édition, ch. 12, Masson, Paris, 1991, pp 397-399.

ANNEXE II: Charge apparente des acides aminés en fonction du pH

(page 1/2).

pH	Asp	Glu	Asn	Gln	Lys	His	Arg	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Tyr	Trp
1,5	0,60	0,83	0,77	0,82	1,82	1,68	1,68	0,74	0,83	0,80	0,62	0,88	0,88	0,87	0,88	0,88	0,88	0,82	0,83	0,89
1,6	0,54	0,79	0,72	0,79	1,78	1,62	1,62	0,69	0,80	0,76	0,56	0,85	0,85	0,85	0,84	0,85	0,85	0,78	0,80	0,87
1,7	0,48	0,75	0,68	0,75	1,74	1,57	1,57	0,64	0,76	0,71	0,51	0,82	0,82	0,81	0,81	0,82	0,82	0,74	0,76	0,84
1,8	0,42	0,71	0,62	0,70	1,70	1,51	1,51	0,59	0,71	0,66	0,45	0,78	0,78	0,78	0,77	0,78	0,78	0,70	0,72	0,81
1,9	0,36	0,66	0,57	0,65	1,65	1,45	1,45	0,53	0,66	0,61	0,39	0,74	0,74	0,73	0,72	0,74	0,74	0,65	0,67	0,77
2,0	0,30	0,60	0,51	0,60	1,59	1,40	1,40	0,47	0,61	0,55	0,34	0,69	0,69	0,69	0,68	0,70	0,70	0,59	0,61	0,73
2,1	0,25	0,55	0,45	0,54	1,53	1,34	1,34	0,41	0,55	0,49	0,29	0,64	0,64	0,63	0,62	0,65	0,65	0,53	0,56	0,68
2,2	0,20	0,49	0,40	0,48	1,48	1,29	1,29	0,36	0,49	0,44	0,24	0,59	0,59	0,58	0,57	0,59	0,59	0,48	0,50	0,63
2,3	0,15	0,43	0,34	0,43	1,42	1,25	1,25	0,31	0,44	0,38	0,20	0,53	0,53	0,52	0,51	0,53	0,53	0,42	0,44	0,57
2,4	0,11	0,37	0,29	0,37	1,37	1,21	1,21	0,26	0,38	0,33	0,17	0,47	0,47	0,47	0,45	0,48	0,48	0,37	0,39	0,52
2,5	0,07	0,31	0,25	0,32	1,31	1,17	1,17	0,22	0,33	0,28	0,14	0,41	0,41	0,41	0,40	0,42	0,42	0,31	0,33	0,46
2,6	0,03	0,26	0,21	0,27	1,27	1,14	1,14	0,18	0,28	0,24	0,11	0,36	0,36	0,35	0,34	0,37	0,37	0,27	0,28	0,40
2,7	-0,01	0,21	0,17	0,23	1,22	1,12	1,12	0,15	0,24	0,20	0,09	0,31	0,31	0,30	0,29	0,31	0,31	0,22	0,24	0,35
2,8	-0,05	0,16	0,14	0,19	1,19	1,09	1,09	0,12	0,20	0,16	0,08	0,26	0,26	0,26	0,25	0,27	0,27	0,19	0,20	0,30
2,9	-0,09	0,12	0,12	0,16	1,15	1,08	1,08	0,10	0,16	0,13	0,06	0,22	0,22	0,22	0,21	0,22	0,22	0,15	0,17	0,25
3,0	-0,14	0,08	0,09	0,13	1,13	1,06	1,06	0,08	0,13	0,11	0,05	0,18	0,18	0,18	0,17	0,19	0,19	0,13	0,14	0,21
3,1	-0,18	0,04	0,08	0,11	1,10	1,05	1,05	0,07	0,11	0,09	0,04	0,15	0,15	0,15	0,14	0,15	0,15	0,10	0,11	0,18
3,2	-0,23	0,01	0,06	0,09	1,08	1,04	1,04	0,05	0,09	0,07	0,03	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,13	0,08	0,09	0,15
3,3	-0,29	-0,03	0,05	0,07	1,07	1,03	1,03	0,04	0,07	0,06	0,03	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,10	0,07	0,07	0,12
3,4	-0,34	-0,07	0,04	0,06	1,05	1,02	1,03	0,03	0,06	0,05	0,02	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,05	0,06	0,10
3,5	-0,40	-0,11	0,03	0,04	1,04	1,02	1,02	0,03	0,05	0,04	0,02	0,07	0,07	0,06	0,06	0,07	0,07	0,04	0,05	0,08
3,6	-0,46	-0,15	0,03	0,04	1,04	1,01	1,02	0,02	0,04	0,03	0,01	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,06
3,7	-0,52	-0,19	0,02	0,03	1,03	1,01	1,01	0,02	0,03	0,02	0,01	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,05
3,8	-0,58	-0,24	0,02	0,02	1,02	1,00	1,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,02	0,02	0,04
3,9	-0,64	-0,29	0,01	0,02	1,02	1,00	1,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03
4,0	-0,69	-0,35	0,01	0,01	1,01	1,00	1,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,03
4,1	-0,74	-0,40	0,01	0,01	1,01	0,99	1,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02
4,2	-0,78	-0,46	0,01	0,01	1,01	0,99	1,00	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
4,3	-0,82	-0,52	0,01	0,01	1,01	0,98	1,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4,4	-0,85	-0,58	0,00	0,01	1,01	0,98	1,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4,5	-0,88	-0,64	0,00	0,00	1,00	0,97	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
4,6	-0,90	-0,69	0,00	0,00	1,00	0,96	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,00	0,01
4,7	-0,92	-0,74	0,00	0,00	1,00	0,95	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
4,8	-0,93	-0,78	0,00	0,00	1,00	0,94	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4,9	-0,95	-0,82	0,00	0,00	1,00	0,93	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,0	-0,96	-0,85	0,00	0,00	1,00	0,91	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,1	-0,97	-0,88	0,00	0,00	1,00	0,89	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,2	-0,97	-0,90	0,00	0,00	1,00	0,86	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,3	-0,98	-0,92	0,00	0,00	1,00	0,83	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,4	-0,98	-0,93	0,00	0,00	1,00	0,80	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,5	-0,99	-0,95	0,00	0,00	1,00	0,76	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,6	-0,99	-0,96	0,00	0,00	1,00	0,72	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,7	-0,99	-0,97	0,00	0,00	1,00	0,67	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,8	-0,99	-0,97	0,00	0,00	1,00	0,61	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5,9	-0,99	-0,98	0,00	0,00	1,00	0,56	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,0	-1,00	-0,98	0,00	0,00	1,00	0,50	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,1	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,44	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,2	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,39	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,3	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,4	-1,00	-0,99	0,00	0,00	1,00	0,28	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,5	-1,00	-1,00	0,00	0,00	1,00	0,24	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,6	-1,00	-1,00	-0,01	0,00	1,00	0,20	1,00	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,7	-1,00	-1,00	-0,01	0,00	1,00	0,16	0,99	0,00	0,00	0,00	-0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,8	-1,00	-1,00	-0,01	0,00	1,00	0,13	0,99	0,00	0,00	0,00	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
6,9	-1,00	-1,00	-0,01	-0,01	0,99	0,11	0,99	0,00	0,00	-0,01	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
7,0	-1,00	-1,00	-0,02	-0,01	0,99	0,08	0,99	0,00	-0,01	-0,01	-0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
7,1	-1,00	-1,00	-0,02	-0,01	0,99	0,07	0,99	0,00	-0,01	-0,01	-0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00
7,2	-1,00	-1,00	-0,02	-0,01	0,99	0,05	0,98	0,00	-0,01	-0,01	-0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01
7,3	-1,00	-1,00	-0,03	-0,01	0,99	0,03	0,98	0,00	-0,01	-0,02	-0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	-0,02	-0,01
7,4	-1,01	-1,00	-0,04	-0,02	0,98	0,02	0,97	0,00	-0,02	-0,02	-0,10	0,00	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,01
7,5	-1,01	-1,01	-0,05	-0,02	0,98	0,01	0,97	0,00	-0,02	-0,02	-0,12	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,02	-0,01
7,6	-1,01	-1,01	-0,06	-0,03	0,97	0,00	0,96	0,00	-0,02	-0,03	-0,15	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	-0,03	-0,03	-0,01
7,7	-1,01	-1,01	-0,07	-0,04	0,97	-0,01	0,95	0,00	-0,03	-0,0										

Annexe II (suite)

Page (2/2).

pH	Asp	Glu	Asn	Gln	Lys	His	Arg	Pro	Ser	Thr	Cys	Met	Gly	Ala	Val	Leu	Ile	Phe	Tyr	Trp
9,2	-1,28	-1,25	-0,72	-0,54	0,46	-0,52	0,38	-0,04	-0,49	-0,56	-0,90	-0,18	-0,21	-0,24	-0,28	-0,28	-0,24	-0,51	-0,64	-0,37
9,3	-1,33	-1,30	-0,76	-0,60	0,40	-0,57	0,33	-0,04	-0,55	-0,61	-0,93	-0,21	-0,25	-0,29	-0,32	-0,33	-0,29	-0,57	-0,72	-0,42
9,4	-1,39	-1,35	-0,80	-0,65	0,33	-0,63	0,28	-0,05	-0,61	-0,67	-0,96	-0,25	-0,29	-0,34	-0,38	-0,39	-0,34	-0,62	-0,81	-0,48
9,5	-1,44	-1,40	-0,83	-0,70	0,27	-0,68	0,24	-0,07	-0,66	-0,72	-0,98	-0,30	-0,34	-0,39	-0,43	-0,44	-0,39	-0,68	-0,89	-0,53
9,6	-1,50	-1,46	-0,86	-0,75	0,20	-0,73	0,20	-0,08	-0,71	-0,76	-1,01	-0,35	-0,40	-0,45	-0,49	-0,50	-0,45	-0,72	-0,98	-0,59
9,7	-1,56	-1,52	-0,89	-0,79	0,14	-0,77	0,16	-0,10	-0,76	-0,80	-1,03	-0,40	-0,45	-0,51	-0,55	-0,56	-0,51	-0,77	-1,07	-0,65
9,8	-1,61	-1,57	-0,91	-0,82	0,08	-0,81	0,13	-0,13	-0,80	-0,83	-1,06	-0,46	-0,51	-0,56	-0,60	-0,61	-0,56	-0,81	-1,16	-0,70
9,9	-1,67	-1,63	-0,93	-0,85	0,02	-0,84	0,11	-0,15	-0,83	-0,86	-1,09	-0,52	-0,57	-0,62	-0,66	-0,67	-0,62	-0,84	-1,24	-0,74
10,0	-1,72	-1,68	-0,94	-0,88	-0,04	-0,87	0,09	-0,19	-0,86	-0,89	-1,12	-0,57	-0,62	-0,67	-0,71	-0,72	-0,67	-0,87	-1,33	-0,78
10,1	-1,76	-1,73	-0,95	-0,90	-0,10	-0,89	0,07	-0,22	-0,89	-0,91	-1,16	-0,63	-0,68	-0,72	-0,75	-0,76	-0,72	-0,89	-1,41	-0,82
10,2	-1,80	-1,77	-0,96	-0,92	-0,16	-0,91	0,05	-0,27	-0,91	-0,93	-1,19	-0,68	-0,72	-0,76	-0,79	-0,80	-0,76	-0,91	-1,48	-0,85
10,3	-1,83	-1,81	-0,97	-0,94	-0,22	-0,93	0,04	-0,31	-0,92	-0,94	-1,24	-0,73	-0,77	-0,80	-0,83	-0,83	-0,80	-0,93	-1,56	-0,88
10,4	-1,86	-1,84	-0,98	-0,95	-0,29	-0,94	0,03	-0,37	-0,94	-0,95	-1,29	-0,77	-0,81	-0,84	-0,86	-0,86	-0,84	-0,94	-1,62	-0,90
10,5	-1,89	-1,87	-0,98	-0,96	-0,35	-0,96	0,02	-0,42	-0,95	-0,96	-1,34	-0,81	-0,84	-0,87	-0,88	-0,89	-0,87	-0,95	-1,68	-0,92
10,6	-1,91	-1,89	-0,98	-0,97	-0,42	-0,96	0,01	-0,48	-0,96	-0,97	-1,39	-0,84	-0,87	-0,89	-0,91	-0,91	-0,89	-0,96	-1,73	-0,94
10,7	-1,93	-1,91	-0,99	-0,97	-0,48	-0,97	0,00	-0,53	-0,97	-0,98	-1,45	-0,87	-0,89	-0,91	-0,92	-0,93	-0,91	-0,97	-1,78	-0,95
10,8	-1,94	-1,93	-0,99	-0,98	-0,55	-0,98	-0,01	-0,59	-0,97	-0,98	-1,51	-0,89	-0,91	-0,93	-0,94	-0,94	-0,93	-0,98	-1,82	-0,96
10,9	-1,95	-1,94	-0,99	-0,98	-0,61	-0,98	-0,01	-0,65	-0,98	-0,98	-1,57	-0,91	-0,93	-0,94	-0,95	-0,95	-0,94	-0,98	-1,85	-0,97
11,0	-1,96	-1,96	-0,99	-0,99	-0,66	-0,99	-0,02	-0,70	-0,98	-0,99	-1,62	-0,93	-0,94	-0,95	-0,96	-0,96	-0,95	-0,99	-1,88	-0,97
11,1	-1,97	-1,96	-1,00	-0,99	-0,71	-0,99	-0,03	-0,74	-0,99	-0,99	-1,68	-0,94	-0,95	-0,96	-0,97	-0,97	-0,96	-0,99	-1,90	-0,98
11,2	-1,98	-1,97	-1,00	-0,99	-0,76	-0,99	-0,04	-0,78	-0,99	-0,99	-1,72	-0,96	-0,96	-0,97	-0,97	-0,98	-0,97	-0,99	-1,92	-0,98
11,3	-1,98	-1,98	-1,00	-0,99	-0,80	-0,99	-0,06	-0,82	-0,99	-0,99	-1,77	-0,96	-0,97	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,99	-1,94	-0,99
11,4	-1,98	-1,98	-1,00	-0,99	-0,84	-0,99	-0,07	-0,85	-0,99	-1,00	-1,81	-0,97	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,98	-0,99	-1,95	-0,99
11,5	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,86	-1,00	-0,09	-0,88	-0,99	-1,00	-1,84	-0,98	-0,98	-0,98	-0,99	-0,99	-0,98	-1,00	-1,96	-0,99
11,6	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,89	-1,00	-0,11	-0,90	-1,00	-1,00	-1,87	-0,98	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-1,97	-0,99
11,7	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,91	-1,00	-0,14	-0,92	-1,00	-1,00	-1,89	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-1,97	-0,99
11,8	-1,99	-1,99	-1,00	-1,00	-0,93	-1,00	-0,17	-0,94	-1,00	-1,00	-1,91	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-1,98	-1,00
11,9	-2,00	-1,99	-1,00	-1,00	-0,94	-1,00	-0,21	-0,95	-1,00	-1,00	-1,93	-0,99	-0,99	-0,99	-0,99	-1,00	-0,99	-1,00	-1,98	-1,00
12,0	-2,00	-2,00	-1,00	-1,00	-0,95	-1,00	-0,25	-0,96	-1,00	-1,00	-1,94	-0,99	-0,99	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,00	-1,99	-1,00

- Calculs effectués à partir des équations présentées au chapitre II et des pK consignés en annexe I
- Les valeurs encadrées correspondent aux pI (à 0,1 unité de pH près) des différents acides aminés.

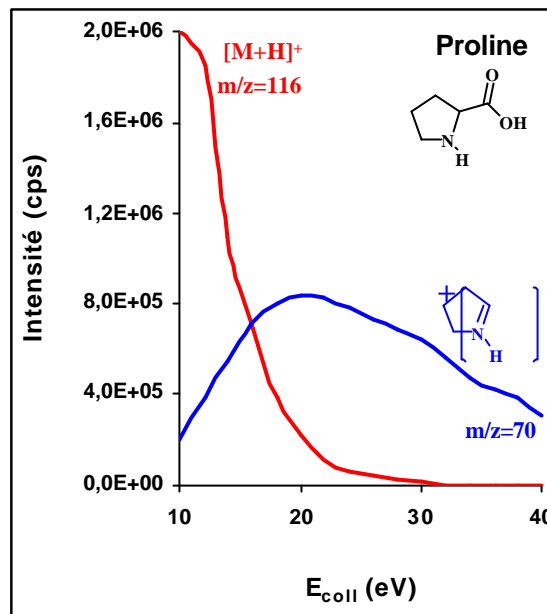
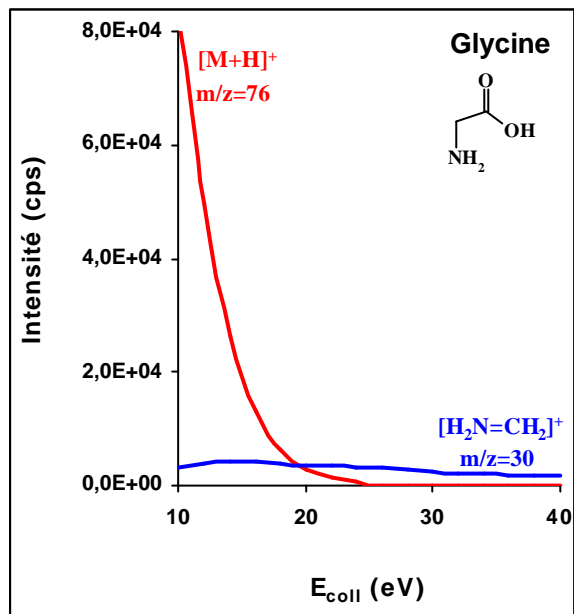
ANNEXE III: Liste des ions observés en SM tandem pour des spectres réalisés à basse énergie de collision¹

Ac. aminés	Ions observés ² (m/z)				
	[M+H] ⁺	[M+H-H ₂ O] ⁺	[M+H-NH ₃] ⁺	Immonium(s) ³	Autre(s)
Ala	90			44	
Arg	175		(158)	(130)	(116), (112), 70, (60)
Asn	133		(116)	87, 74	
Asp	134	116		88, 74	(65), (46), (43)
Cys	122		105	(87)	100, 76,59
Gln	147		130	84 ⁴	(56)
Glu	148	130		84 ⁴	(56), (41)
Gly	76			(30)	
His	156			110	(93), (83), (56)
Ile	132			86	(69), (57), (44), (41), (30)
Leu	132			86	(63), (55), (44), (43), (30)
Lys	147		130	84 ⁴	(56)
Met	150		133	105, (74)	(102), (87), (61), (56)
Phe	166		(149)	120	103, 79
Pro	116			70	
Ser	106	(88)		60	(42)
Thr	120	102		(84), 74	56
Trp	205		188	(159)	146, (132), (118)
Tyr	182		165	136	(147), (123), (119), (95), (91)
Val	118			72	(57), (55)

1. Etude réalisée avec des énergies de collision variant de 10 à 50 eV.
2. Les ions entre parenthèses indique une très faible intensité.
3. L'immonium correspond à ⁺H₂N=CH-COOH (m/z=74) ou.à la conservation du résidu: ⁺H₂N=CH-R.
4. Immonium ayant subi une perte d'eau ou d'ammoniac préalable.

ANNEXE IV: Exemples de fragmentation d'acides aminés en fonction de l'énergie de collision (spectre basse énergie).

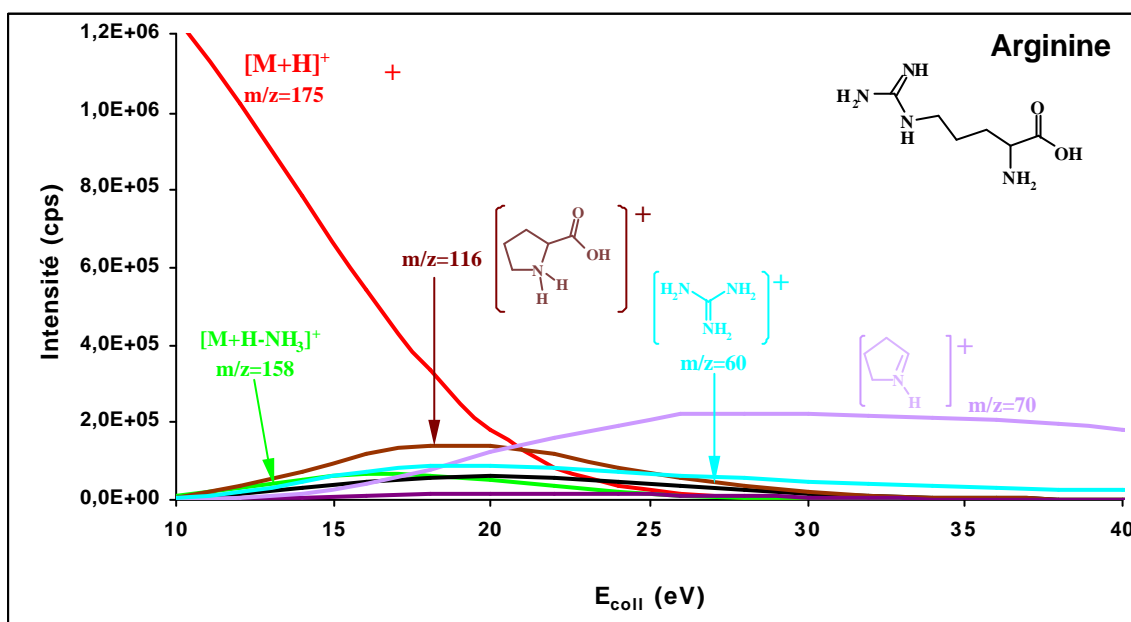
Exemples 1 et 2: un seul ion fragment observé:



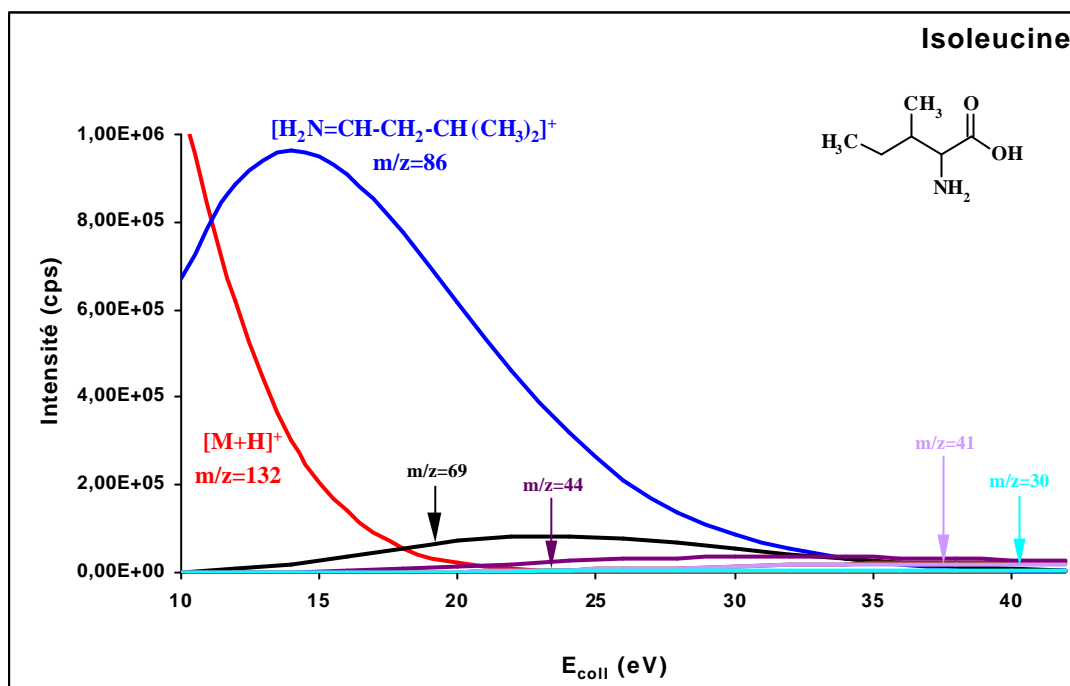
1: fragment de faible intensité: Gly.

2: fragment d'intensité correcte: Ala, Pro.

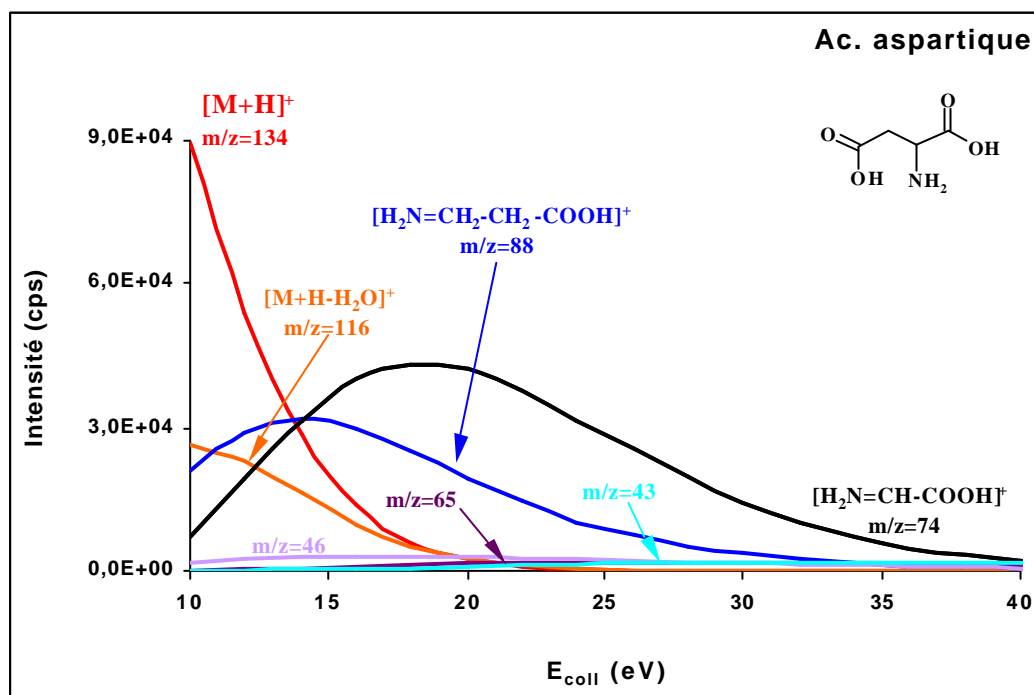
Exemple 3: plusieurs fragments mais de faible intensité (Arg):



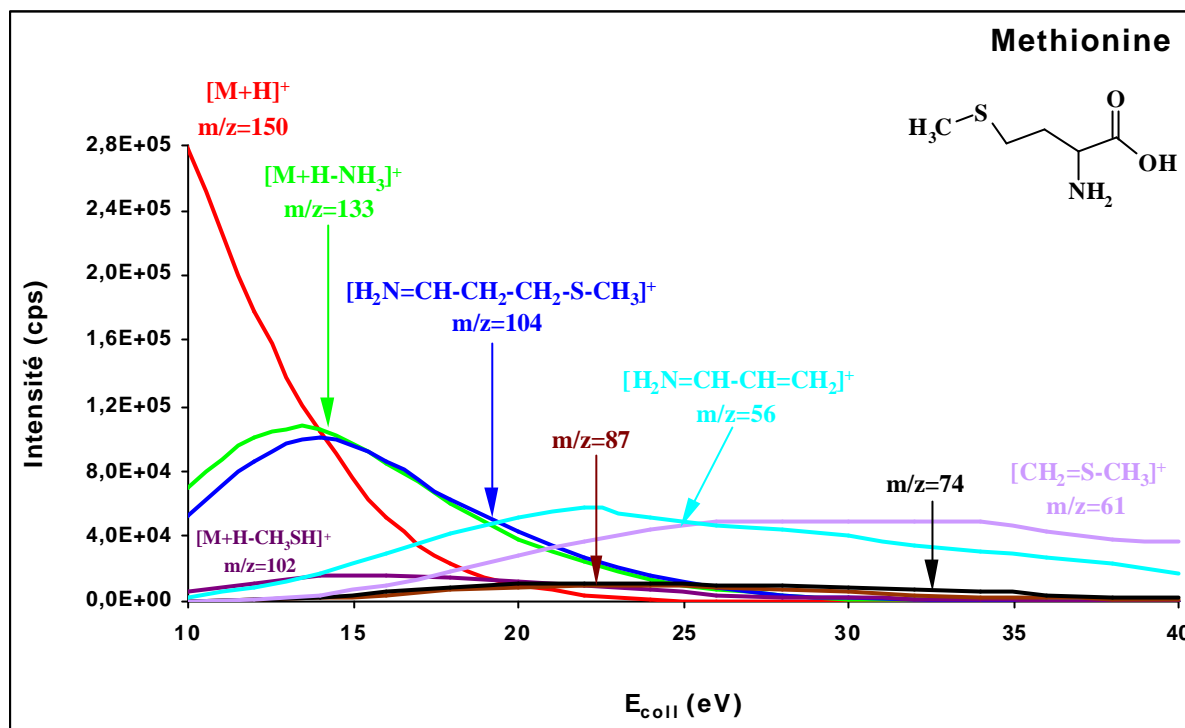
Exemple 4: Plusieurs fragments mais un seul fragment majoritaire (Val, Leu, Ile, Ser, His) :



Exemples 5 et 6: plusieurs fragments majoritaires:



5: de 3 à 4 fragments majoritaires dont le maximum d'intensité se situe à des valeurs d'énergie de collisions distinctes (Asn, Asp, Gln, Glu, Phe, Lys, Trp)



6: le maximum d'intensité des fragments majoritaires se situe à des valeurs d'énergie de collisions proches (Cys, Met, Thr, Tyr)

Conditions: Source IonSpray (+5 kV), Infusions à 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ des acides aminés (60 mg/l) solubilisés dans un mélange acétonitrile-eau (60/40 v/v) contenant du TFA (1,7 mM). Orifice 20V, Anneau : 200V. L'énergie de collision a été incrémentée tous les 2 eV.

Interprétations des fragments d'après:

- S. Bouchonnet, J-P Denhez,, Y. Hoppilliard, C. Mauriac, Anal. Chem. 64 (1992) 743.
- N. N. Dookeran, Y. Yalcin, A. G. Harrison, J. Mass Spectrom. 31 (1996) 500.

ANNEXE V: références des publications issues de ces travaux

- [1] Comparison of the Retention Behavior of Polyethoxylated Alcohols on Porous Graphitic Carbon and Polar as well as Apolar bonded-silica phases.
P. Chaimbault, C. Elfakir, M. Lafosse, *J. Chromatogr. A*, 797 (1998) 83-91.
- [2] Determination of Inorganic Anions on Porous Graphitic Carbon using Evaporative Light Scattering Detection. Use of Carboxylic Acids as Electronic Competitors.
C. Elfakir, **P. Chaimbault**, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, 829 (1998) 193-199.
- [3] Ion-Pair Reversed-Phase Liquid Chromatography (IP-RPLC) for the Determination of Polar Underivatized Amino Acids using Perfluorinated Carboxylic Acids as Ion Pairing Agent.
K. N. Petritis, **P. Chaimbault**, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, 833 (1998) 147-155.
- [4] HPLC Control of an Alkylglycoside Synthesis.
P. Chaimbault, C. Elfakir, F. Blanchard, I. Marc, M. Lafosse, *J. High Resol. Chromatogr.*, 22 vol 3 (1999) 188-190.
- [5] Direct Analysis of Industrial Oligoglycerols by Liquid Chromatography with Evaporative Light-Scattering Detection and Mass Spectrometry.
P. Chaimbault, S. Cassel, S. Claude, C. Debaig, T. Benvegno, D. Plusquellec, P. Rollin, M. Lafosse, *Chromatographia*, 50 (1999) 239-242.
- [6] Determination of 20 Underivatized Proteic Amino Acids by Ion-Pairing Chromatography and Pneumatically Assisted Electrospray Mass Spectrometry.
P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, 855 (1999) 191-202.
- [7] Ion-Pair Chromatography on a Porous Graphitic Carbon stationary phase for the Analysis of twenty Underivatized Protein Amino Acids.
P. Chaimbault, K. Petritis, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, 870 (2000) 245-254.
- [8] Underivatized Amino Acid Analysis by Liquid Chromatography-Pneumatically Assisted Electrospray tandem Mass Spectrometry.
K. Petritis, **P. Chaimbault**, C. Elfakir, M. Dreux, *J. Chromatogr. A*, sous presse.

ANNEXE VI: Appareillage et réactifs

A] REACTIFS:**1) Tensioactifs:**

Les alcools polyéthoxylés (CnOEm) et le polyéthylène glycol 400 proviennent de la société Fluka (Buchs, Suisse). Le Triton X-100 a été acheté chez Sigma (St Louis, USA) et le BC-10TX provient de Nikko Chemicals (Tokyo, Japon). Le decyl-lactoside a été synthétisé par l'équipe de I. Marc (Laboratoire des sciences du génie chimique, CNRS UPR 6811 PRABIL, Vandoeuvre-lès-Nancy, France). Les polyglycérols et esters de polyglycérols ont été synthétisés par les équipes du professeur Rollin (ICOA, Orléans, France) et du professeur Plusquellec (ENSCR, CNRS ESA 6052, Rennes, France).

2) Tensioactifs perfluorés:

L'acide trifluoroacétique (TFA) et l'acide tridécafluoroheptanoïque (TDFHA) provient de Interchim (Montluçon, France), l'acide heptafluorobutyrique (HFBA), nonafluoropentanoïque (NFPA) et pentadécafluorooctanoïque (PDFOA) de Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

3) Acides aminés:

les acides aminés protéiques, la taurine (Tau), Hypotaurine (Hpt), 2-aminoethyl-hydrogenosulfate (2-AEHS) et 2-aminoethyl-thiosulfate (2-AETS) proviennent de chez Sigma (St Louis, USA). La thiotaurine (Tht) n'est pas commerciale et a été synthétisée à partir d'hypotaurine par P. Albéric (Laboratoire de Géologie de la Matière Organique, CNRS URM 6531, Université d'Orléans, France).

4) Solvants:

Le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN), le tétrahydrofurane (THF) ont été achetés chez J.T. Baker (Noisy-le-sec, France). L'acétate d'éthyl provient de chez Carlo Erba (Milan, Italie), le dichlorométhane de chez BDH (Poole, GB), l'éthanol (EtOH), isopropanol (iPrOH), propanol (n-PrOH), butanol (BuOH), pentanol (PentOH) de Prolabo (Paris, France). L'eau déionisée provient d'une station Elgastat UHQ II (Elga, Antony, France).

B] APPAREILLAGE:

1) Colonnes:

La colonne Hypercarb 5 μ m (100 x 2,1 mm DI) provient de Hypersil (Runcorn, GB).

La colonne Zorbax ODS (150 x 4,6 mm DI) provient de Hypersil (Runcorn, GB).

La colonne Astec-NH₂ (250 x 2,1 mm DI) provient de Advanced Separation technology, Whippany, GB).

La colonne Purospher RP-18e (125 x 4 mm DI) provient de Merck (Darmstadt, Allemagne, GB).

La colonne Supelcosil ABZ+Plus (150 x 4,6 mm DI) provient de Supelco (Bellefonte, USA).

2) Analyses CPL-DEDL:

Exceptées les analyses présentées en figure I-27, II-9, II-12, III-16, réalisées avec une pompe binaire Beckman (Fullerton, CA, USA) modèle 128 system Gold et figure III-2, réalisée avec une pompe isocratique Gilson modèle 302 (Villier-le-Bel, France), l'ensemble des analyses CPL-DEDL a été effectué avec une pompe ternaire Varian 9010 (Palo Alto, CA, USA).

Les solutés sont injectés au moyen d'une vanne Rhéodyne (Cotati, CA, USA) muni d'une boucle à volume fixe (volumes précisés en légende des différentes figures).

Le Détecteur Évaporatif à Diffusion de la Lumière est un modèle Sedex 55 commercialisé par SEDERE (Vitry s/Seine, France) réglé de manière suivante (sauf autre précision):

Gaz de nébulisation (azote) : 2,2 bars.

Température du tube d'évaporation : 55°C

Photomultiplicateur : 10.

3) Analyses CPL-SM:

Les infusions d'échantillons sont réalisées avec une pompe seringue Harvard modèle 22.

L'ensemble des analyses CPL-SM a été effectué avec une pompe binaire Perkin Elmer (Forster City, CA, USA) modèle LC-200. Les injections sont réalisées par un injecteur automatique Perkin Elmer series 200 muni d'une boucle à volume fixe (volumes précisés en légende des différentes figures).

Le spectromètre de masse triple quadripôle utilisé est un modèle API300, PE Sciex (Toronto, Canada) muni de la source IonSprayTM ou du nébuliseur chauffé (APCI). Les réglages sont précisés en légende des figures.

4) Autres appareils:

Le pHmètre utilisé pour vérifier la préparation des solutions est un modèle Φ 10 commercialisé par Beckman (Gagny, France).

Le suivi de l'équilibrage des colonnes par conducométrie a été réalisée avec un conductomètre Vydac (Wescan Instrument, Santa Clara, CA, USA) modèle 6000 CD.

Résumé : Les acides aminés forment une des plus importantes classes de molécules naturelles. Ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques dont le plus important est sans doute l'élaboration des peptides et protéines. Ils sont pour la plupart dépourvus de groupements chromophores, aussi, la majorité des méthodes chromatographiques proposées pour leur détermination en mélanges implique une dérivation pré- ou post colonne permettant alors une détection spectrophotométrique.

Pour éviter l'étape de dérivation, la Chromatographie en Phase Liquide (CPL) est ici associée au Détecteur Évaporatif à Diffusion de la Lumière (DEDL) ou couplée à la Spectrométrie de Masse (SM). Ces deux modes de détection sont quasi universels mais requièrent la mise au point de phases mobiles volatiles.

Parmi les systèmes CPL testés pour l'analyse directe des acides aminés, le carbone graphitique poreux a été retenu et évalué comme phase stationnaire. Une phase mobile aqueuse saline, volatile, composée d'acétate d'ammonium, ajustée à pH=9,3, permet notamment la séparation d'acides aminés soufrés analogues de la taurine et la séparation partielle d'acides aminés protéiques. En revanche, la séparation totale des 20 acides aminés protéiques est obtenue avec une phase mobile contenant un acide carboxylique perfluoré (acide nonafluoropentanoïque) comme agent d'appariement d'ions volatil, en gradient d'élution, à 10°C, en une quarantaine de minutes.

Les systèmes CPL mis au point avec le DEDL sont directement compatibles avec la SM. En utilisant la spécificité de détection de la SM et la SM tandem, l'analyse des acides aminés protéiques est possible en 20 minutes. Si le DEDL ne permet pas de descendre à des concentrations détectées inférieures au mg/l, la SM tandem autorise des limites de détection avoisinant quelques dizaines de µg/l seulement. La CPL-SM tandem a permis le dosage direct d'acides aminés soufrés dans des invertébrés marins.

Underivatized Amino Acids Analysis by Liquid Chromatography using Evaporative Light Scattering Detection and Mass Spectrometry

Abstract : Amino acids represent one of the most important classes of natural compounds. They take in many biological processes the most important of which is the formation of peptides and proteins. Since most of them are lacking in a chromophore group, the majority of the chromatographic methods proposed for their determination in mixtures involves pre- or post-column derivatization allowing a spectrophotometric detection.

In order to avoid the derivatization step, Liquid Chromatography (LC) was coupled with an Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) or coupled with Mass Spectrometry (MS). Both detection modes are practically universal but require the development of volatile mobile phases.

Among all the LC systems tried, porous graphitic carbon was chosen and evaluated as stationary phase for underivatized amino acid analysis. Separation of sulfur amino acids (taurine analogous) and partial separations of proteinic amino acids have been obtained using an aqueous volatile mobile phase containing ammonium acetate adjusted to pH=9.3. A complete separation of the 20 underivatized proteinic amino acids was achieved using a mobile phase containing a perfluorinated carboxylic acid (nonafluoropentanoic acid) as volatile ion pairing agent, in a gradient elution mode, at 10°C, in approximately 40 minutes.

LC systems that have been developed with an ELSD are directly transposable with MS. With the higher specificity of MS or MS tandem detection, the analysis of the 20 underivatized proteinic amino acids is achieved in 20 minutes. While ELSD does not permit detection limits below the mg/l level, MS tandem allows the detection of only about ten µg/l. Thus, direct quantitation of sulfur amino acids in some sea invertebrates have been allowed using LC-MS tandem.

Discipline : Chimie et physicochimie des Composés d'Intérêt Biologique.

Mots clés: Chromatographie Liquide, Acides Aminés, Spectrométrie de masse, Détecteur Évaporatif à Diffusion de la Lumière, Couplage, Carbone Graphitique Poreux, Tensioactifs.

Institut de Chimie Organique et Analytique (ICOA), CNRS UPRES-A 6005, UFR Sciences, Université d'Orléans, BP 6759, F-45067 Orléans Cedex2.